

# Cambios en el apoplasto asociados a la senescencia foliar

**TESIS DOCTORAL**

**Lic. María Lucía Borniego**

**Directores: Dra. Dana Martínez**

**y Dr. Juan José Guiamet**

**2018**





El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Naturales fue realizado en el Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE-CONICET), de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Dana Martínez y el Dr. Juan José Guiamet.



## **Mi reconocimiento,**

- A la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata, por posibilitarme realizar el doctorado dentro del ámbito de la Institución.
- Al Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), por brindarme los recursos necesarios para llevar a cabo mi trabajo de tesis.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por la beca otorgada.

## **Mi agradecimiento,**

- A mis directores: Dana y Juan José por brindarme la posibilidad de hacer este proyecto, por el conocimiento que me transmitieron y el apoyo recibido durante estos cinco años en los que trabajamos juntos. Gracias Dana por confiar en mí y estar siempre presente y dispuesta cuando necesité de tus consejos y de tu ayuda.
- A todos los integrantes del INFIVE porque con su aporte y buena onda hicieron posible que esta haya sido una hermosa y valiosa experiencia. Disfruté mucho de estos años que compartimos, me llevo los mejores recuerdos de ustedes.
- A Cacho Sáenz (el profe) por contagiarme su entusiasmo por la investigación.
- A mi hermosa familia que siempre estuvo y estará presente brindándome su amor incondicional. A Belu, mi otra mitad, por su aguante y paciencia, y por sus excelentes consejos. Gracias Belu, sin vos nada sería igual.



## INDICE

ABREVIATURAS:.....	11
UNIDADES:.....	11
RESUMEN .....	13
ABSTRACT .....	15
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>17</b>
1. Senescencia foliar.....	19
1.1. Degradación de proteínas cloroplásticas y proteasas asociadas a la senescencia.....	21
1.2. Regulación de la senescencia foliar natural.....	22
1.3. Señalización. Receptores de membrana asociados a la senescencia .....	23
2. El espacio extracelular o apoplasto .....	24
2.1. Las paredes celulares .....	25
2.2. Espacio intercelular .....	27
2.3. Dinámica del espacio apoplástico. El Fluido Apoplástico (FA) .....	28
OBJETIVO GENERAL.....	35
HIPÓTESIS GENERAL .....	35
<b>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
1. Material vegetal y condiciones de cultivo.....	39
2. Inducción de la senescencia foliar .....	39
3. Parámetros fisiológicos.....	40
3.1. Cuantificación de clorofila foliar.....	40
3.2. Medición del rendimiento cuántico máximo del Fotosistema II (Fv/Fm) .....	40
3.3. Potencial hídrico .....	40
3.4. Curvas de presión-volumen (curvas PV) y estimación del volumen de FA de hojas .....	44
4. Obtención y análisis de fluido apoplástico (FA) de hojas .....	46
4.1. Extracción de fluido de lavado apoplástico (FLA) .....	46
4.2. Estimación del volumen de fluido apoplástico ( $V_{FA}$ ) y de aire apoplástico ( $V_{aire}$ ) de hojas. Técnica del Índigo Carmín .....	48
4.3. Aclaraciones sobre el muestreo de los FLA analizados.....	49
4.4. Determinación de contaminación simplástica en el Fluido de Lavado Apoplástico (FLA) .....	50
5. Obtención, cuantificación y análisis de proteínas y péptidos.....	51
5.1. Extracción de proteínas de extractos foliares .....	51
5.2. Cuantificación de proteínas y péptidos .....	51
5.3. Cuantificación de proteínas en calles de geles de SDS-PAGE por densitometría .....	53
5.4. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).....	54
5.5. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida .....	55

5.6.	Inmunodetección de proteínas .....	56
6.	Análisis proteómico masivo ( <i>shotgun</i> ) por espectrometría de masas de muestras de FLA .....	57
6.1.	Preparación de las muestras .....	57
6.2.	Análisis de proteínas por Orbitrap .....	58
6.3.	Análisis de datos .....	59
7.	Identificación por Orbitrap de proteínas separadas por SDS-PAGE .....	60
7.1.	Preparación de las muestras y análisis por Orbitrap .....	60
8.	Extracción y cuantificación de Aminoácidos totales .....	61
8.1.	Obtención de a.a. totales de hojas .....	61
8.2.	Obtención de a.a. del FA .....	62
8.3.	Cuantificación de a.a. ....	62
9.	Determinación del pH apoplástico foliar .....	62
9.1.	Material vegetal utilizado .....	62
9.2.	Determinación del pH del apoplasto de hojas <i>in vivo</i> por microscopia de fluorescencia .....	63
10.	Aislamiento de polisacáridos de la pared celular .....	64
10.1.	Obtención de Residuos Insolubles en Alcohol (RIA) .....	64
10.2.	Estimación de la cantidad de pared celular .....	65
11.	Extracción y cuantificación de almidón .....	65
12.	Cuantificación de ácidos urónicos .....	66
12.1.	Cuantificación de ácidos urónicos del RIA .....	66
12.2.	Cuantificación de ácidos urónicos de los FLA .....	66
<b>CAPÍTULO 3: OBTENCIÓN DE FLUIDO APOPLÁSTICO (FA) FOLIAR. Características de la técnica de infiltración-centrifugación .....</b>		<b>69</b>
RESUMEN .....		71
INTRODUCCIÓN .....		73
1.	La técnica de <i>infiltración en vacío-centrifugación</i> para el fraccionamiento subcelular de FA .....	74
2.	La técnica de <i>Índigo Carmín</i> (IC) en combinación con la <i>infiltración -centrifugación</i> permite calcular el factor de dilución del FA ( $F_{dil}$ ), y estimar los volúmenes ocupados por aire y por FA .....	79
3.	Consideraciones sobre el material vegetal de partida y las condiciones de muestreo para la obtención de FLA .....	80
HIPÓTESIS .....		81
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....		81
RESULTADOS .....		83
1.	Puesta a punto de la extracción de fluido de lavado apoplástico (FLA) de hojas de Arabidopsis .....	83
2.	Puesta a punto de la técnica del <i>índigo Carmín</i> para estimar el factor de dilución del FA y los volúmenes de aire y de fluido apoplástico .....	87
3.	Estimación del volumen de FA a partir del método del IC y a partir de curvas de presión-volumen (curvas PV) .....	89
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....		93
1.	Puesta a punto de la extracción de fluido de lavado apoplástico (FLA) de hojas de Arabidopsis .....	93

2.	Puesta a punto del método del índigo Carmín para estimar el factor de dilución del FA ( $F_{dil\ FA}$ ) y el volumen de FA.	93
3.	Estimación del volumen de FA de hojas. Comparación entre los métodos IC y curvas P-V	94
<b>CAPÍTULO 4: CARACTERIZACIÓN DE LA SENESCENCIA FOLIAR Y SELECCIÓN DE ESTADIOS ONTOGÉNICOS PARA EL ESTUDIO DEL FLUIDO APOPLÁSTICO.</b>		<b>97</b>
RESUMEN		99
INTRODUCCION		101
1.	Capacidad fotosintética, niveles de clorofila, proteína, y variaciones de peso fresco como marcadores del grado de senescencia foliar en Arabidopsis	101
2.	Cambios en las organelas asociados a la senescencia foliar	101
HIPÓTESIS		103
OBJETIVO ESPECÍFICO		103
RESULTADOS		105
1.	Inicio y progreso de la senescencia foliar de Arabidopsis según variaciones en parámetros fotosintéticos y la edad de la planta	105
2.	Extracción de FA de hojas en los distintos estadios ontogénicos para estudiar cambios en el apoplasto asociados a la senescencia foliar	108
3.	Cambio en las relaciones hídricas al comienzo de la senescencia foliar de Arabidopsis. Contenido de agua y potencial hídrico de hojas S2 y S3.	109
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES		113
1.	Caracterización y selección de las hojas para la extracción de FA	113
2.	Cambio en las relaciones hídricas al comienzo de la senescencia foliar de Arabidopsis	114
3.	Discrepancias entre las medidas de potencial agua obtenidas con la bomba de Scholander y con el psicrómetro	115
<b>CAPÍTULO 5: CAMBIOS FISIOLÓGICOS EN EL APOPLASTO ASOCIADOS A LA SENESCENCIA FOLIAR.</b>		<b>117</b>
RESUMEN		119
INTRODUCCIÓN		121
1.	El apoplasto en la respuesta a estrés	121
2.	Cambios en el apoplasto de las hojas asociados a la ontogenia	124
HIPÓTESIS		127
OBJETIVO ESPECÍFICO		127
RESULTADOS		129
1.	Cambios en el volumen de aire y de fluido apoplastico durante la senescencia foliar (variaciones entre hojas S2 y S3)	129
2.	Estimación de la dilución de FA en muestras de FLA de hojas S2 y S3	129
3.	Análisis de la pared celular en hojas S2 y S3, y su relación con el volumen de FA	130
4.	Cambios en la concentración de solutos en el FA durante la senescencia	134
5.	Variación del pH en el fluido apoplástico entre hojas S2 y S3.	135
DISCUSIÓN		139
1.	Cambios en el volumen de aire y de fluido apoplástico (FA) de la hoja asociados a la senescencia	139

2.	Relación entre el volumen de FA y la cantidad de pared y pectinas.....	139
3.	Cambios en la concentración de solutos en el FA durante la senescencia .....	140
4.	Cambios en el pH apoplástico asociados a la senescencia.....	141
<b>CAPÍTULO 6: DINÁMICA DEL PROTEOMA EN EL FLUIDO APOPLÁSTICO DURANTE LA SENESCENCIA FOLIAR.....</b>		<b>143</b>
	RESUMEN.....	145
	INTRODUCCIÓN.....	147
1.	Proteínas apoplásticas asociadas a la senescencia.....	147
2.	Mecanismos de secreción de proteínas en las plantas.....	148
	HIPÓTESIS.....	153
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	153
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	155
1.	Perfiles de proteínas foliares y del FA en hojas senescentes (S3) y no senescentes (S2) .....	155
2.	Características del proteoma del FA asociado a la senescencia foliar .....	159
	CONCLUSIONES.....	175
	TABLA 6.2. Proteínas identificadas .....	177
<b>CAPÍTULO 7: EL APOPLASTO Y LA REMOVILIZACIÓN DE NITRÓGENO DURANTE LA SENESCENCIA.....</b>		<b>197</b>
	RESUMEN.....	199
	INTRODUCCIÓN.....	201
1.	Incorporación y asimilación del nitrógeno en la planta.....	201
2.	Reciclado y removilización de N durante la senescencia .....	202
	HIPÓTESIS.....	211
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	211
	DISEÑO EXPERIMENTAL .....	213
1.	Senescencia foliar natural e inducción de la senescencia foliar en plantas salvajes S2 y en plantas donde la autofagia se encuentra bloqueada.....	213
2.	Contenido de proteínas, péptidos y aminoácidos .....	214
3.	Análisis estadístico.....	215
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	217
1.	Niveles estables de péptidos y proteínas foliares durante la senescencia natural e inducida por oscuridad en plantas de genotipo salvaje .....	217
2.	Niveles estables de aminoácidos y su partición entre el interior celular y el apoplasto durante la senescencia foliar natural e inducida por oscuridad en plantas salvajes. ....	222
3.	Partición del contenido intracelular y apoplástico de proteínas, péptidos y aminoácidos en plantas mutantes para autofagia .....	224
	CONCLUSIONES .....	229
<b>CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....</b>		<b>231</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>		<b>241</b>

## ABREVIATURAS:

**a.a.:** aminoácidos.

**ABA:** ácido abscísico.

**AJ:** ácido jasmónico.

**AS:** ácido salicílico.

**ATPasa:** Adenosín-trifosfatasa.

**BCA:** *bicinchoninic acid*.

**C:** carbono.

**EROs:** especies reactivas del oxígeno.

**FA:** fluido apoplástico.

**FBP:** fructosa-1,6-bisfosfatasa.

**FLA:** fluido de lavado apoplástico.

**g:** aceleración de la gravedad

**GFP:** *Green fluorescent protein*.

**HR:** *hypersensitive response*.

**LSU:** Subunidad grande de Rubisco (del inglés: *Large Subunit*).

**MCP:** muerte celular programada.

**MP:** membrana plasmática.

**N:** nitrógeno.

**P:** fósforo.

**PF:** peso fresco.

**Pi:** fósforo inorgánico.

**PS:** péptido señal.

**RFP:** *red fluorescent protein*.

**ROI:** región de interés (del inglés: *region of interest*).

**Rubisco:** Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa.

**SAG:** genes asociados a la senescencia (del inglés: *Senescence Associated Genes*).

**SAR:** *Systemic acquired resistance*.

**SD:** desvío estándar (del inglés: *standard deviation*).

**SDS-PAGE:** electroforesis en gel desnaturizante.

**SEM:** error estándar de la media (del inglés: *standard error of the mean*).

**SPAD:** colorímetro que permite estimar el contenido de clorofila en las hojas.

**SSU:** subunidad pequeña de Rubisco (del inglés: *Small Subunit*).

**T°:** temperatura

**TGN:** Red trans Golgi (del inglés: *trans-Golgi network*).

**V<sub>aire</sub>:** volumen de aire apoplástico.

**V<sub>FA</sub>:** volumen de fluido apoplástico.

**WT:** *wild-type*.

## UNIDADES:

**μl:** microlitros.

**μmol:** micromoles

**g:** gramos.

**kDa:** kilo-Dalton.

**Kg:** kilogramos.

**M:** molar.

**mg:** miligramos.

**min:** minutos.

**ml:** mililitros.

**mM:** milimolar.

**mmol:** milimoles.

**MPa:** megapascal.

**ng:** nanogramos

**nm:** nanómetros.

**p/v:** peso/volumen.

**v/v:** volumen/volumen.

**μg:** microgramos.

**μm:** micrómetros.

**μM:** micromolar.



## RESUMEN

La senescencia constituye la etapa final del desarrollo ontogénico de las hojas, que se caracteriza por el desmantelamiento altamente organizado de componentes celulares, y la degradación masiva de sus macromoléculas (proteínas, ARN, ADN, lípidos).

Este síndrome tiene un impacto positivo para la planta, dado que posibilita la exportación de nutrientes, principalmente N, de las hojas senescentes y su re-utilización en otros órganos. A nivel celular, los cloroplastos albergan la mayor parte de las proteínas foliares, y su desensamblado es central y diagnóstico del progreso de la senescencia. Es por esto que la mayor parte de los estudios en el tema se han enfocado en los cloroplastos, y los eventos extraplasmidiales que acompañan estos cambios son menos conocidos. Menos aún se conoce qué ocurre fuera de la membrana plasmática en las células senescentes. El apoplasto representa un compartimiento “extracelular”, externo, limitado por la membrana plasmática, que incluye las paredes celulares, los espacios intercelulares y el fluido apoplástico (FA). La composición (iones, macromoléculas, etc) de este espacio varía en forma dinámica contribuyendo al desarrollo de la planta y la adaptación a las condiciones ambientales. En el apoplasto tiene lugar la percepción y las primeras respuestas a varios estreses, que han sido estudiadas y caracterizadas en detalle tanto para estreses bióticos y abióticos. Dado que el apoplasto es escenario de procesos fisiológicos como la absorción y el transporte de azúcares y aminoácidos, la comunicación intercelular, la señalización sistémica, etc, es altamente probable que en este compartimiento tengan lugar cambios funcionales vinculados con la senescencia. En este trabajo se examinaron cambios en parámetros fisiológicos del apoplasto como compartimiento, y variaciones en la composición del fluido apoplástico a lo largo de la senescencia en *Arabidopsis thaliana*, a fin de profundizar el conocimiento sobre la dinámica de este espacio, y su papel en la degradación y removilización de nitrógeno durante la senescencia.

En el capítulo 3 se describen las técnicas utilizadas para la obtención y análisis de fluido apoplástico foliar (FA). Este capítulo se enfoca en la optimización de las técnicas de *infiltración-centrifugación* para la extracción de FA de hojas senescentes de *Arabidopsis*, y del *Índigo Carmín* para calcular el volumen original de FA y el factor de dilución del FA aislado, ambos parámetros necesarios para estimar la concentración fisiológica de los componentes del FA. Luego, en el capítulo 4 se caracteriza la senescencia foliar como etapa ontogénica y los FAs obtenidos de hojas senescentes y no senescentes. En este capítulo se describe la selección de hojas representativas de distintas etapas de desarrollo para realizar un análisis sobre los cambios asociados a la senescencia en el fluido apoplástico foliar. En el capítulo 5 se presentan cambios fisiológicos en el compartimiento extracelular asociados a la senescencia, y en el

capítulo 6 se analizan variaciones en las proteínas y proteoma del fluido apoplástico. En el capítulo 7 se muestran resultados de experimentos manipulativos de la senescencia foliar, y las respuestas a nivel de variaciones en el contenido estable de aminoácidos, péptidos y proteínas. Se analizó el rol del apoplasto en la degradación de proteínas foliares y la removilización de nitrógeno durante la senescencia, natural y acelerada por oscuridad y el papel de la autofagia en la exportación de aminoácidos al apoplasto.

## ABSTRACT

Senescence is a genetically controlled degradation process whereby cellular compounds are dismantled and the products of macromolecules (proteins, nucleic acids, lipids) breakdown are redistributed to other parts of the plant.

Leaf senescence represents the last stage of leaf development, that is critical for plants fitness, which depends on efficient nutrient (mainly nitrogen) relocation from senescing leaves to developing organs and immature seeds. Chloroplast breakdown is the hallmark of leaf senescence, and consequently this organelle has been the main focus for most of the studies on the regulation and execution of senescence. Extraplasmidial changes associated with leaf senescence are less understood, and even less is known about the processes taking place outside the plasma membrane of senescing cells. The apoplast is a highly dynamic compartment external to the plasma membrane that includes cell walls, intercellular spaces and apoplastic fluid (AF). AF is the fluid that moves freely within the intercellular spaces, and it is composed of secreted proteins, organic acids, sugars, amino acids, ions, and other molecules. The apoplast is the first compartment where perception and the first responses to several biotic and abiotic stresses take place, therefore the AF plays a critical role in the plant–environment interaction as it provides a means for intracellular and intercellular communication. While the role of the apoplast in stress responses has been well studied so far, little is known about the events that take place in this space during senescence. The apoplast might be an important compartment for many senescence-related events, including the orchestration of the highly organized execution of senescence, since important physiological processes, such as absorption and transport of amino acids and sugars, intercellular communication and systemic signaling take place there. This project aimed to shed light on the dynamics of the extracellular space during leaf development, and the role of this compartment in protein degradation and nitrogen remobilization during senescence. Changes in physiological parameters of the leaf apoplast, and variations in the AF composition associated to senescence in *Arabidopsis thaliana* are presented:

Chapter 3 describes the optimization of the *infiltration-centrifugation* and the *Indigo Carmin* techniques for the isolation and analysis of leaf apoplastic fluid (AF). Both techniques are useful for determining apoplastic air volume ( $V_{\text{air}}$ ) and apoplastic fluid volume ( $V_{\text{FA}}$ ), which are necessary to calculate metabolite concentrations in the leaf AF. Then, in chapter 4, based on the ability to extract AF free of cytosolic contamination, leaves from different developmental stages were selected to analyze senescence-associated changes in the AF. Chapter 5 and 6 show

senescence-associated changes in the extracellular environment and in the proteome of the apoplastic fluid, respectively. Chapter 7 examines the involvement of the leaf apoplast in nutrient recycling and remobilization during natural and dark induced leaf senescence, and the role of autophagy in the translocation of amino acids from the cell into the apoplast.

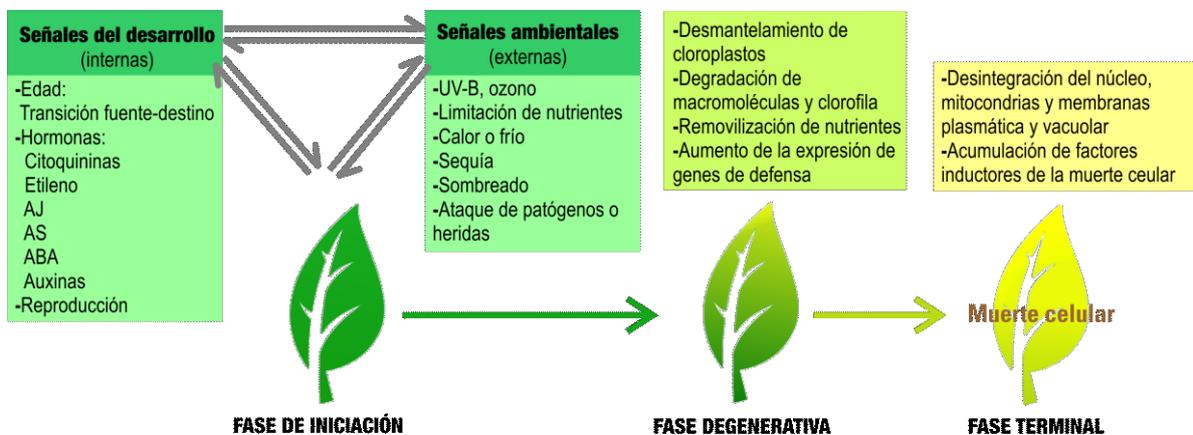
# **CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL**



## INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1. Senescencia foliar

Desde su inicio como primordio la hoja joven es un órgano destino de nutrientes y asimilados, luego, durante su expansión foliar tiene lugar la transición de órgano destino a órgano fuente de fotoasimilados, y después de un período relativamente variable la contribución fotosintética de la hoja disminuye, dando lugar al inicio de la senescencia. A través de la senescencia foliar la planta recupera nutrientes incorporados durante el crecimiento que, de otro modo, se perderían cuando la hoja muere (Himelblau y Amasino, 2001). Durante esta etapa las células de la hoja experimentan, bajo un programa genético, cambios altamente ordenados en su estructura y metabolismo celular, seguidos por la muerte de la hoja. En función de esto la senescencia foliar comprende tres etapas: (1) iniciación, (2) degradación de macromoléculas y removilización de productos de degradación, y (3) una etapa terminal, o muerte celular programada (MCP) (Figura 1.1) (Noodén *et al.*, 1997).



**Figura 1.1. Etapas de la senescencia foliar y sus características fisiológicas.** La senescencia es inducida por señales del desarrollo (internas) y/o ambientales (externas). Durante la senescencia se suceden, de manera paulatina y ordenada, una serie de cambios en la estructura celular, el metabolismo y la expresión génica que hacen posible la removilización de nutrientes, y finalmente conducen a la pérdida de la integridad celular y a la muerte celular.

Durante la etapa de iniciación se produce una reprogramación del metabolismo, disminuyen los procesos anabólicos y se potencia el catabolismo. Esta reprogramación es modulada por señales endógenas y ambientales, integradas a través de múltiples vías de señalización. Los

factores endógenos abarcan la edad, el equilibrio hormonal y metabólico, y procesos de desarrollo, como la transición a la fase reproductiva. Los factores ambientales más relevantes son limitantes hídricas y de nutrientes, temperaturas extremas, la infección por patógenos, y el sombreado (por otras plantas o autosombreado), entre otros (Lim *et al.*, 2007; Guo y Gan, 2012; Schippers, 2015). La senescencia de la hoja que se desencadena en plantas bajo condiciones óptimas de crecimiento se denomina usualmente “senescencia natural”.

La segunda etapa de la senescencia se evidencia por el “amarillamiento” foliar debido a la degradación de clorofila, aunque este es un signo usualmente tardío del dismantelamiento de los cloroplastos. Metabólicamente, la asimilación de carbono es reemplazada por el catabolismo de macromoléculas (i.e. proteínas, lípidos de membrana, ácidos nucleicos) y el aumento de expresión y actividad de numerosas hidrolasas (proteasas, nucleasas, lipasas, etc). El aumento de la actividad catabólica es responsable de convertir los componentes celulares acumulados durante la fase de crecimiento de la hoja en moléculas exportables, que proveen de nitrógeno, fósforo, carbono y minerales a semillas y otros órganos en crecimiento (Havé *et al.*, 2016). Finalmente, a medida que la etapa de degradación llega a su finalización, las células mueren (Noodén *et al.*, 1997). Por lo tanto, aunque la senescencia puede verse como un síndrome perjudicial para la hoja, representa un proceso beneficioso y relevante para la supervivencia y reproducción de la planta.

En especies monocárpicas, es decir aquellas que mueren luego de un único evento de floración (cereales, soja, *Arabidopsis*), la senescencia foliar y la senescencia de la planta entera (senescencia reproductiva o monocárpica) en general ocurren coordinadamente y su inicio está determinado por el desarrollo de las estructuras reproductivas, que se convierten en el “destino” más importante para las distintas moléculas removilizadas desde los órganos vegetativos (Noodén y Leopold, 1988; Guiboileau *et al.*, 2010). *Arabidopsis* exhibe dos tipos de senescencia: senescencia secuencial y monocárpica. Durante la senescencia secuencial, las hojas más viejas envejecen y sus nutrientes se trasladan a las hojas más jóvenes y en crecimiento de la planta. Este tipo de senescencia foliar sería independiente de la monocárpica, ya que la esterilidad o la remoción de las estructuras reproductivas aumenta la longevidad de la planta, mientras que la vida útil de las hojas individuales permanece inalterada (Noodén y Penney, 2001).

La senescencia foliar se puede inducir prematuramente por factores externos como la aplicación de hormonas (i.e. ácido abscísico, etileno), la oscuridad, temperaturas extremas y otros tipos de estrés. De hecho la inducción de la senescencia por oscuridad en hojas

individuales se utiliza con frecuencia para promover una senescencia rápida y uniforme, dado que conduce a muchos síntomas típicos de senescencia, como la degradación de clorofila, y la pérdida de lípidos, ácidos nucleicos y proteínas (Wittenbach, 1978; Noodén y Leopold, 1988; Weaver y Amasino, 2001; Law *et al.*, 2018), si bien la expresión de muchos genes inducidos fuertemente durante la senescencia natural, como varias quinasas y genes de respuesta a patógenos (PR), no se altera durante la senescencia inducida por oscuridad (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). De los tratamientos usualmente utilizados para inducir la senescencia, el oscurecimiento de hojas es el que muestra un patrón de expresión génica más similar con la senescencia natural (Weaver *et al.*, 1998).

### **1.1. Degradación de proteínas cloroplásticas y proteasas asociadas a la senescencia**

La mayor parte de las proteínas de la hoja se localiza en los cloroplastos, y Rubisco representa alrededor de la mitad del N removilizado en hojas de plantas C3. Si bien algunas proteasas cloroplásticas aumentan su expresión durante la senescencia, su función se asocia al recambio de proteínas y homeostasis, y serían otras las proteasas responsables de la degradación proteolítica masiva asociada a la senescencia. El desmantelamiento del cloroplasto es, al menos parcialmente, extraplástico, y requiere del transporte de sus componentes fuera de la organela (Ishida *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008; Wada *et al.*, 2009; Carrión *et al.*, 2013; Spitzer *et al.*, 2015). En los últimos años se han descrito distintas vías involucradas en la degradación de Rubisco y otras proteínas fotosintéticas mayoritarias, estromáticas y tilacoidales (GS1, LHII). Estas vías involucran pequeñas vacuolas asociadas a la senescencia (SAVs) que contienen la proteasa SAG12 y presentan gran actividad proteolítica (Otegui *et al.*, 2005), y vesículas de distinta naturaleza y composición que movilizan proteínas plastidiales a la vacuola central, donde se concentra la actividad proteolítica (Chiba *et al.*, 2003; Michaeli *et al.*, 2014; Wang y Blumwald, 2014). La vacuola central también acumula metabolitos de degradación de clorofilas (Matile *et al.*, 1988; Hinder *et al.*, 1996), e incluso cloroplastos enteros (Wada *et al.*, 2009; Izumi *et al.*, 2017) y representa el reservorio celular donde se acumulan los nutrientes removilizables. Las proteasas de tipo cisteínicas son el principal grupo mecanístico característicamente asociado a la senescencia y su localización es predominantemente vacuolar (Martínez *et al.*, 2007a). Sin embargo proteasas de otros grupos mecanísticos y localizaciones subcelulares se inducen durante la senescencia (Roberts *et al.*, 2012; Martínez y Guiamet, 2014).

## 1.2. Regulación de la senescencia foliar natural

Dado que la senescencia foliar es una respuesta integrada a señales endógenas y condiciones externas, resulta difícil la disección e identificación de las vías específicas de la senescencia natural. Como reflejo de esto, numerosos genes implicados en la respuesta a estreses ambientales son regulados positivamente durante la senescencia natural (Quirino *et al.*, 2000; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). A su vez, la expresión de muchos genes asociados a la senescencia (SAG) se induce en respuesta a tensiones ambientales tales como estrés hídrico u oscuridad (Weaver *et al.*, 1998).

### 1.2.1. Regulación hormonal

Las vías de señalización hormonales participan en todas las etapas de la senescencia de la hoja, integrando las señales del desarrollo y las señales ambientales de una manera compleja. Las hormonas que promueven el crecimiento, como las giberelinas, las auxinas y las citoquininas, en general retrasan la senescencia, aunque el efecto exacto de las auxinas y las giberelinas es variable y no está del todo claro (Schippers *et al.*, 2007). Las citoquininas se conocen desde hace mucho tiempo como las principales hormonas que retrasan la senescencia (Richmond y Lang, 1957), y se cree que la caída en los niveles de citoquininas es una señal clave para el inicio de la senescencia foliar natural (Nooden *et al.*, 1990; Gan y Amasino, 1995; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Por otro lado, los niveles de ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (AJ), ácido salicílico (AS) y etileno aumentan durante el desarrollo de la hoja y se ha demostrado que todas ellas promueven la senescencia foliar (Revisado en Schippers *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2014; Schippers, 2015).

### 1.2.2. Regulación metabólica

Los suministros de carbono y nitrógeno son los dos componentes clave que reflejan el control del flujo metabólico en la senescencia foliar. Durante la senescencia natural los niveles endógenos de azúcar tienden a aumentar, y la alta concentración de azúcares reduciría la actividad fotosintética e induciría la senescencia de las hojas (Pourtau *et al.*, 2006; Wingler y Roitsch, 2008). Incluso, el mismo aumento en el contenido de azúcares durante el desarrollo de la hoja induciría cambios en la expresión génica asociados a la senescencia (Lloyd y Zakhleniuk, 2004; Pourtau *et al.*, 2006), modulados por ABA, las citoquininas y el etileno (Rolland *et al.*, 2002; León y Sheen, 2003; Yanagisawa *et al.*, 2003). Además, se demostró que la glucosa induce la senescencia foliar temprana cuando se combina con un suministro bajo,

pero no alto de nitrógeno (Wingler *et al.*, 2004). El contenido total de aminoácidos y nitrógeno disminuye a lo largo del desarrollo de la hoja (Diaz *et al.*, 2005; Diaz *et al.*, 2008) y la deficiencia de nitrógeno induce cambios asociados a la senescencia en *Arabidopsis* (Diaz *et al.*, 2006). Los cambios en los niveles de azúcar en relación con el contenido de nitrógeno (balance C:N) en las hojas durante la transición de destino a fuente podrían desempeñar un papel importante en la inducción de la senescencia foliar y, por lo tanto, en la removilización del nitrógeno de las hojas viejas (Masclaux *et al.*, 2000; Guiboileau *et al.*, 2010).

### 1.3. Señalización. Receptores de membrana asociados a la senescencia

Las proteínas receptoras de la membrana plasmática con actividad quinasa, *receptor-like kinases* (RLK), contienen un dominio extracelular de reconocimiento de ligandos específicos, y un dominio citoplásmico de traducción de la señal por fosforilación (Becraft, 1998). Las RLK desempeñan papeles críticos en la regulación de procesos de desarrollo y en la respuesta a estrés biótico y abiótico (Gao y Xue, 2012; Wu *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2016a; Ye *et al.*, 2017).

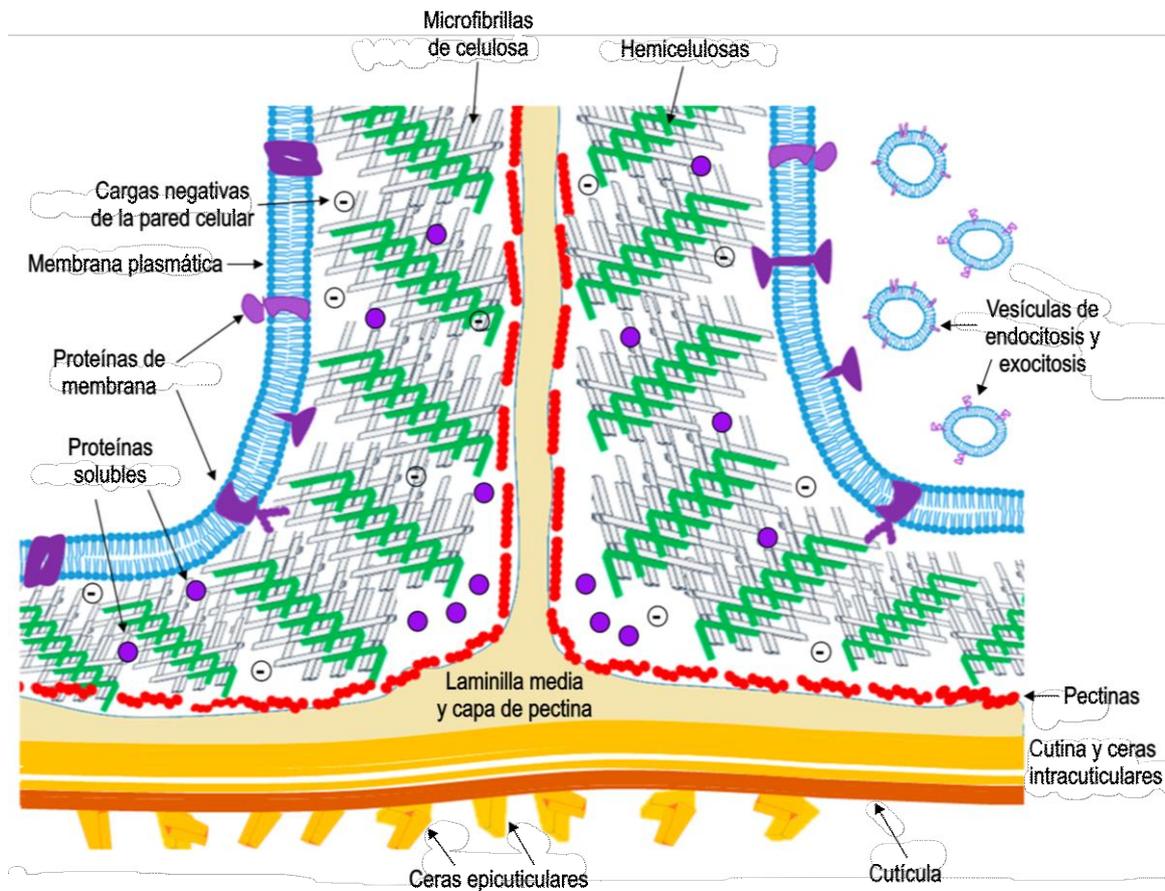
Varias RLK participan en la regulación de la senescencia foliar (Hajouj *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2011). La expresión inducible de *GmSARK*, que codifica para una RLK de soja asociada a la senescencia, en *Arabidopsis* aumenta la expresión de genes asociados a la senescencia (SAG), y acelera la senescencia. En líneas donde *GmSARK* se encuentra silenciado la senescencia se retrasa, por lo que SARK tendría un rol clave en el control de la senescencia foliar (Xu *et al.*, 2011). RPK1 es una RLK involucrada en la percepción temprana de ABA durante la germinación, crecimiento y cierre de estomas en *Arabidopsis*, que también desempeña un papel promotor de la senescencia mediado por ABA (Osakabe *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2011). La identidad de los ligandos específicos de estas RLK y los mecanismos y la regulación de secreción y estabilidad de los ligandos en el espacio extracelular se desconocen.

Los cambios extracelulares asociados a la senescencia son muy poco conocidos. Durante la senescencia aumentaría el tráfico de moléculas hacia el espacio extracelular (van der Graaff *et al.*, 2006), donde además tienen lugar importantes procesos fisiológicos, como la absorción y el transporte de aminoácidos y azúcares, la comunicación intercelular y la señalización sistémica, por lo que es muy probable que este compartimento también participe en la regulación y el progreso de la senescencia foliar.

## 2. El espacio extracelular o apoplasto

Los términos “apoplasto” y “espacio extracelular” se usan a menudo como sinónimos, y en su significado más amplio se refieren al compartimento externo a la membrana plasmática de la planta, que incluye las paredes celulares, el espacio libre entre las células (o espacio intercelular) y el fluido apoplástico (FA) (Figura 1.2). El apoplasto se suele considerar como un sistema casi continuo en toda la planta, que se extiende desde las raíces hasta las hojas y solamente se interrumpe en la raíz por las bandas de Caspary (Schreiber *et al.*, 1999) y algunos autores lo consideran una continuación del xilema (Canny, 1995).

El apoplasto se conoce desde hace más tiempo que el simplasto, y atrajo el interés de los biólogos durante muchos años. El botánico Ernst Münch (1930) separó la planta en dos compartimentos principales: el apoplasto "muerto" y el simplasto "vivo". Münch consideraba que la única función de este nuevo compartimento externo era el transporte de agua y de solutos. Este concepto es muy distinto del entendimiento actual. En general, el apoplasto se puede considerar como un espacio fuera de la membrana plasmática en el que el agua, los nutrientes, los solutos y las señales se intercambian entre las células de las plantas y entre las células de las plantas y los organismos invasores (Floerl *et al.*, 2012).



**Figura 1.2. Representación esquemática del espacio extracelular de una angiosperma.** Componentes principales: membrana plasmática (celestes); hemicelulosas (verde); microfibrillas de celulosa (gris); lamela media y capa de pectina (beige); pectinas (rojo); proteínas solubles y de membrana (violeta). Tomado de Guerra-Guimarães, (2016).

## 2.1. Las paredes celulares

El principal componente estructural del apoplasto es la pared celular, que se ensambla y modifica mediante enzimas y metabolitos secretados al apoplasto. Está compuesta de dos redes estructuralmente independientes pero que interactúan: los polisacáridos y las proteínas estructurales (Cosgrove, 1997; Cosgrove, 2005). Los principales polisacáridos estructurales de la pared celular son la celulosa, las hemicelulosas, las pectinas y la lignina (que proporciona rigidez y resistencia a la pared secundaria). El componente más abundante de la pared es el agua, que constituye aproximadamente dos tercios de la masa de la pared en los tejidos en crecimiento. Debido a la gran cantidad de agua que contienen las paredes celulares, se ha sugerido que la matriz tiene las propiedades de un hidrogel relativamente denso (Cosgrove,

1997). En general, la pared de las células vegetales en crecimiento está compuesta de aproximadamente 30% de celulosa, 30% de hemicelulosa y 35% de pectina, con alrededor de 5% de proteínas estructurales por peso seco de pared (Cosgrove, 1997), aunque la relación y la composición exacta de los diversos componentes varían según la especie, el tipo de tejido y la etapa del desarrollo (Selvendran y O'Neill, 1987; Lynch y Staehelin, 1995; Brett y Waldron, 1996; Carpita *et al.*, 1996) y además están influenciadas por el ambiente (Keller, 1993; Brisson *et al.*, 1994). Se ha propuesto que la pared celular puede funcionar como una reserva de carbono orgánico que, durante las últimas etapas de la senescencia, podría ser removilizado en forma de azúcares solubles gracias a la acción de numerosas enzimas hidrolíticas (Mohapatra *et al.*, 2010).

La celulosa es un homopolisacárido neutro formado por polímeros lineales de  $\beta$ -D glucosa ( $\beta$ -D glucanos) que se unen entre sí por puentes de hidrógeno formando microfibrillas de celulosa. Las microfibrillas de celulosa se sintetizan en la membrana plasmática (Cosgrove, 2005).

Las hemicelulosas son heteropolisacáridos neutros a levemente ácidos, y en las paredes celulares están estrechamente unidos a la celulosa. En la pared primaria de dicotiledóneas la hemicelulosa más abundante es el xiloglucano, un polímero ramificado que consiste en una cadena principal de residuos de  $\beta$ -D glucosa a la cual se incorporan cadenas laterales que contienen xilosa, galactosa y, a menudo, una fucosa terminal (Cosgrove, 1997; Fry, 2004).

Las pectinas son heteropolisacáridos muy ramificados y complejos, formados por azúcares ácidos como el ácido glucurónico y el ácido galacturónico. Son los polisacáridos más solubles de la pared celular y forman un gel en el que está incrustada la red de celulosa-hemicelulosa. Además de proporcionar superficies cargadas que regulan el pH y el balance iónico de la pared celular (Cosgrove, 1997), las pectinas son los objetivos principales de los patógenos invasores y sus productos de degradación funcionan como “elicitors” potentes de las respuestas de defensa de las plantas (Ferrari *et al.*, 2013). Tanto las pectinas como las hemicelulosas se sintetizan en el aparato de Golgi y llegan a la pared celular empaquetadas en el interior de pequeñas vesículas que se fusionan con la membrana plasmática (Cosgrove, 2005).

Las proteínas estructurales de la pared se clasifican de acuerdo con su composición de aminoácidos predominante, por ejemplo, glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP o extensinas), proteínas ricas en glicina (GRP), proteínas ricas en prolina (PRP), etc. Muchas de estas proteínas están altamente glicosiladas y su abundancia varía según el tipo de célula, el desarrollo y factores ambientales (Showalter, 1993). Las proteínas estructurales están

fuertemente unidas a la pared por enlaces covalentes y representan sólo una pequeña fracción de las proteínas extracelulares totales detectadas hasta ahora (Jamet *et al.*, 2006).

### 2.1.1. Organización y estructura de la pared celular

En la pared celular, los polisacáridos y las glicoproteína estructurales se entrecruzan para formar un "entramado" que se mantiene unido en un entorno acuoso (Fry, 1986; Iiyama *et al.*, 1994). La pared celular se organiza en tres capas que difieren en sus propiedades físicas y químicas: la laminilla media, la pared celular primaria y la pared celular secundaria. La primera capa en depositarse es la laminilla media y básicamente consiste en pectinas con diferentes grados de metilación que se depositan como "placa celular" durante la división celular. La siguiente capa en formarse es la pared primaria y se deposita entre la laminilla media y la membrana plasmática. La pared primaria consiste en una red cristalina de microfibrillas de celulosa inserta en una matriz de pectinas y hemicelulosas con proteínas estructurales intercaladas. La pared primaria rige la velocidad y la dirección de la expansión celular y, por lo tanto, el tamaño y la forma final de la célula (Fry, 2004; Cosgrove, 2005). Las células que requieren una gran resistencia mecánica y refuerzo estructural, como las células conductoras del xilema, una vez que dejan de expandirse depositan una pared celular secundaria entre la pared primaria y la membrana plasmática. La pared secundaria consiste en microfibrillas de celulosa con un contenido de hemicelulosas y proteínas considerablemente menor que la pared celular primaria. Además, la inclusión de lignina hace que la pared celular secundaria sea menos flexible y menos permeable al agua que la pared celular primaria (Brett y Waldron, 1996).

## 2.2. Espacio intercelular

La red de celulosa / hemicelulosa de las paredes celulares primarias y secundarias contiene espacios interfibrilares e intermicelares que confieren porosidad a la matriz extracelular y conforman el "espacio intercelular" del apoplasto, es decir, el espacio tridimensional en el que las moléculas pueden difundir. La porosidad de la pared celular puede cambiar con la ontogenia (O'Driscoll *et al.*, 1993; Titel *et al.*, 1997) y durante la diferenciación celular (Lynch y Staehelin, 1995). En general el tamaño de los poros ronda los 3,5 y 5 nm (Carpita *et al.*, 1979), y mientras que el agua y pequeñas moléculas se pueden mover libremente, se considera que el movimiento de las partículas con un diámetro superior a 4 nm está restringido (Lodish *et al.*, 2000). A grandes rasgos, las proteínas tan pequeñas como 20 kDa son demasiado grandes

para moverse libremente dentro de la red. Además, como las paredes celulares normalmente tienen cargas negativas debido al predominio de grupos carboxilo libres de los ácidos galacturónicos de las pectinas, el movimiento de los iones en las paredes celulares se caracteriza por interacciones electrostáticas, que conducen a una acumulación de cationes (Marschner *et al.*, 1986).

### 2.3. Dinámica del espacio apoplástico. El Fluido Apoplástico (FA)

El líquido que se encuentra dentro del espacio intercelular normalmente se llama fluido apoplástico (FA) o fluido extracelular (FE). Está compuesto de sustancias de diferente naturaleza, como solutos (iones, ácidos orgánicos, azúcares y aminoácidos), proteínas y glicoproteínas con una variedad de funciones, por ejemplo, proteasas, inhibidores de proteasas, hidrolasas, oxidorreductasas y otras enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y lípidos, y con la señalización (Lohaus *et al.*, 1995; Sattelmacher y Horst, 2007; Guerra-Guimarães *et al.*, 2016). El volumen de FA foliar en general representa el 4-11% del peso fresco total de la hoja (Sattelmacher y Horst, 2007). El FA proporciona un medio para las comunicaciones intercelulares y desempeña un papel fundamental en la interacción de la planta con su ambiente, además muchas moléculas apoplásticas se transportan al citosol donde participan en la comunicación intracelular.

#### 2.3.1. Vías de señalización

Numerosas vías de señalización involucran cambios que ocurren en el apoplasto. La acumulación de  $H_2O_2$  en el apoplasto de las hojas de maíz inducida por ABA promueve el transporte de  $H_2O_2$  al citosol, donde directamente desencadenaría eventos de transducción de señales que resultan en la regulación positiva de la actividad de enzimas antioxidantes cloroplásticas y citosólicas (Hu *et al.*, 2005). El  $H_2O_2$  producido en el apoplasto en respuesta a la infección con patógenos es relocalizado al citosol a través de la acuaporina AtPIP1;4, donde participa en una ruta de transducción de señales que desencadena respuestas de defensa (Tian *et al.*, 2016).

El aumento en los niveles de auxinas promueve la expresión de genes SAUR (*SMALL AUXIN UP-RNA*) quienes promueven la fosforilación del dominio C terminal intracelular de las bombas de protones de la membrana plasmática (MP  $H^+$ -ATPasas) y de esta manera activan el flujo de  $H^+$  del citosol al apoplasto (Takahashi *et al.*, 2012; Spartz *et al.*, 2014). La consecuente

reducción del pH extracelular estimula la expansión celular mediada por auxinas al 1) activar enzimas apoplásticas sensibles al pH que inician el aflojamiento de la pared celular, y 2) permitir el transporte de solutos y agua del apoplasto al citosol para mantener la presión de turgencia que impulsa la expansión celular (Hager, 2003). El ABA inhibe la expansión celular promoviendo la desfosforilación del dominio C terminal de las MP H<sup>+</sup>-ATPasas, y por ende, la inactivación del transporte de H<sup>+</sup> al apoplasto (Hayashi *et al.*, 2014). En Arabidopsis, la unión del péptido de señalización extracelular RALF (*rapid alkalization factor*) con su receptor de membrana FERONIA (una RLK) alcaliniza el apoplasto y reprime la expansión celular mediante la inactivación del flujo de protones por parte de las MP H<sup>+</sup>-ATPasas durante el desarrollo de las raíces (Haruta *et al.*, 2014).

La proteína RLK asociada a la pared celular Snn1 (*susceptibility/ sensitivity protein1*) de trigo interacciona con la proteína efectora Tox1 secretada al apoplasto de la hoja por el hongo necrótrofo *Parastagonospora nodorum*, y transduce señales de defensa que desencadenan necrosis tisular y consecuentemente proporciona nutrientes para el crecimiento y la reproducción del patógeno (Shi *et al.*, 2016).

Por otra parte, los péptidos de señalización de la familia CLE son secretados al apoplasto, y a través de interacciones con sus receptores de membrana LRR-RLK (*LEUCINE-RICH REPEAT RECEPTOR-LIKE KINASEs*) participan en la comunicación célula-célula y controlan diversos procesos fisiológicos y del desarrollo de las plantas como el desarrollo del embrión y endosperma, la regulación de la proliferación y diferenciación de las células meristemáticas, y el desarrollo vascular (Matsuzaki *et al.*, 2010; Fiume y Fletcher, 2012; Kondo *et al.*, 2014; Shinohara y Matsubayashi, 2015). En Arabidopsis, la infección por ciertos patógenos promueve la expresión de varios genes *PROPEP*, precursores de los péptidos de señalización *AtPeps* (*Plant elicitor peptides*). Los péptidos *AtPeps* se liberarían al apoplasto donde la interacción con sus receptores de membrana PEPR (PEP-RECEPTOR) amplificaría vías de señalización intracelulares de defensa mediadas por AJ/etileno y AS (Huffaker y Ryan, 2007). Recientemente se ha sugerido que el sistema Pep-PEPR intervendría en la removilización de nutrientes durante la senescencia inducida por oscuridad, regulando la degradación de clorofila y la autofagia (Gully *et al.*, 2015).

El estrés por salinidad promueve la exportación de espermidina al apoplasto, donde su catabolismo induce respuestas de tolerancia o muerte celular programada (MCP) en tabaco (Moschou *et al.*, 2008). Estos breves ejemplos demuestran que la permanente conexión entre

el interior celular y el apoplasto es crucial en la regulación fisiológica y metabólica durante el desarrollo de la planta y en las respuestas a distintos tipos de estrés.

### 2.3.2. Proteínas del FA

La complejidad del FA y su importancia en el metabolismo se refleja en la gran cantidad y variedad de proteínas encontradas en esta fracción celular (Agrawal *et al.*, 2010; Guerra-Guimarães *et al.*, 2016). Algunas proteínas apoplásticas participarían en la organización y biogénesis de la pared celular, por ejemplo endoglucanasas,  $\alpha$  y  $\beta$ -glucosidasas,  $\beta$ -xilosidasas,  $\beta$ -galactosidasas, poligalacturonasas, pectin metil esterasas y xiloglucan-endotransglicosilasas, este grupo de proteínas representa un 18-29% del total de proteínas del FA, lo que implica que la pared celular experimenta cambios apreciables durante el crecimiento y desarrollo de la planta (Guerra-Guimarães *et al.*, 2016).

El grupo de proteínas más abundante del FA es el de respuesta a estrés, que representa un 23-33% del total de proteínas del FA (Guerra-Guimarães *et al.*, 2016). Algunas de estas proteínas pueden actuar sobre la pared de posibles patógenos bacterianos y fúngicos y limitar su propagación, por ejemplo quitinasas (PR3, PR 4, PR 8, PR11) y  $\beta$ -1,3-glucanasas (PR2) (Mauch *et al.*, 1988; Zhu *et al.*, 1994). Otras proteínas con actividad antifúngica y bien representadas en el FA de dicotiledoneas son las proteínas similares a la taumatina (PR5), estas proteínas pueden afectar a los hongos, ya sea dañando sus membranas o hidrolizando  $\beta$ -1,3-glucanos de las paredes celulares (Roberts y Selitrennikoff, 1990; Grenier *et al.*, 1999). Las proteínas *germin-like protein* (GLP) son una familia grande y heterogénea de proteínas que se expresan fuertemente en respuesta a estreses bióticos y abióticos (Godfrey *et al.*, 2007; Dunwell *et al.*, 2008; Rietz *et al.*, 2012; Guerra-Guimarães *et al.*, 2015). Muchas GLP se localizan en el apoplasto y, mediante su actividad oxalato oxidasa (OxO) o superóxido dismutasa (SOD) (Dunwell *et al.*, 2008), pueden generar  $H_2O_2$  y desempeñar un doble papel en las respuestas de defensa, por un lado creando una atmósfera tóxica para los patógenos y por otro lado funcionando en la señalización (van Loon *et al.*, 2006) que conduce por ejemplo al fortalecimiento de la pared celular confiriendo tolerancia al ataque por patógenos (Banerjee *et al.*, 2010; Rietz *et al.*, 2012).

Alrededor de un 8% de las proteínas del FA participan en el metabolismo de EROs (especies reactivas del oxígeno) (Guerra-Guimarães *et al.*, 2016), y posiblemente formen parte de rutas de señalización redox (Foyer y Noctor, 2013). Dentro de este grupo se encuentran las

peroxidasas, que están implicadas en la lignificación, suberización, catabolismo de auxinas, cicatrización de heridas y defensa contra patógenos (Cosio y Dunand, 2008). El metabolismo de EROs, junto con el equilibrio de auxinas, controla la remodelación de la pared celular durante el desarrollo y las respuestas a estrés (Tognetti *et al.*, 2012).

En el FA también se encuentran proteasas de diversas clases, principalmente cisteínicas, serínicas, aspárticas y metaloproteasas. En términos generales, las proteasas apoplásticas podrían participar en la eliminación de péptidos señal (PS) de proteínas secretadas; en la eliminación de propéptidos de proteínas que se sintetizan como precursores inactivos; en la liberación de péptidos bioactivos; o en la liberación de proteínas de la superficie celular (Rawlings, 2013; Zimmermann *et al.*, 2016; Ziemann *et al.*, 2018).

Otras proteínas del FA pueden modificar otros sustratos en el apoplasto, por ejemplo, invertasas, fosfatasas, lipasas y diversas deshidrogenasas (Guerra-Guimarães *et al.*, 2016).

Las proteínas del FA pueden ser de dos tipos teniendo en cuenta sus interacciones: (1) proteínas con poca o ninguna interacción con los componentes de la pared, libremente solubles en el apoplasto y que pueden extraerse con buffers de baja fuerza iónica; y (2) proteínas débilmente unidas a la matriz de la pared a través de enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, iónicas o de Van der Waals y que pueden extraerse mediante sales (Boudart *et al.*, 2005).

### 2.3.3. Cambios en el proteoma del FA en respuesta estrés biótico y abiótico

Estudios proteómicos del FA de plantas sometidas a distintas situaciones de estrés permitieron la disección de vías de señalización y respuesta que tienen lugar en el apoplasto. Mediante la implementación de electroforesis en dos dimensiones y proteómica cuantitativa libre de marcas (*label-free ESI-LC-MSMS*) se han analizado modificaciones del secretoma bajo distintas tensiones ambientales, como estrés salino, sequía y respuesta frente a varios patógenos. (Oh *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2009; Floerl *et al.*, 2012; Ali *et al.*, 2014; Bengtsson *et al.*, 2014; Guerra-Guimarães *et al.*, 2015). Por ejemplo, 20 de 150 proteínas detectadas en el FA de hojas de tabaco mostraron variación en sus niveles estables bajo estrés salino (Dani *et al.*, 2005), mientras que solo se detectó variación en 7 de 220 proteínas identificadas en el FA de hojas de *Arabidopsis* en respuesta a *Verticillium longisporum* (Floerl *et al.*, 2012). Los resultados de estos análisis indican que gran parte de las proteínas que se acumulan en el apoplasto en respuesta a estímulos bióticos son las mismas que se acumulan frente a estreses abióticos, e

intervienen principalmente en la degradación de macromoléculas y en la modificación y el metabolismo de la pared celular, como por ejemplo proteasas, quitinasas, ribonucleasas, glucosidasas, galactosidasas y peroxidasas (Dietz, 1997; Dani *et al.*, 2005; Kong *et al.*, 2005; Floerl *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009). Gran parte de las enzimas secretadas en respuesta a estrés también se encuentran, aunque en niveles menores, en los secretomas de plantas no estresadas (Ramanjulu *et al.*, 1999; Dani *et al.*, 2005; Floerl *et al.*, 2012; Ali *et al.*, 2014; Guerra-Guimarães *et al.*, 2016). Estos resultados sugieren que las enzimas apoplásticas participarían tanto en respuestas a estrés/defensa como en programas del desarrollo, o bien son parte de mecanismos de defensa constitutivos que se activan tras la percepción de una determinada señal.

#### 2.3.4. Rol de proteínas apoplásticas en respuesta a estrés y durante el desarrollo

Las proteasas cisteínicas tipo papaína (PLCP) apoplásticas participan en la activación de diversas respuestas de defensa (Misas-Villamil *et al.*, 2016). Recientemente se demostró que varias PLCP apoplásticas inducidas por ácido salicílico (AS) intervienen en la maduración del péptido apoplástico Zip1, que actúa como señal en un ciclo de retroalimentación positiva que induce respuestas de defensa asociadas a AS, como la expresión de genes *PR* y la activación de PLCP, en maíz (Ziemann *et al.*, 2018).

La cistatina CC9 de maíz se localiza en el apoplasto y la expresión de *cc9* es inducida durante la infección con el hongo patógeno *Ustilago maydis* (van der Linde *et al.*, 2012). La sobreexpresión de *cc9* previene las respuestas de defensas frente a la infección con *U. maydis* al inhibir la actividad de PLCPs apoplásticas inducidas por ácido salicílico (AS) (van der Linde *et al.*, 2012). El silenciamiento de *cc9* resulta en la expresión de muchos genes de defensa y en la respuesta hipersensible a *U. maydis* y la consecuente reducción de la colonización fúngica (van der Linde *et al.*, 2012).

Las subtilisinas *Phytaspases* son secretadas constitutivamente al apoplasto en sus formas activas, y en respuesta a estrés biótico o abiótico son reimportadas al interior celular donde intervienen en las respuestas relacionadas con la MCP en tabaco (Chichkova *et al.*, 2010).

En las hojas jóvenes de *Arabidopsis*, la fosfolipasa  $PLA_2\alpha$  se localiza en el aparato de golgi, pero es translocada gradualmente al apoplasto a medida que las hojas maduran y en respuesta a la infección por *Pseudomonas syringae* donde presumiblemente interviene en las respuestas de defensa (Jung *et al.*, 2012).

Durante la germinación de las semillas de girasol, la proteína de transferencia de lípidos HaAP10 apoplástica se relocaliza al interior celular donde interviene en la transferencia de lípidos a los glioxisomas (Pagnussat *et al.*, 2012).

El gen *SDD1* (*Stomatal Density and Distribution*), que codifica para la subtilisina SDD1, se expresa fuertemente en células meristemoides de la epidermis. La proteína SDD1 es secretada al espacio extracelular donde participa junto a la RLK TMM en la regulación de la formación y distribución de los estomas (von Groll *et al.*, 2002).

Las enzimas ATP difosfohidrolasas APY1, 2 y 3 de papa se localizan en el apoplasto de las hojas (Riewe *et al.*, 2008). El silenciamiento de estas enzimas conduce a retrasos en el crecimiento y alteraciones en el desarrollo de los tubérculos, posiblemente a través de una perturbación en la transducción de señales que derivan del ATP extracelular (Riewe *et al.*, 2008). En *Arabidopsis*, APY1 y APY2 son cruciales para el desarrollo normal de la planta y serían secretadas al apoplasto (Wolf *et al.*, 2007). Plantas de *Arabidopsis knock-out* para APY1 y APY2 presentan varias anormalidades en el desarrollo, como por ejemplo defectos en la germinación de los granos de polen (Steinebrunner *et al.*, 2003), pérdida del funcionamiento de los meristemas apicales de la raíz y el tallo, e inhibición de la germinación de las semillas (Wolf *et al.*, 2007).

Estos son algunos ejemplos que demuestran que las proteínas apoplásticas participan activamente durante las respuestas de defensa de la planta a distintas tensiones ambientales y durante distintas etapas del desarrollo de la planta. Las proteínas extracelulares podrían desempeñar diversas funciones a lo largo de las distintas fases de la senescencia, por ejemplo en la señalización, i.e., regulando las relaciones fuente-sumidero, en el tráfico extracelular de compuestos nitrogenados, en la muerte celular, e incluso ser blanco de proteólisis vinculada a la removilización de N.



## **OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general del presente trabajo de tesis doctoral fue profundizar el conocimiento sobre la dinámica del apoplasto, y el papel de este compartimiento en la degradación y removilización de nitrógeno durante la senescencia en *Arabidopsis thaliana*.

## **HIPÓTESIS GENERAL**

Durante la senescencia el apoplasto experimenta cambios fisiológicos y en la composición de proteínas y metabolitos, reflejando su participación en la regulación de la etapa final del desarrollo de la hoja y en los procesos degradativos asociados a la removilización de N.



## **CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS**



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Material vegetal y condiciones de cultivo

En esta tesis se trabajó con plantas de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* Heynh ecotipo Columbia), genotipo salvaje “wt”, y con las siguientes líneas transgénicas:

- **Apo-pHusion**: Línea con expresión estable de la proteína quimérica apo-mRFP1-EGFP (Red Fluorescent Protein- Green Fluorescent Protein) direccionada al apoplasto, donde funciona como sensor de pH (Gjetting *et al.*, 2012).
- **P3**: Línea que expresa el CBM (Carbohydrate Binding Module) de la Expansina 2 de frutilla (*CBMFaEXP2*) direccionado a pared celular, caracterizada previamente por los altos contenidos de pectinas y de residuo insoluble en alcohol (RIA) (Nardi *et al.*, 2015).
- **atg5-1**: Mutante *knock out* por inserción aleatoria de T-ADN en el gen de autofagia *AUTOPHAGYC 5*, de la colección SAIL (Sessions *et al.*, 2002), caracterizada previamente por su fenotipo asociado a la senescencia acelerada (Thompson y Vierstra, 2005).

Previo a la siembra las semillas se estratificaron embebidas en agua destilada (dH<sub>2</sub>O) durante 2-3 días a 4 °C en oscuridad; luego se germinaron en macetas de telgopor de 550 ml con mezcla de tierra negra autoclavada y vermiculita en una proporción 2:1. Cada 30 días se fertilizó con Nitrofoska® 1 g/l, 30 ml por maceta.

Las plantas se crecieron en cámara de cultivo bajo un fotoperíodo de 10 hs de luz y 14 hs de oscuridad, a 24 °C y una irradiancia de 150-200  $\mu\text{mol}$  de fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### 2. Inducción de la senescencia foliar

Se aceleró la senescencia de hojas adheridas a la planta y de hojas escindidas, exponiéndolas en ambos casos a distintos períodos de oscuridad, hasta que el nivel de clorofila cayó un 35-40%, y por lo tanto el valor final de clorofila representó un 60-65% del inicial.

Para inducir la senescencia de hojas unidas a la planta, se taparon 4-5 hojas por planta, envolviendo cada lámina en papel aluminio durante 3-7 días, dependiendo del genotipo y estado ontogenético de la planta. El resto de la planta que no fue tapado continuó bajo el mismo régimen de luz-oscuridad. Para inducir la senescencia de hojas separadas de la planta, estas se cortaron hacia la mitad del período de luz, se colocaron en recipientes con papel de filtro humedecido con dH<sub>2</sub>O, y se mantuvieron en oscuridad durante 3-7 días.

### 3. Parámetros fisiológicos

#### 3.1. Cuantificación de clorofila foliar

Para la estimación instantánea y no destructiva del contenido de clorofila se empleó el medidor SPAD 502 (Konica-Minolta®). Este dispositivo determina un índice SPAD o índice relativo de clorofila que, normalmente, está estrechamente correlacionado con el contenido de clorofila de la hoja (Ling *et al.*, 2011).

#### 3.2. Medición del rendimiento cuántico máximo del Fotosistema II (Fv/Fm)

Este índice indica la probabilidad de que la energía absorbida de un fotón sea usada para la fotosíntesis (Indicador de la eficiencia fotosintética), mostrando una alta correlación con el porcentaje de centros funcionales del fotosistema II (PSII), por lo que su disminución es considerada un indicador de pérdida de función a nivel del aparato fotosintético (Lichtenthaler y Miehé, 1997; Maxwell y Johnson, 2000). El rendimiento cuántico máximo del PSII puede tomar valores entre 0 y 0,85. En *Arabidopsis*, las hojas “sanas” que no están sufriendo ningún tipo de estrés poseen valores de  $F_v/F_m$  de alrededor de 0,83; mientras que en hojas senescentes se registran valores por debajo de 0,8 (Wingler *et al.*, 2004; Pourtau *et al.*, 2006).

Para estimar  $F_v/F_m$  se empleó un fluorímetro de pulso modulado (modelo FMS 2, Hansatech®). Las mediciones se realizaron en la cámara de cultivo. Previo a efectuar las mediciones de  $F_v/F_m$  las hojas se aclimataron a la oscuridad por al menos 30 minutos.

#### 3.3. Potencial hídrico

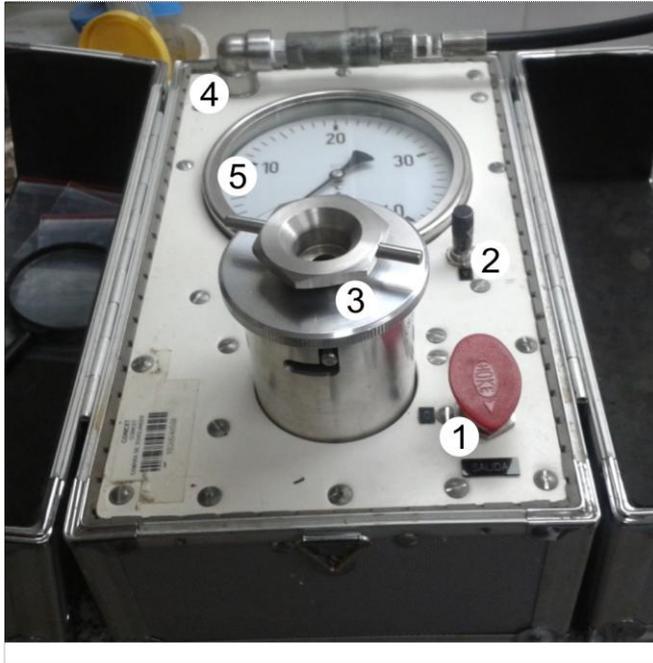
El potencial hídrico o potencial agua ( $\Psi_{\text{agua}}$ ) hace referencia a la energía potencial del agua, o sea, la energía libre que poseen las moléculas de agua para realizar trabajo. Es un concepto generalmente utilizado en fisiología vegetal que permite explicar la circulación del agua en las plantas. El  $\Psi_{\text{agua}}$  de un tejido vegetal de una planta herbácea está determinado principalmente por el potencial de presión o de turgencia ( $\Psi_p$ , aumento de la capacidad de realizar trabajo por la presión que ejerce el agua sobre una superficie, se genera por la resistencia que opone la pared celular al incremento de volumen celular) y el potencial soluto u osmótico ( $\Psi_s$ , disminución de la capacidad de realizar trabajo debido a la presencia de solutos) (Taiz y Zeiger, 2002).

Se examinó el potencial agua ( $\Psi_{\text{agua}}$ ) de hojas enteras, discos de hojas, macerados de hojas y de fluido apoplástico (FA) utilizando las siguientes aproximaciones:

### 3.3.1. Cálculo del potencial agua ( $\Psi_{\text{agua}}$ ) de hojas enteras

Para medir el potencial hídrico de hojas enteras se utilizó una cámara de presión o bomba de Scholander (Figura 2.1 A) y se procedió como en Turner (1981). La bomba de Scholander permite medir de manera sencilla el potencial hídrico de un tejido. Consiste en una cámara cilíndrica de metal, construida de manera tal que soporta altas presiones. Para medir el potencial hídrico, la hoja se coloca dentro de cámara con el pecíolo saliendo hacia el exterior a través de un pequeño orificio en la tapa (Figura 2.1 B). Al cortar el pecíolo, la columna de agua dentro del xilema queda retraída manteniendo la tensión o fuerza con la que el agua se encontraba retenida dentro de la planta. Se inyecta lentamente aire comprimido o nitrógeno gaseoso en la cámara hasta que se visualiza la salida de agua en los vasos de xilema expuestos (Figura 2.1 B). La presión dentro de la cámara a la que el menisco de agua llega a la superficie de corte se denomina presión de equilibrio y tiene la misma magnitud pero signo contrario al  $\Psi_{\text{agua}}$  del tejido colocado dentro de la cámara (Scholander *et al.*, 1965; Salisbury y Ross, 1994; Taiz y Zeiger, 2002).

A)



B)

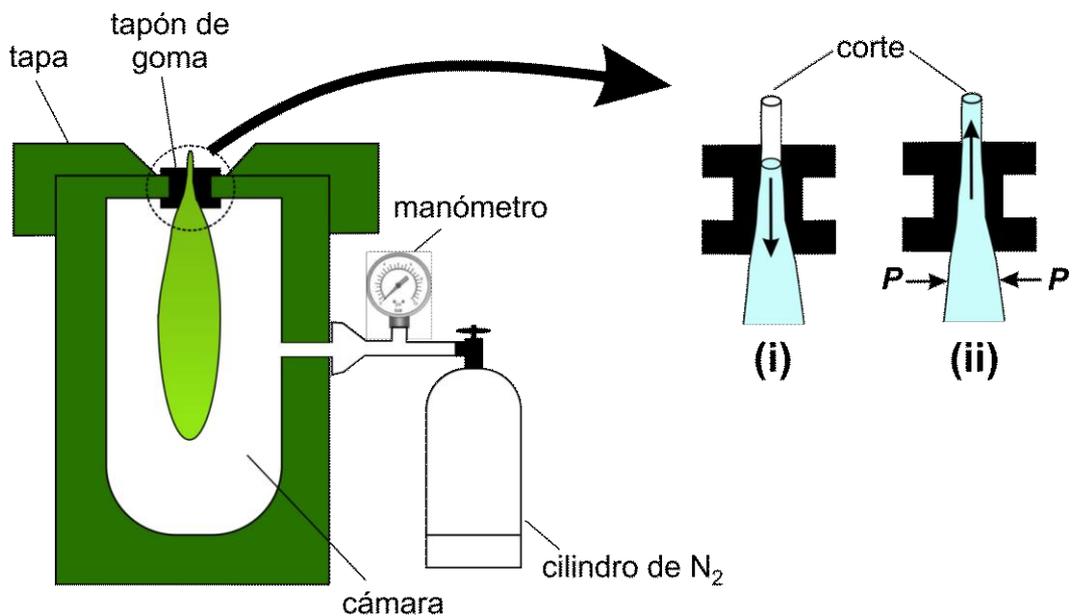


Figura 2.1. Bomba de Scholander.

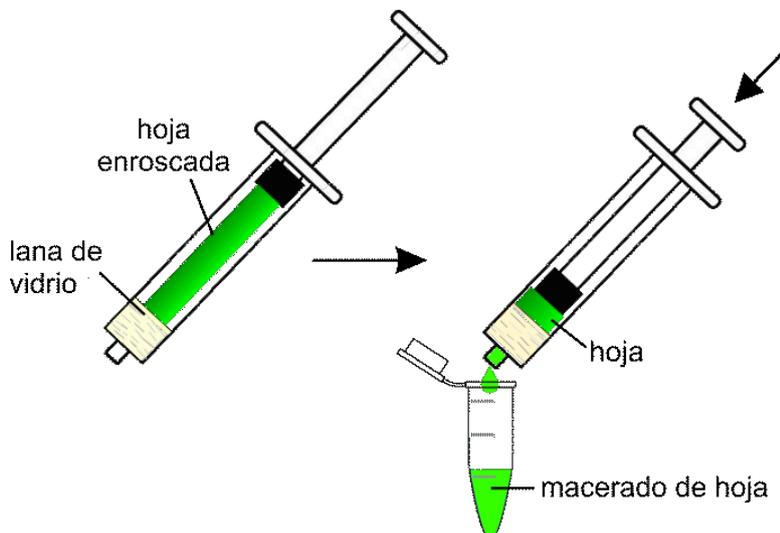
A) Partes de la bomba Scholander: 1. válvula de entrada/salida de gas (N<sub>2</sub>); 2. válvula graduada que permite el ingreso de gas a la cámara en forma muy controlada; 3. tubo de acero con una tapa del mismo material, que en su parte central posee un orificio rodeado con un sello de goma, donde se coloca la muestra; 4. conexión para la manguera que trae el gas; 5. manómetro donde se puede observar la presión a la cual se produce el desplazamiento de agua dentro de la hoja.

B) Funcionamiento de la bomba → (i) Al cortar el pecíolo el agua retrocede dentro de la hoja, lejos de la superficie

cortada, en respuesta a la tensión en el xilema. (ii) La cámara está presurizada, llevando el agua del xilema a la superficie de corte.

### 3.3.2. Cálculo del potencial agua ( $\Psi_{\text{agua}}$ ) de macerados y discos de hojas

Para obtener los macerados de hojas se introdujo la hoja entera en el interior de una jeringa de 1ml en cuyo extremo inferior se colocó previamente lana de vidrio. Luego se procedió a hacer presión con el émbolo. El macerado celular se recogió en tubos de centrifuga de 1,5 ml (Figura 2.2). El potencial hídrico ( $\Psi_{\text{agua}}$ ) de los macerados celulares es igual al potencial soluto ( $\Psi_s$ ) de los mismos.



**Figura 2.2. Obtención de macerados de hojas para calcular el potencial hídrico mediante la utilización de un psicrómetro de punto de rocío.**

Para medir el potencial hídrico de macerados y discos de hojas se utilizó un psicrómetro de punto de rocío Wescor, modelo C-52. El psicrómetro estima el potencial hídrico total de tejidos vegetales o soluciones midiendo el punto de rocío de la atmósfera en equilibrio con la muestra a determinar. Consiste en una cámara sellada donde se sitúa la muestra vegetal (o una solución de referencia), con un termopar conectado exteriormente a una fuente y un registrador de voltaje. Por medio de la inducción de un pequeño voltaje, la temperatura del termopar se reduce hasta el punto de rocío, de tal manera que el vapor de agua de la atmósfera de la

cámara del aparato se condensa en la unión metálica o termopar (efecto Peltier). El enfriamiento se detiene (cortando el paso de corriente eléctrica) y la temperatura de la unión metálica es medida con un microvoltímetro mientras el agua de la gota formada sobre la unión se va evaporando. La temperatura de la unión depende de la velocidad de evaporación (a mayor evaporación mayor descenso de temperatura de la unión metálica), la cual a su vez depende de la humedad relativa del ambiente, que está directamente relacionada con el potencial hídrico del tejido.

Las lecturas registradas por los psicrómetros son microvolts ( $\mu\text{V}$ ). Para convertir las lecturas a valores de potencial hídrico se genera una curva de calibración con la respuesta del psicrómetro a diferentes concentraciones de distintas soluciones de potencial hídrico conocido. Se utilizaron disoluciones de cloruro de sodio a diferentes concentraciones para construir la curva de calibración.

### 3.3.3. Cálculo del potencial soluto ( $\Psi_s$ ) del fluido apoplástico (FA)

Los osmómetros de presión de vapor miden el descenso de presión de vapor que experimenta una solución respecto al solvente puesto a la misma temperatura. Esto se basa en el principio de que el vapor presente en la fase gaseosa de un solvente sobre una solución disminuye en proporción inversa a la osmolalidad de la solución. La osmolalidad es una medida de las concentraciones efectivas de solutos que causan la presión osmótica.

Se utilizó un microosmómetro de presión de vapor (VAPRO<sup>®</sup> modelo 5520) de acuerdo a las instrucciones del manual de usuario. Se utilizaron  $10 \mu\text{l}$  de FLA (Fluido de Lavado Apoplástico) por cada medida, luego los valores de  $\Psi_s$  medidos de cada muestra se corrigieron por sus factores de dilución ( $F_{\text{dil}}$ ) correspondientes (ver a continuación, punto 4.1) para obtener los valores reales de  $\Psi_s$  de cada FA.

## 3.4. Curvas de presión-volumen (curvas PV) y estimación del volumen de FA de hojas

### 3.4.1. Obtención de curvas PV

Las curvas de presión volumen (curvas PV) representan la relación entre el contenido de agua y el potencial hídrico de un tejido. Se utilizaron plantas de Arabidopsis en hidratación máxima. Para esto las macetas se llevaron a capacidad de campo, y las plantas se cubrieron con una bolsa plástica durante una noche, a fin de reducir la pérdida de agua por evapo-transpiración. El potencial agua se midió con una bomba de Scholander. Para la confección de las curvas PV

se utilizó el método de transpiración libre (TL) (Tyree y Hammel, 1972) y se siguió el procedimiento descrito en Fernández y Gyenge (2010) que consiste en pesar repetidamente la hoja e ir midiendo la presión de equilibrio de la misma hoja a medida que disminuye su contenido relativo de agua (CRA). En el método de TL, la hoja se deja deshidratar libremente fuera de la cámara. Para evitar la deshidratación rápida entre mediciones, las hojas se colocaron en bolsas abiertas. Las curvas PV y la estimación de los parámetros asociados se generaron con el programa PV Curve Fitting 5.6.

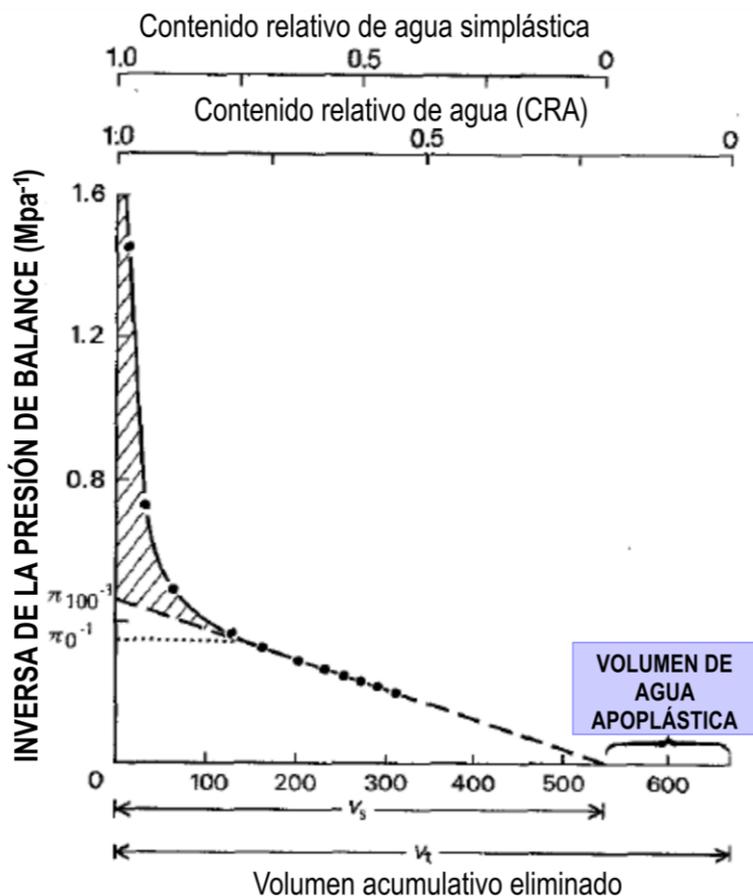
El CRA es una medida del contenido de agua que posee un tejido respecto al total de agua que éste puede almacenar, permite conocer el estado hídrico de la planta. Se relaciona con el potencial hídrico porque éste y sus componentes son función del volumen de agua simplástica (Acevedo y Fereres, 1993; González y González-Vilar, 2001). Se estimó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{CRA} = (\text{PF} - \text{PS}) / (\text{PT} - \text{PS})$$

Donde: PF=peso fresco, PS=peso seco, PT=peso a turgencia máxima.

#### 3.4.2. Estimación del volumen de fluido apoplástico (FA) a partir de las curvas PV

Al extrapolar la recta que relaciona  $-1/\Psi_{\text{agua}}$  (o  $1/\text{presión de balance}$ ) y el contenido de agua (en este caso el volumen de agua removido), hasta donde  $-1/\Psi_{\text{agua}} = 0$ , esto es a presiones de compensación muy altas o  $\Psi_{\text{agua}}$  muy bajos, ese punto separa la fracción de agua simplástica de la apoplástica. Este método asume que durante la presurización, el volumen de agua apoplástica no cambia (Tyree, 1976; Turner, 1988). (Figura 2.3).



**Figura 2.3.** Curva PV que muestra las relaciones entre la inversa de la presión de balance y el volumen acumulado de agua removida de hojas de trigo.  $V_s$ =volumen de agua simplástica,  $V_t$ = volumen total de agua en la hoja,  $\pi_{100}^{-1}$ =inversa de la presión osmótica a turgencia máxima,  $\pi_0^{-1}$ =inversa de la presión osmótica a turgencia cero. Tomado de Turner (1988).

#### 4. Obtención y análisis de fluido apoplástico (FA) de hojas

##### 4.1. Extracción de fluido de lavado apoplástico (FLA)

La extracción de FA de hojas se realizó empleando la técnica de infiltración en vacío seguida de centrifugación en frío según (Lohaus *et al.*, 2001), Brevemente, mediante esta técnica las hojas se infiltran con una solución de infiltración (**ScIn**), que puede ser agua bidestilada ( $ddH_2O$ ) o un determinado buffer, y luego se someten a una centrifugación a bajas revoluciones, que permite extraer Fluido de lavado Apoplástico (FLA), que es el FA más la ScIn.

Para esto las hojas se cortaron de la planta a la mitad del pecíolo e inmediatamente se lavaron con ddH<sub>2</sub>O. Para la infiltración se colocaron de a 4-6 hojas en una jeringa de plástico de 60 ml y se cubrieron con ScIn (en este trabajo ddH<sub>2</sub>O fría, salvo los casos especificados) hasta la marca de 40 ml. Luego se colocó un tapón en el orificio donde se insertaría la aguja y se aplicó vacío tirando del émbolo hasta la marca de 60 ml durante 30 segundos, luego se retiró gradualmente el vacío soltando muy suavemente el émbolo. Los pulsos de vacío se repitieron 5 veces a fin de asegurar la infiltración total de las hojas (hecho que puede visualizarse claramente). Posteriormente, las superficies de las hojas infiltradas se secaron muy bien con papel “tissue” y se colocaron, nuevamente en grupos de 3-4 hojas, en el interior de tubos de centrifuga de 50 ml, con los peciolos hacia arriba, y adheridos a la boca del tubo con una cinta adhesiva. Para el análisis de metabolitos y proteínas, en cada tubo se agregó 5  $\mu$ l de 300 mM de PMSF (inhibidor de proteasas serínicas), para realizar medidas de potencial soluto, no se agregó PMSF. Luego se centrifugaron a 4 °C a 500-600 xg durante 40 min. El FLA se colectó del fondo de cada tubo y se traspasó a tubos de 1,5 ml para su almacenamiento a -80 °C hasta ser analizados (Figura 2.4).

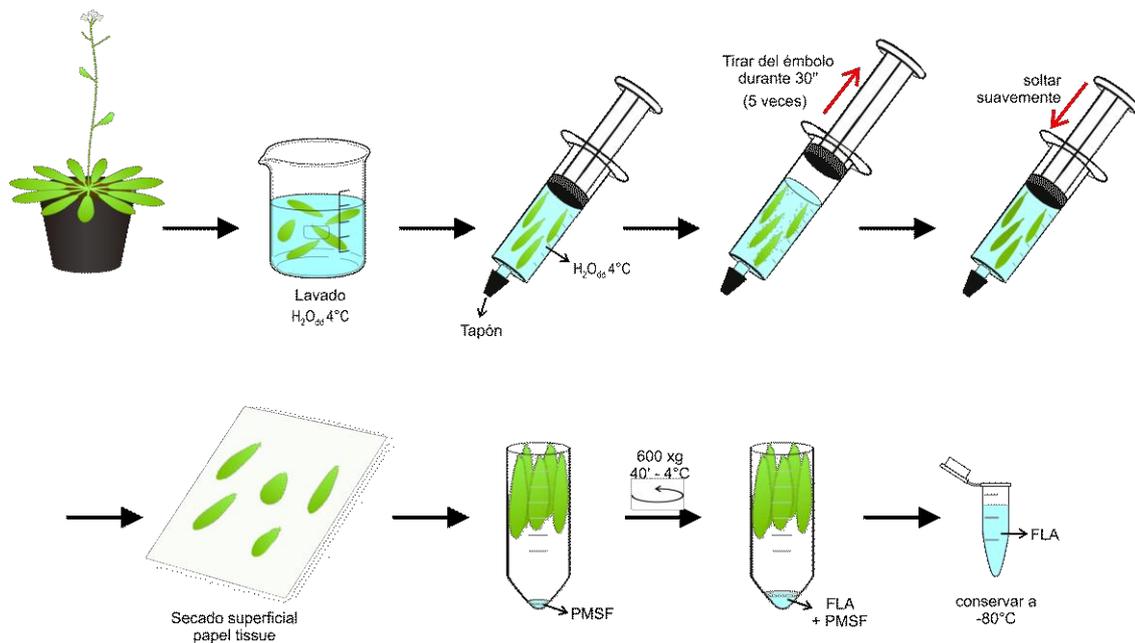


Figura 2.4. Esquema de la extracción de FLA de hojas de Arabidopsis.

Para cada alícuota de FLA obtenida se determinó el grado de contaminación de la fracción FA con componentes intracelulares (ver las técnicas utilizadas más adelante), y únicamente se trabajó con los FLA donde se detectó hasta un 0,2% máximo de contaminación respecto a los extractos de hoja correspondientes. Para *Arabidopsis* y otras especies generalmente se acepta hasta un 2-3% de contaminación de FLA por componentes intracelulares (Husted y Schjoerring, 1995; Seling *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2005; Agrawal *et al.*, 2010).

La concentración de metabolitos y proteínas del FA se calculó como se describe en (Husted y Schjoerring, 1995; Lohaus *et al.*, 2001), multiplicando la concentración medida en el FLA por el factor de dilución del FA:

$$F_{\text{dil FA}} = (V_{\text{aire}} + V_{\text{FA}}) / V_{\text{FA}}$$

Donde  $V_{\text{aire}}$  es el espacio apoplástico ocupado por aire y  $V_{\text{FA}}$  es el volumen de fluido apoplástico.

#### 4.2. Estimación del volumen de fluido apoplástico ( $V_{\text{FA}}$ ) y de aire apoplástico ( $V_{\text{aire}}$ ) de hojas. Técnica del Índigo Carmín

La estimación del  $V_{\text{FA}}$  se realizó mediante la técnica del Índigo Carmín, IC (indigo-5,5´ disulfonic acid, disodium Salt). Esta técnica se basa en utilizar una solución de Infiltración (ScIn) que contiene una concentración determinada del colorante IC para infiltrar las hojas y extraer FLA. Conociendo la concentración de IC en la ScIn (concentración inicial) y en el FLA (concentración final), se determina la dilución de IC y, por ende, la cantidad de  $V_{\text{FA}}$  en el FLA extraído. Se siguió el protocolo descrito en Husted y Schjoerring (1995) y Lohaus *et al.* (2001) con algunas modificaciones.

Las hojas se cortaron de la planta a mitad del pecíolo, se pesaron y se infiltraron en vacío con una ScIn que contiene IC (50  $\mu\text{M}$ ) disuelto en buffer fosfato de sodio 10 mM pH 6,2 enfriado a 4°C. La infiltración se realizó utilizando una jeringa como se describió previamente. Una vez que las hojas se infiltraron, se secó bien su superficie con papel tissue para remover el excedente de ScIn e inmediatamente se volvieron a pesar. El volumen de aire ( $V_{\text{aire}}$ ) se calculó a partir del incremento del peso de las hojas después de infiltrarlas, corregido por la densidad de la solución de índigo carmín. Asumiendo que luego de infiltrar las hojas no se produce flujo de agua entre el interior y exterior de las células, el volumen de aire es igual al volumen de solución infiltrada (Lohaus *et al.*, 2001). Como control, también se determinó el  $V_{\text{aire}}$  infiltrando las hojas con  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada. Inmediatamente luego de volver a pesarlas, se procedió a extraer FLA como se describió anteriormente, colocando las hojas infiltradas en tubos de 50 ml y

centrifugando a 4°C a 500-600 xg durante 40 minutos (Figura 2.5). La extracción de FLA se realizó inmediatamente o dentro de los 25 minutos luego de la infiltración, secado y pesado de las hojas. Se ha demostrado que el IC no difunde ni es transportado a través de la membrana plasmática de células del mesófilo de hojas infiltradas en frío durante un tiempo de incubación relativamente corto, y que la cantidad de IC que se adsorbe a las paredes celulares es despreciable (Husted y Schjoerring, 1995). La concentración de IC de la ScIn y en los FLA recuperados se determinó espectrofotométricamente midiendo Abs 610 nm. El volumen de FA ( $V_{FA}$ ) se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$V_{FA} = (V_{aire} \times Abs\ 610nm\ ScIn\ IC / Abs\ 610\ nm\ FLA) - V_{aire}$$

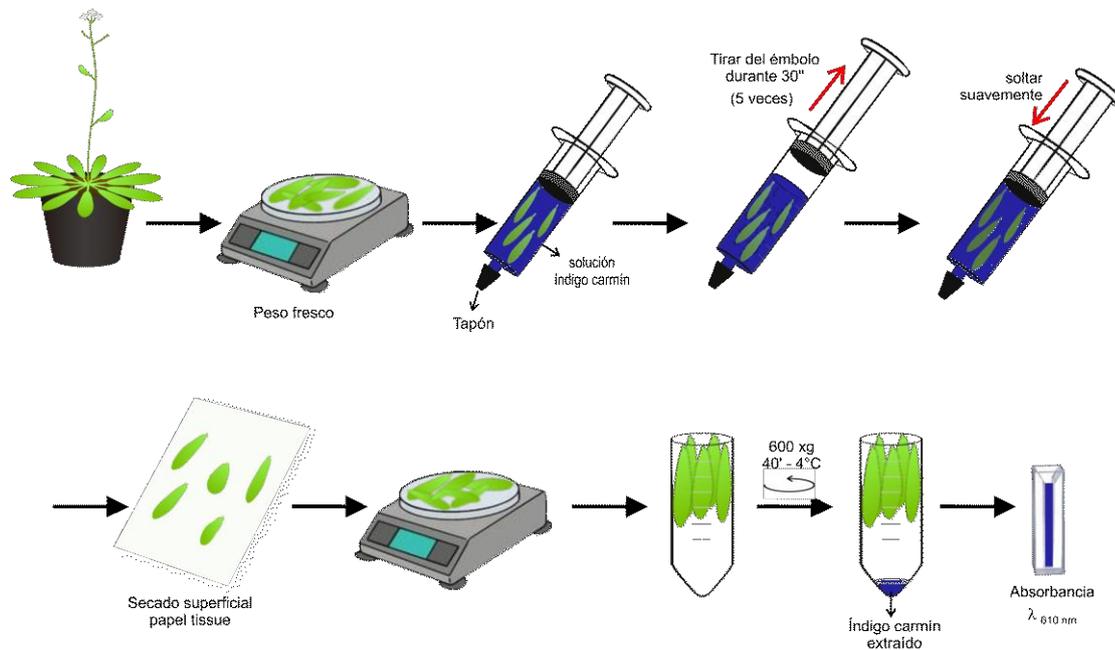


Figura 2.5. Esquema del ensayo de índigo carmín para calcular el  $V_{FA}$ .

### 4.3. Aclaraciones sobre el muestreo de los FLA analizados

Debido a la poca cantidad de FLA que se obtiene de una hoja de Arabidopsis, se necesitan varias hojas para lograr cantidades de FLA suficientes para realizar los distintos experimentos y por lo tanto sería prácticamente imposible realizar las comparaciones siguiendo la senescencia en una misma hoja. En esta tesis cada FLA analizado se obtuvo de un conjunto de hojas pertenecientes al mismo estadio de desarrollo y provenientes de una misma planta, con lo cual,

cada réplica biológica analizada está formada por el FLA de un conjunto de hojas equivalentes pertenecientes a una misma planta. Adicionalmente, trabajar con un pool de hojas tiene la ventaja de que las diferencias observadas son independientes del tipo de hoja utilizada y más representativas de lo que está ocurriendo a nivel de la roseta.

#### **4.4. Determinación de contaminación simplástica en el Fluido de Lavado Apoplástico (FLA)**

Se examinó la presencia de componentes de la fracción simplástica en los FLA obtenidos. Para esto se determinaron: 1- perfil de proteínas, 2- presencia, por inmunodetección, de la proteína citosólica Fructosa-1,6-bifosfatasa (FBP, EC: 3.1.3.11), y 3- presencia, por ensayo de actividad, enzimática de la enzima citosólica Glucosa-6-P-deshidrogenasa (G6PDH, EC 1.1.1.49). Los métodos de extracción, cuantificación y análisis de proteínas se describen en el punto 5 de este capítulo.

##### **4.4.1. Perfil de proteínas**

Se examinó comparativamente el perfil de proteínas solubles de la fracción FLA y de extractos totales del mismo grupo de hojas. Se utilizaron área (superficie foliar) y proteínas totales como parámetros de comparación.

##### **4.4.2. Inmunodetección de la proteína citosólica Fructosa-1,6-bifosfatasa (FBP, EC3.1.3.11)**

La fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBP) cataliza la descomposición de la fructosa-1,6-bifosfato (F1,6BP) en fructosa-6-fosfato (F6P) y Pi (Zimmermann *et al.*, 1976). Se han descrito tres isoformas de FBP en plantas, dos cloroplásticas (cFBP1 y cFBP2) y una isoforma citosólica (cyFBP) (Cséke y Buchanan, 1986; Serrato *et al.*, 2009).

La detección de FBP en los FLA y extractos de hojas se realizó mediante dot blot y western blot, como se describe en el punto 5.6 de este capítulo. Como anticuerpo primario se utilizó una dilución 1:5000 de un anticuerpo comercial específico para FBP. Como anticuerpo secundario se utilizó una dilución 1:10000 de un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado a HRP (Goat Anti Rabbit IgG Antibody, Sigma-Aldrich®).

##### **4.4.3. Ensayo de actividad enzimática Glucosa-6-P-deshidrogenasa (G6PDH, EC 1.1.1.49)**

La actividad enzimática del marcador citosólico G6PDH se cuantificó siguiendo el protocolo descrito en Ranieri *et al.* (1996) con algunas modificaciones según resultados publicados en Wakao y Benning (2005). El medio de incubación para determinar la actividad enzimática G6PDH consistió en 100mM Tris-HCl pH 8; 6,7 mM MgCl<sub>2</sub>, 12 mM glucosa-6-P; 0,4 mM

NADP<sup>+</sup> más la adición de 50  $\mu$ l de FLA o 10  $\mu$ l de extracto de proteínas totales de hojas cada 100  $\mu$ l finales de mezcla de reacción (Los FLA se obtuvieron como se describió previamente, en el punto 4.1 de esta sección, y la extracción de proteínas foliares totales se explica a continuación, en el punto 5.1.2). Como control negativo se utilizó el medio de incubación sin agregado de sustrato (glucosa-6-P). Se midió la Abs a 340 nm durante 6 min a 25 °C en un espectrofotómetro. La actividad G6PDH se expresó como  $\mu$ mol de NADP<sup>+</sup> reducido  $\times$  g<sup>-1</sup> de peso fresco de hojas  $\times$  min<sup>-1</sup> o bien como  $\mu$ mol de NADP<sup>+</sup> reducido  $\times$  mg<sup>-1</sup> proteína  $\times$  min<sup>-1</sup>.

## 5. Obtención, cuantificación y análisis de proteínas y péptidos

Se emplearon diversos protocolos, de acuerdo a los requerimientos de los distintos experimentos realizados

### 5.1. Extracción de proteínas de extractos foliares

#### 5.1.1. Extracción de proteínas para ensayos de cuantificación de proteínas totales y SDS-PAGE

Inmediatamente después de coleccionar las hojas, se cortaron 10 discos de 1 cm de diámetro con un sacabocado, se pesaron y se molieron en mortero con N<sub>2</sub> líquido y arena de cuarzo y se homogeneizaron en 400  $\mu$ l de buffer de extracción (50 mM Tris-HCl pH 8, 1% Polivinilpirrolidona (PVPP) insoluble, 2 mM EDTA, 10 mM PMSF). Todo el proceso de homogeneización se realizó a 4°C. Luego, el homogenato se centrifugó a 15000  $\times$  g a 4 °C durante 15 minutos. Se reservó el sobrenadante a -80 °C para su análisis.

#### 5.1.2. Extracción de proteínas para medir actividad enzimática

Inmediatamente después de coleccionar las hojas, se molieron 200 mg en mortero con N<sub>2</sub> líquido y arena de cuarzo y se homogeneizaron en 800  $\mu$ l de buffer de extracción (100 mM Tris-HCl pH 8, 4 mM PMSF). Todo el proceso de homogeneización se realizó a 4°C. Luego, el homogenato se centrifugó a 15000  $\times$  g a 4 °C durante 15 minutos. Al sobrenadante se le midió inmediatamente su actividad enzimática.

### 5.2. Cuantificación de proteínas y péptidos

#### 5.2.1. Método de Bradford

El método de Bradford (1976) involucra la unión del colorante hidrofóbico *Coomassie brilliant blue* G-250 a las proteínas y/o péptidos (interacciona con aminoácidos básicos, principalmente

arginina, y aromáticos), provocando un cambio en el máximo de absorción de 465 a 595 nm y se monitorea midiendo la absorbancia a 595 nm. Las diluciones acuosas de este colorante en presencia de ácido Fosfórico tienen un color pardo y al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas y péptidos y se puede medir fácilmente.

Cada muestra de extracto crudo de hoja, de FLA, y de blanco (el blanco es buffer sin muestra) se mezcló con el reactivo de Bradford (0,01% p/v *Coomassie Brilliant Blue* G-250; 4,7% v/v Etanol; 8.5% v/v ácido Ortofosfórico) en una proporción 45:5 de reactivo:muestra. La reacción se desarrolló a temperatura ambiente y a los 10 min se determinó el contenido de proteína por Abs a 595 nm. Para realizar la curva de calibración se empleó Albúmina de Suero Bovino (BSA) como estándar. La concentración de péptidos y proteínas del FA se calculó multiplicando la concentración medida en el FLA por el factor de dilución del FA ( $F_{dil\ FA}$ ).

### 5.2.2. Método del ácido bicinconínico (BCA)

Se utilizó el kit *Pierce® BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific) y se siguieron las indicaciones descriptas en el manual del fabricante. El ensayo de BCA de Pierce está basado en la reducción de  $Cu^{+2}$  a  $Cu^{+1}$  por proteínas en un medio alcalino (reacción de Biuret) y la subsecuente detección colorimétrica, sensible y específica, del  $Cu^{+1}$  usando ácido bicinconínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985). El BCA es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones  $Cu^{+1}$  en medio alcalino. La cantidad de  $Cu^{+2}$  reducido es proporcional a la concentración de proteínas y péptidos y puede ser determinada espectrofotométricamente por un cambio en el color de la solución a púrpura, el cual absorbe a 562 nm. Comparado con otros métodos, el ensayo de BCA es uno de los más sensibles (límite de detección 5  $\mu\text{g/mL}$ ) y además responde más uniformemente a diferentes proteínas (menor variabilidad) que el método de Bradford.

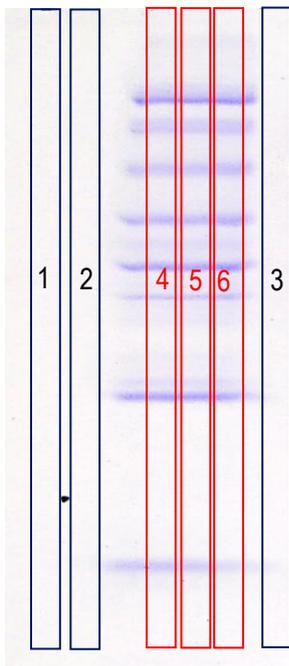
Se preparó el reactivo de trabajo BCA mezclando 50 partes de “reactivo A” con 1 parte de “reactivo B” (Pierce BCA catálogo No. 23225).

Cada estándar, cada muestra de extracto crudo de hoja obtenido y de FLA extraído y cada blanco se mezcló con el reactivo de trabajo BCA en proporciones 8:1 de reactivo:muestra y se incubó a 37 °C durante 30 minutos con agitación. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 562 nm usando un espectrofotómetro y/o un lector de placa CLARIOStar® (BMG Labtech). Para realizar la curva de calibración se empleó BSA como

estándar. La concentración de péptidos y proteínas del FA se calculó multiplicando la concentración medida en el FLA por el factor de dilución del FA ( $F_{dil\ FA}$ ).

### 5.3. Cuantificación de proteínas en calles de gels de SDS-PAGE por densitometría

La concentración relativa de proteínas en las distintas calles de un mismo gel de SDS-PAGE se determinó utilizando el software “ImageJ 1.6” (*National Institutes of Health, USA*). La cuantificación de proteínas en cada calle del gel se realizó sobre una imagen en formato .jpg del gel de interés teñido previamente con una solución de *Coomassie Brilliant Blue R-250*, utilizando la aplicación “*Analyze→Gels*”. Para cada calle, se calculó el promedio de la intensidad de píxeles totales de tres áreas rectangulares iguales, cada área incluyó todo el largo de la calle y aproximadamente 1/5 del ancho. Para calcular la intensidad de píxeles del blanco se procedió de la misma manera que para las calles de interés, sin embargo en este caso las áreas incluyeron sectores del gel libres de proteína. La cantidad de proteínas de cada calle se expresó como la intensidad de píxeles promedio de las tres áreas de la calle menos la intensidad de píxeles promedio de las tres áreas del blanco (Figura 2.6).



**Figura 2.6. Cuantificación de proteínas en calles de gels de SDS-PAGE por densitometría.** Las áreas 4, 5 y 6 (en rojo) corresponden a la calle de interés. Las áreas 1, 2 y 3 (en negro) corresponden al blanco. Se midió la intensidad de píxeles totales de cada área y se promediaron por un lado las áreas correspondientes al blanco (1, 2 y 3) y por otro lado, las áreas correspondientes a la calle de interés (4, 5 y 6). La cantidad de proteínas de la calle se expresó como la intensidad de píxeles promedio de las áreas 4, 5 y 6 restada por la intensidad de píxeles promedio de las áreas 1, 2 y 3

#### **5.4. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).**

La técnica de electroforesis permite la separación de proteínas según su relación carga/masa, o solamente según su masa si se incorpora el detergente aniónico SDS (dodecil-sulfato de sodio), cuando se mueven a través de un gel poroso por la aplicación de un campo eléctrico. Esta técnica tiene gran utilidad ya que a través de la movilidad electroforética relativa se puede determinar el peso molecular de las proteínas. En la práctica se utilizan patrones de peso molecular (PM o MW) conocido y comparando las distancias recorridas se puede calcular el peso molecular.

El análisis electroforético de las muestras proteicas se efectuó utilizando el equipo Mini-PROTEAN® III (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se emplearon geles de poliacrilamida, una matriz polimerizada de acrilamida y N,N'-metilen-(bis-acrilamida), en una relación de 30% p/v de acrilamida y 1% p/v de bis-acrilamida. Para la preparación del gel se siguió el método descrito por Laemmli (1970) que consiste en dos geles consecutivos con distinta porosidad y pH: el superior es un gel de apilamiento de proteínas de poliacrilamida 4% p/v y pH 6,8; seguido por un gel separador de proteínas de poliacrilamida 12% y pH 8,8. Se agregó el detergente aniónico SDS 1% p/v a los geles y al buffer de corrida.

##### **5.4.1. Preparación de los FLA**

Previo a su siembra en el gel de poliacrilamida, los FLA fueron concentrados. Para esto se utilizaron dos métodos:

###### **5.4.1.1. Precipitación con acetona fría**

Se siguió el protocolo descrito en Jiang et al. (2004) con algunas modificaciones. Se mezclaron 5 volúmenes de acetona a -20 °C por cada volumen de muestra en tubos de centrifuga, esto se realizó en una cámara fría (4 °C). Se dejó O.N. a -20°C y se centrifugó a 4°C a 11000 RPM durante 15 min. Luego se descartó la acetona y se dejaron los tubos boca abajo aproximadamente 30 min para eliminar restos de acetona. Los pellet se resuspendieron en SB 1X.

###### **5.4.1.2. Liofilización**

Las muestras se congelaron a -80 °C en tubos eppendorf de 1,5 ml y se liofilizaron durante 5 o 24 hs dependiendo del liofilizador utilizado. Para algunas muestras se empleó el liofilizador

Rifcor® modelo L-T4, y para otras, el liofilizador Scientz® modelo 10 N. Los liofilizados se resuspendieron en SB 1X.

La concentración de proteínas y péptidos se determinó con el kit de Pierce®, *BCA Protein Assay Kit*.

#### 5.4.2. Siembra de muestras en el gel SDS PAGE:

Las muestras de extractos de proteínas foliares se diluyeron con “sample” buffer (SB) 4X (250 mM Tris-HCl pH 6,8; 8% p/v SDS; 40% v/v glicerol; 20% v/v β-mercaptoetanol; 0,004% p/v azul de bromofenol) en proporción 3:1 de muestra: SB 4X, y se centrifugaron a 15000 xg durante 3 min en frío. Las muestras de FLA previamente liofilizadas o precipitadas se resuspendieron en SB 1X y se centrifugaron a 15000 xg durante 3 min en frío. Los sobrenadantes se sembraron en las calles del gel y se sometieron a electroforesis a 12-13 mA (dependiendo del grosor del gel) de corriente constante y voltaje variable durante toda la corrida.

### 5.5. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida

#### 5.5.1. Coomassie Brilliant Blue (CBB)

Una vez finalizadas las corridas electroforéticas, los geles se transfirieron a recipientes con solución de tinción formada por 0,1% p/v *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Sigma®), 50% v/v de Metanol, 10 % v/v de ácido Acético glacial. Los geles se mantuvieron en la solución de tinción durante toda la noche en agitación a temperatura ambiente. Los geles se destiñeron con una solución de 20% v/v de Metanol y 7% v/v de ácido Acético glacial.

#### 5.5.2. Coomassie Blue Coloidal

Este método de tinción se utilizó para los geles de los cuales se extrajeron bandas de proteínas para analizar por espectrometría de masas (MALDI-TOF). La tinción *Coomassie Blue Coloidal* es más sensible que la CBB (límite de detección ~10 ng y ~100 ng respectivamente) y más reproducible (la tinción coloidal no penetra en el gel, por lo tanto no requiere desteñido) (Weiss *et al.*, 2009).

Una vez finalizada la electroforesis, se fijaron las proteínas dejando el gel en la solución fijadora (30% v/v Etanol; 2% ácido Fosfórico) toda la noche. Luego se lavó tres veces durante 30 min con H<sub>2</sub>O bidestilada. Se agregó la solución de tinción (18% v/v Metanol; 17 % p/v (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 2% v/v ácido Fosfórico) y se dejó en agitación durante una hora. Luego se agregó 0.5 g/L

*Coomassie Brilliant Blue G-250* (Sigma®) en polvo al gel en la solución de tinción y se agitó suavemente por 1-2 días. Finalmente se lavó el gel con H<sub>2</sub>O bidestilada y se procedió a extraer las bandas inmediatamente.

## 5.6. Inmunodetección de proteínas

### 5.6.1. Análisis de proteínas por *Western blot*

El western blot es una técnica analítica utilizada para inmunodetectar proteínas específicas en una muestra determinada. Mediante una electroforesis en gel se separan las proteínas y luego son electro-transferidas del gel a una membrana de nitrocelulosa. Los antígenos que se han transferido a la membrana son detectados por anticuerpos específicos.

Para la transferencia de las proteínas separadas mediante SDS-PAGE a la membrana de nitrocelulosa de 0,2  $\mu$ m de Bio-Rad® se utilizó el sistema Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell de Bio-Rad® (*Bio-Rad Laboratorios*) y se procedió de acuerdo a las especificaciones del fabricante descritas en el manual de instrucciones. La transferencia se llevó a cabo a 150 mA durante 90 minutos en *buffer* de transferencia frío (48 mM TRIS; 39 mM Glicina; 0,04% p/v SDS y 20% v/v Metanol). Una vez finalizada la transferencia, se tiñeron las proteínas con Rojo Ponceau (0,1% p/v de Rojo Ponceau S y 5% p/v de ácido acético) durante 15 min en agitación, seguido de lavado con agua bidestilada. El bloqueo de la membrana se realizó con 10% p/v de leche descremada en PBS-T (8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,45 M NaCl, 0,05% v/v Tween-20) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Se realizó un lavado en PBS-T durante unos segundos. Se incubó la membrana durante toda la noche en frío (4 °C) con la dilución adecuada del anticuerpo primario en PBS-T con 1,5% p/v de leche descremada. Se realizaron 5 lavados con PBS-T durante 5 minutos en agitación. Se incubó la membrana durante 2 horas a temperatura ambiente con la dilución del anticuerpo secundario en PBS-T con 1,5% p/v de leche descremada. Se realizaron 5 lavados con PBS-T durante 5 minutos en agitación. Para el revelado de la membrana se utilizó una solución de quimioluminiscencia preparada en el momento, formada por partes iguales de solución A (100 mM Tris-HCl pH 8,5; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,06%) y solución B (100 mM Tris-HCl pH 8,5; 2,5 mM Luminol; 0,4 mM ácido p-cumárico), se incubó la membrana por unos segundos, se retiraron los restos del sustrato y se expuso a una placa radiográfica durante el tiempo necesario y luego se reveló.

### 5.6.2. Dot blot

Se sembraron 5-10  $\mu\text{l}$  de cada muestra y controles en una membrana de nitrocelulosa de 0,2  $\mu\text{m}$  de Bio-Rad®. Se bloqueó la membrana con 10% p/v de leche descremada en PBS-T. Los lavados de la membrana, incubación con anticuerpos y revelado se llevaron a cabo de la misma manera que para el western blot.

## 6. Análisis proteómico masivo (*shotgun*) por espectrometría de masas de muestras de FLA

### 6.1. Preparación de las muestras

Se liofilizaron cantidades iguales de proteínas de FLA de los estadios de hojas a comparar, como se describió previamente (punto 5.4.1.2 de este capítulo) y se resuspendieron en cantidades iguales de una solución de urea 8M hasta lograr una concentración de proteínas final de 0,85 mg/ml para cada una de las muestras. Se enviaron alícuotas de las réplicas biológicas al servicio de espectrometría de masas del CEQUIBIEM (*Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa*) de la UBA para su análisis (se reservaron alícuotas de cada réplica para otros ensayos).

La concentración de proteínas totales se determinó antes de liofilizar y luego de resuspender las muestras en urea 8M. La cuantificación de proteínas totales se realizó con el kit *Pierce® BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific) como en el punto 5.2.2 de este capítulo, según la recomendación del servicio de espectrometría de masas. Para las muestras en urea 8 M, se tomaron alícuotas y se cuantificaron diluciones compatibles con el método del BCA.

La reducción, alquilación y digestión triptica de las muestras fueron realizadas en el CEQUIBIEM. Para la reducción y alquilación, se tomó una alícuota de muestra que contenía 0,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de proteína en  $\text{HCO}_3\text{NH}_4$  50 mM. Se adicionó 1  $\mu\text{l}$  de DTT 1M en  $\text{HCO}_3\text{NH}_4$  50 mM y se incubó 45 min a 56-60 °C. Se adicionaron 2  $\mu\text{l}$  de Iodoacetamida 550 mM en  $\text{HCO}_3\text{NH}_4$  50 mM y se incubó 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Se adicionó 0,5  $\mu\text{l}$  de DTT 1 M en  $\text{HCO}_3\text{NH}_4$  50 mM y se Incubó 10 min a 56-60 °C. Se lavó con  $\text{HCO}_3\text{NH}_4$  25mM y acetonitrilo (ACN) 50% v/v. Finalmente se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de ACN, se descartó y se dejó secar al aire. Para realizar la digestión triptica en solución, se agregó aproximadamente 1,5  $\mu\text{l}$  de tripsina 100 ng/ $\mu\text{l}$  en ácido acético 10 mM (relación Tripsina/proteína 1/100 aproximadamente) y se dejó incubando toda la noche a 37°C. Al siguiente día se extrajeron los péptidos agregando

ácido trifluoroacético (TFA) hasta  $\text{pH} \leq 4$ . Se realizó una limpieza con Zip-Tip C18 para extraer las sales.

## 6.2. Análisis de proteínas por Orbitrap

Los péptidos trípticos de cada muestra se analizaron por LC-MSMS mediante un *nanoHPLC-ESI-Orbitrap*, modelo *Q-Exactive*, marca *Thermo Scientific* (Figura 2.7). Este equipo está conformado por un cromatógrafo nanoHPLC (apto para separar mezclas de péptidos trípticos con un alto grado de resolución utilizando una columna de fase reversa) acoplado a un espectrómetro de masa que cuenta con un analizador Orbitrap, lo que permite en primer lugar una separación de los péptidos obtenidos por digestión tríptica de la muestra y una posterior identificación de los mismos. La ionización de las muestras se realiza por electrospray (ESI). Los iones son separados según su  $m/z$  en el analizador Orbitrap de alta resolución. En este tipo de analizador, los iones giran alrededor de un electrodo central y también se mueven hacia los lados del eje horizontal del electrodo, describiendo orbitas que son dependientes de la relación  $m/z$ . El equipo cuenta con una celda de colisión HCD (High Collision Dissociation), que permite realizar espectros MSMS de iones peptídicos seleccionados. Los iones peptídicos elegidos para realizarles MSMS son seleccionados en un analizador cuadrupolo en el cuál se determina qué  $m/z$  es transmitida, esto se logra aplicando un voltaje de radiofrecuencia que permita a un determinado ión atravesar el analizador. Ese ión seleccionado luego pasa a la celda de colisión HCD y sus productos de fragmentación pasan al analizador orbitrap (previa retención en la C-Trap).

Se utilizó un método que realiza la mayor cantidad de ciclos de medición por unidad de tiempo. En cada ciclo el equipo hace un Full MS y luego hace MSMS a los 12 o 15 picos de mejor relación señal:ruido en ese ciclo, con un rango de exclusión dinámico para evitar que un mismo pico sea fragmentado más de una vez en el mismo pico de elución del cromatograma.

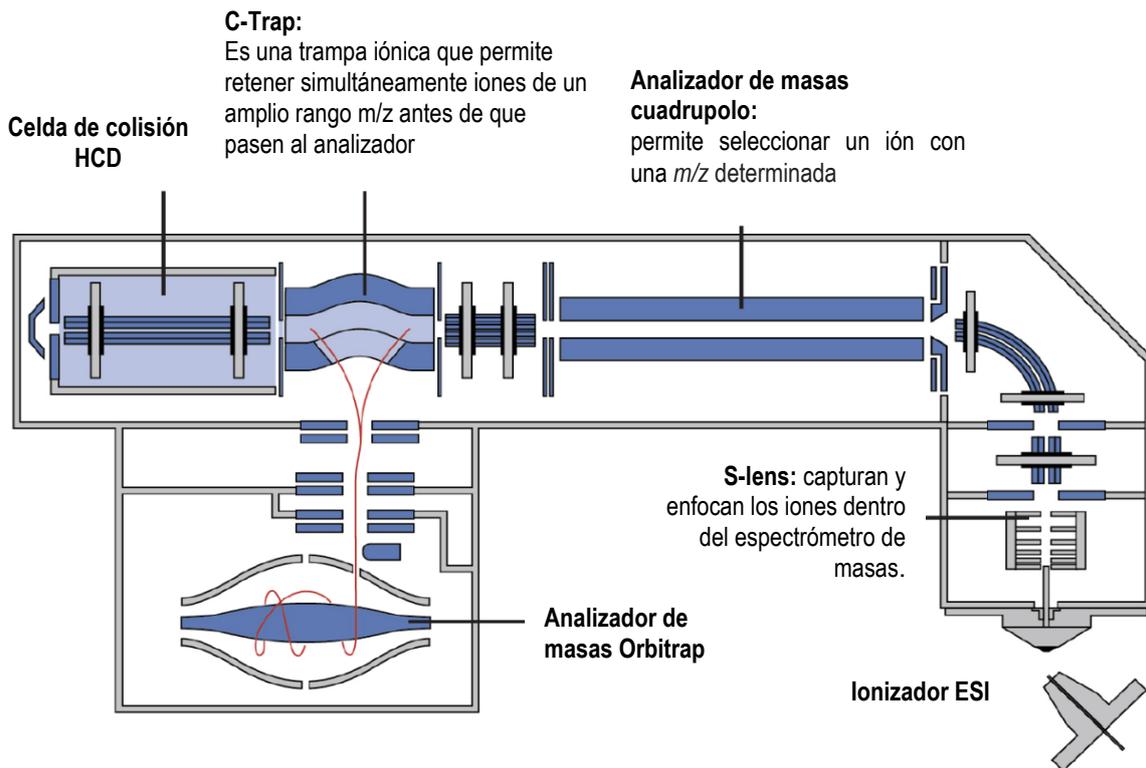


Figura 2.7. Esquema de las principales partes del espectrómetro de masas Orbitrap Q-Exactive, Thermo Scientific.

### 6.3. Análisis de datos

Los espectros obtenidos se analizaron con el programa Proteome Discoverer utilizando la base de datos correspondiente a *Arabidopsis thaliana*. Proteome Discoverer es un motor de búsqueda en el cual el usuario debe seleccionar la base de datos y ciertas características que se vinculan con la forma en que fue tratada la muestra. En base a esta información y a los datos crudos obtenidos del espectrómetro de masa, el programa desarrolla un informe donde indica qué proteínas fueron identificadas y los péptidos que utilizó para esta identificación.

El método de cuantificación relativa utilizado es *label-free-quantification*. Este método se basa en la asunción de que, bajo condiciones controladas y con suficientes replicados técnicos, péptidos idénticos se pueden comparar directamente, a lo largo de diferentes experimentos de LC-MS/MS. Esto es posible gracias al poder de resolución del analizador Orbitrap para separar iones de  $m/z$  muy similar.

La cuantificación se realiza con el cálculo de áreas para cada proteína. El cálculo de estas áreas se realiza según los algoritmos usados por el programa Proteome Discoverer.

Finalizada la búsqueda con el Proteome Discoverer, los datos se exportan a una planilla de Excel para proceder con la normalización manual de las áreas de cada proteína identificada y luego procesar con el Perseus, un software que permite realizar un trabajo estadístico más profundo sobre los datos obtenidos con Proteome Discoverer.

### 6.3.1. Criterios de búsqueda

Base de datos (origen): “*Arabidopsis thaliana* (Mouse-ear cress) (Strain: cv. Columbia) (UNIPROT: Proteome ID UP000006548)”

Enzima: Tripsina

Miscleavage: 2

Tolerancia de masa para precursor: 5 ppm

Tolerancia de masa para fragmento: 0,02 Da

Modificaciones Dinámicas: Oxidación (M)

Modificaciones estáticas: Carbamidametilación (C)

Nivel de confianza de los péptidos: Alta

## 7. Identificación por Orbitrap de proteínas separadas por SDS-PAGE

Las bandas mayoritarias detectadas en geles SDS-PAGE de proteínas FLA fueron extraídas de los geles y tratadas para su identificación por espectrometría de masas:

### 7.1. Preparación de las muestras y análisis por Orbitrap

Se corrieron alícuotas de FLA de hojas resuspendidas en urea 8 M con 0,85 mg/ml proteína en geles SDS-PAGE como se describió previamente. Una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron con Coomassie Blue Coloidal. Una vez que las bandas se hicieron visibles se procedió a su disección del gel. Este procedimiento se llevó a cabo en una cámara de flujo laminar tomando todas las precauciones necesarias para evitar la contaminación de las muestras con queratina (uso de guantes, barbijo, cofia, hojas de bisturí nuevas y estériles). Las bandas se cortaron con bisturí delineando específicamente el área ocupada por la banda más abundante, y un área equivalente a esta en el caso de las bandas menos abundantes. Además se disectó un

trozo de gel de la misma superficie, pero sin muestra, como control. Los trozos de gel se enviaron al CEQUIBIEM para su posterior análisis por espectrometría de masas.

En el servicio de espectrometría los trozos de gel se lavaron con H<sub>2</sub>O miliQ y con HCO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub> más el agregado de ACN. Posteriormente fueron reducidas con DTT 20 mM en HCO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub> 50 mM durante 45 minutos a 56 °C y alquiladas con Iodoacetamida 20 mM en HCO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub> 50 mM durante 45 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Luego se lavaron con HCO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub> más el agregado de ACN. Se realizó la digestión trípica en gel durante toda la noche: se adicionó a cada taquito de gel tripsina 10ng/μl en ácido acético 10 mM y se dejó hidratando 10 min, 4 °C (en hielo); se agregaron 10 μl de bicarbonato de amonio 25 mM y se dejó incubando toda la noche a 37°C. Se realizó la extracción de los péptidos con ACN 50%/TFA 0,5%. A los digeridos con tripsina se les realizó una limpieza con Zip-Tip C18 para extraer las sales. Las muestras fueron liofilizadas por Speed Vac y vueltas a resuspender con 10 ul de Ácido Fórmico 0,1%.

El Análisis de proteínas por Orbitrap se realizó de la misma manera que en el punto 6.2 de este capítulo.

#### 7.1.1. Análisis de Datos

A fin de identificar las proteínas presentes en las muestras, los espectros obtenidos se analizaron con el programa Proteome Discoverer, y se utilizó la base de datos de *Arabidopsis thaliana* (los criterios de búsqueda se explicaron previamente en el punto 6.3.1). Se realizó una aproximación cuantitativa en base al número total de secuencias de péptidos identificados de cada proteína identificada (#PSM, *Peptide Spectrum Matches*).

## 8. Extracción y cuantificación de Aminoácidos totales

Para la medición del contenido de aminoácidos (a.a.) se utilizó una adaptación de la técnica de Rosen (1957).

### 8.1. Obtención de a.a. totales de hojas

Las hojas de *Arabidopsis* fueron homogenizadas en mortero, y los aminoácidos se obtuvieron por sucesivas extracciones con alcohol etílico a 4 °C (en hielo) (Rosen, 1957). Dos discos de hoja de 1 cm de diámetro se homogeneizaron en frío, en N líquido con etanol 80% v/v. El homogenato se recuperó en un tubo de centrifuga de 1,5 ml y se centrifugó durante 10 min a

9000 xg a 4 °C, se reservó el sobrenadante y el pellet se homogeneizó con etanol 60% v/v, se centrifugó 10 min a 9000 xg a 4 °C y este sobrenadante se añadió al sobrenadante anterior. Por último, el pellet se homogeneizó con agua bidestilada, se centrifugó 10 min a 9000 xg a 4 °C y el sobrenadante obtenido se agregó a los sobrenadantes obtenidos previamente.

## 8.2. Obtención de a.a. del FA

Se extrajeron los a.a solubles en el FA mediante la técnica de infiltración-centrifugación, como se describió previamente, utilizando ddH<sub>2</sub>O como solución de infiltración. Los FLA así obtenidos se utilizaron para cuantificar a.a.

## 8.3. Cuantificación de a.a.

Se utilizó la técnica de Ninhidrina (Rosen, 1957). La ninhidrina, que originalmente es amarilla, reacciona con los alfa-aminoácidos y se vuelve púrpura (color detectado). La ninhidrina reacciona con los grupos  $\alpha$ -amino libres (NH<sub>2</sub>-C-COOH), esto incluye  $\alpha$ -aminoácidos, imino ácidos, amino alcoholes, amidas primarias. En una mezcla biológica, únicamente la urea puede existir en concentraciones suficientemente altas como para interferir con el análisis de los  $\alpha$ -aminoácidos; proteínas y péptidos no reaccionan (Rosen, 1957).

La mezcla de reacción colorimétrica consistió en volúmenes iguales de muestra (o estándar), solución de ninhidrina (4% de ninhidrina en Dimetilsulfóxido) y solución de reacción (4 M Buffer AcOH/NaAc pH 5,3 y 0,0002 M KCN), colocados en tubos de centrifuga de 2 ml. Inmediatamente después se calentaron los tubos a 100 °C durante 15 min, la reacción fue detenida con alcohol isopropílico 50% en ddH<sub>2</sub>O. Se midió la absorbancia de las muestras y el estándar mediante espectrofotometría a 570 nm. Para la curva de calibración se usó ácido glutámico como estándar. Las concentraciones de a.a. del FA se calcularon multiplicando la concentración en el FLA por el  $F_{dil\ FA}$  correspondiente.

## 9. Determinación del pH apoplástico foliar

### 9.1. Material vegetal utilizado

Se utilizaron plantas de Arabidopsis Apo-pHusion que expresan en el apoplasto el sensor de pH apo-mRFP1-EGFP (Gjetting *et al.*, 2012). EGFP es muy sensible a cambios en el pH, la mayor señal de EGFP se da a pH 7-8 y a medida que disminuye el pH la fluorescencia de EGFP se va debilitando, hasta apagarse totalmente a pH < 5 (pKa = 6,15). Por el contrario, mRFP1 es

prácticamente insensible a cambios en el pH dentro del rango de pH fisiológico ( $pK_a = 4,5$ ). Con valores de  $pK_a$  de los dos fluoróforos en el intervalo ácido, este sensor es adecuado para mediciones de pH en el apoplasto de tejidos vegetales (Gjetting *et al.*, 2012).

## 9.2. Determinación del pH del apoplasto de hojas *in vivo* por microscopia de fluorescencia

El pH se calculó por la relación de fluorescencia entre EGFP y mRFP1 en el apoplasto de la epidermis de hojas registrada *in vivo* con un microscopio confocal (los detalles del microscopio, y seteos utilizados se describen a continuación). Luego de la captura de imágenes, con el software ImageJ se calculó para cada región de interés (ROI) la relación de intensidades de pixeles promedio EGFP/mRFP1. Para calcular el pH de cada ROI se extrapoló el valor de la relación de intensidades EGFP/mRFP1 del ROI sobre la gráfica de una curva de calibración del sensor.

### 9.2.1. Calibración *in vitro* del sensor

La curva se generó utilizando FLA extraído de plantas apo-mRFP1–EGFP (la extracción de FLA de hojas de Arabidopsis se describió en el punto 4.1). El FLA se incubó con buffers de distintos pH (ver Tabla 2.1 con la composición de los buffers) y se analizó por microscopía confocal. Luego de la captura de imágenes, con el software ImageJ se calculó la relación de la intensidad de la señal de fluorescencia EGFP/mRFP1 para cada valor de pH, y con el software GraphPad Prism se realizó un ajuste no lineal de la relación EGFP/mRFP1 vs pH y se generó una curva de calibración sigmoide.

pH	Buffer
5,0	MES 300 mM
5,5	MES 300 mM
5,7	MES 300 mM
6,0	MES 300 mM
6,3	MES 300 mM
6,5	MES 300 mM
7,0	Tris HCl 300 mM
7,5	Tris HCl 300 mM
8,0	Tris HCl 300 mM

**Tabla 2.1.** Buffers utilizados para construir la curva de calibración del sensor de pH.

### 9.2.2. Análisis de Imágenes. Relación de fluorescencia EGFP/mRFP1

Con el software ImageJ, se generaron imágenes de relación de fluorescencia EGFP/mRFP1 mediante la superposición de imágenes confocales correspondientes a los canales EGFP y mRFP. Para la presentación visual de las imágenes de relación, a partir de la calibración *in vitro* del sensor se diseñó y ajustó una tabla de pseudo color que abarcó el rango dinámico del sensor.

### 9.2.3. Microscopia de fluorescencia

Para la inspección de localización, intensidad, etc de los fluoróforos analizados (línea Apo-pHusion), el material vegetal se observó en un microscopio de epifluorescencia Olympus® BX-51, y en el microscopio confocal Leica® TCS SP5 II. El microscopio Olympus® BX-51 posee dos cubos de fluorescencia: con máximos de excitación/emisión de 545/580 y 470/525 nm. Este microscopio dispone de una cámara digital Olympus® A330 adaptada para la captura de imágenes.

En el caso del microscopio confocal, Se utilizaron las siguientes condiciones de excitación/emisión: fluorescencia de la clorofila 633/670-730 nm, EGFP 488/524–550 nm, mRFP1 543/566–634 nm. Las imágenes fueron adquiridas con el software LAS AF versión 2.2.1 y se procesaron con el software ImageJ.

## 10. Aislamiento de polisacáridos de la pared celular

### 10.1. Obtención de Residuos Insolubles en Alcohol (RIA)

Los polisacáridos de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y pectinas) se obtuvieron como Residuos Insolubles en Alcohol, (RIA) según Nardi et al. (2015) con algunas modificaciones.

Se homogeneizó un gramo (peso fresco) de hojas de la roseta en mortero con N<sub>2</sub> líquido. El polvo resultante se mezcló con 4 ml de EtOH 100% y luego se incubó en baño a 80°C durante 30 minutos. Una vez que el homogenato se enfrió a T° amb, se le agregó 4 ml de EtOH 100 % y se colocó en tubo de polipropileno de 15 ml previamente pesado. Se centrifugó a 10000 xg durante 5 min a T° amb y se descartó el sobrenadante. Se agregó 8 ml de EtOH 100% al precipitado del tubo y se volvió a centrifugar, este proceso de lavado del precipitado se repitió hasta que el precipitado se tornó color blanco-grisáceo (aproximadamente 8 lavados). Luego, el tubo conteniendo el precipitado se colocó en estufa a 30 °C por varios días, hasta la evaporación completa del alcohol remanente en el RIA.

## 10.2. Estimación de la cantidad de pared celular

Para estimar la cantidad de pared celular, se restó a cada RIA su contenido de almidón (ver a continuación).

## 11. Extracción y cuantificación de almidón

### 11.1.1. Extracción de almidón del RIA

Para determinar el contenido de almidón de los RIA, en primera instancia se extrajo el almidón del RIA según Carpita and Kanabus (1987) con algunas modificaciones. Se agregó DMSO 90 % v/v al RIA obtenido, en una proporción de 20 ml DMSO 90% v/v cada 100 mg de RIA y se dejó 48 hs a T° ambiente para disolver el almidón. Se centrifugó a 9000 xg durante 5 minutos y se guardó el sobrenadante diluido 1/2 con ddH<sub>2</sub>O para cuantificar almidón (punto 11.1.3 de esta sección), y el pellet para extraer pectinas (punto 12.1.1 de este capítulo).

### 11.1.2. Extracción de almidón de discos de hojas

Se molieron en mortero 2 discos de hoja de 1 cm de diámetro y se homogeneizaron en 1,5 ml de acetona fría (4 °C) con una pizca de arena de cuarzo. Todo el proceso de homogeneización se realizó a 4 °C. Luego, el homogenato se centrifugó a 10000 rpm y 4 °C durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se re-suspendió el pellet con 1,5 ml de etanol 80%. Se centrifugó a 11000 rpm y 4 °C durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1,5 ml de HCl 1,1%. Se colocó en baño de agua a 100 °C durante 30 min. Se centrifugó a 11000 rpm y 4 °C y se reservó el sobrenadante diluido 1/3 con ddH<sub>2</sub>O (extracto para medir almidón).

### 11.1.3. Cuantificación de almidón

Se siguió el protocolo descrito en Perini et al. (2017) con algunas modificaciones. Se mezcló 0,1 ml del extracto de almidón obtenido previamente (puntos 11.1.1 y 11.1.2), o patrón para la curva de calibración, con 1 ml de antrona al 0,05% p/v en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 66% v/v. La mezcla se incubó a 100 °C durante 10 minutos, se enfrió en un baño de agua a temperatura ambiente y el contenido de almidón se midió espectrofotométricamente a 620 nm, usando cantidades variables de glucosa 10 mM como patrones.

## 12. Cuantificación de ácidos urónicos

### 12.1. Cuantificación de ácidos urónicos del RIA

#### 12.1.1. Extracción de pectinas totales

Se siguió el protocolo descrito en Rosli et al. (2004) con algunas modificaciones. Brevemente, 100 mg de RIA (al cual previamente se le extrajo el almidón) se mezclaron con 50 ml de HCl 0,01 M. Esta mezcla se colocó a baño María durante 2 hs. Luego se dejó enfriar a T° ambiente y se filtró. Se reservó la solución filtrada para proceder a la cuantificación de pectinas.

#### 12.1.2. Hidrólisis de pectinas

Previamente al ensayo colorimétrico, las pectinas presentes en las muestras se deben hidrolizar a sus ácidos urónicos constituyentes. Para ello, se mezclaron 100  $\mu$ l del filtrado de pectinas obtenido en el punto anterior con 600  $\mu$ l de tetraborato de Na 0,0125 M en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Se incubó a baño María durante 20 minutos y luego se dejó enfriar.

#### 12.1.3. Ensayo colorimétrico

Se utilizó el método colorimétrico del fenil-fenol (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973). Se mezclaron 200  $\mu$ l de hidrolizado con 140  $\mu$ l de buffer HAc/Ac 50 mM pH 5,5 y 1480  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / tetraborato de Na 0,0125 M, se incubó a baño María durante 15 min y se dejó enfriar en baño de agua hielo. Luego, se mezclaron enérgicamente 800  $\mu$ l de la mezcla de reacción con 13  $\mu$ l de fenilfenol (solución de fenilfenol 0,15% en NaOH 0,5%) utilizando un vortex. Adicionalmente para el blanco se mezclaron 800  $\mu$ l de la mezcla de reacción con 13  $\mu$ l de buffer HAc/Ac. El color se termina de producir luego de diez minutos y permanece estable por una hora. Durante ese período de tiempo se procedió a medir la absorbancia a 520 nm. Para construir la curva estándar se utilizó ácido galacturónico (Gal) como patrón.

### 12.2. Cuantificación de ácidos urónicos de los FLA

Se utilizó el método colorimétrico del fenil-fenol (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973) adaptado por Filisetti-Cozzi and Carpita (1991) para muestras con baja proporción ácidos urónicos/azúcares neutros.

#### 12.2.1. Hidrólisis de las muestras de FLA

Previamente al ensayo colorimétrico las pectinas presentes en las muestras se hidrolizaron a sus ácidos urónicos constituyentes. Para ello, se mezclaron 100  $\mu$ l de FLA con 337,5  $\mu$ l de tetraborato de Na 0,0125 M en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado más el agregado de 44  $\mu$ l de una solución de

ácido sulfámico 4M/sulfamato de potasio pH 1,6. Se incubó a baño María durante 20 minutos y luego se dejó enfriar. La solución de ácido sulfámico 4 M/sulfamato de potasio se agregó para prevenir que los hidrolizados se vuelvan color marrón a causa de la reacción de carbohidratos no urónicos presentes en la muestra con ácido sulfúrico y calor, lo que interferiría en la reacción colorimétrica posterior.

#### **12.2.2. Ensayo colorimétrico**

Se mezclaron 160  $\mu\text{l}$  de hidrolizado con 20  $\mu\text{l}$  de buffer HAc/Ac 50 mM pH 5,5 y 80  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  / tetraborato de Na 0,0125 M. Se incubó a baño María durante 15 min y se dejó enfriar en baño de agua hielo. Se mezclaron enérgicamente 100  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción con 1,5  $\mu\text{l}$  de fenilfenol (solución de fenilfenol 0,15 % en NaOH 0,5%) utilizando un vortex. Adicionalmente para el blanco se mezclaron 100  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción con 1,5  $\mu\text{l}$  de buffer HAc/Ac. Dentro de la hora siguiente se procedió a medir la absorbancia a 520 nm. Para construir la curva estándar se utilizó ácido galacturónico (Gal) como patrón.



**CAPÍTULO 3: OBTENCIÓN DE FLUIDO  
APOPLÁSTICO (FA) FOLIAR. Características  
de la técnica de infiltración-  
centrifugación.**



## RESUMEN

En esta tesis se analizan variaciones en la fisiología y composición del fluido apoplástico (FA) de hojas de *Arabidopsis* de distinto grado de senescencia. Para un estudio integral del FA es necesario su aislamiento a partir del órgano en estudio. Uno de los principales desafíos de las técnicas que implican la extracción de FA es la obtención de un fluido libre de componentes intracelulares y que sea representativo del FA nativo, es decir, que no sufra modificaciones como artefacto de la metodología implementada para su extracción. La técnica mejor establecida para extraer el FA de las hojas es la de *infiltración-centrifugación*. Esta técnica ha resultado útil en distintos órganos y especies de plantas, pero ha sido poco implementada en hojas de *Arabidopsis*, donde se ha utilizado sobre hojas jóvenes, de plantas de corta edad. Por tal motivo este capítulo se enfocó en la optimización de la técnica de *infiltración-centrifugación* para la extracción de FA de hojas senescentes de *Arabidopsis*. Adicionalmente, y en combinación con la obtención de FA, se optimizó la técnica del *Índigo Carmín*. Esta técnica permite calcular el volumen original de FA, y a través de este valor el factor de dilución del FA aislado y la concentración fisiológica de sus componentes.



## INTRODUCCIÓN

La composición del apoplasto, particularmente la de su matriz fluida, o fluido apoplástico (FA) varía rápidamente frente a condiciones ambientales cambiantes, y distintos escenarios de estrés (Lopez-Millan *et al.*, 2000; Lohaus *et al.*, 2001; Dani *et al.*, 2005; Floerl *et al.*, 2012; Trentin *et al.*, 2015). En líneas generales, el abanico de variaciones en el ambiente apoplástico incluye cambios en el pH, en la composición de proteínas y en los niveles de ácido abscísico (ABA) y de especies activas del oxígeno (EROs), entre otras (Dani *et al.*, 2005; Bindschedler *et al.*, 2006; Floerl *et al.*, 2012; Ali *et al.*, 2014; Guerra-Guimarães *et al.*, 2015; Geilfus, 2017). Como ejemplos puntuales, se ha observado que la infección por *Pseudomonas syringae* genera aumentos en la conductividad eléctrica, y la acumulación de citrato,  $\gamma$ -aminobutirato (GABA), iones ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2/3+}$ ,  $Mg^{2+}$ ), sacarosa y varios aminoácidos en el apoplasto de plantas de poroto (O'Leary *et al.*, 2016). También se han registrado variaciones en la concentración apoplástica de ácidos orgánicos en respuesta a la deficiencia de hierro en hojas de remolacha (Lopez-Millan *et al.*, 2000). Estudiar los cambios moleculares y fisiológicos que ocurren en el fluido apoplástico es desafiante ya que es un compartimento espacialmente estructurado y a la vez dinámico en el que los metabolitos y/o iones pueden ser volátiles, transitorios o incluso estar asociados con la pared celular y la membrana plasmática (O'Leary *et al.*, 2014).

Algunas técnicas no invasivas permiten examinar el apoplasto *in vivo*, por ejemplo, mediante la utilización de líneas transgénicas que expresan biosensores en el apoplasto, o mediante la infiltración de sondas indicadoras específicas. Algunas de estas sondas permitieron estudiar fluctuaciones en el pH y en la concentración de  $Ca^{+}$  extracelular en respuesta al estrés hídrico y salino y a la deficiencia de Boro (Mühling *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 2004; Geilfus y Muhling, 2011). Por otra parte, es posible concentrar componentes extracelulares sin la necesidad de realizar un fraccionamiento subcelular. La glicosilación del extremo N terminal es una modificación postraduccional común de las proteínas vegetales que se exportan a través de la vía secretoria (Scheiffele y Füllekrug, 2000; Faye *et al.*, 2005). Mediante cromatografía de afinidad, utilizando lectinas tipo Concavalina como ligando se han aislado e identificado proteomas enriquecidos en glicoproteínas apoplásticas de tallos de *Arabidopsis* (Minic *et al.*, 2007) y de fruto de tomate (Catala *et al.*, 2011).

Estudios más integrales del apoplasto requieren un fraccionamiento subcelular para el aislamiento de FA del tejido. Se han desarrollado varios métodos para extraer fluidos apoplásticos y xilemáticos: la aplicación de presión con una bomba de Scholander (Hartung *et al.*, 1988), el método de perfusión al vacío (Bernstein, 1971), el método de elución (Long y

Widders, 1990), y el método de infiltración-centrifugación (Klement, 1965; Terry y Bonner, 1980; Pfanz, 1991; Speer y Kaiser, 1991; Lohaus *et al.*, 1995). Este último, debido a su eficiencia y simplicidad es el mejor establecido para extraer fluido apoplástico de hojas, y fue el elegido para el desarrollo de este trabajo.

## 1. La técnica de *infiltración en vacío-centrifugación* para el fraccionamiento subcelular de FA

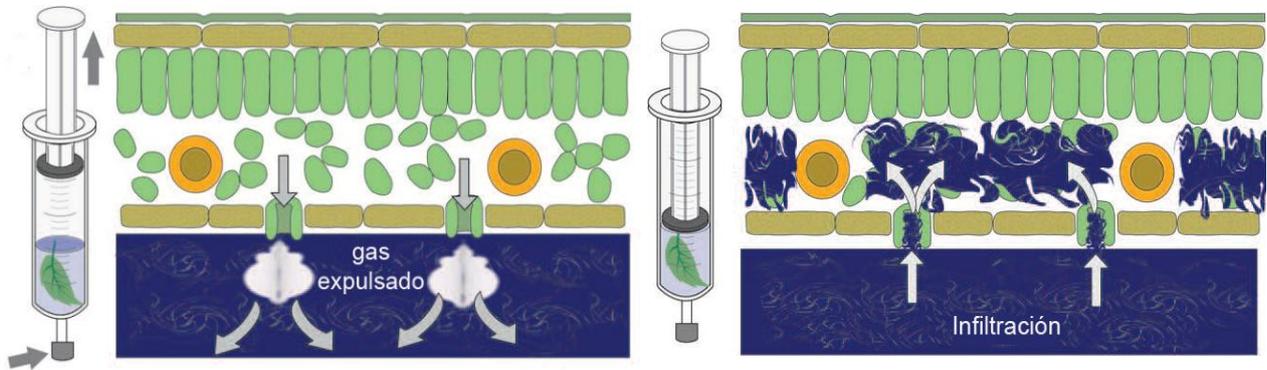
Esta técnica esencialmente implica dos pasos: 1-*Infiltración*: sustitución del espacio apoplástico ocupado por aire por una Solución de Infiltración (**ScIn**) acuosa, que ingresa a la hoja desplazando el aire y mezclándose con el líquido apoplástico nativo (fluido apoplástico, **FA**), seguido de 2- *centrifugación*: recuperación de la mezcla de Solución de infiltración-fluido apoplástico mediante centrifugación suave (alrededor de 500-1000 xg) de las hojas (Lohaus *et al.*, 2001). Como el líquido recuperado es FA que se ha diluido y solo contiene una fracción de la totalidad de compuestos presentes en la pared celular, se conoce comúnmente como fluido de lavado apoplástico (**F<sub>LA</sub>**), o fluido de lavado extracelular (**F<sub>LE</sub>**) (O'Leary *et al.*, 2014). Se ha propuesto que durante la centrifugación, la solución se extrae preferentemente del espacio que rodea las células vivas, y por el contrario, el agua en el xilema (o fluido xilemático) debe ser menos extraíble debido a las fuerzas capilares (Meinzer y Moore, 1988). El F<sub>LA</sub> recuperado mediante esta metodología puede ser sometido a un amplio rango de técnicas analíticas y bioquímicas (por ejemplo, electroforesis de proteínas, medición de actividad enzimática, resonancia magnética nuclear, cromatografía y espectrometría de masas). Además, en combinación con la técnica de “*Indigo Carmín*” (ver más adelante), se puede determinar el factor de dilución del F<sub>LA</sub> obtenido, y estimar otras variables del espacio apoplástico, como la cantidad relativa de espacio ocupado por aire o fluido.

### 1.1. Características y variantes de la técnica

#### 1.1.1. Infiltración de las hojas a través de los estomas, por cambios de presión

Al infiltrar la hoja, el aire de los espacios intercelulares es desplazado por la solución de infiltración (ScIn) mediante presión, por repeticiones de pulsos de despresurización y presurización. Las hojas a infiltrar se introducen dentro de la solución de infiltración y luego se procede a aplicar vacío. A medida que se ejerce vacío ( $\sim -0,20$  Atm) sobre las hojas, el “aire apoplástico” es forzado a salir del apoplasto. Seguidamente, a medida que el vacío se va liberando progresivamente hasta volver a presión atmosférica (1 Atm), la ScIn es forzada a

entrar al apoplasto (Lohaus *et al.*, 2001; Stavrinidou *et al.*, 2015). Para generar de vacío se utiliza una bomba de vacío convencional, o bien una jeringa en el caso de hojas pequeñas (Figura 3.1).



**Figura 3.1. Esquema del proceso de Infiltración en vacío utilizando una jeringa.** (A) Hoja inmersa en ScIn en el interior de una jeringa de 60 ml en la que se ha eliminado el aire. Al tirar del émbolo de la jeringa, se crea una presión negativa, lo que fuerza a que el gas dentro del mesófilo esponjoso sea expulsado. (B) Cuando la jeringa vuelve a la presión atmosférica, la solución se impulsa hacia el interior a través de los estomas, llenando el mesófilo esponjoso entre las venas. Tomada de (Stavrinidou *et al.*, 2015), con modificaciones.

Lohaus y colaboradores (2001) observaron una relación inversa entre la conductancia estomática y el número de pasos de infiltración necesarios para alcanzar el peso constante de la hoja infiltrada (“infiltrabilidad”), y a su vez encontraron pocas diferencias entre la infiltrabilidad de hojas enteras y segmentos foliares. Con estos resultados, concluyeron que la ScIn entra a las hojas a través de los estomas y no por heridas inducidas por cortes (Lohaus *et al.*, 2001). Adicionalmente, se observó que en hojas de arroz infiltradas bajo distintas intensidades y calidades de luz (lo que resulta en distintas conductancias estomáticas), existe una correlación positiva entre el tiempo de infiltración necesario y el grado de cierre estomático (Nouchi *et al.*, 2012). La misma correlación entre el volumen de ScIn infiltrada y la conductancia estomática se observó en hojas de “madroño” *Arbutus unedo* (Beyschlag y Pfan, 1990).

### 1.1.2. Composición de la solución de infiltración y tiempos de incubación

La dilución del apoplasto durante la infiltración puede provocar una respuesta en la hoja. Frente a una disminución en la concentración de ciertos componentes del fluido apoplásico, las células podrían responder secretando metabolitos adicionales, lo que distorsionaría la interpretación de las concentraciones de metabolitos (Lohaus *et al.*, 2001). La composición del

FLA extraído no sería afectada por la fuerza iónica de la solución de infiltración (a diferencias iónicas moderadas) (Husted y Schjoerring, 1995; Lohaus *et al.*, 2001); tampoco por el tiempo de incubación es decir, el tiempo transcurrido entre el inicio de la infiltración y la centrifugación, si los tiempos de incubación no superan los 30 minutos. Esta observación sugiere que la homeostasis de solutos apoplásticos se mantendría de manera eficiente, y cualquier artefacto resultante de la dilución del FA sería mínimo (O'Leary *et al.*, 2014). Por otra parte, el pH y la composición de la ScIn puede afectar la composición del FLA (Lohaus *et al.*, 2001), por ejemplo, la adición de sales a la ScIn, mejora la extracción de proteínas asociadas a la pared celular (Figura 3.2) (Boudart *et al.*, 2005). El agua destilada como ScIn es una de las alternativas más implementadas para el estudio de moléculas solubles en el FA (Lohaus *et al.*, 2001; Rico y Preston, 2008; Baker *et al.*, 2012; O'Leary *et al.*, 2016).

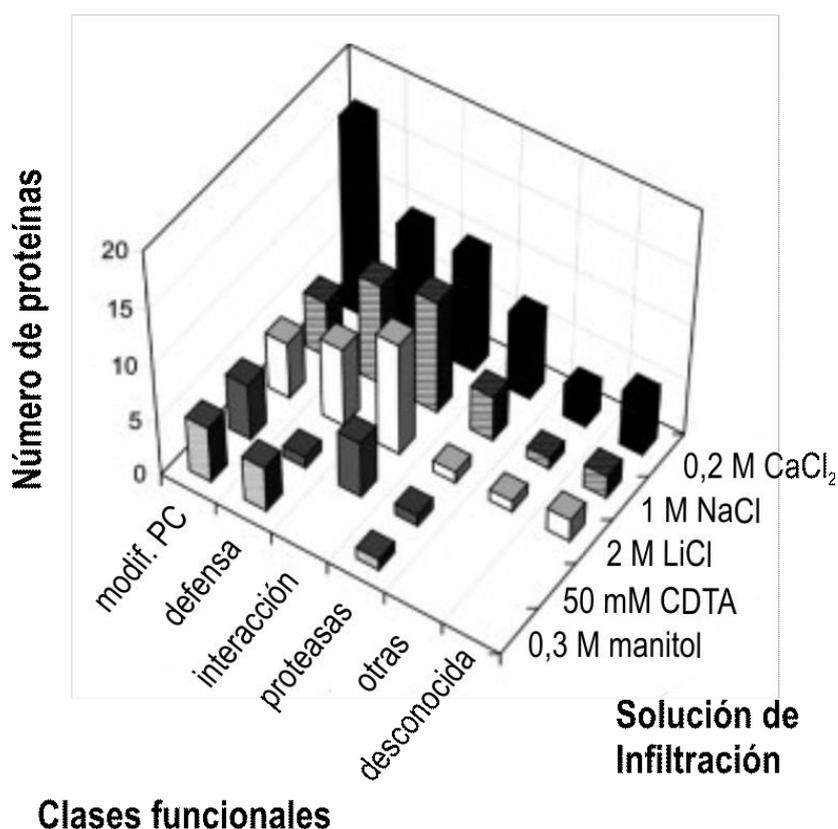


Figura 3.2. Proteínas apoplásticas de la roseta de *Arabidopsis*, distribuidas dentro de seis clases funcionales, y solubilizadas por diversas ScIn. Se muestra el número total de proteínas de cada clase funcional extraídas por cada solución extractante: 0,3 M manitol, 50 mM CDTA (ácido 1,2-ciclohexanodiaminotetraacético), 2 M LiCl, 1 M NaCl, 0,2 M CaCl<sub>2</sub>. Clases funcionales: modificación de la pared celular (modif. PC), defensa,

interacciones con polisacáridos o proteínas (interacción), proteasas, otras funciones (otras), función desconocida (desconocida). Adaptada de Boudart et al. (2005).

### 1.1.3. Marcadores de contaminación/pureza del FLA

Las principales causas de contaminación de los FLA con proteínas y metabolitos citoplásmicos son la lisis celular y la muerte celular. Durante la extracción de FLA puede ocurrir daño en la integridad de las células tanto en la etapa de infiltración, si los cambios de presión son demasiado rápidos, y durante la etapa de centrifugación si la fuerza centrífuga es demasiado alta (Husted y Schjoerring, 1995; Lohaus *et al.*, 2001; Boudart *et al.*, 2005; O'Leary *et al.*, 2014). De hecho, existe una fuerte correlación entre la fuerza centrífuga aplicada durante la extracción de los FLA y el nivel de contaminación de los mismos con componentes citosólicos o vacuolares a causa de daños celulares (Terry y Bonner, 1980; Lohaus *et al.*, 2001). Por lo tanto, es necesario evaluar si los FLA obtenidos están libres de contaminación con componentes citosólicos solubles; e idealmente se recomiendan múltiples ensayos independientes. En general se utilizan dos tipos de análisis bioquímicos sobre proteínas para evaluar la presencia de marcadores de contaminación citoplásmica: (i) ensayo enzimático e (ii) inmunodetección de proteínas marcadoras. La selección de las enzimas u otras proteínas marcadoras se basa en la suposición de que estas proteínas normalmente no se encuentran en el apoplasto, y en consecuencia, solamente se recuperan en el FLA si las condiciones implementadas condujeron a la ruptura de la membrana plasmática.

Una de las enzimas citosólicas más utilizadas para determinar la pureza del FLA es la Malato Deshidrogenasa (MDH) (Boudart *et al.*, 2005), sin embargo se ha evidenciado actividad MDH soluble en el apoplasto de algunas especies de plantas (Mäder y Schloss, 1979; Li *et al.*, 1989). Alternativamente, se ha utilizado como marcador celular la enzima Hexosa Fosfato Isomerasa (HPI), también citosólica (Dannel *et al.*, 1995). Una desventaja de utilizar MDH y HPI como marcadores celulares es su gran tamaño, de aproximadamente 70 y 120 kDa respectivamente, ya que estas enzimas podrían quedar retenidas en la célula rota o muerta, mientras otros metabolitos de menor tamaño, o mayor tasa de difusión podrían estar presentes en el FLA.

Otras enzimas marcadoras citoplasmáticas usadas para la evaluación de la pureza del FLA son la enzima vacuolar  $\alpha$ -Manosidasa (Delannoy *et al.*, 2008), y las citosólicas PEP carboxilasa (Tran y Plaxton, 2008), Aldolasa (Tran y Plaxton, 2008), y Glucosa 6-Fosfato Deshidrogenasa

(G6PDH) (Oh *et al.*, 2005; Casasoli *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009; Nouchi *et al.*, 2012).

Los metabolitos que se cree que son predominantemente citoplásmicos, como hexosa-6-fosfatos, también se utilizan para evaluar contaminación de FLA (O'Leary *et al.*, 2014).

La G6PDH participa en la vía de las pentosas fosfato deshidrogenando la glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona. Se han descrito dos localizaciones subcelulares para la G6PDH: citosólica y plastídica (Schnarrenberger *et al.*, 1973). La actividad de la enzima G6PDH fue la elegida en este trabajo, ya que es una actividad sencilla de cuantificar, y es una enzima marcadora de citosol utilizada habitualmente (Casasoli *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009; Nouchi *et al.*, 2012)

En cuanto a la inmunodetección (Dot Blot y Western Blot), las proteínas marcadoras intracelulares más utilizadas son la Ribulosa-1,5-Bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Delannoy *et al.*, 2008), Hexoquinasa (Cheng *et al.*, 2009), Actina (Cho *et al.*, 2009), HSP 70 (Cho *et al.*, 2009), entre otras. En este trabajo se realizaron ensayos de inmunodetección de la enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBP). La enzima FBP se localiza el citosol donde participa en la síntesis de sacarosa a partir de triosas fosfato, y en el estroma de los cloroplastos donde participa en la regeneración de ribulosa -1,5-bifosfato a partir de triosas fosfato durante el ciclo de Calvin (Harbron *et al.*, 1981; Cséke y Buchanan, 1986; Strand *et al.*, 2000; Taiz y Zeiger, 2002; Sahrawy *et al.*, 2004).

Por último, aunque no tan específica, la comparación de los perfiles de proteínas de FLA y de proteínas foliares totales acompaña al análisis de pureza de la fracción subcelular, y es de utilidad para evidenciar proteínas enriquecidas en el FLA (O'Leary *et al.*, 2014).

#### 1.1.4. Optimización del método de infiltración-centrifugación

Para evitar la contaminación citoplásmica del FLA debido a la lisis celular parcial que se produciría si el estrés mecánico que encuentran las células es severo durante las etapas de infiltración y/o centrifugación, se debe optimizar la velocidad de centrifugación empíricamente para cada tipo de hoja evaluando el volumen recuperado y la contaminación de los FLA en un rango de velocidades de centrifugación (O'Leary *et al.*, 2014). Se ha observado que la actividad de enzimas marcadoras, como MDH, G6PDH y glucosa-fosfato isomerasa, permanece bajas hasta que se sobrepasa una fuerza centrífuga umbral, por encima de la cual estas actividades aumentan rápidamente, presumiblemente debido a fugas citoplásmicas (Husted y Schjoerring, 1995; Lohaus *et al.*, 2001; Boudart *et al.*, 2005; Nouchi *et al.*, 2012).

Por último, dado que el FLA contiene proteasas y otras hidrolasas (Boudart *et al.*, 2005), es recomendable utilizar inhibidores de proteasas desde el momento de la infiltración-centrifugación, o después de extraído el FLA.

#### 1.1.5. Limitaciones de la técnica

Un inconveniente potencial es que la elución del FLA por centrifugación no capture todas las moléculas presentes en el apoplasto. Esto puede deberse a varias razones, por ejemplo, algunos compuestos, pueden estar estrechamente asociados con la pared celular cargada negativamente y por ende no eluir en el FLA (Boudart *et al.*, 2005), o bien ser demasiado grandes como para que se extraigan eficientemente del apoplasto a las velocidades de centrifugación utilizadas (Lohaus *et al.*, 2001).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son una clase importante de compuestos producidos en el apoplasto, pero debido a su corta vida media no están bien representados en el FLA (O'Leary *et al.*, 2014).

A pesar de sus limitaciones, la técnica de infiltración-centrifugación sigue siendo una técnica sencilla y sólida en el estudio de proteínas apoplásticas, metabolitos primarios y secundarios e iones inorgánicos.

## 2. La técnica de *Indigo Carmín* (IC) en combinación con la *infiltración -centrifugación* permite calcular el factor de dilución del FA ( $F_{dil}$ ), y estimar los volúmenes ocupados por aire y por FA

El proceso de infiltración diluye el FA y por lo tanto se necesita un factor de dilución para estimar las concentraciones reales (pre-extracción) de fluido apoplástico a partir del FLA. El cálculo de la dilución del FA supone que el líquido de infiltración no se adsorbe a las paredes celulares y tampoco es absorbido o diluido apreciablemente por las células de la hoja durante el proceso de recuperación del FLA. Esta suposición fue verificada previamente por Lohaus y col. (2001).

El Indigo Carmín (IC) es el colorante más utilizado y más ampliamente probado para los cálculos de dilución ( $F_{dil}$ ) del FA (Husted y Schjoerring, 1995; O'Leary *et al.*, 2016), y además permite calcular el volumen de apoplasto ocupado por aire ( $V_{aire}$ ) y por FA ( $V_{FA}$ ) (las ecuaciones matemáticas correspondientes se desarrollan en el punto 4.2 de Materiales y Métodos,). Se ha demostrado en varias especies que el IC no es adsorbido ni modificado en el apoplasto, y si los

tiempos de incubación no son excesivamente largos, tampoco se transporta a través de la membrana plasmática (Cosgrove y Cleland, 1983; Husted y Schjoerring, 1995; Baker *et al.*, 2012).

### 3. Consideraciones sobre el material vegetal de partida y las condiciones de muestreo para la obtención de FLA

Cuando se realizan extracciones de FLA, la variación biológica y técnica puede ser grande por lo que un flujo de trabajo altamente estandarizado es necesario para asegurar la continuidad a través de los experimentos, incluyendo las condiciones de crecimiento de las plantas (O'Leary *et al.*, 2014). El ciclo circadiano influye fuertemente en muchos procesos metabólicos y fisiológicos de las plantas (Kreps y Kay, 1997; Dodd *et al.*, 2005). Varios estudios reportan grandes variaciones diurnas en la expresión génica y de niveles de metabolitos en *Arabidopsis* (Bläsing *et al.*, 2005; Gibon *et al.*, 2006; Augustijn *et al.*, 2016). Más aún, la concentración de la mayoría de los metabolitos (sacarosa, hexosas, malato, aminoácidos) en el apoplasto son más elevadas al final del período de luz que al final del período de oscuridad, razón por la cual la recolección del material vegetal debe realizarse siempre en un mismo horario (O'Leary *et al.*, 2014).

En cuanto al material vegetal de partida, se ha observado que la capacidad de extracción del FLA de las hojas varía según la especie y el tipo de hoja (Lohaus *et al.*, 1995; Lohaus *et al.*, 2001; Nouchi *et al.*, 2012). Por ejemplo, la recolección de FLA de las hojas de arroz por el método de infiltración-centrifugación es mucho más problemática que en especies dicotiledóneas, como espinaca y poroto y por lo tanto se requieren tiempos de infiltración más largos y fuerzas centrifugas más altas (Hayashi *et al.*, 2008; Nouchi *et al.*, 2012).

El estado fisiológico de la hoja, y otras características asociadas a la edad del órgano y de la planta (i.e, variación en la composición de membranas y de la pared celular, estado hídrico), pueden incidir en el grado de integridad celular al momento de realizar la extracción de FA.

Tiendo en cuenta todas estas variables, la preparación de FLA para el estudio de los cambios en el apoplasto asociados al proceso de senescencia foliar requirió la optimización de la técnica de extracción de FLA, para ser implementada en hojas de distintos estadios de forma eficiente y con los menores niveles de contaminación simplástica.

## HIPÓTESIS

Las técnicas de infiltración-centrifugación e Índigo Carmín pueden implementarse en hojas de Arabidopsis permitiendo la extracción de FA libre de componentes citosólicos y la determinación del factor de dilución del FA y el volumen de apoplasto ocupado por aire y por FA.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Optimizar la técnica de infiltración centrifugación para extraer FLA de hojas de Arabidopsis libres de componentes citosólicos.
2. Optimizar la técnica del Índigo Carmín para calcular los factores de dilución de los FA extraídos y el volumen apoplasto ocupado por aire ( $V_{\text{aire}}$ ) y por fluido ( $V_{\text{FA}}$ ).



## RESULTADOS

### 1. Puesta a punto de la extracción de fluido de lavado apoplástico (FLA) de hojas de *Arabidopsis*

Como primer paso en la puesta a punto de la obtención de FLA de *Arabidopsis*, se utilizaron hojas maduras completamente expandidas de plantas de *Arabidopsis* salvajes (WT) creciendo a día corto, en floración. Para la extracción del FLA del tejido, se probaron soluciones de infiltración (ScIn) con diferentes osmolaridades en combinación con distintas fuerzas centrífugas y tiempos de centrifugado.

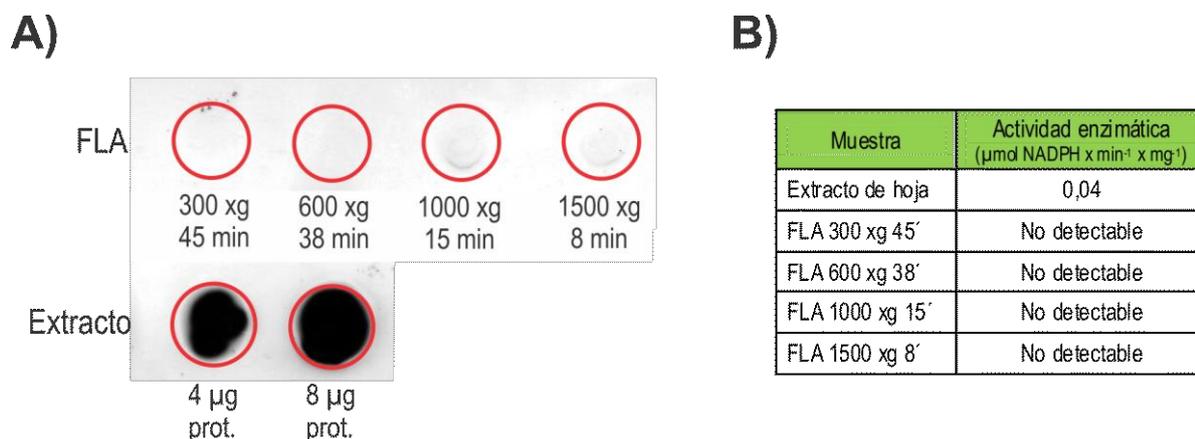
#### 1.1. Evaluación de la capacidad para extraer FLA libre de contaminación combinando diferentes fuerzas y tiempos de centrifugado

En base a la bibliografía (Husted y Schjoerring, 1995; Lohaus *et al.*, 2001; O'Leary *et al.*, 2014) se ensayaron las siguientes combinaciones de fuerzas y tiempos de centrifugado: 300 xg durante 45 min, 600 xg durante 38 min, 1000 xg durante 15 min y 1500 xg durante 8 min. La infiltración de las hojas se realizó utilizando agua bidestilada (ddH<sub>2</sub>O). El procedimiento se detalla en el punto 4.1 de Materiales y Métodos.

La pureza de los FLA obtenidos se evaluó mediante: 1- ensayos de inmunodetección de la enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBP), y 2- actividad enzimática glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Como control positivo se utilizaron extractos de proteínas totales de las hojas utilizadas. Los detalles metodológicos se describen en los puntos 4.4.2 y 4.4.3 de Materiales y Métodos. La Figura 3.3 A muestra la detección de FBP con un anticuerpo específico, en Dot Blots de extractos totales y de FLA obtenidos infiltrando con ddH<sub>2</sub>O y con las variantes de centrifugación. La señal de FBP es intensa en los “Dot blots” de proteínas totales, y es indetectable en los FLA extraídos a 300 xg y a 600 xg. Esto sugiere que estas fuerzas centrífugas no provocan la fuga de componentes citosólicos al espacio apoplástico durante la extracción del FLA (Figura 3.3 A). Una leve señal de FBP en FLA extraídos por centrifugación a 1000 xg y 1500 xg evidencia una posible contaminación con componentes citosólicos. La figura 3.3 B muestra la actividad de la enzima citosólica G6PDH en estas mismas muestras. El extracto de hojas presentó una actividad promedio de 0,04  $\mu\text{mol NADPH} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  de proteína, no se detectó actividad G6PDH en ninguno de los FLA (Figura 3.3 B).

La combinación de 300 xg y 45 min de centrifugado resultó poco eficiente en cuanto a cantidad de FLA extraído por gramo de hoja, en comparación con el resto de las combinaciones.

Estos resultados muestran que las cuatro variantes de centrifugación permitieron extraer FLA con niveles despreciables de contaminación citosólica. Sin embargo, debido a la leve señal de FBP detectada en los Dot blots de FLA obtenidos a 1000 y 1500 xg, estas condiciones fueron descartadas. Debido a la baja eficiencia en la obtención de FLA a 300 xg, también se descartó esta combinación.

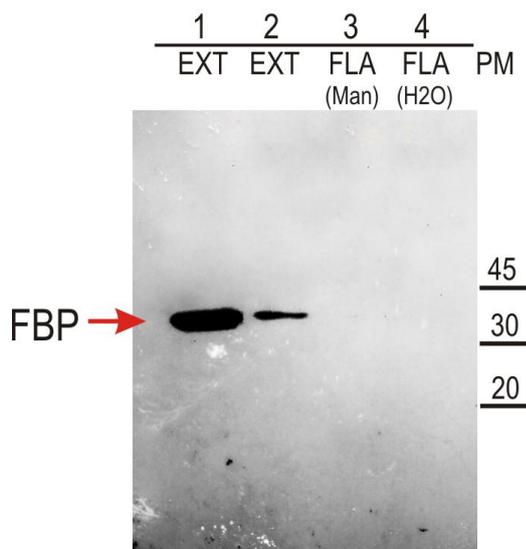


**Figura 3.3. Evaluación de contaminación citosólica en FLAs obtenidos con distintas variantes de la técnica infiltración-centrifugación.** A) Inmunodetección de la proteína citosólica FBP mediante Dot blot. Se utilizó un anticuerpo específico anti FBP. Las muestras corresponden a 10  $\mu\text{l}$  (2-3  $\mu\text{g}$  proteína) de FLA de un conjunto de hojas expandidas, extraídos con ddH<sub>2</sub>O a distintas combinaciones de tiempo y fuerzas centrifugas: 300 xg 45 min, 600 xg 38 min, 1000 xg 15 min y 1500 xg 8 min. Como control positivo se utilizaron 5  $\mu\text{l}$  (4  $\mu\text{g}$  proteína) y 10  $\mu\text{l}$  (8  $\mu\text{g}$  proteína) de extracto de proteínas totales de hojas. B) Actividad enzimática de la enzima citosólica G6PDH de las mismas muestras que en (A), expresada como  $\mu\text{mol NADPH} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  de proteína.

## 1.2. Evaluación de la capacidad para extraer FLA libre de contaminación utilizando soluciones de infiltración con distinta osmolaridad

Se evaluaron dos ScIn con distintas osmolaridades: 1- ddH<sub>2</sub>O y 2- buffer 10mM Tris pH 7, 300 mM manitol [isotónica respecto al citosol, (Speer y Kaiser, 1991)], a fin de examinar si el uso de manitol aumentaba la eficiencia de extracción de FA. Las infiltraciones se realizaron con jeringa y las centrifugaciones se realizaron a 600 xg durante 38 min. Se cuantificó la concentración de proteínas y péptidos de los FLA con el método de Bradford, y luego cada FLA se incubó en acetona fría, para precipitar las proteínas, (ver puntos 5.2.1 y 5.4.1.1 de Materiales y Métodos). La concentración de proteínas más péptidos en los FLA extraídos utilizando ddH<sub>2</sub>O o 10 mM Tris pH 7, 0,3 M Mannitol fue de alrededor de 0,06  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  en ambos casos. Esto indica que la eficiencia de ambas ScIn para extraer proteínas y péptidos apoplásticos es similar.

En este caso la pureza de los FLA obtenidos se evaluó mediante inmunodetección de FBP por western blot (Figura 3.4). No se detectó FBP en ninguno de los dos FLA, con lo cual se concluye que las dos soluciones de infiltración evaluadas permiten recuperar FLA libres de componentes citosólicos a fuerzas centrífugas de 600 xg. En base a los resultados obtenidos hasta aquí, se continuó trabajando con ddH<sub>2</sub>O como solución de infiltración y centrifugaciones de 38 min a 600 xg.



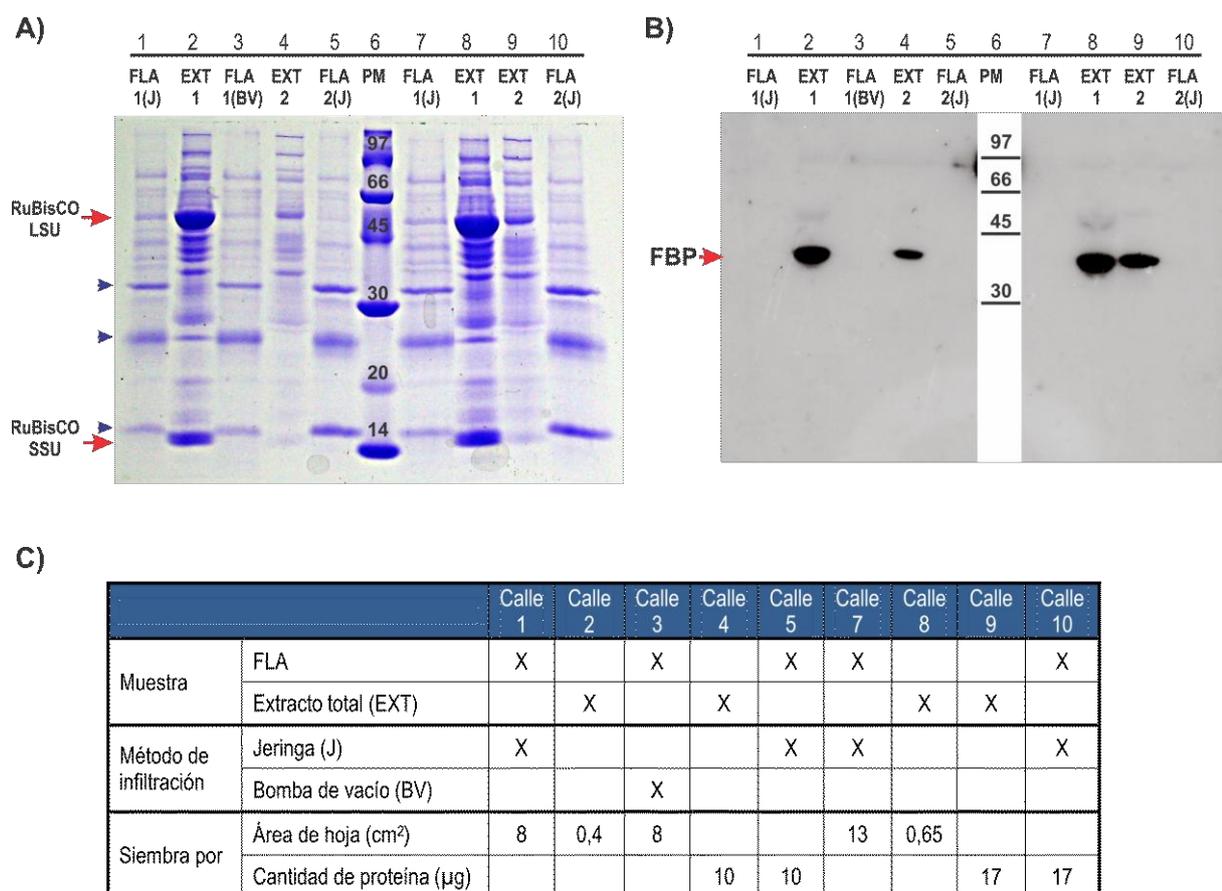
**Figura 3.4. Inmunodetección de la proteína citosólica FBP mediante western blot.** Los FLA se infiltraron con jeringa y se extrajeron de hojas maduras a 600 xg durante 38 min. Se utilizó un anticuerpo específico anti FBP. Las calles 1 y 2 corresponden a extractos de hojas: la calle 1 contiene 100 µg de proteínas y la calle 2 contiene 15 µg de proteínas; la calle 3 corresponde a FLA (15 µg de proteína) infiltrado con 0,3 M de manitol y la calle 4 corresponde a FLA (15 µg de proteína) infiltrado con ddH<sub>2</sub>O.

### 1.3. Perfil de proteínas e inmunodetección de FBP por Western Blot para evaluar contaminación citosólica en los FLAs obtenidos según las condiciones de infiltración-centrifugación seleccionadas

Para confirmar que mediante la infiltración con ddH<sub>2</sub>O y centrifugación a 600 xg, 38 minutos se obtienen FLA libres de contaminación citosólica se examinó comparativamente el perfil de proteínas de FLA y de proteínas totales de las hojas correspondientes, y se examinó la presencia de FBP como marcador citosólico. El experimento se realizó por duplicado, utilizando dos grupos de hojas de dos plantas distintas. La metodología se describe en los puntos 4.4.1 y 4.4.2 de materiales y métodos.

En este experimento además del método de infiltración utilizando una jeringa se ensayó en forma paralela el método de infiltración en una bomba de vacío.

Una vez obtenidos los FLA se precipitaron en acetona fría y se resuspendieron en SB 1X para su siembra en el gel de poliacrilamida. La Figura 3.5 muestra los perfiles de proteínas obtenidos (3.5 A), y la presencia de FBP (3.5 B). La tabla 3.5 C resume el contenido de cada muestra sembrada en el gel. Los perfiles de proteínas de FLAs preparados por infiltración con jeringa y con bomba de vacío resultaron muy similares entre sí, y libres de contaminación citosólica (Figura 3.5), lo que indica una buena reproducibilidad del método de infiltración-centrifugación. Los perfiles de proteínas de los FLA fueron marcadamente diferentes a los perfiles de los extractos totales de las hojas correspondientes (Figura 3.5 A). Mientras que los extractos totales se caracterizan por dos bandas predominantes, de 50 KDa y 14 KDa, presumiblemente las subunidades mayor y menor de Rubisco (flechas rojas), los FLA muestran 3 bandas mayoritarias, de alrededor de 14, 25 y 35 KDa, que no son evidentes en los extractos de hojas (flechas azules).



**Figura 3.5. (A) SDS-PAGE de FLA y extractos de proteínas totales de hojas maduras.** Comparación (por área de hoja y por cantidad de proteína) de los perfiles de proteínas totales de distintos FLA con los extractos de hojas correspondientes. Con una punta de flecha azul se marcan las bandas de proteínas que se acumularon en los FLA. Con flechas rojas se

marcan las subunidades mayor (LSU) y menor (SSU) de Rubisco.

**(B) Inmunodetección de la proteína citosólica FBP mediante western blot.** La detección se realizó sobre los perfiles de proteínas mostrados en el gel A.

**(C) Tabla con la descripción de las muestras sembradas en cada calle del gel y del western blot.**

Se concluye que las extracciones a 600 xg durante 38 min y el uso de agua como medio de infiltración permiten obtener FLAs, sin dañar la integridad celular, al menos en la magnitud detectable con la sensibilidad de los ensayos de inmunodetección y enzimáticos realizados. Estas condiciones son las utilizadas en los ensayos posteriores de este trabajo.

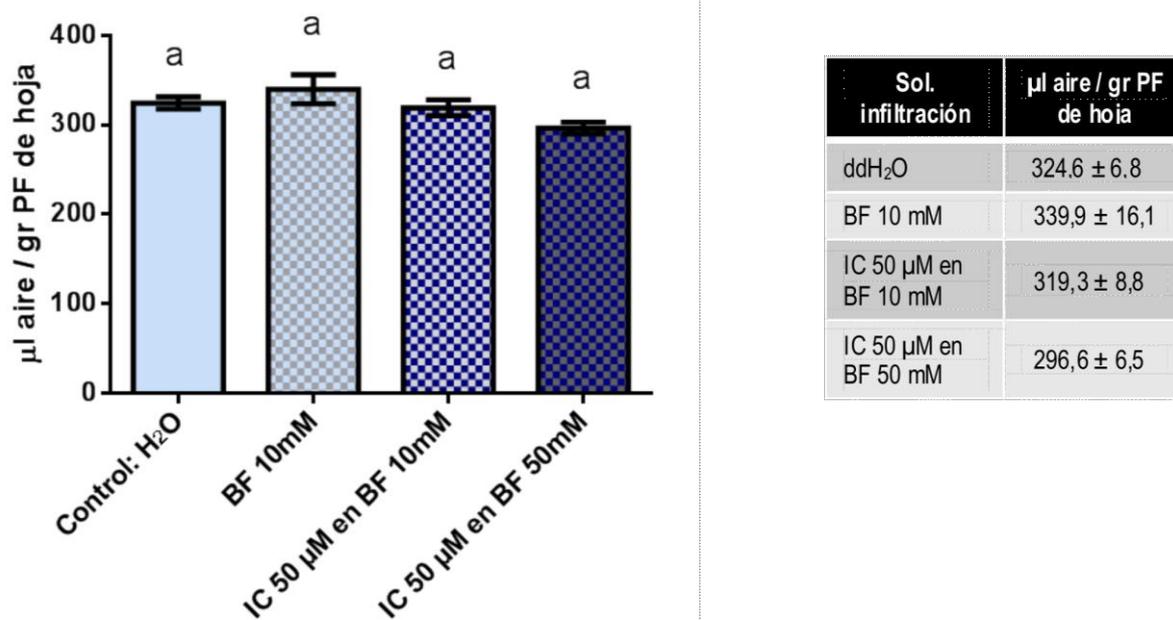
## 2. Puesta a punto de la técnica del índigo Carmín para estimar el factor de dilución del FA y los volúmenes de aire y de fluido apoplástico

Para poder estimar las concentraciones fisiológicas de los componentes del fluido apoplástico, FA, se necesita conocer el factor de dilución de cada FLA obtenido ( $F_{dil\ FA}$ ). Asimismo, para expresar las cantidades de diversos metabolitos apoplásticos por unidad de área o por peso fresco de hoja es necesario calcular el volumen de FA ( $V_{FA}$ ) presente por unidad de área foliar o por peso fresco de hoja. Para realizar estos cálculos se eligió la técnica del Índigo Carmín.

Con el objetivo de optimizar la composición de la solución de Indigo Carmín (IC), se infiltraron hojas con diferentes concentraciones de IC en distintas concentraciones de buffer fosfato (BF): 1- IC 50  $\mu\text{M}$  en 50 mM BF pH 6,2, esta solución fue utilizada previamente en hojas de *Brassica napus* por Husted y Schjoerring (1995) y 2- IC 50  $\mu\text{M}$  en 10 mM BF pH 6,2; y se incluyeron 10 mM BF pH 6,2 y ddH<sub>2</sub>O como controles.

El volumen de solución infiltrada en el espacio aéreo apoplástico es igual al volumen de aire apoplástico ( $V_{aire}$ ), y se calcula como la diferencia de peso de las hojas antes y después de infiltradas, ajustado por la densidad de la solución de infiltración (ver punto 4.2 de Materiales y Métodos).

No se observaron diferencias significativas entre el  $V_{aire}$  calculado con las distintas soluciones de infiltración con IC y ddH<sub>2</sub>O (Figura 3.6). Sin embargo, la solución que mostró valores más cercanos a los obtenidos con ddH<sub>2</sub>O fue la solución compuesta por menores concentraciones de BF (50  $\mu\text{M}$  en BF 10 mM pH 6,2), y fue la utilizada en este trabajo.



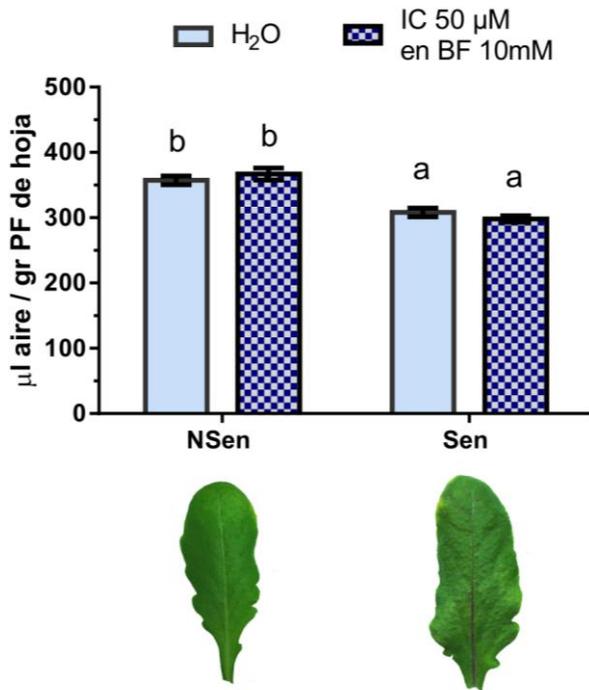
**Figura 3.6. Volumen de apoplasto ocupado por aire ( $V_{\text{aire}}$ ) en hojas expandidas.** El  $V_{\text{aire}}$  (diferencia de peso de las hojas antes y después de la infiltración, ajustado por la densidad de  $\text{ScIn}$ ) se expresa como  $\mu\text{l}$  de aire por gramo de peso fresco (PF) de hoja.

Se calcularon diferencias significativas a  $P \leq 0,05$  entre el control ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ) y cada buffer mediante la prueba de Dunnett. Los datos mostrados corresponden a la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media). BF= Buffer Fosfato; IC= Índigo Carmín.

## 2.1. Infiltración-centrifugación y estimación de volumen de aire ( $V_{\text{aire}}$ ) y de FA apoplástico ( $V_{\text{FA}}$ ) en hojas de distinto estado de desarrollo

Se calculó el volumen de aire apoplástico en grupos de hojas de plantas de distintas edades, no senescentes (NSen) y con síntomas de senescencia (Sen).

Llamativamente, los volúmenes de aire por gramo de hoja calculados en el grupo de hojas Sen resultaron significativamente menores que los correspondientes a hojas NSen (Figura 3.7). No se observaron diferencias significativas entre los volúmenes de aire apoplástico calculados con ambas soluciones de infiltración ( $\text{ddH}_2\text{O}$  y IC  $50 \mu\text{M}$  en BF 10 mM) dentro de cada grupo (Figura 3.7).



**Figura 3.7. Volumen de apoplasto ocupado por aire en hojas NSen y Sen.** El volumen de se expresa por gramo de peso fresco (PF) de hoja.

Se calcularon diferencias significativas a  $P \leq 0,05$  entre ambas condiciones de infiltración (H<sub>2</sub>O vs IC) y entre ambos estadios de hojas (NSen vs Sen) mediante ANOVA de dos vías. Los datos mostrados corresponden a la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media). BF= Buffer Fosfato; IC = Índigo Carmin.

### 3. Estimación del volumen de FA a partir del método del IC y a partir de curvas de presión-volumen (curvas PV)

En esta sección se compararon los dos métodos más utilizados para estimar el volumen de FA: la técnica del IC y extrapolaciones a partir de curvas P-V, a fin de determinar el más adecuado para hojas de Arabidopsis.

La estimación del  $V_{FA}$  mediante la técnica del IC se basa en el método de *infiltración-centrifugación*, y se utiliza como ScIn una solución de IC de concentración conocida. Conociendo la concentración de IC en la ScIn (concentración inicial IC) y en el FLA extraído (concentración final) y el volumen de ScIn infiltrada en la hoja (que es igual al  $V_{aire}$ ), se determina la cantidad de FA de la hoja ( $V_{FA}$ ) a partir de la siguiente ecuación:  $V_{FA} = (V_{aire} \times$

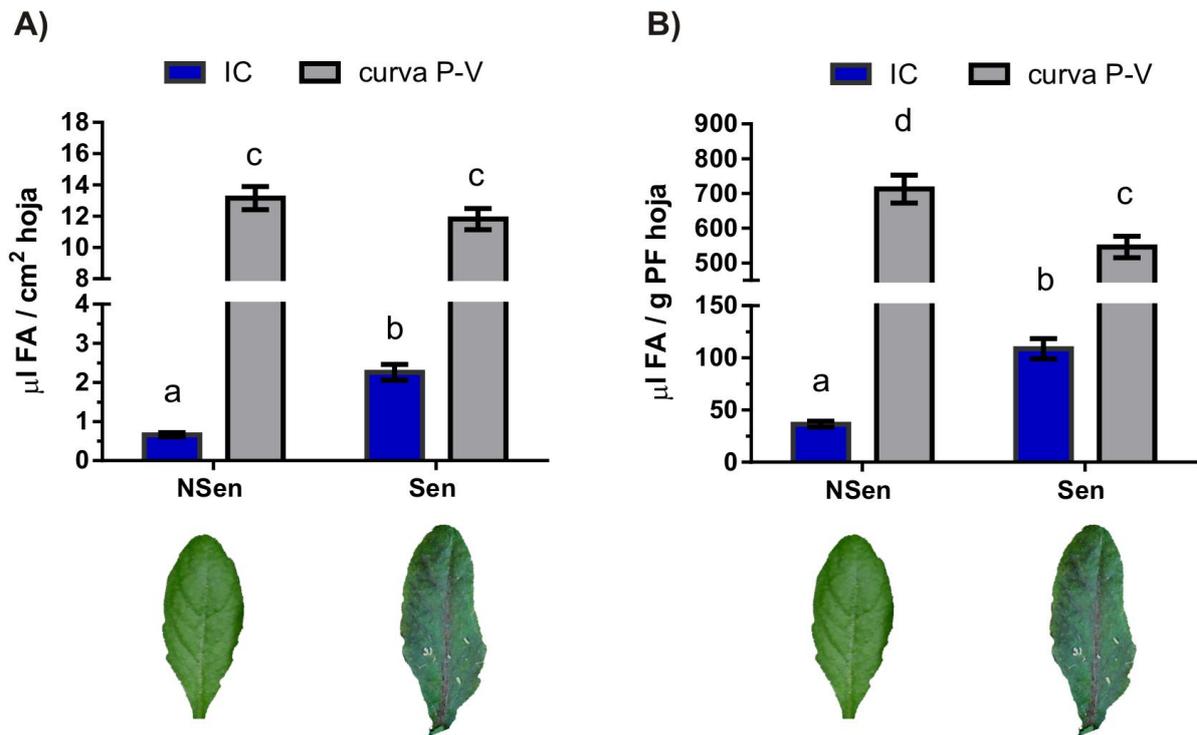
conc. inicial IC /conc. final IC) –  $V_{\text{aire}}$ . Los detalles de esta metodología se explican en el punto 4.2 de Materiales y Métodos.

Las curvas PV representan la relación entre el contenido de agua y el potencial hídrico de un tejido. Se obtienen a partir de una serie de medidas del Contenido relativo de agua (CRA) y del  $\Psi_{\text{agua}}$  de la hoja (Turner, 1988). El análisis de la curva PV se realiza graficando la relación entre  $-1/\Psi_{\text{agua}}$  y  $1-\text{CRA}$  (Tyree y Richter, 1982; Turner, 1988). La extrapolación de la parte linear de las curvas PV a  $-1/\Psi_{\text{agua}} = 0$  se ha utilizado para estimar el contenido de agua apoplástica (FA) en órganos vegetales (Tyree y Jarvis, 1982; Turner, 1988; Andersen *et al.*, 1991). La metodología se explica en más detalle en el punto 3.4.2 de Materiales y Métodos. Este método asume que durante la presurización el volumen de agua del apoplasto (FA) permanece constante, aunque la validez de esta suposición es cuestionada (Tyree y Richter, 1982; Cortes y Sinclair, 1985; Vos y Oyarzun, 1988; Andersen *et al.*, 1991; Cochard *et al.*, 1992; Urban *et al.*, 1993; Wardlaw, 2005).

En la figura 3.8 se muestra el volumen de FA de hojas de plantas de Arabidopsis de distintas edades, empezando a senescer (Sen) y no senescentes (NSen) estimado a partir de curvas PV y por el método del IC. Cabe aclarar que las plantas utilizadas en este experimento no fueron de genotipo salvaje, sino de la línea *secRFP* que expresa de forma constitutiva la proteína fluorescente RFP direccionada al apoplasto (SP-RFP) (Scabone *et al.*, 2011).

Los valores de FA estimados mediante curvas PV fueron notoriamente más altos que los obtenidos mediante el método del IC para ambos grupos de hojas analizados.

Se observaron grandes discrepancias entre los volúmenes de FA relativos entre hojas NSen y hojas Sen calculados con ambos métodos. Los valores de FA para hojas Sen estimados con el método del IC fueron entre 3 y 3,4 veces superiores que los obtenidos para NS, mientras que las estimaciones mediante curvas PV mostraron volúmenes de FA similares para ambos estadios cuando se expresaron por unidad de área foliar (Figura 3.8 A) y 1,3 veces mayores para hojas NSen que para hojas Sen cuando se expresaron por gramo de hoja (Figura 3.8 B).



**Figura 3.8. Volumen de FA en hojas NSen y Sen estimado mediante dos métodos distintos: curvas de presión volumen (curva P-V) e indigo carmín (IC).** El  $V_{FA}$  se expresó por A) unidad de área de hoja y B) unidad de peso fresco (PF) de hoja. Para las estimaciones mediante curvas PV se realizaron entre 4 y 8 réplicas biológicas y para los cálculos mediante el método del IC se realizaron 12 réplicas biológicas. Se calcularon diferencias significativas a  $P \leq 0,05$  entre las condiciones utilizando la prueba ANOVA de dos vías. Los datos mostrados en el gráfico corresponden a la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media).



## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

### 1. Puesta a punto de la extracción de fluido de lavado apoplástico (FLA) de hojas de *Arabidopsis*

Para trabajar con FA es crucial poner a punto y estandarizar la forma de extraerlo de las hojas en estudio, buscando aplicar la menor velocidad de centrifugación posible a la que se puede recuperar el FLA (O'Leary *et al.*, 2014). En esta tesis se utilizó la técnica de *infiltración en vacío-centrifugación*. Para ponerla a punto con hojas de plantas maduras se probaron distintas combinaciones de fuerza centrífuga, tiempos de centrifugación y soluciones de infiltración y se evaluó la eficiencia de estas combinaciones para extraer FLA libres de contaminación citosólica. Aplicando fuerzas de centrifugado de 300 xg y 600 xg en infiltraciones con agua o con una solución isotónica respecto al citosol (0,3 M de manitol) no se detecta contaminación con componentes citosólicos en el FLA. Sin embargo, a 300 xg la eficiencia para extraer FLA es baja, por lo tanto se considera más adecuada la combinación de centrifugado de 600 xg y 38 minutos. En general, utilizando ensayos enzimáticos, se admiten contaminaciones citosólicas de hasta un 2-3% respecto al extracto de proteínas totales (Husted y Schjoerring, 1995; Seling *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2005; Agrawal *et al.*, 2010), incluso se han utilizado muestras de FA con mayores niveles de contaminación (Jung *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009).

La eficiencia para extraer proteínas apoplásticas, estimada en base a la concentración de proteínas de los FLA obtenidos, fue similar para las dos ScIn (agua destilada y 0,3 M manitol). Por lo tanto, para continuar con el resto de las extracciones se seleccionó ddH<sub>2</sub>O como medio de infiltración y combinaciones de tiempos y fuerzas centrifugas de 38 min y 600 xg, respectivamente. Si bien el método de infiltración por medio de jeringa fue el elegido debido a la mayor simplicidad en su uso respecto de la bomba de vacío, se compararon ambas técnicas de infiltración, y no se observó diferencias entre los resultados obtenidos con ambos métodos.

### 2. Puesta a punto del método del índigo Carmín para estimar el factor de dilución del FA ( $F_{dil\ FA}$ ) y el volumen de FA

Para optimizar la composición de la solución de IC utilizada para el cálculo de dilución del FA, y de volúmenes apoplásticos de aire y FA, se compararon la solución de IC 50  $\mu$ M en 50 mM BF (utilizada en Husted y Schjoerring (1995)) y otras de menor molaridad (Figura 3.6), y no se encontraron diferencias significativas entre ellas. Estos resultados coinciden con los reportados previamente por Lohaus *et al.* (2001) quienes demostraron para *Vicia faba* y *Zea mayz* que

dentro del intervalo de molaridad correspondiente a 0 - 300 mM, el volumen de solución infiltrada en el espacio aéreo apoplástico es similar (Lohaus *et al.*, 2001). Sin embargo, para el cálculo de los factores de dilución de los experimentos posteriores se eligió la solución compuesta por IC 50  $\mu\text{M}$  en BF 10 mM, ya que fue la que presentó volúmenes de infiltración más similares a los obtenidos con agua (Figuras 3.6 y 3.7).

### 3. Estimación del volumen de FA de hojas. Comparación entre los métodos IC y curvas P-V

Para estimar en forma precisa las concentraciones fisiológicas de metabolitos del FA a partir del FLA extraído, es necesario determinar con la mayor exactitud posible el factor de dilución ( $F_{\text{dil}}$ ) de cada FA y el volumen de FA ( $V_{\text{FA}}$ ) presente en la hoja.

En esta tesis se estimó el  $V_{\text{FA}}$  mediante dos de los métodos más utilizados: curvas PV y el método del IC. Los  $V_{\text{FA}}$  calculados mediante curvas PV fueron marcadamente superiores a los  $V_{\text{FA}}$  obtenidos mediante el método del IC para los dos tipos de hojas analizados (Figura 3.8). Hasta el momento no se han reportado, para mi conocimiento, valores de  $V_{\text{FA}}$  para hojas de *Arabidopsis*, los valores para especies de dicotiledóneas herbáceas rondan los 39-120  $\mu\text{l}$  FA  $\text{g}^{-1}$  de peso fresco (PF) de hoja (Tabla anexa). Estos valores son del orden de los  $V_{\text{FA}}$  obtenidos en esta tesis mediante el método del IC, y distan mucho de los  $\sim 700$   $\mu\text{l}$  FA  $\text{g}^{-1}$  PF de hoja obtenidos mediante curvas PV.

El empleo de las curvas PV para la estimación del contenido de FA ha sido cuestionado (Tyree y Richter, 1982; Richter, 1997). Por una lado, se ha sugerido que las largas extrapolaciones de las curvas P-V hasta el eje de las abscisas pueden magnificar pequeñas desviaciones de los datos obtenidos, dando lugar a estimaciones inexactas del volumen de FA (Tyree y Richter, 1982). Otro punto muy discutido es que en las estimaciones del volumen de FA mediante extrapolación a partir de curvas PV se asume que el volumen de FA no cambia a medida que la hoja se deshidrata durante la construcción de la curva (Tyree, 1976) y como consecuencia de esta suposición la relación  $-1/\Psi_{\text{agua}}$  vs  $1-\text{CRA}$  más allá de la pérdida de turgencia es lineal. Varios autores han demostrado que en muchos casos el *agua apoplástica* (i.e. FA) no permanece constante, sino que es removida a medida que la hoja se va deshidratando (Tyree y Richter, 1982; Cortes y Sinclair, 1985; Vos y Oyarzun, 1988; Andersen *et al.*, 1991; Cochard *et al.*, 1992; Urban *et al.*, 1993; Wardlaw, 2005). Por este motivo, se ha sugerido que un modelo no lineal es más adecuado que un modelo lineal para reproducir los valores de potenciales agua observados en la región no turgente (Andersen *et al.*, 1991; Urban *et al.*, 1993). Si esto es así,

las estimaciones del volumen de FA mediante extrapolación lineal a partir de curvas PV serían erróneas (o al menos muy poco confiables), algo que ya habían sugerido Tyree y Richter (1982). Más aún, las estimaciones del volumen de FA mediante extrapolación de curvas PV podrían estar sobreestimadas (Turner et al., 1984).

Otra causa de error que se puede sumar a lo anterior es que las hojas de *Arabidopsis* son demasiado frágiles como para soportar numerosos pasos de presurización en la bomba de Scholander. Es posible que las hojas acumulen daños imperceptibles con las sucesivas mediciones, pero que podrían resultar en medidas erróneas de los potenciales agua con los que se construyeron las curvas PV y por lo tanto a estimaciones falsas del volumen de FA.

Debido a la gran discrepancia que existe en la bibliografía sobre la confiabilidad de las estimaciones del volumen de FA mediante curvas PV, y considerando los valores excesivamente altos obtenidos con este método para hojas de *Arabidopsis* (Figura 3.8), se concluye que, al menos para el material vegetal utilizado en esta tesis la estimación mediante curvas PV no es adecuada para calcular el volumen de FA.

Además, a diferencia del método del IC, mediante curvas PV no se puede calcular el volumen de aire apoplástico, que resulta indispensable para calcular el factor de dilución del FA en el FLA extraído ( $F_{dil\ FA}$ ).

Por otra parte, el método del IC es el elegido actualmente para estimar  $F_{dil\ FA}$  y volúmenes de FA en varias especies como por ejemplo tomate, *Pisum sativum*, soja y *Brassica napus* (Cosgrove y Cleland, 1983; Husted y Schjoerring, 1995; Baker et al., 2012).

Especie	$V_{aire}$ ( $\mu l / g$ )	$V_{FA}$ ( $\mu l / g$ )
<i>Beta vulgaris</i>	211	39
<i>Carpinus betulus</i>	200	150
<i>Corylus avelana</i>	330	130
<i>Fagus sylvatica</i>	220	130
<i>Hedera helix</i>	380	200
<i>Hordeum vulgare</i>	343	66
<i>Hordeum vulgare</i>	260	53
<i>Hordeum vulgare</i>	300	80
<i>Oryza sativa</i>	224	143

<b><i>Phaseolus vulgaris</i></b>	271	157
<b><i>Phaseolus vulgaris</i></b>	420	74
<b><i>Pisum sativum</i></b>	373	103
<b><i>Pisum sativum</i></b>	-	120
<b><i>Solanum tuberosum</i></b>	188	40
<b><i>Spinacia oleracea</i></b>	372	162
<b><i>Spinacia oleracea</i></b>	586	96
<b><i>Spinacia oleracea</i></b>	430	70
<b><i>Spinacia oleracea</i></b>	450	110
<b><i>Spinacia oleracea</i></b>	450	106
<b><i>Suaeda maritima</i></b>	-	54
<b><i>Triticum aestivum</i></b>	218	170
<b><i>Vicia faba</i></b>	885	111
<b><i>Vicia faba</i></b>	870	110
<b><i>Zea mays</i></b>	151	72

**Tabla anexa.** Ejemplos de  $V_{FA}$  y  $V_{aire}$  en hojas de especies herbáceas y leñosas. Los datos fueron tomados de Nouchi et al. (2012), Dietz (1997) y Lohaus et al. (2001).

**CAPÍTULO 4: CARACTERIZACIÓN DE LA  
SENESCENCIA FOLIAR Y SELECCIÓN DE  
ESTADIOS ONTOGÉNICOS PARA EL ESTUDIO  
DEL FLUIDO APOPLÁSTICO.**



## **RESUMEN**

La senescencia de las hojas se caracteriza por la disminución de la tasa fotosintética, y a nivel celular por la pérdida de estructura de las organelas, caída en los niveles de clorofila y proteínas, daño oxidativo acumulativo, incremento de la actividad proteolítica y permeabilización de las membranas. Como consecuencia, los fraccionamientos subcelulares son más problemáticos en tejidos senescentes. Por lo tanto, para conocer cambios en la composición extracelular es necesario determinar cuáles son las limitaciones metodológicas para extraer fluido apoplástico de hojas senescentes. Este capítulo se enfocó en seleccionar hojas representativas de distintas etapas de desarrollo que permitan realizar un análisis sobre los cambios asociados a la senescencia en el fluido apoplástico foliar. Se evaluaron y se seleccionaron hojas de distintas edades, provenientes de plantas adultas, en base al grado de senescencia foliar y a la capacidad para extraer sus fluidos apoplásticos con mínimos niveles de contaminación citosólica.



## INTRODUCCION

### 1. Capacidad fotosintética, niveles de clorofila, proteína, y variaciones de peso fresco como marcadores del grado de senescencia foliar en *Arabidopsis*

El síntoma visible de senescencia es el amarillamiento de las hojas, que en *Arabidopsis* comienza en el ápice foliar y se produce como consecuencia de la degradación de clorofila (Wingler *et al.*, 2004; Krupinska, 2007; Martinez *et al.*, 2008; Breeze *et al.*, 2011; Woolhouse y Batt, 2016). Mientras que el amarillamiento de las hojas se correlaciona con una disminución en la capacidad fotosintética (Wingler *et al.*, 2004), los niveles relativos de proteínas comienzan a disminuir considerablemente antes de que decaigan significativamente los niveles de clorofila y de fotosíntesis, e incluso antes de que la hoja alcance su peso máximo (Breeze *et al.*, 2011). En el contexto de este trabajo es importante destacar que en *Arabidopsis* el peso fresco (PF) foliar se incrementa aún después de alcanzada la máxima expansión foliar, y alcanza el peso máximo cuando aparecen los primeros síntomas de amarillamiento, y esto se atribuye a un mayor contenido de agua y a aumentos continuos en la densidad de la pared celular y otros desarrollos estructurales (Diaz *et al.*, 2005; Breeze *et al.*, 2011). Luego, una vez que la hoja comienza a amarillar, el PF disminuye rápidamente principalmente como consecuencia de la degradación de las macromoléculas y la pérdida de agua (Breeze *et al.*, 2011).

### 2. Cambios en las organelas asociados a la senescencia foliar

Los cloroplastos manifiestan los primeros signos de senescencia, otras organelas, como el núcleo y las mitocondrias, no evidencian cambios funcionales o estructurales hasta las últimas etapas de la senescencia (Smart, 1994). La vacuola, principal espacio lítico de la célula, se mantiene funcional, y muestra marcados aumentos en su actividad hidrolítica (Smart, 1994; Hortensteiner y Feller, 2002), mientras los peroxisomas se vuelven más abundantes y activos, (Vicentini y Matile, 1993; Pastori y Luis, 1994), acumulando grandes cantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que puede difundir al citosol durante las últimas etapas de la senescencia (Baeuerle *et al.*, 1996; del Rio *et al.*, 1998; Noodén, 2004). La integridad y la compartimentación de la hoja se mantienen hasta una etapa avanzada de la senescencia, permitiendo el reciclaje eficiente de los productos de degradación de las macromoléculas (Niewiadomska *et al.*, 2009; Rolny *et al.*, 2011). Sin embargo, durante etapas tardías de la senescencia, la degradación y oxidación de los lípidos y proteínas que forman parte de las membranas puede conducir a cambios estructurales que causan pérdida de integridad y aumento de la permeabilidad de las membranas, y como

consecuencia las células pierdan la capacidad de retener solutos y metabolitos (Ferguson y Simon, 1973; Dhindsa *et al.*, 1981; Koiwai *et al.*, 1981; Wanner *et al.*, 1991; Rolny *et al.*, 2011).

Al analizar cambios asociados a la senescencia en el apoplasto, se debe considerar que las alteraciones estructurales en las membranas pueden facilitar la fuga de componentes citosólicos al apoplasto durante el proceso de extracción del FA. Por lo tanto, es necesario conocer cuáles son las limitaciones de la técnica de *infiltración-centrifugación* para extraer FA de hojas senescentes, dado que hasta el momento esto no ha sido evaluado.

## **HIPÓTESIS**

La edad y estado fisiológico de la hoja pueden afectar la eficiencia de la técnica de infiltración-centrifugación para obtener FLA libres de componentes citosólicos. Esta técnica podría ser implementada para analizar variaciones en la composición del fluido apoplástico durante el inicio y progreso de la senescencia, con limitaciones en hojas en estado avanzado de la senescencia.

## **OBJETIVO ESPECÍFICO**

Seleccionar hojas de distinto grado de desarrollo a partir de las cuales sea posible extraer FLA libres de contaminación citosólica, y que sean adecuadas para analizar cambios en el apoplasto durante el inicio y progreso de la senescencia foliar.



## RESULTADOS

### 1. Inicio y progreso de la senescencia foliar de *Arabidopsis* según variaciones en parámetros fotosintéticos y la edad de la planta

Los cambios en el contenido de clorofila y proteínas foliares, junto con la actividad fotosintética son los parámetros más utilizados para monitorear el curso de la senescencia. En función de estos parámetros, a fin de estandarizar la selección del material vegetal para la obtención de FLA se examinaron hojas totalmente expandidas en distinto estado ontogénico, de plantas de *Arabidopsis* de distintas edades creciendo bajo las mismas condiciones. Se definieron 4 estadios:

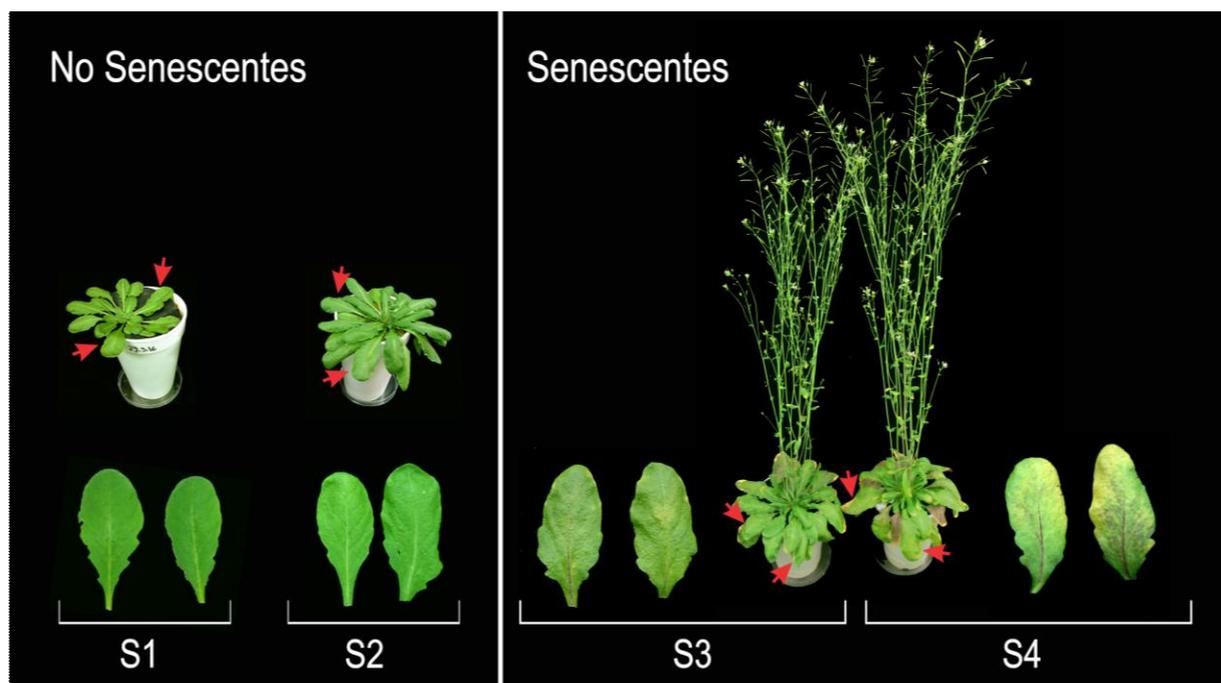
Hojas S1 y S2: hojas totalmente expandidas, de plantas en estado vegetativo (S1), o al comienzo de la etapa reproductiva “Bolting” (S2), con los niveles más altos de contenido de clorofila y proteínas, y rendimiento cuántico potencial del fotosistema II (Fv/Fm) (Figura 4.1).

Hojas S3: hojas totalmente expandidas, de plantas en floración y estructuras reproductivas (inflorescencias) en activo crecimiento, con características de senescencia foliar, i.e., con menores contenidos de clorofila y proteínas, y menor rendimiento fotosintético, respecto de S1 y S2. Visiblemente distintas de S1 y S2 debido a que muestran signos de amarillamiento (Figura 4.1).

Hojas S4: hojas totalmente expandidas, de plantas en floración, en las que ya ha cesado el desarrollo de inflorescencias, y crecimiento general de la planta, que evidencia senescencia monocárpica. Los niveles de clorofila, proteínas y la actividad fotosintética han caído notoriamente respecto de S1, S2 y S3 y el grado de amarillamiento es más avanzado que en S3 (Figura 4.1).

Las hojas S1 provienen de plantas de 30-35 días desde germinación, las hojas S2 de plantas de 45-50 días, y las hojas S3 y S4 de plantas de 70-80 días y 85-90 días respectivamente, siempre en las mismas condiciones de crecimiento (Figura 4.1). Es decir, las hojas S2, S3 y S4 representan una cohorte de hojas producidas entre los 30 y 45 días desde la germinación de la planta pero muestreadas en diferentes momentos de su desarrollo.

Como la senescencia foliar de *Arabidopsis* es acompañada de cambios en el contenido de agua en las hojas (Diaz *et al.*, 2005; Breeze *et al.*, 2011), y el estado hídrico incide en el volumen de fluido apoplástico (Andersen *et al.*, 1991; Wardlaw, 2005), se examinó el porcentaje de agua de las hojas S1, S2 y S3.



**Figura 4.1. Plantas y hojas representativas de los cuatro estadios analizados:** hojas maduras no senescentes (S1 y S2) y hojas senescentes (S3 y S4). Se señalan hojas representativas de cada estadio.

### 1.1. Variación de los niveles de clorofila, proteínas, actividad fotosintética y estado hídrico a lo largo de los estadios foliares S1-S4

En función del área foliar, las hojas S1 y S2 presentan contenidos similares de proteínas, estos valores caen un 60% en las hojas S3 y un 85% en las hojas S4 (Figura 4.2 A).

Las hojas S2 muestran un aumento en el contenido de clorofila por unidad de área foliar respecto a S1. En hojas S3 y S4 los niveles de clorofila caen un 30-35% y >50% respectivamente en relación a S2 (Figura 4.2 B). El rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (Fv/Fm) de hojas S1 y S2 mostró valores superiores a 0,8; esperables para hojas maduras no senescentes (Wingler *et al.*, 2004; Pourtau *et al.*, 2006), y cayó a Fv/Fm= 0,78 en hojas S3. En hojas S4, la mayoría de las mediciones no aportó un valor de lectura con el medidor de fluorescencia (Figura 4.2 C). De acuerdo a estos resultados, las hojas S3 muestran los síntomas característicos de la senescencia foliar, comienzo del “amarillamiento” de las hojas acompañado de una disminución de proteínas foliares, y disminución de la fotosíntesis, mientras que las hojas S4 representan un estado muy avanzado de la senescencia, con niveles mínimos de clorofila y proteínas remanentes. El porcentaje de agua de la hoja acompaña el

curso de los niveles de clorofila y actividad fotoquímica (Fv/Fm) (Figura 4.2 D). Todos los parámetros analizados a lo largo de S1 a S4 muestran un cambio marcado entre S2 y S3, sugiriendo que el inicio de la senescencia se ubicaría entre esos estadios.

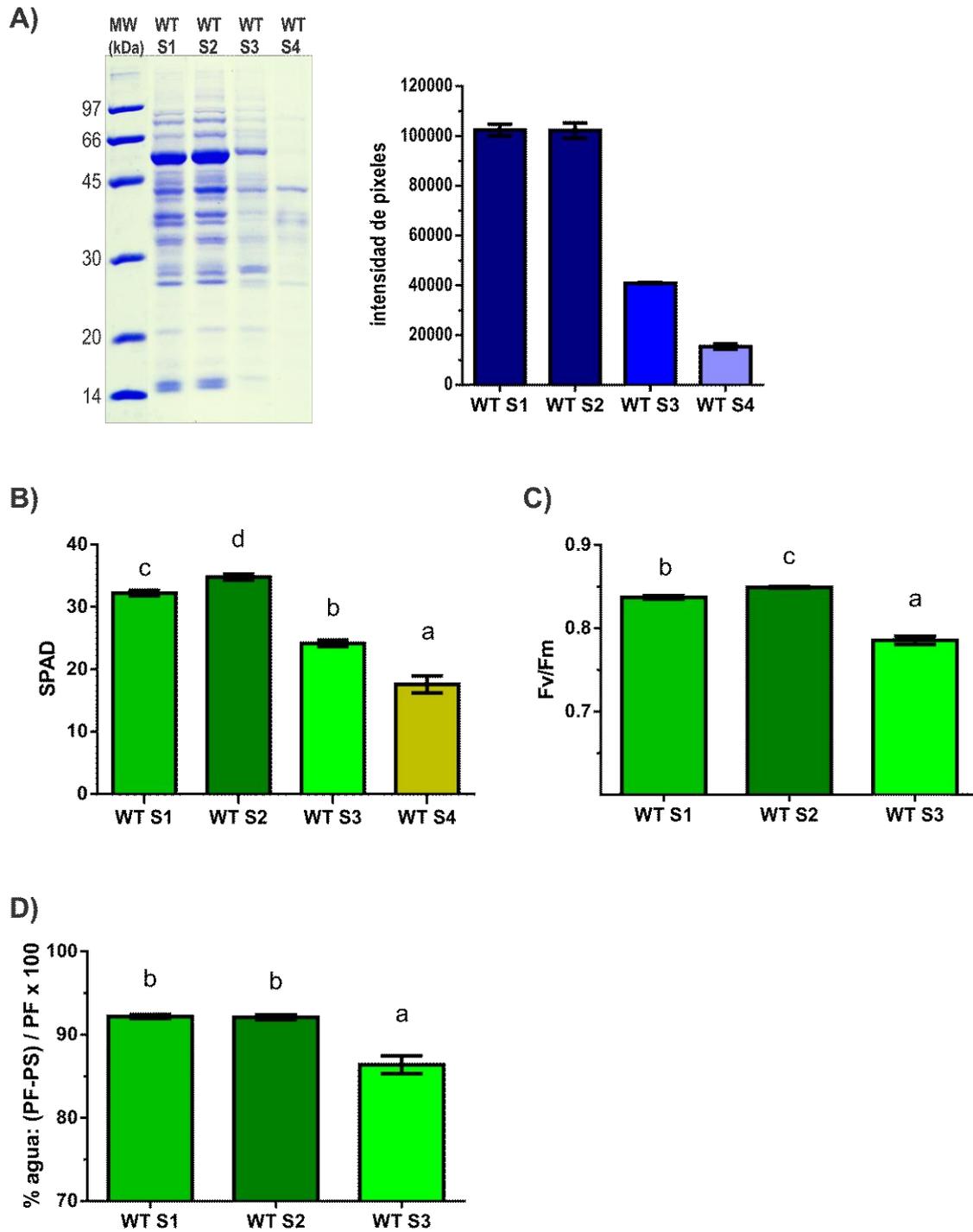


Figura 4.2. Clorofila, proteínas, actividad fotoquímica y estado hídrico en hojas de distintos estadio

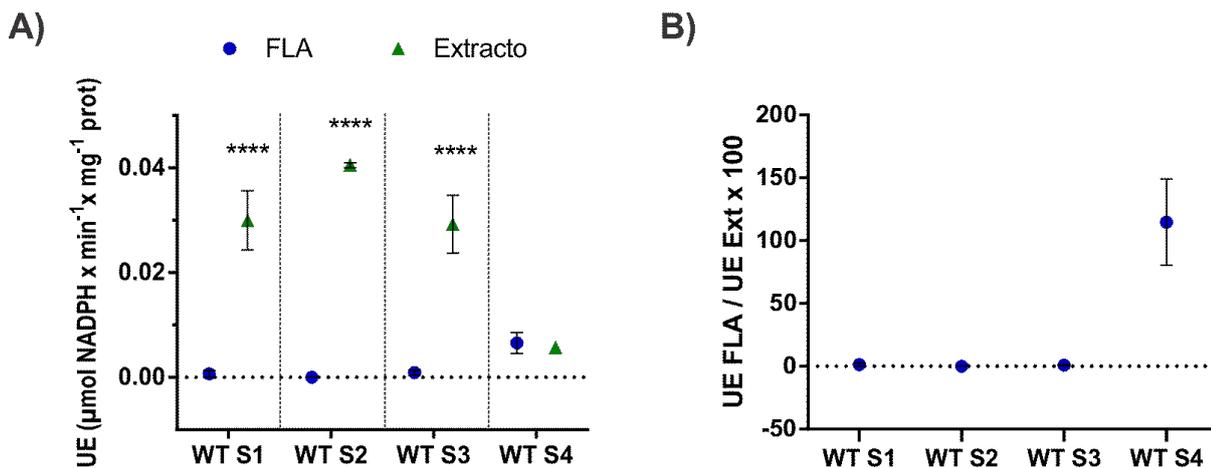
**ontogénico.**

(A) Perfil de proteínas en gel SDS-PAGE y contenido relativo de proteínas totales por unidad de área foliar estimado por densitometría (punto 5.3 de Materiales y Métodos). (B) Contenido de clorofila en función del área foliar expresado en unidades de SPAD. (C) Rendimiento cuántico máximo del Fotosistema II (Fv/Fm). Los valores en S4 no están representados, ya que en la mayoría de las mediciones no fue posible obtener un valor de lectura con el medidor de fluorescencia. (D) Porcentaje de agua. Los datos se distribuyeron normalmente y se calcularon diferencias significativas (en B, C y D) a  $P \leq 0,05$  entre las condiciones utilizando las prueba de Tukey y Dunn. Los datos mostrados corresponden a la media  $\pm$  SEM.

## 2. Extracción de FA de hojas en los distintos estadios ontogénicos para estudiar cambios en el apoplasto asociados a la senescencia foliar

Conforme progresa la senescencia, la permeabilidad e integridad de las membranas se modifica como resultado del aumento en la degradación de los lípidos estructurales, además puede ocurrir muerte celular en algunas zonas de la lámina foliar (Ferguson y Simon, 1973; Dhindsa *et al.*, 1981; Thompson *et al.*, 1987; Buchanan-Wollaston, 1997; Thompson *et al.*, 1998). Como consecuencia, los fraccionamientos subcelulares son más problemáticos en tejidos senescentes.

Por tal motivo, se evaluó la pureza /grado de contaminación de FLA extraídos a partir de hojas de los estadios de desarrollo definidos previamente, S1 a S4. El FLA se extrajo a 600 xg durante 38 min, tal como se definió en el capítulo 3, y se evaluó el grado de contaminación citosólica mediante actividad enzimática G6PDH (Figura 4.3).



**Figura 4.3. Determinación del grado de contaminación simplástica en FLA provenientes de hojas de distinto grado de desarrollo.** Actividad enzimática (UE) de la enzima citosólica G6PDH en FLA y extractos totales de hojas expresada por cantidad de proteína total (A) y como porcentaje de la UE de los extractos (B). Los valores mostrados en los gráficos corresponden a la media  $\pm$  SEM, se calcularon diferencias significativas entre cada FLA y su extracto correspondiente mediante ANOVA de dos vías: \*\*\*\*,  $P < 0,0001$ .

En los FLA S1, FLA S2 y FLA S3 los niveles de actividad G6PDH no son detectables, en contraposición con los altos niveles de esta actividad enzimática registrados para la misma cantidad de proteína en los correspondientes extractos totales de hojas. En cambio, el FLA S4 posee abundante actividad G6PDH en relación con la actividad registrada para la misma cantidad de proteína en los extractos S4 correspondientes, (Figura 4.3 A y B). Este resultado indica que en alguna etapa de la extracción los FLA S4 se estarían contaminando apreciablemente con componentes citosólicos. Esto es esperable ya que, como se mencionó anteriormente, a medida que progresa la senescencia la permeabilidad de las membranas y por ende la compartimentalización de los solutos y metabolitos se ve comprometida y aumentan las fugas de componentes citosólicos al apoplasto, algo indeseable al momento de trabajar con FLA.

En función de estos resultados, y del estado fisiológico de las hojas examinadas (Figura 4.2) se decidió utilizar hojas S2 y S3 para estudiar cambios en el FA asociados a la senescencia. Los parámetros fisiológicos de hojas S1 y S2 fueron muy similares entre sí, resultado esperable para hojas maduras no senescentes. Las hojas S2 y las S3 provienen de plantas en una misma fase de desarrollo (reproductivo), y trabajar con estos dos estadios minimizaría la detección de diferencias en el FA asociadas al desarrollo de la planta entera.

### **3. Cambio en las relaciones hídricas al comienzo de la senescencia foliar de Arabidopsis. Contenido de agua y potencial hídrico de hojas S2 y S3.**

El estado hídrico de la hoja incide en la concentración de solutos y el contenido de agua del apoplasto (Gaff y Carr, 1961; Tyree, 1976; Andersen *et al.*, 1991; Wardlaw, 2005). Por ende, conocer el estado hídrico foliar es relevante para comprender la dinámica propia del apoplasto, y para realizar un abordaje metodológico apropiado (O'Leary *et al.*, 2014).

#### **3.1. Contenido de agua y almidón**

Mientras que el porcentaje de agua disminuye marcadamente entre hojas S2 y S3 (Figura 4.2 D), los valores de Contenido Relativo de Agua (CRA) correspondientes son muy similares entre

sí (CRA S2= 0,9492 y CRA S3= 0,9548) (Figura 4.4 A), lo que sugiere que el estado hídrico es similar para hojas S2 y S3, y que las hojas S3 poseen mayor biomasa. Se determinó el peso fresco por unidad de área foliar (PF/cm<sup>2</sup>), encontrándose un aumento en S3 (Figura 4.4 B). Este aumento podría deberse en parte a que las hojas S3 presentan mayor contenido de almidón por unidad de área foliar (Figura 4.4 C).

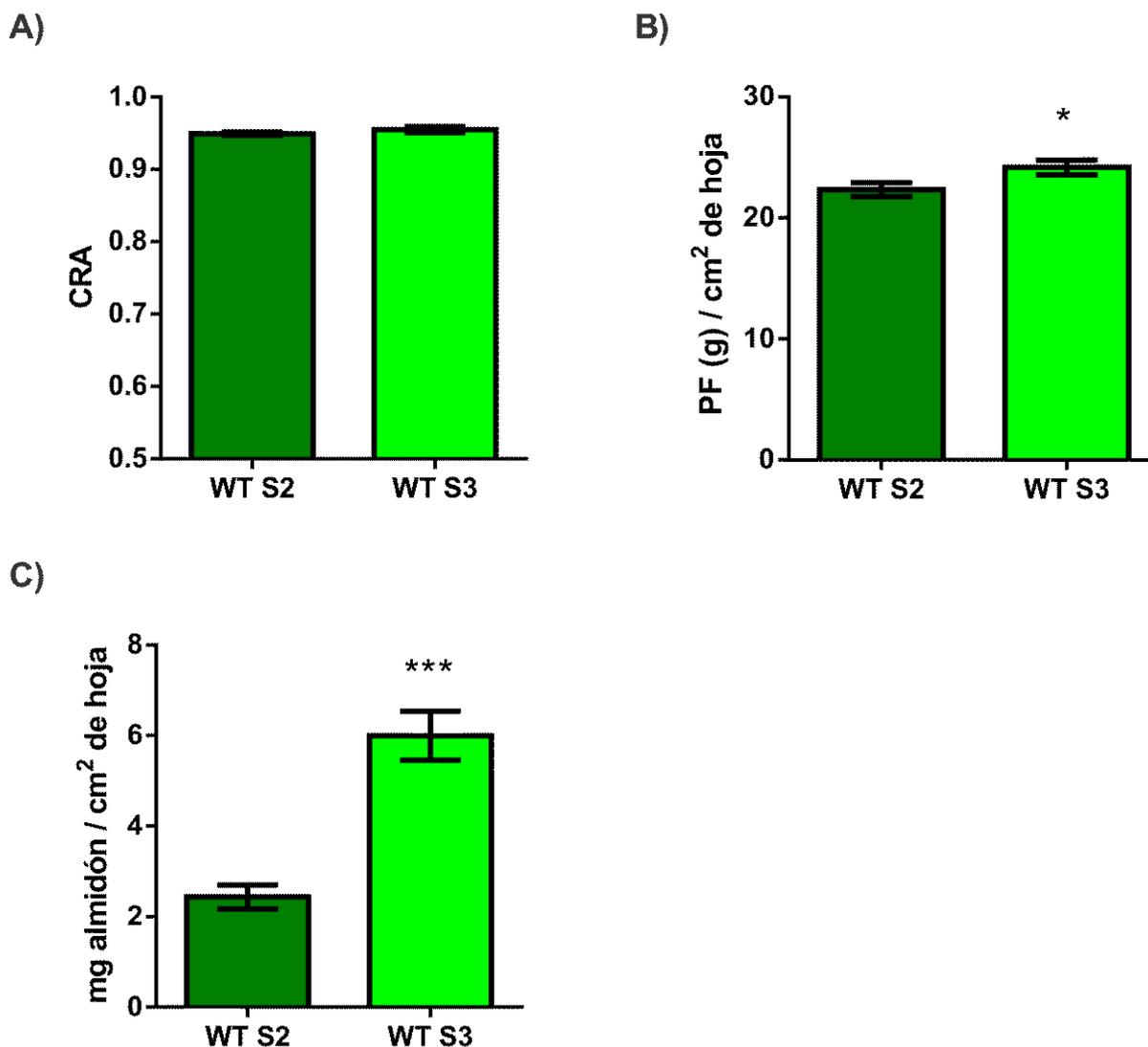


Figura 4.4. (A) Contenido relativo de agua (CRA), (B) peso fresco (PF) y (C) contenido de almidón en hojas S2 y S3. Los datos se distribuyeron normalmente y se calcularon diferencias significativas a  $P \leq 0,05$  entre S2 y S3 utilizando la prueba t de Student: \*,  $P < 0,05$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ . Los datos mostrados en los gráficos corresponden a la media  $\pm$  SEM.

### 3.2. Variaciones de Potencial agua y potencial soluto en hojas S2 y S3

En este trabajo se examinó el potencial agua utilizando psicrómetro (P) y bomba de Scholander (BS). Los detalles metodológicos de ambas técnicas se describen en el punto 3.3 de Materiales y Métodos de esta tesis. Los valores promedios de potencial hídrico ( $\Psi_{\text{agua}}$ ) medidos en discos de hojas por psicrometría presentan una disminución significativa de  $\Psi_{\text{agua}}$  en S3 respecto de S2, mientras que los valores obtenidos de hojas enteras con la bomba de Scholander no muestran diferencias significativas de  $\Psi_{\text{agua}}$  entre estadios (Figura 4.5 A y C). Llamativamente, son muy pocos los trabajos en los que se han reportado valores del potencial hídrico de hojas de *Arabidopsis*, y estas mediciones se han realizado prácticamente en su totalidad por psicrometría (Xing y Rajashekar, 2001; Brini *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2016). No existe consenso en la bibliografía sobre cuál de las dos metodologías es más confiable (Klepper y Barrs, 1968; Ritchie y Hinckley, 1975; Turner, 1988).

Por otra parte, se midió el  $\Psi_{\text{agua}}$  de macerados de hojas utilizando un psicrómetro a termocupla. Los macerados de hojas están formados por la combinación del FA y el contenido celular, y el único componente de su  $\Psi_{\text{agua}}$  es el potencial soluto ( $\Psi_s$ ). Por lo tanto, el  $\Psi_s$  de los macerados proporciona una estimación de la concentración de solutos en las hojas.

Los valores promedios de potencial soluto en las hojas S3 y S2 no presentan diferencias significativas (Figura 4.5 B y C), indicando que la concentración de solutos en ambos tipos de hojas es muy parecida.

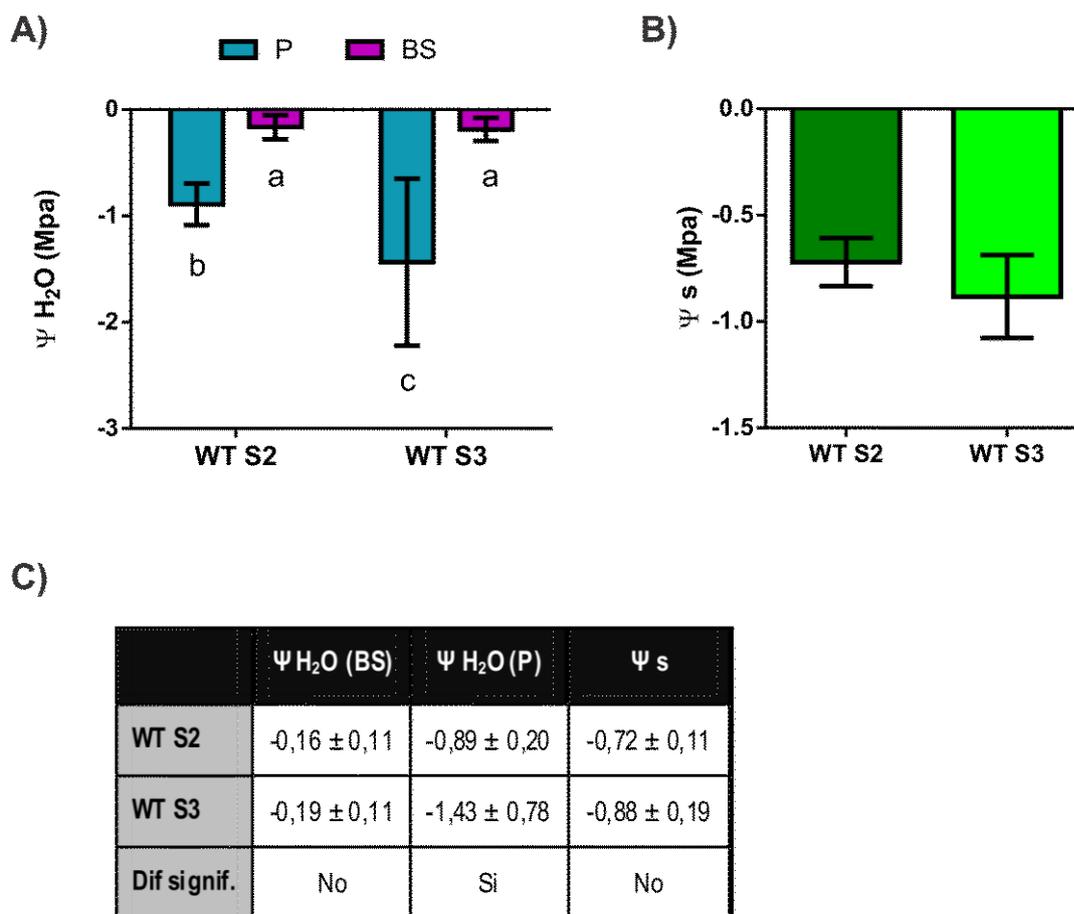


Figura 4.5. Relaciones hídricas en hojas S2 y S3. (A) Potencial agua ( $\Psi_{H_2O}$ ) medido con psicrómetro (P) a discos de hojas y con bomba de Scholander (BS) a hojas enteras. (B) potencial soluto de macerados de hoja medido con psicrómetro. (C) Tabla con los valores de  $\Psi_{H_2O}$  y  $\Psi_s$  expresados en MPa. Los datos se distribuyeron normalmente y se calcularon diferencias significativas a  $P \leq 0,05$  entre las condiciones utilizando ANOVA de dos vías (A) y t de Student (B y C). Los datos mostrados en los gráficos corresponden a la media  $\pm$  SD (desvío estándar). Para las medidas de potencial hídrico con la bomba de Scholander se realizaron 24 medidas independientes de cada estadio de hoja. Para las medidas con el psicrómetro se realizaron entre 4 y 6 réplicas biológicas.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este capítulo se seleccionaron los estadios ontogénicos foliares donde se analizarán cambios en el apoplasto asociados a la senescencia. Esta elección se basó en 1- parámetros fisiológicos utilizados ampliamente como marcadores de la senescencia, y 2- en el grado de contaminación de los FLA con componentes citosólicos indeseables.

### 1. Caracterización y selección de las hojas para la extracción de FA

En función del contenido de proteínas y clorofila, y la capacidad fotosintética de las hojas, y de la fase del desarrollo (vegetativa o reproductiva) y edad de las plantas correspondientes se establecieron cuatro estadios con distintos grados de senescencia: S1, S2, S3 y S4. Las hojas S1 y S2 presentaron características fisiológicas similares y propias de hojas maduras no senescentes, i.e. altos valores de rendimiento cuántico potencial del fotosistema II, clorofila y proteínas. Todos estos parámetros cayeron significativamente en las hojas S3 y se decrecieron aún más en hojas S4, quienes presentaron contenidos mínimos de clorofila y proteínas (Figura 4.2). Adicionalmente, el porcentaje de agua disminuyó en S3 respecto a S1 y S2, esta es una característica observada frecuentemente durante la senescencia (Masclaux *et al.*, 2000; Diaz *et al.*, 2005; Breeze *et al.*, 2011).

#### 1.1. Hojas maduras completamente expandidas y hojas senescentes para estudiar cambios en el FA asociados a la senescencia foliar

Las principales diferencias en cuanto a rendimiento cuántico máximo del fotosistema II, y contenido de clorofila y proteínas foliares, se registraron entre los estadios S2 y S3 por lo que ambos estadios se consideran fundamentales para el estudio de los cambios en el apoplasto asociados a la senescencia en esta tesis.

Un requisito fundamental a la hora de analizar cambios en el apoplasto durante la senescencia es la obtención de FLA que estén libres (o presenten niveles mínimos) de contaminación con componentes citosólicos. Por lo tanto, se evaluó la eficiencia para extraer FLA libres de contaminación a partir de hojas de los cuatro estadios de desarrollo establecidos previamente. Se encontró marcada contaminación citosólica en los FLA provenientes de hojas S4, posiblemente relacionada al deterioro de membranas y pérdida de compartimentalización, más que con limitaciones metodológicas. Por otro lado, los parámetros fisiológicos evaluados indican que las hojas S4 se encuentran en una etapa de senescencia muy avanzada, con niveles mínimos de nutrientes y por ende su análisis resulta poco relevante en el contexto de este

trabajo, enfocado en comprender el papel del apoplasto en el inicio y transcurso de la senescencia, más que en la etapa final del proceso. En base a lo expuesto, el estadio S4 se considera prescindible para el objetivo de esta tesis y se descartó del análisis en el resto de los experimentos.

Las hojas S2 y S3 provienen de plantas en etapa reproductiva y corresponden a una misma cohorte de hojas muestreadas en distintos momentos de su desarrollo. Las diferencias que se puedan encontrar entre S2 y S3 se deberían principalmente al grado de senescencia foliar y no estarían relacionadas al desarrollo de la planta entera. Dado que las hojas S1 y S2 muestran similitudes fisiológicas se descartó el estadio S1 del resto de los análisis, y el trabajo se concentró en hojas S2 y S3 de aquí en adelante.

## **2. Cambio en las relaciones hídricas al comienzo de la senescencia foliar de *Arabidopsis***

Para comprender la dinámica del apoplasto a lo largo de la senescencia y poder abordar su estudio con una metodología adecuada, es importante conocer el estado hídrico foliar ya que éste repercute directamente en el contenido de agua del apoplasto, y por ende en la concentración de solutos (Gaff y Carr, 1961; Tyree, 1976; Andersen *et al.*, 1991; Wardlaw, 2005).

En *Arabidopsis* el peso fresco aumenta al principio de la senescencia foliar para luego caer a medida que progresa la senescencia (Diaz *et al.*, 2005; Breeze *et al.*, 2011). Las hojas S3 presentaron un peso fresco significativamente mayor que las hojas S2, y esto podría deberse a un aumento en el contenido de materia seca como por ejemplo almidón en hojas S3 (Figura 4.4), y no a diferencias en el contenido de agua. A pesar de su menor porcentaje de agua (Figura 4.2), las hojas S3 presentaron un contenido relativo de agua (CRA) y concentración de solutos similares a las hojas S2 (Figura 4.4 A y Figura 4.5 B). Por su parte, el potencial hídrico promedio fue bastante menor en hojas S3 (Figura 4.5 A). Estos resultados indican que las hojas S3 a pesar de mostrar síntomas claros de senescencia, mantienen un estado hídrico similar a las hojas no senescentes, con mayores contenidos de materia seca.

La presencia de mayor cantidad de almidón en hojas S3 es esperable, ya que en general los niveles de almidón aumentan a medida que la hoja madura, alcanzando un máximo al inicio de la senescencia foliar, para luego decaer a medida que progresa la removilización de nutrientes (Masclaux *et al.*, 2000; Diaz *et al.*, 2008; Avila-Ospina *et al.*, 2014).

### 3. Discrepancias entre las medidas de potencial agua obtenidas con la bomba de Scholander y con el psicrómetro

Los resultados obtenidos con estas técnicas son claramente distintos (Figura 4.5 A y C). Existen numerosos ejemplos que demuestran que puede haber considerable discrepancia entre el potencial hídrico foliar medido por psicrometría y medido con la cámara de presión. En muchas especies de dicotiledoneas, a potenciales agua por encima de -1 MPa los valores obtenidos por psicrometría fueron más bajos que los obtenidos con la cámara de presión (Klepper y Barrs, 1968; Ritchie y Hinckley, 1975; Turner *et al.*, 1984). Por ejemplo, en hojas de algodón se obtuvieron valores de hasta 0,5 MPa más bajos por psicrometría (Klepper y Barrs, 1968). Turner y col. (1984) observaron que el potencial hídrico calculado con la cámara de presión se correlacionó mucho más estrechamente con el potencial hídrico medido por psicrometría *in situ* cerca de la vena media que en la periferia de la hoja, y concluyeron que la cámara de presión estaría midiendo el potencial hídrico de las células cercanas al sitio de corte y no un promedio para la hoja (Turner *et al.*, 1984). En concordancia, Tyree y Zimmermann (2002) demostraron que el potencial medido en la cámara de presión para una hoja equilibrada en realidad corresponde al potencial de presión del xilema, que es menos negativo que el de la hoja entera.

En hojas de *Arabidopsis thaliana*, únicamente se han reportado valores de potencial agua obtenidos mediante psicrometría. Los valores para hojas jóvenes sanas provenientes de plantas bien regadas y sin síntomas de estrés rondan entre -0,35 y -0,87 MPa (Xing y Rajashekar, 2001; Brini *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2016), dentro del orden de los valores obtenidos por psicrometría para hojas no senescentes en esta tesis (Figura 4.5 A y C).

Dentro de una hoja senescente natural, las partes distales en general senescen primero, mientras que las zonas que rodean las venas tienden a permanecer activas más tiempo (Figura 4.1) (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Con lo cual, dentro de las hojas S3 podrían existir diferencias cuantificables en el potencial hídrico (Roy y Berger, 1983; Turner *et al.*, 1984), este hecho explicaría los grandes desvíos obtenidos por psicrometría en hojas S3 (Figura 4.5 A y C).

Curiosamente, el potencial soluto ( $\Psi_s$ ) de la hoja (para S2 y S3) fue mayor que el potencial agua ( $\Psi_{H_2O}$ ) correspondiente, si bien ambos potenciales se determinaron por psicrometría (Figura 4.5). Dado que los macerados de hoja utilizados para medir  $\Psi_s$  (la preparación de estos macerados se explica en el punto 3.3.2 de Materiales y Métodos) representan una mezcla del contenido celular, más fluido apoplastico y líquido xilemático (ambos con  $\Psi_s$  mayores que el  $\Psi_s$

celular), podría ser posible que el contenido apoplástico y xilemático diluyera apreciablemente el contenido celular durante la preparación del macerado, generando un aumento del  $\Psi_s$  de este último.

# **CAPÍTULO 5: CAMBIOS FISIOLÓGICOS EN EL APOPLASTO ASOCIADOS A LA SENESCENCIA FOLIAR.**



## RESUMEN

Se ha demostrado ampliamente que la composición del fluido apoplástico se modifica en respuesta a estreses bióticos y abióticos, favoreciendo la aclimatación, y en última instancia, la viabilidad de la planta. A pesar de que varias evidencias sugieren que el apoplasto cumpliría un rol significativo en la regulación y ejecución de la senescencia, como en la señalización y la removilización de nutrientes, hasta el momento el conocimiento en el tema es fragmentario. En este capítulo se analizaron cambios en distintos parámetros del apoplasto asociados a la senescencia natural. Se examinaron y caracterizaron parámetros fisiológicos tales como el volumen de espacio intercelular ocupado por aire ( $V_{\text{aire}}$ ) y por fluido apoplástico ( $V_{\text{FA}}$ ), la cantidad de pared celular y de pectinas, la concentración de solutos y de  $H^+$  en el apoplasto de hojas maduras no senescentes (S2) y de hojas en una etapa temprana de senescencia (S3).



## INTRODUCCIÓN

### 1. El apoplasto en la respuesta a estrés

Las plantas como organismos sésiles son desafiadas por su ambiente biótico y abiótico significativamente más que la mayoría de los animales. Muchos de los estímulos ambientales no son percibidos directamente por la célula sino a través de cambios en el apoplasto (Hoson, 1998). Sin dudas, la respuesta a estrés ha sido el escenario en la mayor parte de los estudios sobre apoplasto, y de donde proviene la mayor información sobre este compartimiento. Dejando de lado los cambios en el proteoma del fluido apoplástico (tema que se analiza específicamente en el capítulo siguiente de esta tesis), las principales modificaciones y respuestas fisiológicas que tienen lugar en el apoplasto de plantas enfrentadas a distintos tipos de estrés abarcan: el ajuste osmótico, y cambios en las concentraciones de diversos metabolitos e iones.

#### 1.1. El papel del apoplasto en el ajuste osmótico

El ajuste osmótico es una de las principales adaptaciones fisiológicas asociada con la tolerancia a la salinidad y déficit hídrico en las plantas (Sánchez *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2007b; Flowers *et al.*, 2015). Distintas evidencias sugieren que el apoplasto juega un papel crucial en el ajuste osmótico pasivo; por ejemplo, plantas de *Beta macrocarpa* y maíz bajo estrés salino presentan un contenido de fluido apoplástico en las hojas significativamente mayor que las plantas control (Lohaus *et al.*, 2000; Hamouda *et al.*, 2016). Una respuesta similar se observó en plantas de trigo expuestas a estrés por sequía (Rascio *et al.*, 1992). Se ha propuesto que la alteración en el contenido de fluido apoplástico junto con la reducción del volumen celular podrían contribuir a la concentración intracelular pasiva de solutos y, por lo tanto, al mantenimiento de la turgencia en las células de plantas estresadas (Touchette *et al.*, 2009; Salpeter *et al.*, 2012; Hamouda *et al.*, 2016). También se han observado aumentos en la cantidad de fluido apoplástico frente a infecciones con hongos patógenos (Tetlow y Farrar, 1993).

#### 1.2. Papel de diversos metabolitos e iones del apoplasto en la aclimatación al estrés

##### 1.2.1. Especies reactivas del oxígeno (EROs) y daño oxidativo

Las EROs se producen principalmente en el apoplasto por actividad de las NADPH oxidasas de la membrana plasmática (Torres *et al.*, 2002; Torres y Dangl, 2005). Además de las NADPH oxidasas, se ha propuesto que las peroxidasa de la pared celular podrían estar involucradas en

la producción de EROs en el apoplasto (Bolwell *et al.*, 2002; Bindschedler *et al.*, 2006; O'Brien *et al.*, 2012a; Mammarella *et al.*, 2015). Las EROs apoplásticas juegan un papel importante en la respuesta de defensa frente a patógenos (Vanacker *et al.*, 2000; Bindschedler *et al.*, 2006; Mammarella *et al.*, 2015). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se acumula en el espacio extracelular como parte de la respuesta hipersensible (HR), un mecanismo de defensa de las plantas que previene la propagación de infecciones por patógenos gracias a la muerte rápida de las células próximas al sitio de infección (Vanacker *et al.*, 2000). Las EROs apoplásticas pueden afectar la expresión de genes involucrados en la aclimatación al estrés abiótico relocalizándose en el citoplasma donde junto con otras EROs producidas intracelularmente alteran el estado redox de proteínas reguladoras clave, como los factores de transcripción (Choudhury *et al.*, 2017).

El ácido ascórbico protege a organelas y células de las EROs que se acumulan debido a daños oxidativos inducidos por el estrés (Latif *et al.*, 2016; Mukhtar *et al.*, 2016; Naz *et al.*, 2016). El contenido de ácido ascórbico apoplástico sería vital para la percepción del estrés ambiental y estaría implicado en las subsecuentes señales y respuestas en las plantas (Horemans *et al.*, 2000; Zechmann, 2011; Shapiguzov *et al.*, 2012; Akram *et al.*, 2017). La ascorbato oxidasa (AO) inicia la oxidación del ácido ascórbico en el apoplasto. Se observó una mayor tolerancia a la sal en *Arabidopsis* y plantas de tabaco con expresión suprimida del gen de la AO apoplástica (Yamamoto *et al.*, 2005). Resultados similares indican un aumento en la tolerancia al estrés hídrico relacionados con una disminución de la actividad de la AO en tomate (Garchery *et al.*, 2013).

### 1.2.2. pH

El pH del apoplasto está controlado en mayor medida por las bombas de protones de la membrana plasmática (MP-H<sup>+</sup>-ATPasas) que exportan H<sup>+</sup> del citoplasma a expensas del ATP (Sondergaard *et al.*, 2004). Estas bombas son las responsables de la formación del gradiente de pH a ambos lados de la membrana plasmática que posibilita el transporte de otros iones en contra de su gradiente de concentración (Arango *et al.*, 2003). Durante el desarrollo, la acidificación del apoplasto es importante por ejemplo en la absorción de minerales en las raíces, en la carga de metabolitos al floema (Palmgren, 2001) y en la expansión celular mediada por auxinas (Hager, 2003; Spartz *et al.*, 2014; Barbez *et al.*, 2017).

Distintos tipos de estrés provocan una alcalinización transitoria del apoplasto (Felle, 2001; Jia y Davies, 2007; Geilfus, 2017). El aumento en el pH desempeñaría un papel fundamental en la señalización sistémica de eventos de estrés desde la raíz hasta la parte aérea a través de la vía

apoplástica (Felle *et al.*, 2005; Sharp y Davies, 2009). Los mecanismos por los cuales los distintos eventos de estrés modulan la alcalinización del apoplasto son diferentes y aún son poco comprendidos, pero en todos ellos parecen estar involucradas las MP-H<sup>+</sup>-ATPasas (Geilfus, 2017).

Las hojas de cebada, alcalinizan transitoriamente su apoplasto foliar en dos fases consecutivas luego de la infección por el hongo patógeno *Blumeria graminis*. En una primera fase, a los pocos minutos luego de la infección, el pH del apoplasto foliar aumenta transitoriamente en una unidad, de pH 5 a pH 6, y permanece estable cerca de una hora. En una segunda fase, pasado un día de la infección, el pH apoplástico aumenta de nuevo hasta llegar a pH 7 y permanece estable por un período de 20-30 horas, antes de volver al pH original (Felle *et al.*, 2004; Felle *et al.*, 2005). En particular, se ha sugerido que esta alcalinización de mayor duración contribuiría a la resistencia contra enfermedades causadas por microorganismos fitopatógenos, ya que minimizaría el crecimiento patogénico, por ejemplo impidiendo la incorporación activa de nutrientes ligada al simporte de H<sup>+</sup> (Felle *et al.*, 2004; Felle *et al.*, 2005).

Durante el estrés por sequía, la alcalinización del apoplasto podría retrasar el crecimiento y controlar la apertura estomática mediante la regulación de la compartimentalización de ABA (Hayashi *et al.*, 2014; Geilfus, 2017). La alcalinización transitoria del apoplasto provocada por el estrés salino también promueve un aumento en la concentración de ABA apoplástico, que se acumula en las células oclusivas induciendo el cierre estomático al inicio del episodio de estrés salino (Geilfus *et al.*, 2015). Se ha propuesto que bajo condiciones de salinidad del suelo, la alcalinización del apoplasto foliar inducible por Cl<sup>-</sup> reduce la tasa de transpiración, y de esta forma reduce la absorción de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> del suelo (Geilfus, 2017). La capacidad de regular el pH apoplástico en la epidermis, evitando la alcalinización frente a estrés salino, previene la rigidez de la pared celular, e incluso conduce a un incremento en su extensibilidad, permitiendo mantener la tasa de crecimiento. En híbridos de maíz tolerantes y sensibles a NaCl sometidos a una salinidad pronunciada (100 mM NaCl), tras 8 días de estrés el pH del apoplasto en la epidermis permanece invariable, a pH 4,5, en el híbrido sensible, mientras cae prácticamente una unidad, de pH 4,5 a 3,5; en el híbrido tolerante (Zörb *et al.*, 2015).

### 1.2.3. Azúcares

En *Arabidopsis* la infección por bacterias patógenas provoca la fuga de azúcares desde el interior celular al apoplasto (el principal sitio de colonización bacteriana), por la desintegración

de las membranas o bien por la activación transcripcional de exportadores de sacarosa de la familia SWEET (Wang *et al.*, 2012; Streubel *et al.*, 2013; Cohn *et al.*, 2014). Se ha sugerido que las plantas restringen la proliferación bacteriana en el apoplasto controlando los niveles de azúcar extracelular, mediante transportadores de membrana específicos (STPs) que importan al interior celular los monosacáridos generados por la invertasa extracelular cwINV en el apoplasto (Yamada *et al.*, 2016).

## 2. Cambios en el apoplasto de las hojas asociados a la ontogenia

Los cambios apoplásticos asociados a la ontogenia son muy poco conocidos. A continuación se describen algunos cambios físicos y químicos que ocurren en el apoplasto a medida que las hojas envejecen.

### 2.1. Volumen de apoplasto

En varias especies se han observado cambios en los volúmenes de aire ( $V_{\text{aire}}$ ) y de fluido apoplásticos ( $V_{\text{FA}}$ ) asociados a la edad de la hoja (Husted y Schjoerring, 1995; Lohaus *et al.*, 2001; Nouchi *et al.*, 2012). Por ejemplo, en *Brassica napus* y *Vicia faba* los  $V_{\text{FA}}$  y  $V_{\text{aire}}$  apoplásticos de las hojas aumentan entre un 35 y un 100% respectivamente con la edad de la hoja (Husted y Schjoerring, 1995; Lohaus *et al.*, 2001). En las hojas de arroz, el  $V_{\text{FA}}$  apoplástico disminuye y el  $V_{\text{aire}}$  aumenta durante la senescencia, (Nouchi *et al.*, 2012).

### 2.2. pH y concentración de amonio

Se observó una disminución en la concentración de  $\text{NH}_4^+$  en el apoplasto de hojas de *Brassica napus* a medida que la hoja envejece, estos cambios no fueron acompañados por alteraciones en el pH apoplástico (Husted y Schjoerring, 1995). En Rye grass (*Lolium perenne*) el pH apoplástico disminuyó marcadamente al inicio de la senescencia foliar natural, mientras que la concentración de  $\text{NH}_4^+$  apoplástica permaneció estable; pero hacia finales de la senescencia el pH apoplástico aumentó levemente y el  $\text{NH}_4^+$  se acumuló en el apoplasto de manera pronunciada (Mattsson y Schjoerring, 2003). Por el contrario, en hojas de tabaco tanto el pH como la concentración de  $\text{NH}_4^+$  en el apoplasto aumentaron durante las primeras etapas de la senescencia y luego cayeron hacia el final de la senescencia (Wu *et al.*, 2016b).

### 2.3. Urea

El aumento en la degradación de proteínas que ocurre durante la senescencia conduce a una mayor producción de urea (Witte, 2011) que es liberada al apoplasto, donde es hidrolizada a

$\text{NH}_4^+$  (Bohner *et al.*, 2015). Según el análisis de exudados de peciolo la urea aportaría alrededor del 13% del nitrógeno (N) removilizado (Bohner *et al.*, 2015). La actividad del promotor del gen *DUR3*, que codifica para el transportador de urea de alta afinidad *DUR3*, se localiza mayoritariamente en el tejido vascular de hojas senescentes. *DUR3* se encarga de recuperar la urea apoplástica como fuente para la removilización de N especialmente en etapas tardías de la senescencia de la hoja (Bohner *et al.*, 2015).

#### 2.4. Poliaminas

Las poliaminas son compuestos de naturaleza policatiónica, implicadas en el control de la división celular, embriogénesis, maduración de frutos y en las respuestas a estrés. (Takahashi y Kakehi, 2009). Como parte de la respuesta hipersensible las plantas secretan espermidina al apoplasto, donde su catabolismo conduce a la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Yoda *et al.*, 2006; Marina *et al.*, 2008). Durante la senescencia foliar inducida por oscuridad de hojas de cebada, se detectaron incrementos de los niveles de poliaminas apoplásticas, y su catabolismo generó una acumulación de diaminopropano y  $\text{H}_2\text{O}_2$  apoplásticos, que podrían participar en procesos asociados a la senescencia (Sobieszczuk-Nowicka *et al.*, 2015; Sobieszczuk-Nowicka, 2017).



## **HIPÓTESIS**

A medida que las hojas atraviesan la etapa de senescencia tienen lugar cambios fisiológicos en el apoplasto.

## **OBJETIVO ESPECÍFICO**

Examinar y caracterizar distintos parámetros fisiológicos del compartimiento apoplástico en hojas no senescentes (S2) y al inicio de la senescencia (hojas S3).



## RESULTADOS

### 1. Cambios en el volumen de aire y de fluido apoplastico durante la senescencia foliar (variaciones entre hojas S2 y S3)

En la figura 5.1 se muestran los volúmenes de FA ( $V_{FA}$ ) y de espacio apoplástico ocupado por aire ( $V_{aire}$ ), calculados para hojas S2 y S3 mediante el método del Indigo Carmín a lo largo de múltiples ensayos independientes. Los resultados obtenidos indican que el  $V_{FA}$  aumenta de manera significativa con la edad de la hoja. Las hojas S3 presentaron un 170% más de FA en relación a las hojas S2 cuando los volúmenes de FA se expresan por unidad de área foliar:  $0,49 \mu\text{l cm}^{-2}$  en hojas S2 ( $V_{FA}$  S2) y  $1,34 \mu\text{l cm}^{-2}$  en hojas S3 ( $V_{FA}$  S3). Cuando los  $V_{FA}$  son expresados por peso fresco las hojas S3 contienen un 157% más de  $V_{FA}$  que las hojas S2:  $V_{FA}$  S2=  $21,4 \mu\text{l g}^{-1}$ , y  $V_{FA}$  S3=  $55 \mu\text{l g}^{-1}$ .

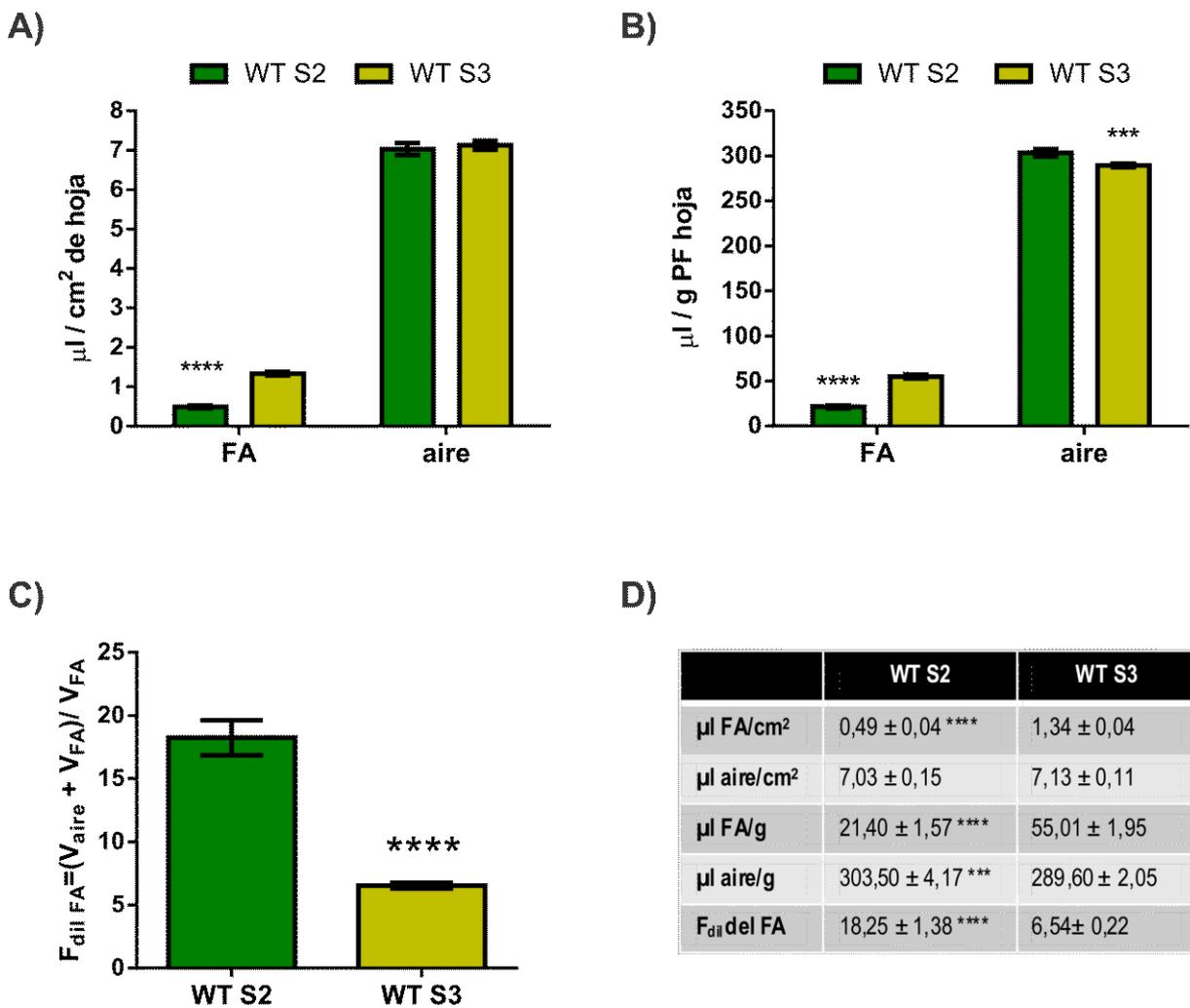
El volumen de apoplasto que es ocupado por aire permanece más estable a lo largo de la senescencia. Al expresar el  $V_{aire}$  por unidad de área foliar no se observaron diferencias significativas entre estadios S2 y S3, resultando el  $V_{aire} = 7 \mu\text{l}$  por cada  $\text{cm}^{-2}$  de hoja. Cuando  $V_{aire}$  es expresado por peso fresco, se obtiene una ligera disminución, de 4,6% en hojas S3 en relación a S2:  $V_{aire}$  S2=  $303,5 \mu\text{l g}^{-1}$  y  $V_{aire}$  S3=  $289,6 \mu\text{l g}^{-1}$ . Las diferencias observadas en el  $V_{FA}$  y en el  $V_{aire}$  cuando éstos se expresan por unidad de área foliar o por peso fresco se deben al mayor peso fresco por unidad de área de las hojas S3 respecto a S2 (Figura 4.4 B).

### 2. Estimación de la dilución de FA en muestras de FLA de hojas S2 y S3

A partir de los  $V_{FA}$  y de  $V_{aire}$  apoplásticos se calcularon los factores de dilución de los FA ( $F_{dil FA}$ ) obtenidos de hojas S2 y S3 (Figura 5.1 C). El  $F_{dil FA}$  se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$F_{dil FA} = (V_{FA} + V_{aire}) / V_{FA}$$

Conociendo el  $F_{dil FA}$  se calculó la fracción de FA presente en cada FLA. El FLA proveniente de hojas S2 contiene en promedio 5,48% de FA mientras que el FLA proveniente de hojas S3 contiene 15,3% de FA. Es decir, por cada  $100 \mu\text{l}$  de FLA obtenido de hojas S2,  $5,48 \mu\text{l}$  son FA y  $95 \mu\text{l}$  son Solución de infiltración (ScIn,  $\text{ddH}_2\text{O}$ ), en hojas S3, por cada  $100 \mu\text{l}$  de FLA un promedio de  $15,3 \mu\text{l}$  son FA y  $85 \mu\text{l}$  son ScIn.



**Figura 5.1. Volumen de apoplasto ocupado por FA y por aire en hojas de distinto grado de desarrollo.** Los  $V_{aire}$  y  $V_{FA}$  se expresaron en µl por gramo de peso fresco, PF, de hoja (A) y µl por unidad de área de hoja (B). C) Factor de dilución de los FA ( $F_{dil FA}$ ) en las muestras de FLA provenientes de hojas S2 y S3. La tabla (D) muestra los valores graficados en A-C). Los valores mostrados corresponden a la media ± SEM. Se calcularon diferencias significativas a  $P \leq 0,05$  entre los estadios utilizando la prueba t de Student. Los asteriscos indican diferencias significativas: \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0,0001$ .

### 3. Análisis de la pared celular en hojas S2 y S3, y su relación con el volumen de FA

Se ha propuesto que las plantas tienen potenciales mátricos significativos, que estarían asociados principalmente con las paredes celulares (Boyer, 1967), en particular con la concentración de ácidos poliurónicos ionizados (i.e. pectinas ionizadas) (Tyree, 1976). A mayor concentración de pectinas ionizadas, más negativo sería el valor de potencial mátrico de la pared celular y mayor el  $V_{FA}$  (Boyer, 1967). En resumen, la cantidad de pared y la cantidad y el

grado de ionización de las pectinas pueden afectar el volumen de fluido apoplástico. Se ha propuesto que el volumen de fluido apoplástico foliar se correlaciona positivamente con la cantidad de pared celular, ya que hojas de especies con mayor cantidad pared celular presentaron más fluido apoplástico que las hojas de especies con menor cantidad de pared (Boyer, 1967). El marcado aumento de  $V_{FA}$  en hojas S3 (Figura 5.1) podría indicar diferencias en la cantidad y/o composición de la pared celular entre estas hojas. Para testear esta posibilidad se plantearon dos aproximaciones: a-comparar la cantidad de pared celular y pectinas presente en hojas S2 y S3, y b-comparar la cantidad de fluido apoplástico,  $V_{FA}$ , de hojas S2 y S3 de plantas WT con el  $V_{FA}$  de hojas S2 y S3 de plantas transgénicas que poseen mayor cantidad de pared celular y pectinas. Para esto se utilizó una línea de Arabidopsis que expresa en forma ectópica el módulo de unión a carbohidratos de la expansina2 de frutillas, línea “P3”, caracterizada por tener paredes celulares más gruesas y con mayor proporción de pectinas que las de plantas WT (Las hojas P3 presentan un 17% más de residuo de pared, residuo insoluble en alcohol, RIA, y un 40% más de pectinas en el RIA) (Nardi *et al.*, 2015) (Figura 5.2). Cabe aclarar que en los experimentos donde se examinó P3, como plantas control se utilizaron plantas provenientes de la misma línea salvaje sobre la que se generó P3.

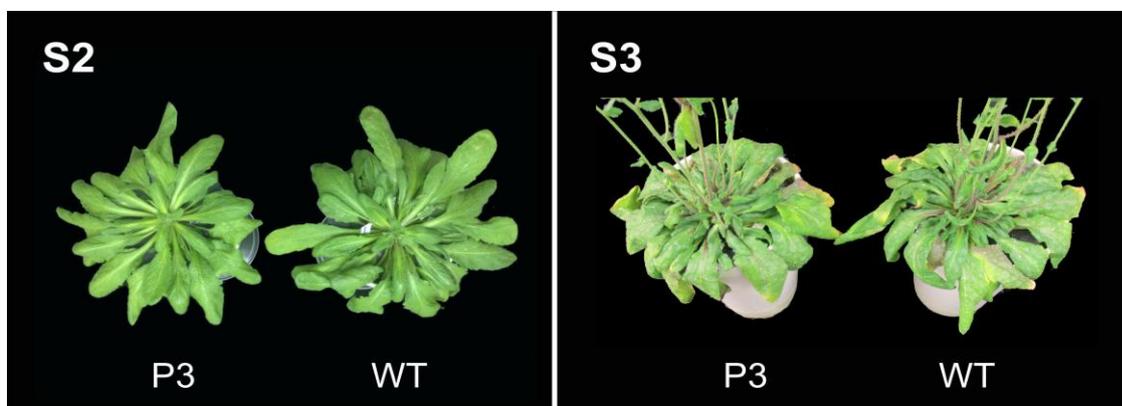
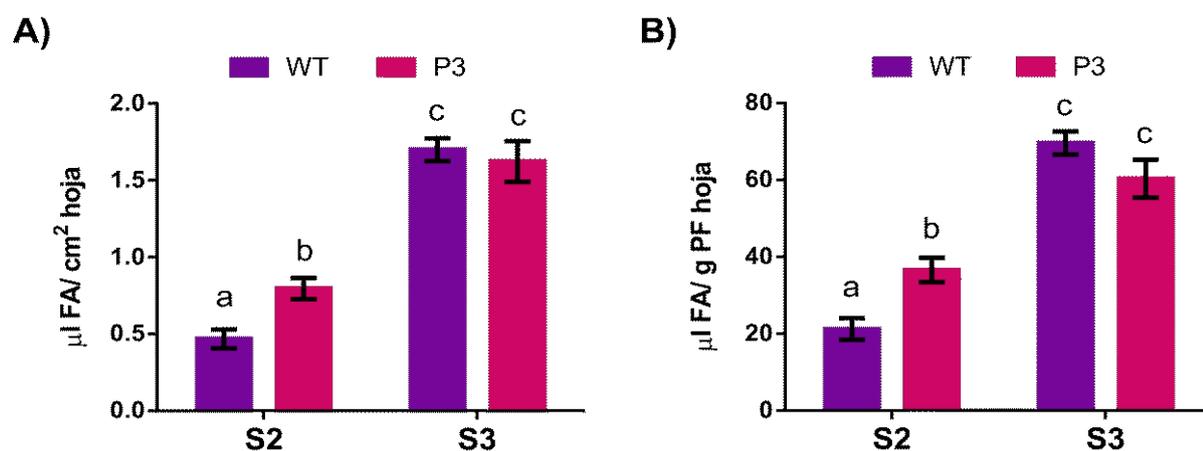


Figura 5.2. Plantas transgénicas de la línea P3 y plantas WT (background usado para obtener la línea P3) representativas de los estadios S2 y S3.

### 3.1. Relación entre el volumen de FA y la cantidad de pared celular en plantas WT y P3

Las plantas P3 no presentaron diferencias en el ritmo de senescencia foliar (niveles de clorofila y proteínas) respecto de las plantas WT (resultados no mostrados), por lo que se extrajo FA de hojas S2 ó S3 de plantas P3 y WT simultáneamente. En el caso de las hojas S2, las

provenientes de plantas P3 (S2 P3) presentaron un 70 % más de  $V_{FA}$  por unidad de área foliar y por gramo de PF que las hojas de plantas WT (S2 WT) (Figura 5.3). El volumen de FA en hojas S3 no presentó diferencias significativas entre plantas P3 y WT (Figura 5.3). Es posible que en hojas no senescentes (hojas S2), donde la fracción de FA es marcadamente menor que en hojas S3, el  $V_{FA}$  estuviera asociado a la cantidad de pared y/o de pectinas presente, y que esta asociación se perdiera o no fuera detectable al aumentar el  $V_{FA}$  durante la senescencia.



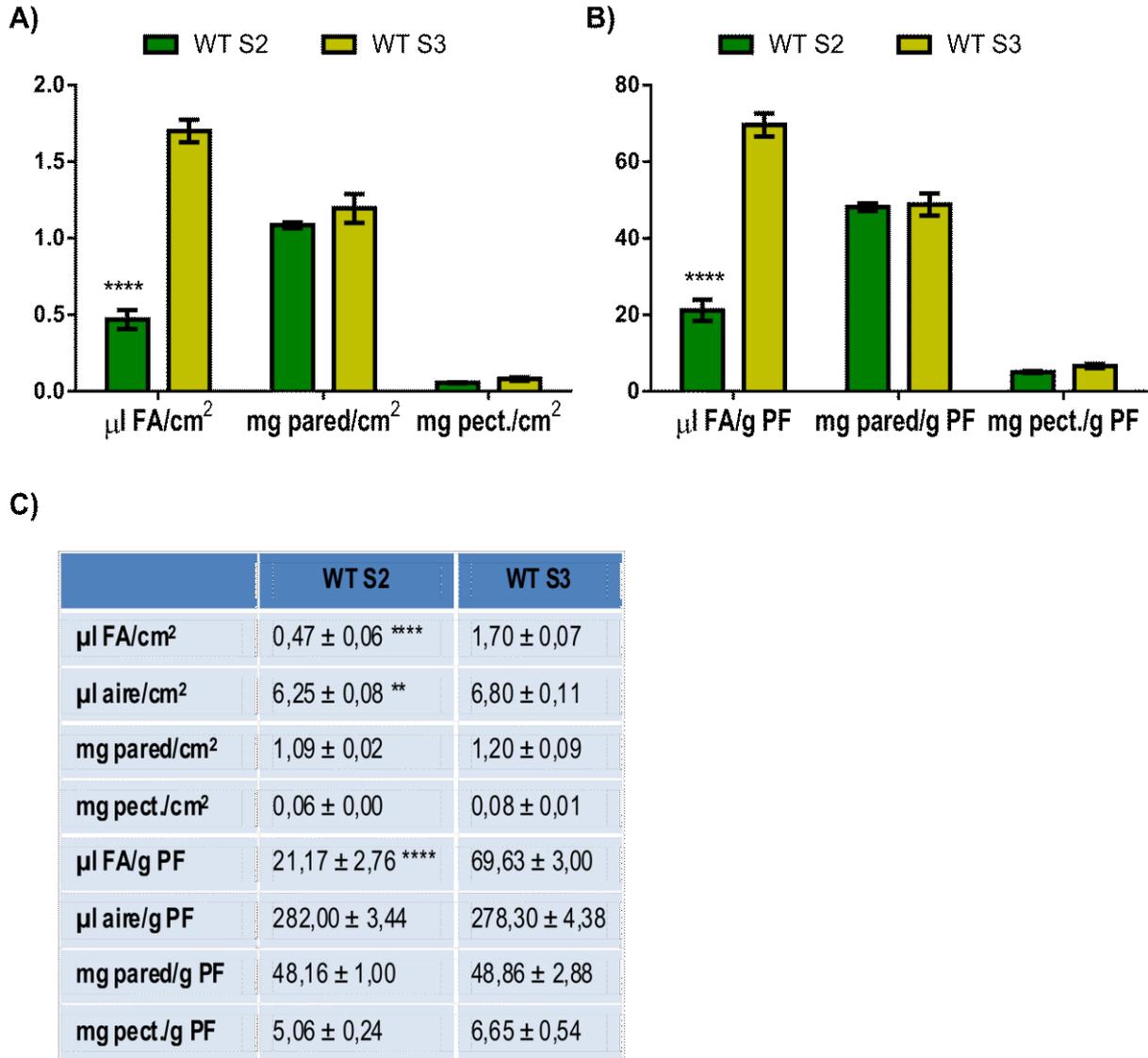
**Figura 5.3. Volumen de FA en hojas S2 y S3 de genotipos WT y P3.** A)  $V_{FA}$  por unidad de área de hoja. B)  $V_{FA}$  por unidad de peso fresco (PF) de hoja. Se calcularon diferencias significativas a  $P \leq 0,05$  entre las condiciones utilizando la prueba de Tukey. Los datos mostrados en el gráfico corresponden a la media  $\pm$  SEM. Las letras indican diferencias significativas.

### 3.2. Cuantificación de pared celular y de pectinas en hojas S2 y S3

Para examinar si tienen lugar cambios significativos en la cantidad y/o composición de la pared celular durante la senescencia que pudieran explicar el aumento en el  $V_{FA}$  en hojas senescentes, se cuantificó simultáneamente la cantidad de pared y de pectinas en hojas S2 y S3. En este ensayo se utilizaron las mismas plantas WT que en el punto anterior, caracterizadas previamente (Nardi *et al.*, 2015). La estimación de la cantidad de pared se describe en el punto 10 de Materiales y Métodos. Brevemente, se obtuvo un residuo insoluble en alcohol (RIA), al que se le restó el almidón presente en el mismo. La extracción de pectinas totales de las paredes celulares y su cuantificación se describen en el punto 12.1 de Materiales y Métodos.

El contenido de pared celular y de pectinas no varía significativamente entre hojas S2 y S3, por lo que no explican el aumento significativo en el  $V_{FA}$  en hojas S3 en relación a S2 (Figura 5.4 A, B y C). Anteriormente se mencionó que el potencial mátrico de las paredes no sólo depende de

la cantidad de pared celular y de pectinas sino también de su grado de ionización (Tyree, 1976). Como el grado de ionización de las pectinas en las paredes celulares se incrementa con el aumento del pH, no se puede descartar que las paredes S3 tengan potenciales mátricos más negativos, y por lo tanto adsorban más agua respecto a S2, como resultado del mayor pH apoplástico (el pH del apoplasto se analiza en el punto 5 de este capítulo).



**Figura 5.4. Volumen de apoplasto ocupado por FA y por aire y cantidad de pared celular y pectinas (pect.) en hojas WT S2 y S3.** A)  $\mu\text{l FA}$ , mg de pared y mg de pectinas por  $\text{cm}^2$  de hoja. B)  $\mu\text{l FA}$ , mg de pared y mg de pectinas por gramo de peso fresco (PF) de hoja. C)  $V_{\text{aire}}$ ,  $V_{\text{FA}}$  y cantidad de pared y pectinas expresados por  $\text{cm}^2$  de hoja y por gramo de PF de hoja. La cantidad de pectinas se expresó como mg de ácidos urónicos. Para calcular el  $V_{\text{FA}}$  y el  $V_{\text{aire}}$  se realizaron 5 repeticiones biológicas para S2 y 6 para S3. La cantidad de pared y pectinas se calculó a partir de 4 repeticiones biológicas

para cada estadio. Los datos se distribuyeron normalmente y se calcularon diferencias significativas a  $P \leq 0,05$  entre los estadios utilizando la prueba t de Student. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas: \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*\*,  $P < 0,0001$ .

### 3.3. Pectinas solubles en el FA

La expresión de genes que codifican para enzimas poligalacturonasas (PG) aumenta en hojas senescentes (Lee *et al.*, 2001; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003), por lo tanto podría ser posible que los fragmentos pécticos liberados al FA por la actividad PG tengan efecto en el potencial soluto y por ende sean responsables de los cambios observados en el  $V_{FA}$  durante la senescencia de la hoja.

Para determinar si existen diferencias en la cantidad de fragmentos pécticos difusibles en el FA de hojas de Arabidopsis a lo largo de la senescencia, se cuantificaron ácidos urónicos en FLA S2 y S3. Se utilizó el método colorimétrico del fenil-fenol (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973) adaptado para muestras con baja proporción ácidos urónicos / azúcares neutros (Filisetti-Cozzi y Carpita, 1991) (ver punto 12.2 de Materiales y Métodos). No se detectaron ácidos urónicos en los FLA de hojas S2 y S3. Considerando la sensibilidad del método (Filisetti-Cozzi y Carpita, 1991), las muestras de FLA contendrían menos de 0,15 nmol (= 0,03  $\mu$ g) de ácidos urónicos por  $\mu$ l y probablemente se requieran técnicas más sensibles como HPLC o GC-MS para detectarlos.

## 4. Cambios en la concentración de solutos en el FA durante la senescencia

Para estimar la concentración total de solutos en los FA, se midió el potencial soluto ( $\Psi_{sol}$ ) de los FLA utilizando un microosmómetro de presión de vapor (ver punto 3.3.3 de Materiales y Métodos). Los valores de  $\Psi_{sol}$  obtenidos se convirtieron a moles de soluto utilizando la siguiente relación: 1000 mmol/kg = 2,5 MPa de acuerdo con la ecuación de Van't Hoff's (Hohl y Schopfer, 1991). Luego, con los factores de dilución de los FA ( $F_{dil FA}$ ) se calcularon los valores de concentración de soluto en cada FA analizado.

Las concentraciones de solutos determinadas en el FA de hojas de Arabidopsis (Tabla 5.1) fueron del mismo orden de magnitud que la concentración de solutos medida en el FA de hojas de caña de azúcar (Meinzer y Moore, 1988) y que las concentraciones apoplásticas estimadas por Tyree (1976).

Los valores promedios obtenidos muestran una disminución marcada en la concentración de solutos en el FA a medida que la hoja envejece (Tabla 5.1), sin embargo estas diferencias no

llegaron a ser estadísticamente significativas, quizás debido a los grandes desvíos estándar y a las pocas réplicas biológicas analizadas (3 réplicas por estadio). Esta variación concuerda con los datos de Meinzer y Moore (1988), quienes observaron una menor concentración de solutos en FA obtenidos de segmentos foliares más viejos en caña de azúcar.

	$\Psi_{sol}$ FA (Mpa)	mmol/kg
WT S2	-0,508 ± 0,08	203,00 ± 31,96
WT S3	-0,304 ± 0,04	121,40 ± 15,32

**Tabla 5.1. Potencial soluto ( $\Psi_{sol}$ ) y molalidad de FA provenientes de hojas S2 y S3.**

Para medir el  $\Psi_{sol}$  se utilizó un microsmómetro de presión de vapor. Para las conversiones entre MPa y molalidad se utilizó la siguiente relación: 1000 mmol/kg = 2,5 MPa. Los valores corresponden a la media ± SEM. Se calcularon diferencias significativas a  $P \leq 0,05$  entre los estadios utilizando la prueba t de Student.

## 5. Variación del pH en el fluido apoplástico entre hojas S2 y S3.

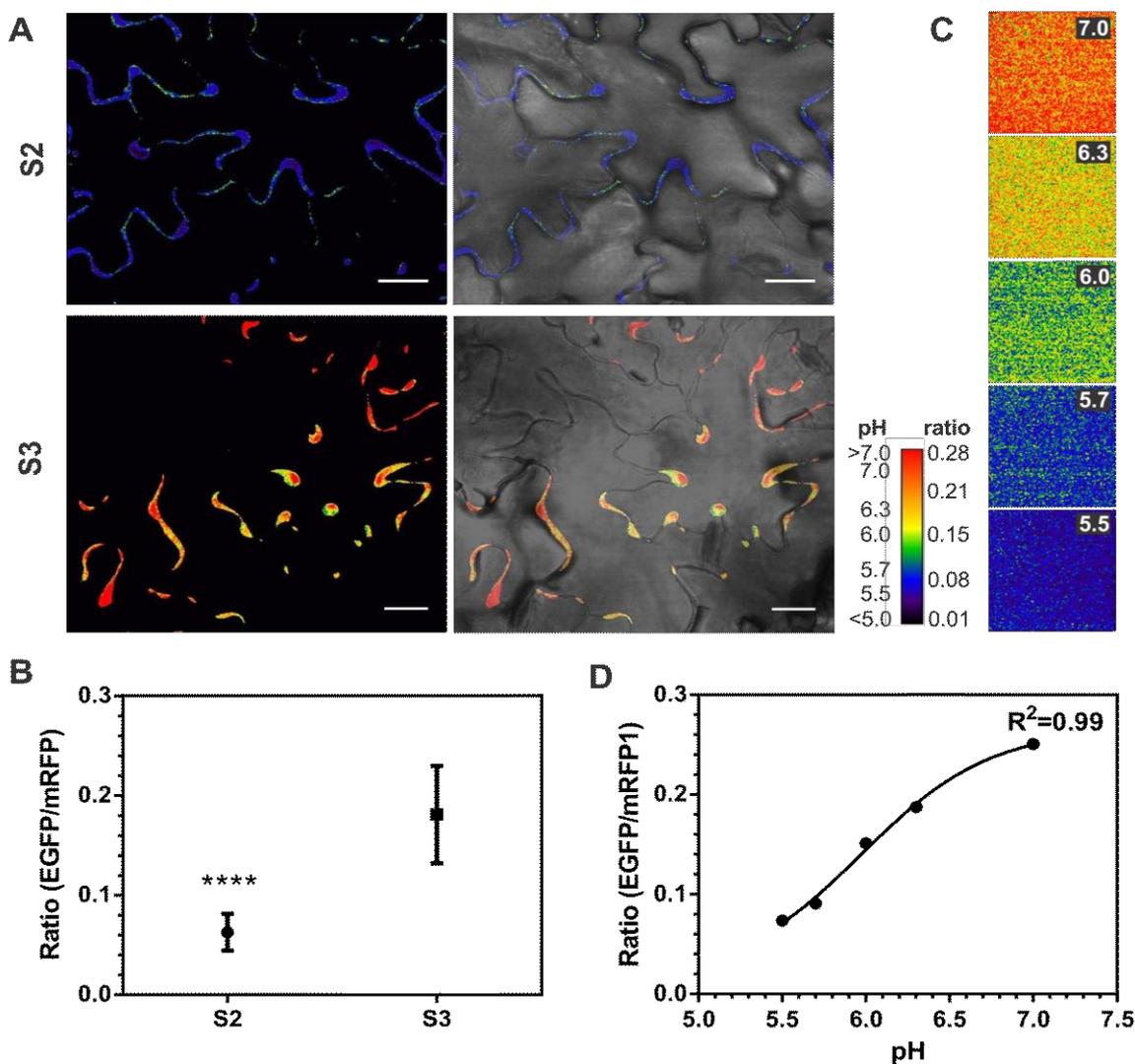
Las variaciones en el pH apoplástico son un componente importante en la señalización sistémica asociada a distintos procesos biológicos (Felle, 2001), y podrían tener un papel relevante en rutas de señalización asociadas a la senescencia.

Con el objetivo de determinar si existen cambios en el pH del apoplasto de las hojas durante la senescencia, se estimó el pH del apoplasto de hojas S2 y S3 *in vivo* mediante microscopía confocal. Para esto se utilizaron plantas de Arabidopsis Apo-pHusion que expresan de forma estable la proteína quimérica mRFP1–EGFP, direccionada a apoplasto, donde funciona como sensor de pH apoplástico (Gjetting *et al.*, 2012). Las mediciones de pH se realizaron *in vivo* ya que el método de infiltración centrifugación para extraer FA (y medir pH en el FLA extraído) introduciría cambios en el pH apoplástico (Felle, 2006; Geilfus, 2017).

Para calcular el promedio de pH en cada estadio de hoja, se estimó el pH para cada región de interés (ROI) de acuerdo con las relaciones de intensidades de fluorescencia entre EGFP y mRFP. Se realizaron más de 35 medidas independientes en distintas hojas por cada estadio y se promediaron (los detalles se explican en el punto 9 de materiales y métodos). Estas mediciones se obtuvieron principalmente de células epidérmicas, donde la señal fluorescente tiene la

intensidad suficiente para ser cuantificada. En cada caso se examinaron células de la parte media de la lámina.

Se observó un aumento del pH apoplástico a medida que la hoja envejece. Mientras que el pH promedio en hojas no senescentes (S2) es menor a 5,5; el valor de pH en hojas senescentes (S3) alcanza un promedio de 6,3 (Figura 5.5). Estos valores coinciden con los publicados previamente para el apoplasto de varios tejidos vegetales de distintas especies (Sakurai, 1998; Felle, 2001). Aunque para mi conocimiento, en *Arabidopsis* no se han reportado variaciones del pH del apoplasto durante el desarrollo de la hoja, en hojas de *Brassica napus* de diferentes edades creciendo en la misma planta no se observaron cambios significativos en el pH del FA (medido con microelectrodo en FLA) (Husted y Schjoerring, 1995).



**Figura 5.5.** pH del apoplasto de la epidermis de hojas S2 y S3 calculado *in vivo*. **Análisis *in vivo* de pH apoplástico** utilizando la línea de Arabidopsis que expresa de forma estable el sensor de pH apoplástico **apo-mRFP1-EGFP** (Gjetting *et al.*, 2012). El pH fue estimado de acuerdo con las relaciones de intensidades de fluorescencia entre EGFP y mRFP (ratio EGFP/mRFP) para cada región de interés (ROI). (A) Imágenes de relación de intensidad representativas de la epidermis de hojas S2 y S3 (paneles izquierdos), los paneles derechos muestran la superposición de las imágenes de relación con su correspondiente campo claro. (B) Gráfico que muestra los valores promedios de la relación EGFP/mRFP del apoplasto de la epidermis de hojas S2 y S3  $\pm$  SD de  $n > 35$  ROI, se realizó una prueba t de Student ( $P \leq 0.05$ ), los asteriscos indican diferencias significativas: \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ . (C y D) Calibración *in vitro* del sensor apo-pHusion. (C) Imágenes de relación de intensidad de fluorescencia de FLA a diferentes pH, estos valores se utilizaron para construir la curva de calibración. Para la presentación visual de las imágenes de relación, se diseñó y ajustó una tabla de pseudo color. (D) Curva de calibración *in vitro*.

Barra de escala = 20 μm



## DISCUSIÓN

### 1. Cambios en el volumen de aire y de fluido apoplástico (FA) de la hoja asociados a la senescencia

El volumen de fluido apoplástico observado en hojas de *Arabidopsis* (Figura 5.1) es comparable con los valores reportados previamente para otras especies, entre 40-200  $\mu\text{l}$  por gramo de peso fresco de hoja (Tabla anexa capítulo 3).

Se detectó un aumento en el volumen de FA asociado a la senescencia, pasando de 21,4  $\mu\text{l}$  de FA por gramo peso fresco en hojas no senescentes a 55  $\mu\text{l}$  en hojas senescentes (Figura 5.1 B). Si bien son pocos los estudios previos en los que han evaluado cambios en los volúmenes de FA ( $V_{\text{FA}}$ ) y de aire ( $V_{\text{aire}}$ ) apoplásticos asociados a la ontogenia, también se ha observado un mayor volumen de FA en hojas más viejas en *Brassica napus* y *Vicia faba* (Husted y Schjoerring, 1995; Lohaus *et al.*, 2001) y en porciones más viejas de una misma hoja en caña de azúcar (Meinzer y Moore, 1988). También se han observado aumentos en el volumen de fluido apoplástico foliar bajo distintas situaciones de estrés (Rascio *et al.*, 1992; Tetlow y Farrar, 1993; Lohaus *et al.*, 2001; Hamouda *et al.*, 2016).

El  $V_{\text{aire}}$  difiere ampliamente entre distintas especies (Tabla anexa capítulo 3). Por ejemplo en arroz el  $V_{\text{aire}}$  por peso fresco de hoja es 150  $\mu\text{l}$  mientras que en *Vicia faba* es 885  $\mu\text{l}$ . Las hojas de plantas con metabolismo C3 presentan aproximadamente un 30 % más de aire apoplástico que las hojas de plantas C4 (Dengler *et al.*, (1994). A diferencia de los resultados obtenidos previamente para arroz, *B. napus* y *Vicia faba*, donde se observó un aumento significativo en el  $V_{\text{aire}}$  con la edad de la hoja (Husted y Schjoerring, 1995; Lohaus *et al.*, 2001; Nouchi *et al.*, 2012), en las hojas de *Arabidopsis* el comportamiento fue distinto, disminuyó desde 303,5  $\mu\text{l}$  de aire por gramo de peso fresco en hojas no senescentes a 289,6  $\mu\text{l}$  de aire en hojas senescentes (una disminución del 5%) (Figura 5.1 B).

### 2. Relación entre el volumen de FA y la cantidad de pared y pectinas

#### 2.1. ¿Cambios en el potencial mátrico de la pared celular durante la senescencia?

El potencial agua ( $\Psi_{\text{agua}}$ ) del apoplasto está compuesto principalmente por el potencial soluto ( $\Psi_{\text{sol}}$ ), el potencial de tensión (o potencial de presión,  $\Psi_{\text{p}}$ , negativo) producido por la tensión superficial en las interfaces agua-aire de la pared celular, y el potencial mátrico ( $\Psi_{\text{m}}$ ). Este último se da como resultado de la interacción del agua con las superficies aniónicas de las

paredes celulares, de modo que cuanto más superficies aniónicas, más negativo es el  $\Psi_m$ , y por ende mayor capacidad tienen las paredes para retener agua (Boyer, 1967; Tyree, 1976). Las pectinas son componentes estructurales de las paredes altamente ionizables y por lo tanto se han considerado como las principales causantes del potencial mátrico en el apoplasto (Tyree, 1976). A su vez, el potencial mátrico apoplástico también depende de la cantidad de pared presente, ya que a mayor cantidad de pared mayor es el área superficial disponible para interactuar con el agua (Boyer, 1967; Tyree, 1976).

Previamente se había reportado que el  $V_{FA}$  de la hoja estaría asociado con la cantidad de pared celular presente (Boyer, 1967). Para examinar si la cantidad de pared y/o de pectinas tiene algún efecto en el  $V_{FA}$  en hojas de Arabidopsis, en primera instancia se comparó el  $V_{FA}$  de hojas WT con el  $V_{FA}$  de la línea P3 (que presenta un 17% más de RIA y un 40% más de pectinas (Nardi *et al.*, 2015)). Se encontró un 70% más de FA en las hojas P3 respecto a las WT en el estadio no senescente (S2) (Figura 5.3), sugiriendo una relación positiva entre la cantidad de pared y/o de pectinas en el  $V_{FA}$ . Sin embargo, esta relación desaparece en hojas senescentes (S3) quizás como consecuencia del aumento en la cantidad de FA presente en estas hojas.

No se encontraron diferencias significativas en la cantidad de pared celular y pectinas durante la senescencia entre hojas WT S2 y S3 (Figura 5.4). En base a estos resultados, el aumento en el  $V_{FA}$  en hojas S3 respecto a S2 no estaría relacionado con diferencias en la cantidad de pared celular y/o de pectinas totales entre ambos estadios. El aumento de  $V_{FA}$  durante la senescencia podría estar relacionado con la alcalinización del apoplasto en S3 (Figura 5.5), ya que cuanto mayor es el pH apoplástico mayor es el grado de ionización de los ácidos carboxílicos de las pectinas, y por ende las paredes son capaces de adsorber más cantidad de agua.

### 3. Cambios en la concentración de solutos en el FA durante la senescencia

Las concentraciones de solutos en el FA de hojas de Arabidopsis son comparables con las obtenidas para el FA de hojas de caña de azúcar, y además, la concentración de solutos en ambos casos fue menor en el FA obtenido del tejido más viejo (Tabla 5.1) (Meinzer y Moore, 1988). Sin embargo, estos valores difieren en un orden de magnitud de los adjudicados al FA de tallos de soja y poroto (Nonami y Boyer, 1987). Estas diferencias podrían deberse al origen de las muestras, ya que las muestras analizadas por Nonami y Boyer (1987) provienen de exudados recogidos de la superficie de tallos mediante aplicación de presión a las raíces sumergidas en agua y se ha sugerido que con esta técnica se extrae principalmente contenido del xilema, que es más diluido que el FA (Fahn, 1974; Meinzer y Moore, 1988). En esta tesis, al

igual que en el trabajo de Meinzer y Moore (1988), la forma de obtención del FA fue por centrifugación, y como se mencionó en la introducción del capítulo 3, durante la centrifugación la solución se extrae preferentemente del espacio que rodea las células vivas, mientras que el agua en el xilema debe ser menos extraíble debido a las fuerzas capilares (Meinzer y Moore, 1988). Por lo tanto, el método de centrifugación parece proporcionar una estimación más representativa del potencial soluto apoplástico.

#### 4. Cambios en el pH apoplástico asociados a la senescencia.

El pH del apoplasto está esencialmente determinado por la actividad de las H<sup>+</sup>-ATPasas de la membrana plasmática y de los solutos transportados a través de la membrana. Las sustancias pécticas en las paredes celulares también afectan las concentraciones de iones y el pH en el apoplasto (Grignon y Sentenac, 1991; Sakurai, 1998).

Si bien los valores de pH apoplástico estimados a partir de la curva de calibración *in vitro* podrían no corresponderse en forma exacta con valores fisiológicos, los resultados obtenidos (Figura 5.5) indican claramente una alcalización promedio de alrededor de una unidad de pH en hojas S3 respecto a S2. Hasta el momento, todos los pH apoplásticos informados en la literatura son ácidos, hecho que se asocia a la actividad de las bombas de H<sup>+</sup> que exportan constantemente H<sup>+</sup> al apoplasto manteniendo un gradiente de pH transmembrana que impulsa el transporte de muchas moléculas desde el apoplasto al interior celular (Felle, 2001). Un aumento en el pH apoplástico, como el registrado en este estudio, podría significar menos fuerza motriz para translocar sustratos hacia las células. Se ha propuesto que el pH podría cumplir funciones de señalamiento (Felle, 2001), ejemplo de esto es la regulación de la actividad de acuaporinas a través de la protonación de algunos de sus aminoácidos cuando al pH citosólico se acidifica en respuesta a anoxia (Tournaire-Roux *et al.*, 2003). Al inicio de la senescencia foliar de plantas de tabaco, el pH apoplástico se incrementa y se acumula NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en el apoplasto de manera más rápida y pronunciada en fenotipos de senescencia “rápida” que en fenotipos de senescencia “lenta” (Wu *et al.*, 2016b). En ambos fenotipos, el incremento de pH apoplástico tiene lugar antes de que comiencen a caer los niveles de proteínas foliares (Wu *et al.*, 2016b). Estos resultados apoyan la idea de que el aumento en el pH apoplástico podría actuar como señal durante el inicio de la senescencia.

El aumento del pH apoplástico favorece la tolerancia a distintos tipos de estrés, por ejemplo minimizando la propagación de patógenos, reduciendo la tasa de crecimiento frente a sequía o impidiendo la absorción de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> bajo estrés salino (Geilfus, 2017). En algunos casos la

alcalinización apoplástica mediada por estrés va acompañada por un aumento en la concentración extracelular de ABA (Wilkinson y Davies, 1997; Geilfus *et al.*, 2015), que es un regulador positivo de la senescencia foliar (Lee *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016; Mao *et al.*, 2017). Es probable que el incremento de pH incida en la actividad de transportadores y enzimas extracelulares, modulando señales regulatorias como la exportación de moléculas. A pesar de su relevancia en la respuesta al estrés, es cuestión de debate si la alcalinización apoplástica es una señal general que actúa aguas arriba de respuestas a distintos estreses ambientales, o si en realidad es un efecto secundario del estrés con consecuencias fisiológicas favorables para la planta (Geilfus, 2017). Este mismo interrogante se extiende a la senescencia.

En conjunto, los resultados presentados demuestran que el “ambiente apoplástico” se modifica durante la senescencia foliar de *Arabidopsis*. Estas modificaciones podrían ser causa y efecto de los cambios en el metabolismo celular y del incremento en el transporte de metabolitos fuera de la célula.

**CAPÍTULO 6: DINÁMICA DEL PROTEOMA EN  
EL FLUIDO APOPLÁSTICO DURANTE LA  
SENESCENCIA FOLIAR.**



## RESUMEN

La composición de proteínas (i.e. proteoma) del apoplasto se modifica en respuesta a diferentes tensiones ambientales. El proteoma del apoplasto asociado a la senescencia foliar no ha sido caracterizado, pero el análisis funcional de determinadas proteínas extracelulares demuestra que muchas de estas tienen roles fundamentales en la regulación de los distintos procesos que tienen lugar durante la senescencia, como la señalización, la removilización de nutrientes y la muerte celular. Un análisis global del conjunto de proteínas del FA permitirá una visión más amplia de los cambios que ocurren en el apoplasto a medida que las hojas senescen. En este capítulo se analizaron cambios en los perfiles de proteínas del FA de hojas S2 y S3, donde se detectaron e identificaron las proteínas más abundantes asociadas a la senescencia. Luego, mediante un enfoque proteómico, se compararon los proteomas de FA S2 y S3, con énfasis en aquellas proteínas identificadas cuyos niveles cambiaron (disminución o aumento) significativamente entre ambos estadios, sobre las que se discute su función biológica, nivel de expresión génica, su localización subcelular, presencia de péptido señal y de sitios potenciales de glicosilación.



## INTRODUCCIÓN

El ambiente apoplástico se modifica durante la senescencia foliar (capítulo 5 de esta tesis), y es muy probable que el contenido de proteínas apoplásticas también muestre variaciones. Si bien hasta el momento no se cuenta con información exhaustiva sobre variaciones cuali-cuantitativas de proteínas en el fluido apoplástico (FA) a lo largo de la senescencia, distintos estudios indican que las proteínas apoplásticas cumplirían funciones importantes en distintas fases de la ontogenia foliar:

### 1. Proteínas apoplásticas asociadas a la senescencia

#### 1.1. Papel de la invertasa apoplástica en la regulación de la senescencia

El movimiento a larga distancia de la sacarosa se ve facilitado por la descarga eficiente del floema en los tejidos receptores (o destino). La invertasa extracelular (cwINV) se encarga de hidrolizar la sacarosa a glucosa y fructosa en el apoplasto de los órganos receptores, y de esta manera permite mantener un gradiente de concentración de sacarosa pronunciado entre las células conductoras del floema y el apoplasto de los órganos receptores. La actividad invertasa extracelular disminuye con la edad de la hoja, mientras que la expresión inducible del gen que codifica para cwINV retrasa la senescencia foliar, y la inhibición de la actividad invertasa extracelular acelera la senescencia (Lara *et al.*, 2004). El ácido abscísico (ABA) regula positivamente la expresión génica de un inhibidor de la invertasa extracelular (INVINH), y el silenciamiento de *INVINH* retrasa la senescencia foliar (Jin *et al.*, 2009). Esta evidencia demuestra que la invertasa extracelular y su inhibidor desempeñan un papel crucial en la regulación de la senescencia, controlando las relaciones fuente-destino.

#### 1.2. Proteasas apoplásticas asociadas a la senescencia

El aumento de la expresión génica de proteasas apoplásticas de diferentes clases (cisteínicas, serínicas y metaloproteasas) conforme progresa la senescencia sugiere que estas enzimas podrían tener funciones específicas en la regulación de la senescencia (Golldack *et al.*, 2002; Martínez y Guiamet, 2014).

Los niveles de transcripto y de actividad de la proteasa apoplástica SASP, aumentan durante la senescencia de *Arabidopsis* (Martinez *et al.*, 2015). Las plantas mutantes *sasp-1*, no muestran un fenotipo particular en la etapa vegetativa, pero producen inflorescencias más ramificadas con mayor cantidad de silicuas y semillas (Martinez *et al.*, 2015). La expresión del gen At2-

MMP, que codifica para la metaloproteasa 2 de la matriz extracelular (At2-MMP) aumenta a medida que la planta envejece (Golldack *et al.*, 2002), y la línea *knock-out At2-mmp-1* muestra degradación acelerada de clorofila y retraso en la floración (Golldack *et al.*, 2002). Las proteasas At2-MMP y AtSASP cumplirían funciones regulatorias diferenciales durante la senescencia, sin embargo, sus sustratos fisiológicos y, en consecuencia, las vías regulatorias en las que participan, se desconocen.

Estos breves ejemplos demuestran la participación de proteasas y proteínas apoplásticas en la regulación de la senescencia. El conocimiento sin embargo es menos que fragmentario. En este contexto, un análisis que considere al proteoma en su complejidad y en su conjunto sería de gran ayuda para lograr una comprensión más integral del papel que cumplen las proteínas apoplásticas a lo largo de la senescencia.

## 2. Mecanismos de secreción de proteínas en las plantas

Las proteínas secretadas al espacio extracelular están involucradas en una multitud de procesos biológicos, como la comunicación célula-célula, la señalización sistémica, o la defensa frente a patógenos (Agrawal *et al.*, 2010; Krause *et al.*, 2013; Martínez y Guiamet, 2014; Guerra-Guimarães *et al.*, 2016). La secreción puede ser constitutiva y por lo tanto independiente de señales internas y ambientales, o puede responder a estímulos particulares, intra o extracelulares (Brunner *et al.*, 2009; Agrawal *et al.*, 2010; Krause *et al.*, 2013). Por ejemplo, proteínas relacionadas con el metabolismo y la organización de la pared celular como ciertas glucosidasas, xilosidasas o galactosidasas se secretan constitutivamente al apoplasto (Boudart *et al.*, 2005; Guerra-Guimarães *et al.*, 2016). Por otro lado, la infección provocada por ciertos patógenos estimula la secreción de un subconjunto específico de proteínas de defensa de la planta, como varias proteínas PR (*Pathogenesis related*), peroxidasas o lipasas (Oh *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2009; Kaffarnik *et al.*, 2009; Floerl *et al.*, 2012). Curiosamente varias proteínas de respuesta a patógenos también son secretadas de forma constitutiva, e incluso se ha sugerido la existencia de un sistema inmune constitutivo en el espacio extracelular (Boudart *et al.*, 2005; Guerra-Guimarães *et al.*, 2016).

El conjunto de proteínas secretadas al apoplasto por una célula, tejido u órgano en cualquier momento y condición dada, a través de mecanismos de secreción constitutivos o regulados se conoce como “secretoma” (Agrawal *et al.*, 2010). En esta tesis se utilizará el término “proteoma del apoplasto” como sinónimo de secretoma.

El direccionamiento de proteínas al apoplasto puede ocurrir a través de la vía canónica RE – Golgi-TGN, seguida por proteínas que poseen un péptido señal, o a través de otros mecanismos no convencionales de secreción proteica (Agrawal *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2014).

### **2.1. Secreción al apoplásto través de la vía secretoria RE-Golgi-TGN. Proteínas con péptido señal**

En la vía clásica de secreción, el péptido señal N-terminal (PS) media la captación de la proteína en el lumen del retículo endoplasmático (RE). Después de la escisión del PS y el posterior replegamiento de las proteínas, estas son transportadas en vesículas desde el RE hasta el aparato de Golgi, donde comúnmente son glicosiladas previo a ser secretadas de la célula (Krause *et al.*, 2013; Lannoo y Van Damme, 2015; Strasser, 2016). Las glicosilaciones participan tanto en el plegamiento y la estabilidad de las proteínas como en las interacciones proteína-proteína (Moremen *et al.*, 2012; Hebert *et al.*, 2014). La glicosilación de residuos de asparagina (i.e. N-glicosilación) es la modificación postraduccional más común de las proteínas que entran en la ruta secretora clásica. Ciertos N-glicanos resultarían cruciales para el crecimiento correcto bajo condiciones de estrés abiótico (Kang *et al.*, 2008; Strasser, 2014; Takano *et al.*, 2015; von Schaewen *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2018), y también podrían ser utilizados como fuente de nutrientes por los patógenos durante la infección (Dupouiron *et al.*, 2015).

### **2.2. Mecanismos no convencionales de secreción de proteínas que carecen de péptido señal, PS**

A diferencia de las proteínas secretadas por la vía convencional, las proteínas secretadas por mecanismos no convencionales carecen de péptido señal (PS) para su captación en el RE y normalmente no están glicosiladas (Nickel, 2003; Regente *et al.*, 2012). Debido a la ausencia de una señal de direccionamiento a apoplasto, estas proteínas se suelen denominar *Leaderless Secretory Proteins* (LSPs). Las LSPs pueden ser secretadas desde el citosol a través de la membrana plasmática o incorporadas en estructuras vesiculares que se fusionan con la membrana plasmática para liberar su contenido al apoplasto (Regente *et al.*, 2012; Krause *et al.*, 2013; Ding *et al.*, 2014; Robinson *et al.*, 2016). Este tipo de secreción es posible tanto para proteínas citosólicas solubles como para proteínas de membrana.

Se ha detectado la presencia de vesículas extracelulares (EV) de entre 10-300 nm de diámetro en el fluido apoplástico de hojas de *Arabidopsis* y girasol (Regente *et al.*, 2012; Rutter y Innes,

2017). Varias evidencias sugieren que las EV podrían ser secretadas al apoplasto luego de la fusión de cuerpos multivesiculares (MVB) con la membrana plasmática (Regente *et al.*, 2012; Ding *et al.*, 2014; Rutter y Innes, 2017). Las EV están enriquecidas en proteínas de defensa/estrés, con un alto porcentaje de LSPs, y su liberación al apoplasto se estimula frente a infección por patógenos o en respuesta al ácido salicílico (AS) (Rutter y Innes, 2017). Si bien la composición cualitativa de proteínas de las EV se modifica solo ligeramente en respuesta a *Pseudomonas syringae*, los niveles de algunas de sus proteínas aumentan marcadamente (Rutter y Innes, 2017). En base a estos hallazgos, se sugiere que las EV juegan un papel destacado en la respuesta inmune de las plantas (Rutter y Innes, 2017).

### 2.2.1. Rol de las LSPs en el espacio extracelular

Estudios genómicos estiman que alrededor del 17% del genoma de *Arabidopsis* podría presentar PS y por lo tanto codificaría para proteínas que son dirigidas a la ruta secretoria clásica RE-Golgi-TGN (Initiative, 2000). Sin embargo, uno de los hallazgos más interesantes de los trabajos sobre secretómica es que las LSPs representan en promedio el 50% de las proteínas apoplásticas en las plantas (Agrawal *et al.*, 2010; Krause *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2014). Curiosamente, los secretomas de plantas sometidas a estrés biótico y abiótico generalmente contienen más LSPs que los secretomas de plantas creciendo en condiciones óptimas, lo que sugiere que la señalización ambiental podría ser un factor involucrado en la liberación de LSPs en el espacio extracelular (Agrawal *et al.*, 2010). Es muy probable que las plantas hayan desarrollado estrategias eficientes para contrarrestar los estreses bióticos y abióticos al reubicar rápidamente las proteínas intracelulares (LSPs) en el apoplasto en lugar de recurrir a la transcripción *de novo*, la traducción y la secreción (Agrawal *et al.*, 2010). Un ejemplo de esto son las proteasas serínicas tipo caspasas de avena. Las formas activas de las saspasas de avena SAS-1 y SAS-2 están presentes de manera constitutiva en las células, pero se liberan al fluido apoplástico cuando las plantas son sometidas a golpes de calor o en respuesta a la toxina victorina producida por el hongo patógeno *Cochliobolus victoriae* (Coffeen y Wolpert, 2004). Se ha sugerido que una vez liberadas al fluido apoplástico, SAS-1 y SAS-2 participarían, junto con otras proteasas, en una cascada de señalización inductora de la muerte celular programada (MCP), que conduce al procesamiento proteolítico de la subunidad mayor (LSU) de Rubisco (Coffeen y Wolpert, 2004).

Aunque las funciones intracelulares de muchas LSP están bien documentadas, aún resta por conocer el rol que cumplen en el espacio extracelular. Por ejemplo, la calmodulina se conoce como un sensor de calcio intracelular, pero también se ha propuesto su función como una

señal polipeptídica extracelular (Cui *et al.*, 2005). Las tiorredoxinas son factores intracelulares conocidos que intervienen en el equilibrio redox tanto en las plantas (Montrichard *et al.*, 2009) como en animales (Arnér y Holmgren, 2000), e incluso en mamíferos se ha demostrado que una vez secretadas al espacio extracelular adquieren nuevas funciones, como moléculas de señalización (Nickel y Seedorf, 2008). Por lo tanto, al menos algunas de las LSPs parecen jugar papeles duales, comportándose de manera diferente dependiendo de su localización celular. En este contexto, un desafío importante es descubrir cuáles son las funciones extracelulares de estas proteínas (Agrawal *et al.*, 2010).



## HIPÓTESIS

El proteoma del apoplasto se modifica a lo largo de la senescencia foliar.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

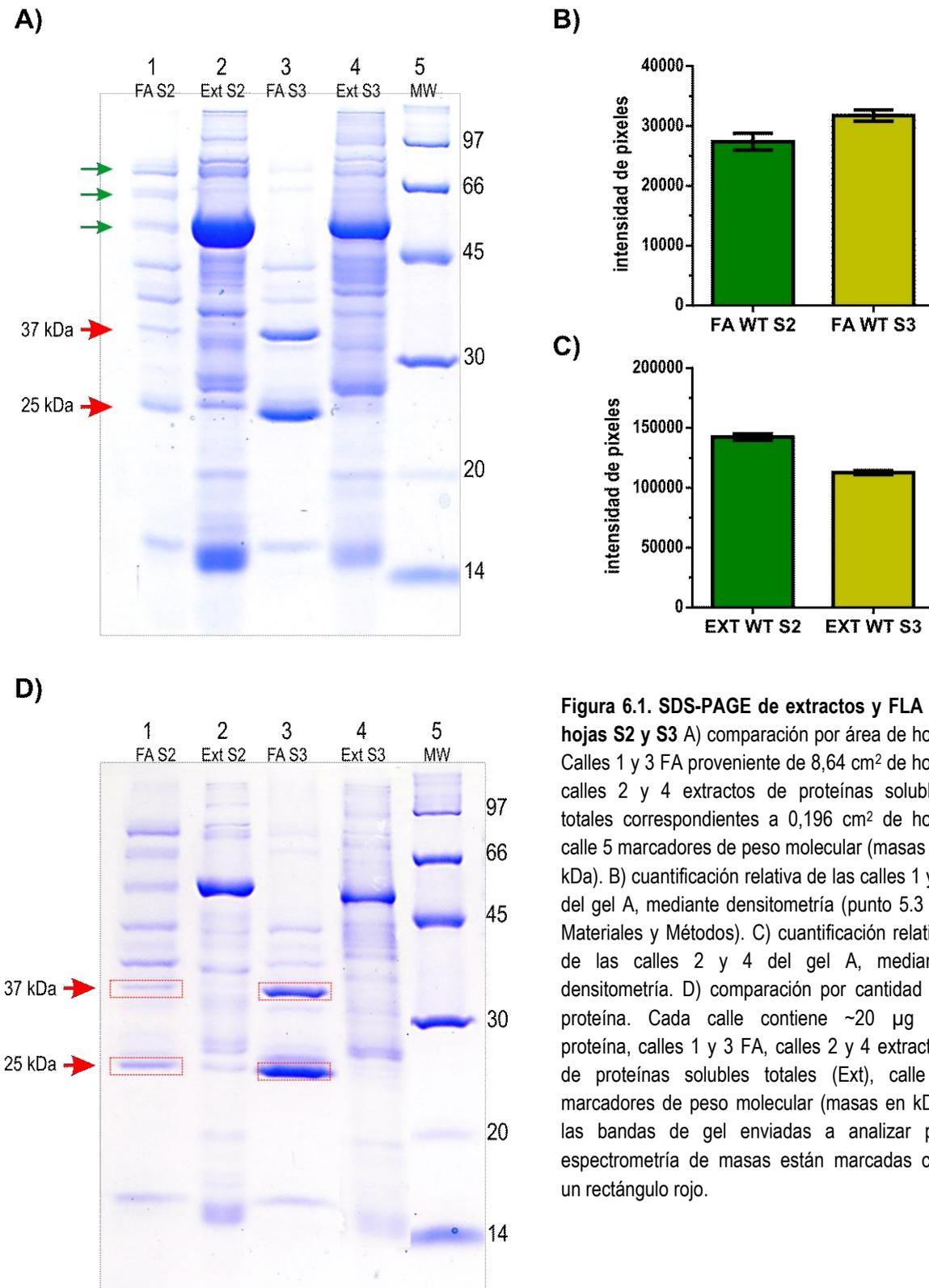
- 1- Examinar en geles SDS-PAGE variaciones en los perfiles de proteínas del FA y de extractos totales de hojas S2 y S3, e identificar las proteínas más abundantes del FA en hojas senescentes.
- 2- Examinar exhaustivamente los cambios cuali y cuantitativos en el proteoma del FA a lo largo de la senescencia foliar de Arabidopsis (proteomas de FA de hojas S2 y S3).



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Perfiles de proteínas foliares y del FA en hojas senescentes (S3) y no senescentes (S2)

Se examinaron comparativamente, entre hojas no senescentes (S2) y senescentes (S3), los perfiles de proteínas foliares totales y del FA. Los perfiles obtenidos se muestran en la figura 6.1. El perfil de proteínas de FA es marcadamente distinto entre hojas S2 y S3, incluso, las diferencias cualitativas entre los perfiles de proteínas de FAs son más notorias que las diferencias observadas entre los extractos totales correspondientes. El FA S2 contiene menor cantidad de proteínas por unidad de área que el FA S3 en el intervalo de 14 a 100 kDa (Figura 6.1 B), y sus proteínas están distribuidas de manera homogénea en las distintas bandas (Figura 6.1 A). En el FA S3 las bandas > 45 kDa presentes en S2 casi no se detectan (Figura 6.1 A, flechas verdes), lo que podría estar indicando que estas proteínas se están degradando en el FA S3, o bien, que sus niveles estables y/o de secreción al apoplasto caen en S3. El perfil de FA S3 se caracteriza por dos bandas abundantes, una de 25 kDa y otra de 37 kDa, mucho menos evidentes en FA S2 (Figura 6.1 A, flechas rojas), y que representan un alto porcentaje de las proteínas observadas en el FA S3. Estas dos bandas conspicuas se eluyeron de un gel SDS PAGE en el que se sembraron iguales cantidades de proteínas para ambas muestras, S2 y S3 (Figura 6.1 D), y se analizaron por espectrometría de masas para la identificación de las proteínas correspondientes.



**Figura 6.1. SDS-PAGE de extractos y FLA de hojas S2 y S3** A) comparación por área de hoja. Calles 1 y 3 FA proveniente de 8,64 cm<sup>2</sup> de hoja; calles 2 y 4 extractos de proteínas solubles totales correspondientes a 0,196 cm<sup>2</sup> de hoja, calle 5 marcadores de peso molecular (masas en kDa). B) cuantificación relativa de las calles 1 y 3 del gel A, mediante densitometría (punto 5.3 de Materiales y Métodos). C) cuantificación relativa de las calles 2 y 4 del gel A, mediante densitometría. D) comparación por cantidad de proteína. Cada calle contiene ~20 µg de proteína, calles 1 y 3 FA, calles 2 y 4 extractos de proteínas solubles totales (Ext), calle 5 marcadores de peso molecular (masas en kDa) las bandas de gel enviadas a analizar por espectrometría de masas están marcadas con un rectángulo rojo.

### 1.1. Identificación de las proteínas mayoritarias en las bandas de 25 y 37 kDa de los FA S2 y S3

En cada una de las bandas analizadas se identificaron distintas proteínas que co-migran en el gel SDS-PAGE. En base al número total de secuencias de péptidos identificados de cada proteína identificada (#PSM), las proteínas identificadas más abundantes resultaron *Pathogenesis-related protein 5 (PR5)* en la banda de 25 kDa (Tabla 6.1 B) y *Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic isoform (PR2)* en la banda de 37 kDa (Tabla 6.1 A). Ambas proteínas están presentes en S2 y su abundancia aumenta en S3 (Tablas 6.1 A y B). PR2 y PR5 intervienen en la resistencia sistémica adquirida y también forman parte de la respuesta a estrés abiótico (Sävenstrand *et al.*, 2004; Amme *et al.*, 2006; Mishina y Zeier, 2007; Zavaliev *et al.*, 2013). Ambas proteínas presentan una señal de direccionamiento a apoplasto (péptido señal, PS) y los genes que las codifican se regulan positivamente durante la senescencia foliar (Winter *et al.*, 2007). En la sección siguiente se profundiza el análisis de PR2 y PR5.

Las proteínas minoritarias identificadas en las bandas analizadas se listan en las tablas 6.1 A y B. En las dos bandas de 25 y 37 kDa se identificaron más proteínas en FA S3 que en FA S2, y la abundancia de cada una es mayor en FA S3 que en FA S2, solo dos de las proteínas identificadas se encontraron en mayor abundancia en FA S2 respecto de S3: *Cyclase1*, y *Slow embryo development 1 (SED1)*. SED1 (94,8 kDa) es una proteína de función desconocida, pero esencial para la acumulación de nutrientes durante la embriogénesis de *Arabidopsis* (Ju *et al.*, 2016). SED1 es de localización mitocondrial, pero también ha sido detectada en el apoplasto en granos de polen durante su germinación (Ge *et al.*, 2011). La detección de SED1, cuya masa molecular es de 94,8 kDa, en las bandas de 25 y 37 kDa sería reflejo de una acumulación de fragmentos de degradación de SED1 en el FA. Curiosamente, la isoforma de CYCLASE1 (28,4 kDa) detectada en la banda de 37 kDa se encontró sólo en el FA S2 a pesar de que la expresión del gen que codifica esta proteína extracelular aumenta durante la senescencia (Smith *et al.*, 2015). CYCLASE1 participa en la regulación de la muerte celular programada (Smith *et al.*, 2015).

Muchas de las proteínas identificadas poseen masas moleculares mayores a las predichas en función a sus secuencias, y probablemente correspondan a variantes glicosiladas, ya que la mayoría presenta sitios potenciales de glicosilación (Tablas 6.1 A y B). Teniendo en cuenta que las glicosilaciones son una modificación muy común en proteínas secretadas (Strasser, 2016) y que el tipo y cantidad de glicosilaciones puede variar en diferentes etapas del desarrollo de la

hoja (Elbers *et al.*, 2001), no se descarta la presencia de otras isoformas de esas proteínas migrando en el gel SDS PAGE con otros tamaños.

Por el contrario, otras proteínas detectadas en las bandas analizadas poseen masas moleculares predichas mayores. Las proteínas de ACT2 (41,2 kDa) y *Non-lysosomal glucosylceramidase* (105,7 kDa) se detectaron en la banda de 37 kDa de FA S3, y PR2 (37,3 kDa) se identificó en la banda de 25 kDa de FA S3. Estas tres proteínas podrían estar siendo degradadas durante la senescencia y sus fragmentos podrían acumularse en FA S3 (Tablas 6.1 A y B).

**Tabla A)**

Accession	Descripción	Coverage S2	# PSM S2	Coverage S3	# PSM S3	Glic.	MW [kDa]
P33157	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase (PR2)	15,63	6	46,90	45	-	37,3
O24603	Chitinase class 4-like protein (LSC222)			17,33	3	SI	29,8
Q93V74	CYCLASE1	13,33	3			-	28,4
P28493	Pathogenesis-related protein 5 (PR5)	5,86	1	12,55	2	-	25,2
Q9LJR2	Lectin-like protein (LEC)			9,23	3	SI	29,7
Q43387	Peroxidase 71 (PER71)			9,15	3	SI	34,9
O65469	Putative cysteine-rich receptor-like protein kinase 9 (EP1)			4,53	1	SI	29,7
Q9M2U5	Endochitinase ( EP3)			4,40	1	SI	29,4
Q94BT2	Auxin-induced in root cultures protein 12 (AIR12)			3,97	1	SI	25,6
F4HR96	Non-lysosomal glucosylceramidase			3,38	2	-	105,7
Q9FFH6	Fascidin-like arabinogalactan protein 13 (FLA13)			3,24	1	SI	26,2
F41GL7	Fructose-bisphosphate aldolase (FBA1)			3,22	1	-	33,3
O24598	Endochitinase At2g43580			3,02	1	SI	28,8
F4J8V9	Actin 2 (ACT2)			2,70	1	-	41,2
Q9C7M2	Slow embryo development 1 (SED1)	1,30	3	1,30	1	-	94,8

**Tabla B)**

Accession	Descripción	Coverage S2	# PSM S2	Coverage S3	# PSM S3	Glic.	MW [kDa]
P28493	Pathogenesis-related protein 5 (PR5)	58,58	27	58,58	50	-	25,2
P33157	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic isoform (PR2)			14,75	3	-	37,3
Q94BT2	Auxin-induced in root cultures protein 12 (AIR12)	3,97	1	3,97	1	SI	25,6
P59833	Uncharacterized GPI-anchored protein At5g19250			3,57	1	SI	21,0
Q9C7M2	Slow embryo development 1 (SED1)			1,30	1	-	94,8

**Tablas 6.1. Proteínas identificadas en la banda de 37 kDa (Tabla A) y en la de 25 kDa (Tabla B) de los FA S2 y S3.** Se muestran las proteínas identificadas con al menos un péptido único. En “negrita” se marca la proteína mayoritaria de cada banda. En naranja se muestran las isoformas y/o fragmentos proteicos que se acumulan en el FA S3 y en verde se marcan las isoformas y/o fragmentos proteicos que se encuentran en mayor cantidad en el FA S2. En la columna “Glic.” se muestran las proteínas con potenciales sitios de glicosilación (glic.).

## 2. Características del proteoma del FA asociado a la senescencia foliar

Se observó en geles SDS-PAGE que los perfiles de proteínas de FAs S2 y S3 difieren cuali y cuantitativamente, y se identificó a PR2 y PR5 como las proteínas mayoritarias del FA S3 (Figura 6.1 y Tablas 6.1). Para profundizar en los cambios en la composición de proteínas apoplásticas a lo largo de la senescencia, se comparó el proteoma del FA de hojas WT S2 y S3 mediante espectrometría de masas de tipo “shotgun” (esta metodología se explica en el punto 6 de Materiales y Métodos). Se realizaron 4 réplicas biológicas de cada estadio y cada una de estas réplicas se corrió por triplicado técnico. En todas las corridas cromatográficas se analizó la misma cantidad de proteínas de FA, determinado por el método BCA, por lo que este análisis aporta información sobre la representación relativa de cada proteína en los proteomas FA S2 y S3. A fines de realizar un examen riguroso, que permita identificar variaciones pronunciadas, para este análisis únicamente se consideraron las proteínas cuyos niveles relativos estables variaron (aumentaron o disminuyeron) significativamente más de dos veces entre S2 y S3 o las que sólo se detectaron en un estadio, en al menos 2 de 4 réplicas biológicas analizadas. Estas proteínas se listan en la tabla 6.2. Mediante técnicas bioinformáticas, y utilizando distintos programas y criterios de búsqueda, se recabó información sobre cada una de las proteínas identificadas, como localización subcelular, función biológica, nivel de expresión génica durante la senescencia, presencia de péptido señal y de sitios potenciales de glicosilación. En líneas generales, como resultado de este análisis se encontró que los niveles estables de 183 proteínas mostraron cambios significativos entre ambos estadios. De estas, el 87% (159 proteínas) presentaron una disminución asociada a la senescencia y solo el 13% (24 proteínas) aumentaron en hojas senescentes (Figura 6.2 y tabla 6.2). Como se observó previamente en geles SDS-PAGE, PR2 y PR5 resultaron las proteínas predominantes en este análisis, y los niveles estables de ambas aumentan notoriamente en el FA de hojas senescentes, S3.

### 2.1. Presencia de péptido señal (PS)

La presencia de péptido señal se determinó mediante búsquedas en la base de datos de *UniProt Knowledgebase* (The UniProt Consortium, 2017). Del total de proteínas cuyos niveles

cambiaron, sólo el 50% presentó péptido señal (PS). Este resultado coincide con lo publicado previamente en diversos estudios sobre proteomas extracelulares de plantas (Agrawal *et al.*, 2010).

Curiosamente, todas las proteínas que aumentaron en el FA de hojas senescentes (S3) presentan PS (Figura 6.2 A). Teniendo en cuenta que la senescencia natural es parte del programa de desarrollo de la planta, no resulta extraño que las proteínas que cumplen alguna función durante la senescencia en el apoplasto tengan una señal de direccionamiento que asegure su exportación desde el momento en que se traducen en la célula. Por el contrario, sólo el 43% de las proteínas que disminuyeron en S3 presentan señal de direccionamiento a la vía secretoria (Figura 6.2 A), con lo cual más del 50% corresponderían a LSPs que están siendo secretadas por rutas no convencionales.

## 2.2. Presencia de sitios potenciales de glicosilación (glic.)

Las glicosilaciones desempeñan un papel en la secreción y en la función de las proteínas secretadas. Además, la cantidad y el tipo de glicosilaciones varía según la edad de la hoja (Elbers *et al.*, 2001). En este contexto, es interesante conocer qué porcentaje del proteoma del FA de hojas S2 y S3 estaría representado por glicoproteínas. Debido a la alta probabilidad de que las glicosilaciones sean cortadas durante el análisis espectrométrico (concretamente, durante la ionización), es poco probable que mediante espectrometría de masas de tipo shotgun se puedan detectar glicopéptidos en las muestras de FA utilizadas, ya que no se realizó un enriquecimiento previo en los mismos. Por esta razón se procedió a determinar qué porcentaje de las proteínas cuyos niveles cambiaron significativamente entre estadios (S2 a S3) presentan sitios potenciales de glicosilación. La presencia de sitios potenciales de glicosilación se determinó utilizando la base de datos UniprotKB (The UniProt Consortium, 2017).

Como resultado de este análisis se determinó que más del 50 % de las proteínas que aumentaron en FA S3 presentan sitios potenciales de glicosilación, mientras que sólo el 24% de las proteínas que disminuyeron en S3 corresponderían a proteínas glicosiladas (Figura 6.2 B). Curiosamente, sólo el 45% de las proteínas que presentan PS contiene sitios potenciales de glicosilación (Figura 6.2, Tabla 6.2).

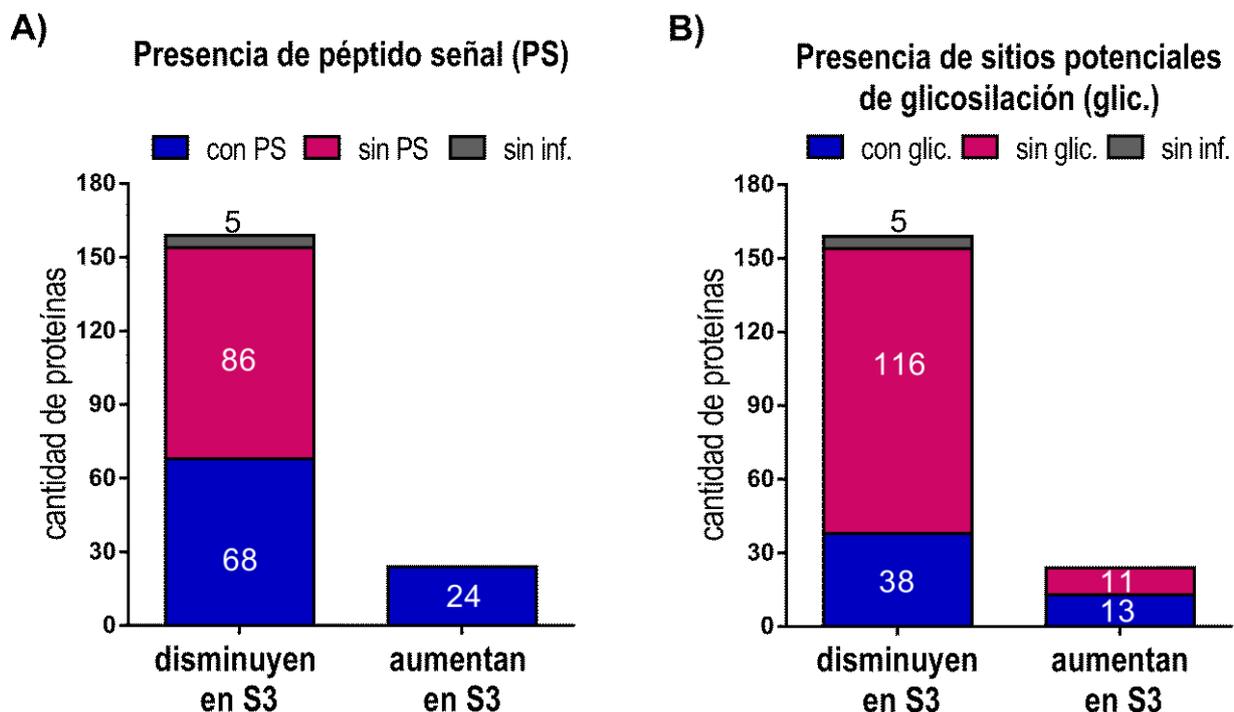
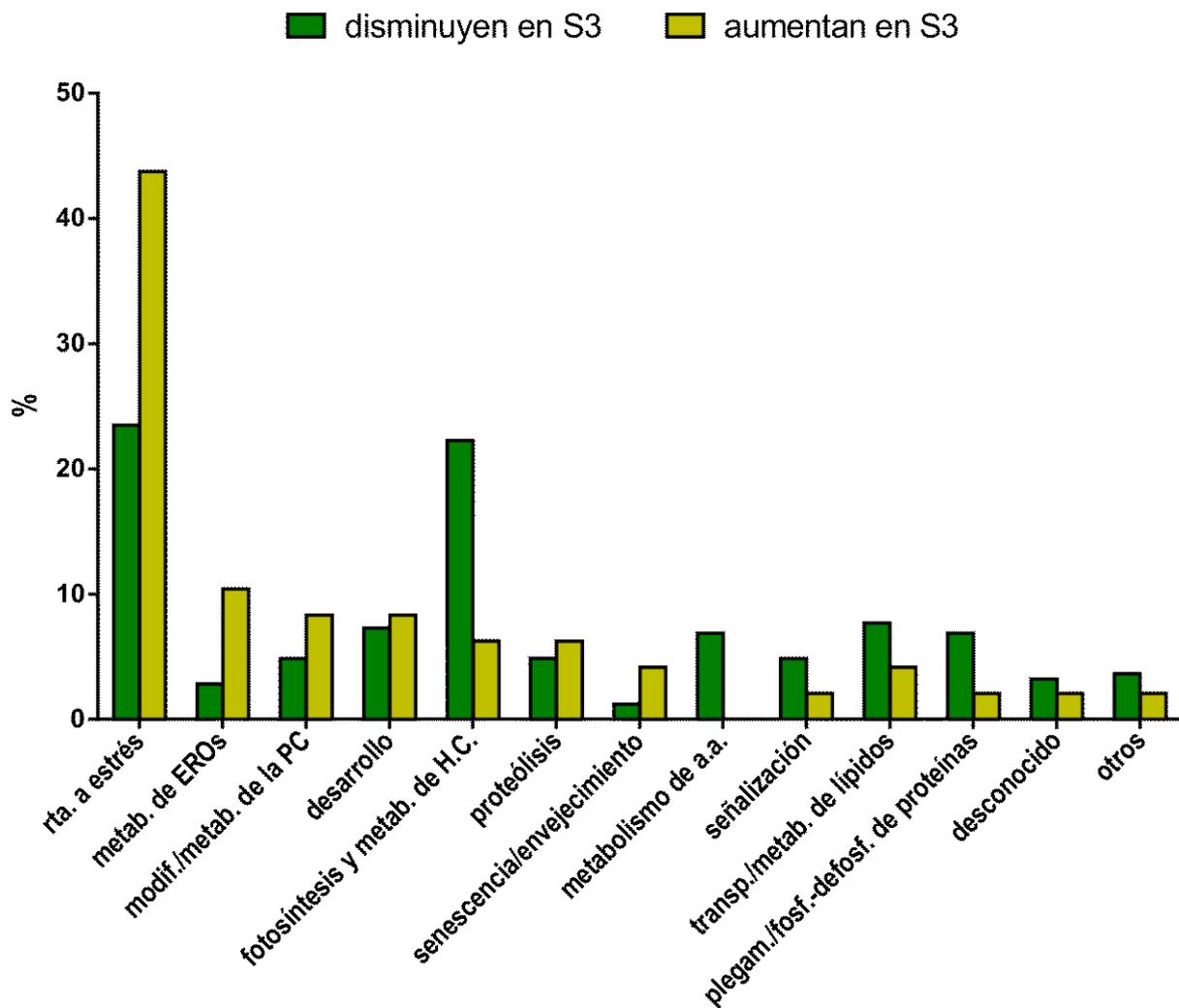


Figura 6.2. Presencia de A) péptido señal y B) potenciales sitios de glicosilación en las proteínas acumuladas diferencialmente en S2 (disminuyen en S3) y S3 (aumentan en S3). PS = péptido señal; glic.= sitios potenciales de glicosilación; sin inf.= sin información. Los números dentro y fuera de las barras indican cantidad de proteínas.

### 2.3. Grupos funcionales predominantes en el FA de hojas S2 y S3

Las potenciales funciones de cada proteína se buscaron en la base de datos de Gene Ontology (Ashburner *et al.*, 2000; Consortium, 2016) (se listan en la columna “proceso biológico” de la tabla 6.2). En función de esta análisis, las proteínas se asignaron a 13 grupos funcionales: respuesta a estrés, modificación/metabolismo de la pared celular, señalización, transporte/metabolismo de lípidos, proteólisis, fotosíntesis/metabolismo de carbohidratos, senescencia/envejecimiento, desarrollo, metabolismo de aminoácidos, plegamiento/fosforilación-defosforilación de proteínas, metabolismo de EROs, proteínas con otras funciones y proteínas con función desconocida. Las proteínas que presentan varias funciones conocidas se asignaron a más de un grupo funcional.

El grupo funcional más representado en hojas S3 es el de proteínas vinculadas con la respuesta a estrés, mientras que en hojas S2 las dos clases predominantes se asocian a fotosíntesis/metabolismo de carbohidratos y respuesta a estrés (Figura 6.3).



**Figura 6.3. Grupos funcionales predominantes en el FA de hojas S2 y S3.** Los valores corresponden al porcentaje que representa cada grupo funcional dentro del grupo de proteínas que disminuyen en S3 y dentro del grupo de proteínas que aumentan en S3. H.C. = hidratos de carbono, a.a. = aminoácidos; PC = pared celular; EROs = especies reactivas de oxígeno, modif. = modificación; metab. = metabolismo; plegam. = plegamiento; transp. = transporte; fosf. = fosforilación, defosf. = defosforilación, rta = respuesta.

Debido a la gran cantidad de proteínas, en las secciones siguientes se revisan las funciones de algunas de las proteínas identificadas.

### 2.3.1. Proteínas que se acumulan en el apoplasto de hojas S3 vinculadas con respuestas a estrés

Diversas tensiones ambientales pueden causar síntomas asociados a la senescencia en las hojas, como degradación de Rubisco, pérdida de clorofila, inducción de genes asociados a la

senescencia (SAGs) y muerte celular (Thomas y de Villiers, 1996; Gan y Amasino, 1997; Miller *et al.*, 1999; John *et al.*, 2001; Munné-Bosch y Alegre, 2004; Veronese *et al.*, 2004; Diaz *et al.*, 2006; Espinoza *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2011). De hecho, estudios transcriptómicos sugieren que la senescencia y los mecanismos de respuesta a distintos tipos de estrés comparten varios genes asociados y vías de señalización (Gan y Amasino, 1997; Quirino *et al.*, 2000; Pic *et al.*, 2002; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Gepstein *et al.*, 2003; Breeze *et al.*, 2011; Guo y Gan, 2012). Se ha propuesto que la alta expresión de genes de defensa en las hojas más viejas podría ser una respuesta adaptativa, ya que en varias especies se ha visto que las hojas se tornan más resistentes a los patógenos a medida que envejecen, debido al aumento de niveles de hormonas de respuesta a estrés como el ácido salicílico (Ashburner *et al.*, 2000; Carella *et al.*, 2015; Kaurilind y Brosché, 2017).

Aproximadamente el 88% de las proteínas que aumentan en el FA de S3 intervienen en la respuesta a algún tipo de estrés (Tabla 6.2). Entre estas proteínas se encuentran PR5 y PR2, previamente identificadas en este trabajo (Tabla 6.2). A continuación se describen algunos ejemplos donde se refleja la existencia de proteínas en común entre la senescencia y las respuestas a estrés.

#### 2.3.1.1. PR2 y PR5, las proteínas mayoritarias del proteoma de FA S3

El análisis *shotgun* indica, con un alto nivel de confianza, que las proteínas PR5 (At1g75040) y PR2 (At3g57260) son las más representativas del FA de hojas S3, y que se acumulan preferentemente en este estadio. Este resultado confirma el obtenido combinando perfiles SDS PAGE de FA y espectrometría de masas de las bandas más abundantes (Figura 6.1 y tablas 6.1).

PR2 es una  $\beta$ -1,3-glucanasa, este tipo de enzimas hidrolizan los enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,3 en los  $\beta$ -1,3-glucanos (Uknes *et al.*, 1992). Los  $\beta$ -1,3-glucanos (calosa) además de encontrarse en las paredes vegetales, constituyen los principales componentes estructurales de las paredes celulares de hongos, de ahí las propiedades antifúngicas de PR2 (Doxey *et al.*, 2007). PR5 fue identificada en secretomas de inflorescencias de *Arabidopsis* como una proteína unida iónicamente a la pared celular (Wei *et al.*, 2015). Su función molecular se desconoce, pero por homología de secuencia PR5 ha sido asignada a la familia de las taumatinas (Uknes *et al.*, 1992; The UniProt Consortium, 2017). Las proteínas de tipo taumatina (TLP) tienen funciones antifúngicas y anticongelantes; normalmente no se detectan en las hojas de las plantas jóvenes sanas, pero se acumulan rápidamente en altos niveles en respuesta a estrés biótico o abiótico

(Velazhahan *et al.*, 1999). Aunque también se demostró que las hojas más viejas de papa acumulan TLP en ausencia de estrés (Pierpoint *et al.*, 1990).

Tanto *PR5* como *PR2* se inducen marcadamente en respuesta al ácido salicílico (AS) y a varios tipos de estreses bióticos y abióticos (Uknes *et al.*, 1992; Van Loon y Van Strien, 1999; Sävénstrand *et al.*, 2004; Seo *et al.*, 2008). Los niveles estables de *PR2* y *PR5* aumentan en respuesta a bajas temperaturas (Antikainen *et al.*, 1996; Amme *et al.*, 2006). Además, ambas proteínas *PR* se asocian con la respuesta hipersensible (HR), y con los programas de resistencia sistémica adquirida (SAR) (Linthorst y Van Loon, 1991; Ward *et al.*, 1991; Mishina y Zeier, 2007). La HR al igual que la senescencia es una forma de muerte celular programada (MCP), si bien la senescencia ocurre durante un período relativamente largo y permite el rescate de nutrientes antes que ocurra la MCP, mientras que durante la HR el ataque de un patógeno desencadena una muerte celular rápida que da como resultado la formación de una región de células muertas alrededor del sitio de infección (Mittler y Lam, 1996). Aunque la senescencia y la HR cumplen funciones distintas, a nivel molecular, ambas vías convergen en ciertos pasos (Butt *et al.*, 1998; Pontier *et al.*, 1999; McLellan *et al.*, 2009). Por ello, no resulta extraño que *PR2* y *PR5* también participen en el programa de senescencia.

Si bien la expresión de *PR5* se considera diagnóstica de respuesta a patógenos (Mishina y Zeier, 2007), *PR5* y *PR2* también son regulados positivamente por los factores de transcripción WRKY75 y WRKY23, que promueven la senescencia de las hojas (Jing *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2017). La expresión de *PR2* depende de la presencia de AXR, un regulador positivo de la muerte celular mediada por AS (Kaurilind y Brosché, 2017). En síntesis, los patrones de expresión de *PR2* y *PR5* indican que ambos genes se inducen fuertemente en hojas senescentes (Winter *et al.*, 2007). Ambas proteínas (*PR2* y *PR5*) fueron identificadas en la pared celular y estuvieron asociadas al crecimiento tardío en *Arabidopsis* (Wei *et al.*, 2015), sin embargo, hasta el momento no habían sido vinculadas directamente con la senescencia foliar.

### 2.3.1.2. Otras proteínas de respuesta a estrés se acumulan en el FA de hojas S3

Entre otras de las proteínas previamente vinculadas con la respuesta a estrés cuyos niveles aumentaron significativamente en el FA de hojas S3 se encuentran cinco peroxidasas (At5g05340, At5g19880, At5g06720, At3g49120 y At5g06730), dos lectinas (At3g16530 y At3g15356), un inhibidor de proteasas serínicas (At2g43510), una proteína de transferencia de lípidos (At5g59310), una serina/treonina quinasa (At1g51890), una nodulina (At5g53870), y varias hidrolasas: tres quitinasas (At2g43580, At2g43570 y At3g54420), una glucanasa

(At4g16260), dos ribonucleasas (At3g04720 y At2g02990), una proteasa (At1g24140), una amilasa (At4g25000). Según la información sobre expresión génica obtenida de la plataforma EFP browser (Winter *et al.*, 2007), la mayoría de estos genes se induce fuertemente durante la senescencia, únicamente los niveles de expresión de At2g43580, At5g06720 y At3g16530 se mantienen estables durante la ontogenia de la hoja.

Curiosamente, de todas estas proteínas sólo la ribonucleasa RNS1 (At2g02990) y la amilasa AMY1 (At4g25000) habían sido vinculadas previamente a la senescencia. Sin embargo, en base a sus funciones conocidas se infiere que otras proteínas de este grupo también podrían participar de procesos asociados a la senescencia. A continuación se describen algunos ejemplos:

-RNS1 (At2g02990): la ribonucleasa RNS1 se localiza en el apoplasto y el gen que la codifica se expresa fuertemente no sólo durante la senescencia sino también frente a un déficit de fósforo (Bariola *et al.*, 1994; Bariola *et al.*, 1999). Se ha sugerido que RNS1 (en combinación con las fosfatasa apoplásticas) podría intervenir en la removilización del fósforo en el espacio extracelular, particularmente recuperando el P presente en el ARN cuando las células senescen o cuando el fósforo se vuelve limitante (Bariola *et al.*, 1994; Bariola *et al.*, 1999).

-PR4 (At3g04720): la ribonucleasa PR4 (At3g04720) se ve fuertemente inducida por etileno, ácido salicílico y por infecciones con patógenos (Potter *et al.*, 1993; Camargo-Ramírez *et al.*, 2018) y participa en la resistencia sistémica adquirida en Arabidopsis (Mishina y Zeier, 2007). Adicionalmente, la expresión de PR4 reduce frente a estrés hídrico prolongado (Cho *et al.*, 2013). Aunque no existen trabajos previos que la vinculen a la senescencia, su expresión aumenta en hojas senescentes y en el doble mutante de Arabidopsis *knock-out* para los factores de transcripción WRKY54 y WRKY70 (Winter *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2017). Estos dos factores de transcripción regulan negativamente la senescencia foliar y la síntesis de AS (Besseau *et al.*, 2012), lo que sugiere que PR4 podría participar en la regulación de la senescencia mediada por AS, siendo regulada negativamente por los factores de transcripción WRKY70 y WRKY54.

La expresión de PR4 también es reprimida por la fosfatasa SSPP. La expresión de SSPP se reduce notoriamente durante la senescencia foliar, y su sobreexpresión retrasa significativamente la senescencia natural e inducida por oscuridad, suprime la biosíntesis de etileno y reduce las respuestas al etileno en Arabidopsis (Xiao *et al.*, 2015). Esto sugiere que durante la senescencia, la disminución de los niveles de SSPP mediada por etileno podría inducir la expresión y la acumulación de PR4.

-*Peroxidasas*: el aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (EROs) es un factor común entre las diferentes respuestas de estrés y la senescencia (Barth *et al.*, 2004; Conklin y Barth, 2004; Bechtold *et al.*, 2005; Zimmermann y Zentgraf, 2005). Uno de los primeros eventos en la respuesta de defensa de la planta contra el ataque de patógenos es la producción de EROs, especialmente peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y superóxido ( $O_2^-$ ) (Bolwell y Wojtaszek, 1997; Lamb y Dixon, 1997; Wojtaszek, 1997). Aunque las peroxidasas cumplen un rol clave en la reducción del  $H_2O_2$ , paradójicamente se ha propuesto que algunas peroxidasas apoplásticas dependientes del pH podrían participar en la producción de EROs a pH fisiológico (Kawano, 2003; Almagro *et al.*, 2009; O'Brien *et al.*, 2012a). Se ha reportado que las peroxidasas apoplásticas juegan un papel significativo durante la respuesta de defensa de *Arabidopsis* y confieren resistencia a una amplia gama de patógenos (Bolwell *et al.*, 1998; Bolwell *et al.*, 2002; Bindschedler *et al.*, 2006; O'Brien *et al.*, 2012b). Se ha sugerido que la acumulación rápida de EROs durante las primeras fases de la senescencia de las hojas (Smart, 1994; Zimmermann y Zentgraf, 2005; Juvany *et al.*, 2013; Buchanan *et al.*, 2015; Muñoz y Munné-Bosch, 2018) conduciría, en algunos casos, a la oxidación de pigmentos, proteínas y lípidos; y podría ser necesario para la removilización de nutrientes (Hortensteiner y Feller, 2002).

Se observó una acumulación de 5 peroxidasas en el FA de hojas S3: PRX34 (At3g49120), PRX53 (At5g06720), PRX58 (At5g19880), PRX54 (At5g06730) y PRX52 (At5g05340). La expresión de los genes que codifican estas proteínas se induce en respuesta a estrés y todas presentan péptido señal de direccionamiento a la vía secretoria clásica. Mientras que los niveles de expresión de PRX58, PRX52, PRX54 y PRX53 aumentan levemente en hojas senescentes, la expresión de PRX34 se induce de manera pronunciada (Winter *et al.*, 2007).

Plantas doble *knock-down* para PRX34 y su homólogo PRX33 (*prx34/prx33*) son más susceptibles al ataque de diversos patógenos (O'Brien *et al.*, 2012b; Mammarella *et al.*, 2015), y según comentan Daudi *et al.* (2012) presentarían retraso en la senescencia. Adicionalmente, la línea simple *knock-down prx34* produce niveles mínimos de  $H_2O_2$  apoplástico en respuesta a MAMPs (*Microbe-associated molecular patterns*) en comparación con el genotipo salvaje (Daudi *et al.*, 2012) y, al igual que el doble *knock-down*, presentaría retraso en la senescencia foliar (Daudi *et al.*, 2012). La ausencia de PRX34 conduce a un aumento en la expansión celular, lo cual refleja el rol de las peroxidasas en promover rigidez a las paredes celulares (Bradley *et al.*, 1992; Passardi *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2011; Daudi *et al.*, 2012; O'Brien *et al.*, 2012b).

### 2.3.2. Proteínas relacionadas con la fotosíntesis y el metabolismo de carbohidratos que se acumulan en el FA de S3

De las 24 proteínas que se acumulan en el FA de S3, solo las  $\beta$ -1,3-glucanasas PR2 y Q8VZJ2 (At4g16260) y la amilasa AMY1 (At4g25000) participarían en el metabolismo de hidratos de carbono.

AMY1 es la única de las tres  $\alpha$ -amilasas de *Arabidopsis* que contiene péptido señal, y además se demostró su localización en el apoplasto de *Arabidopsis* (Doyle *et al.*, 2007). Tanto la expresión de AMY1 como los niveles estables de AMY1 aumentan fuertemente con la edad y durante la senescencia en *Arabidopsis*, sugiriendo un papel en la degradación del almidón asociada a la senescencia (Doyle *et al.*, 2007). Se ha propuesto que AMY1 podría actuar sobre algunos carbohidratos desconocidos que normalmente se encuentran en las paredes celulares o que son generados por microorganismos (Doyle *et al.*, 2007). Adicionalmente, la expresión de AMY1 se induce por ABA, por calor y por patógenos (Doyle *et al.*, 2007). El mutante *knock-out* de *Arabidopsis amy1* presenta floración temprana en comparación con el genotipo salvaje (Jie *et al.*, 2009).

### 2.3.3. Proteasas que se acumulan en el FA S3

Las principales funciones de la actividad proteolítica asociada a la senescencia son la degradación de proteínas, y consecuente liberación de aminoácidos, y la regulación de vías de señalización a través del procesamiento de moléculas (i.e., propéptidos) (Beers *et al.*, 2000).

Dos proteasas extracelulares se acumularon marcadamente en el FA de hojas senescentes: la metaloproteasa 3-MMP (At1g24140) y la proteasa cisteínica Q9SG15 (At3g49340). Ambas presentan péptido señal, y sus transcritos aumentan marcadamente durante la senescencia (Winter *et al.*, 2007).

En un estudio reciente, se sugirió que At3-MMP cumpliría funciones redundantes con At2-MMP y At5-MMP en la defensa frente a hongos patógenos (Zhao *et al.*, 2017). Se ha reportado que las metaloproteasas de tomate Sl2-MMP y Sl3-MMP, homólogas a At3-MMP, cumplirían funciones redundantes en el control negativo de la muerte celular (Zimmermann *et al.*, 2016). Adicionalmente, se reportó que Sl2-MMP y Sl3-MMP actúan aguas arriba de la subtilasa extracelular P69B en una cascada proteolítica extracelular que regula la muerte celular (Zimmermann *et al.*, 2016). La falta de la metaloproteasa At2-MMP, quien presenta un 71% de similitud de secuencia con At3-MMP, causa aceleración de la senescencia y retraso en la

floración (Golldack *et al.*, 2002) Esta información sugiere que la acumulación de At3-MMP en el apoplasto de hojas senescentes podría participar en la represión de la muerte celular.

La función específica de Q9SG15 (At3g49340) se desconoce, pero por similitud de secuencia ha sido asignada a familia de las proteasas cisteínicas (Ashburner *et al.*, 2000; Consortium, 2016). Las proteasas cisteínicas de tipo vacuolares cumplen funciones importantes en el control de la senescencia y la muerte celular (Coupe *et al.*, 2003). Adicionalmente, varias proteasas cisteínicas extracelulares están involucradas en la inducción de la muerte celular programada durante la infección con patógenos (Gilroy *et al.*, 2007; Bozkurt *et al.*, 2011; van der Linde *et al.*, 2012; Ziemann *et al.*, 2018). Por ejemplo, las proteasas cisteínicas tipo papaínas extracelulares, CP1 y CP2, de maíz intervienen en las respuestas de defensa frente a patógenos mediadas por AS, mediante el procesamiento y liberación del péptido de señalización apoplástico ZIP1 (Ziemann *et al.*, 2018).

#### **2.3.4. Proteínas apoplásticas cuyos niveles estables disminuyen en S3**

##### **2.3.4.1. Proteínas de respuesta a estrés que disminuyen en el FA de S3**

Del total de proteínas que muestran una disminución en el FA de hojas senescentes, al menos 58 intervienen en la respuesta a distintos tipos de estrés (Tabla 6.2). Adicionalmente, la gran mayoría de estos genes se regula negativamente durante la senescencia foliar. Dentro de este grupo, sólo la expresión de los genes que codifican la aldolasa FBA6 (At2g36460) y la peroxidasa PRX51 (At4g37530) se regula positivamente durante la senescencia de la hoja, es decir que los niveles de proteína disminuyen en el FA a pesar de que su expresión aumenta (Winter *et al.*, 2007). Si bien la mayoría de estas proteínas no ha sido asociada directamente a la senescencia, a continuación se describen algunos ejemplos que sugieren que muchas de estas proteínas podrían regular negativamente la senescencia en el apoplasto de la hoja.

-CPN-60  $\beta$ 1 (At1g55490): se ha demostrado que la falta de la chaperona CPN-60  $\beta$ 1 causa reducción del crecimiento y muerte celular en Arabidopsis (Ishikawa *et al.*, 2003). Plantas de tabaco con el gen que codifica CPN-60  $\beta$  silenciado presentan retraso en el crecimiento y senescencia temprana (Zabaleta *et al.*, 1994). Si bien no presenta péptido señal, ha sido identificada en el apoplasto de plantas de Arabidopsis (Bindschedler *et al.*, 2008).

-AED3 (At1g09750): la proteasa aspártica extracelular AED3 participaría en la regulación de la muerte celular programada (Ashburner *et al.*, 2000; Consortium, 2016) y su expresión se

reprime en mutantes de autofagia, donde la senescencia se encuentra acelerada (Havé *et al.*, 2018).

-RCA (At2g39730): la enzima *Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase*, RCA (At2g39730) se localiza principalmente en los cloroplastos, sin embargo también ha sido identificada en el apoplasto y en vesículas extracelulares (EV) de *Arabidopsis* (Bindschedler *et al.*, 2008; Rutter y Innes, 2017). RCA utiliza la energía de la hidrólisis del ATP para eliminar los inhibidores unidos a Rubisco, desempeñando así un papel clave en la regulación de la fotosíntesis en las plantas (Zhang y Portis, 1999). Además participa en la respuesta a distintos tipos de estrés (Goulas *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2006). Mediante análisis genéticos y fisiológicos se demostró que la pérdida de RCA conduce a características típicas asociadas a la senescencia, como pérdida de clorofila y aumento en la expresión de genes asociados a la senescencia (SAGs), en una ruta mediada por ácido jasmónico (Shan *et al.*, 2011).

-AnnAt1 (At1g35720): otra proteína de respuesta a estrés detectada en el FA cuyos niveles estables disminuyen durante la senescencia es la anexina AnnAt1 (At1g35720). La expresión de At1g35720 disminuye marcadamente en hojas senescentes (Winter *et al.*, 2007). Si bien no presenta péptido señal, se ha demostrado que se secreta de las células (Clark *et al.*, 2005; Bindschedler *et al.*, 2008; Ge *et al.*, 2011). Plántulas mutantes *knock-out* de *Arabidopsis* para el gen At1g35720 muestran senescencia temprana e hipersensibilidad al ABA y al estrés osmótico (Lee *et al.*, 2004). La expresión ectópica de *AnnBj1*, que codifica para un homólogo de AnnAt1 proveniente de *Brassica juncea* (Jami *et al.*, 2009), disminuye la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y retrasa la senescencia en plantas de tabaco y algodón sometidas a distintos tipos de estrés (Jami *et al.*, 2008; Divya *et al.*, 2010). Estos datos, junto con la disminución en los niveles de AnnAt1 en el FA a medida que avanza la senescencia permiten suponer que AnnAt1 podría regular negativamente la senescencia, al promover una baja sensibilidad al ABA.

#### 2.3.4.2. Enzimas implicadas en el metabolismo de EROs cuyos niveles disminuyen en el FA S3

Durante la senescencia, las plantas deben controlar la producción de EROs tanto en el espacio como en el tiempo para impedir que la muerte celular proceda antes de que ocurra la removilización de nutrientes (Munné-Bosch *et al.*, 2001; Zimmermann y Zentgraf, 2005; Juvany *et al.*, 2013).

-*Enzimas que intervienen en el catabolismo de EROs*: algunas de las enzimas implicadas en el catabolismo de EROs cuyos niveles disminuyeron en el FA de S3 son la peróxidasa PRX51, las

superóxido dismutasas CSD1 (At1g08830) y CSD2 (At2g28190) y la fosfatasa ácida AtPAP26 (At5g34850).

La expresión de los genes que codifican las enzimas superóxido dismutasas CSD1 y CSD2 disminuye marcadamente durante la senescencia foliar (Winter *et al.*, 2007). Ambas proteínas se localizan principalmente en los cloroplastos, sin embargo también han sido identificadas en el apoplasto (Bindschedler *et al.*, 2008). CSD1 y CSD2 catalizan la conversión de  $O_2^-$  a  $H_2O_2$  que puede ser removido por enzimas antioxidantes como la Catalasa o la ascorbato peroxidasa, o por compuestos antioxidantes como el glutatión o el ascorbato (Ahmad *et al.*, 2008). Se ha demostrado que la senescencia se correlaciona con la disminución en la actividad superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa y catalasa, entre otras enzimas y compuestos antioxidantes (Dhindsa *et al.*, 1981; Casano *et al.*, 1994; Prochazkova *et al.*, 2001; Prochazkova y Wilhelmova, 2007; Zhang *et al.*, 2016). Además, dado que el  $O_2$  es sustrato en la generación de radicales libres, la mayor captación de  $O_2$  durante la senescencia (Tetley y Thimann, 1974) sumado a la disminución de las actividades CSD1, CSD2, ascorbato peroxidasa y catalasa favorecerían la acumulación de EROs.

La expresión del gen que codifica para la fosfatasa ácida AtPAP 26 (At5g34850) aumenta levemente durante la senescencia (Winter *et al.*, 2007), sin embargo sus niveles estables disminuyen en el FA S3 (Tabla 6.2). AtPAP26 se localiza tanto en la vacuola como en el apoplasto (Carter *et al.*, 2004; Shimaoka *et al.*, 2004; Minic *et al.*, 2007; Hurley *et al.*, 2010). AtPAP26 es la isoenzima PAP predominante y funciona tanto en el reciclaje de Pi vacuolar como en la captación de Pi extracelular de fuentes orgánicas de P durante el déficit de Pi (Hurley *et al.*, 2010; Tran *et al.*, 2010). En los mutantes *knock-out atpap26* se interrumpe la removilización de P de las hojas senescentes, disminuye el P total acumulado por las semillas y se retrasa la senescencia de las hojas (Robinson *et al.*, 2012a). La inducción de la actividad AtPAP26 y RNasa observada en preparados de pared celular durante la senescencia de *Hakea prostrata* y *Arabidopsis* sugiere que esta hidrolasa funciona en la removilización del P extracelular producto de fugas citosólicas (Robinson *et al.*, 2012b; Shane *et al.*, 2014). Se ha demostrado que AtPAP26 presenta actividad peroxidasa a pH alcalino (Veljanovski *et al.*, 2006). La acumulación de PAP26 en residuos insolubles de pared celular de hojas senescentes y su disminución en el FA de hojas senescentes sugieren que PAP26 disminuye su solubilidad en el FA durante la senescencia.

-*Enzimas que intervienen en la biosíntesis de EROs:* por otro lado, las glicolato oxidasas GOX1 (At3g14420) y GOX2 (At3g14415) implicadas en la biosíntesis de EROs disminuyeron en

abundancia en el FA de S3: (Tabla 6.2). La expresión de GOX1 y GOX2 disminuye en hojas senescentes (Winter *et al.*, 2007). Si bien no tienen péptido señal, GOX1 se identificó en el FA de plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés oxidativo (Bindschedler *et al.*, 2008). Se ha demostrado que la disminución en la actividad de GOX1 y GOX2 interviene en la regulación de la senescencia foliar en *Arabidopsis*, ya que el doble *knock-down* para estos genes, *amiRgox1/2*, presentó aceleración de la senescencia respecto al genotipo salvaje (Dellero *et al.*, 2016).

#### **2.3.4.3. Proteínas relacionadas al metabolismo de carbohidratos cuyos niveles disminuyen en el FA S3**

La senescencia de las hojas va acompañada de una disminución de la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis (Nam, 1997). De las 159 proteínas que disminuyen en S3, 55 intervienen en el metabolismo de hidratos de carbono. Adicionalmente, los genes de 48 de estas 55 proteínas también se regulan negativamente durante la senescencia foliar (Tabla 6.2) y varias participan en la fotosíntesis. Se ha observado que plantas mutantes para varios de estos genes muestran fenotipos característicos de la senescencia, como clorosis y disminución del rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (Fv/Fm) (Yi *et al.*, 2005; Timm *et al.*, 2008; Jamaï *et al.*, 2009; Kissen *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2013). Sin embargo, se desconoce si cumplen alguna función en la regulación extracelular de la senescencia.

#### **2.3.4.4. Proteínas relacionadas al metabolismo de aminoácidos cuyos niveles disminuyen en el FA S3**

Curiosamente, todas las proteínas identificadas en este estudio cuya función se relaciona con metabolismo de aminoácidos muestran una disminución de sus niveles en FA S3 (Tabla 6.2). Adicionalmente, según el análisis de expresión, los genes de todas estas proteínas se regulan negativamente durante la senescencia foliar (Winter *et al.*, 2007). Entre estas proteínas se identificaron:

-OASA1 (At4g14880): la cisteína sintasa OASA1 (At4g14880) no presenta péptido señal, pero ha sido identificada en el apoplasto de plantas de *Arabidopsis* expuestas a estrés oxidativo y en vesículas extracelulares (EV) (Bindschedler *et al.*, 2008; Rutter y Innes, 2017). Plantas de *Arabidopsis old3*, mutantes para el gen At4g14880, presentaron aceleración marcada de la senescencia en comparación con el WT (Jing *et al.*, 2002). Se propuso un modelo en el que la enzima cisteína sintasa OASA1 (OLD3) actúa aguas abajo de OLD1 y OLD2 reprimiendo una cascada de señalización inductora de la senescencia mediada por etileno (Jing *et al.*, 2002).

-GS2 (At5g35630): la glutamina sintasa GS2 (At5g35630) se localiza principalmente en los cloroplastos y mitocondrias, sin embargo también ha sido identificada en el apoplasto en plantas de *Arabidopsis* (Taira *et al.*, 2004; Bindschedler *et al.*, 2008). GS2 se encarga de la reasimilación del amonio generado durante la fotorrespiración (Masclaux *et al.*, 2000; Taira *et al.*, 2004). La expresión de At5g35630 y la actividad de GS2 disminuyen notoriamente durante la senescencia foliar (Masclaux *et al.*, 2000). Se propuso que a medida que las hojas senescen y los cloroplastos se degradan, la actividad glutamina sintasa se mantiene gracias a la síntesis de nuevas isoformas citosólicas GS1 (Masclaux *et al.*, 2000; Cabello *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2006). Sin embargo, hasta el momento no hay ninguna prueba directa que involucre a GS2 con la regulación de la senescencia.

-CYP20-3 (At3g62030): la ciclofilina CYP20-3 (At3g62030) interviene en el plegamiento de proteínas y en la síntesis de cisteína en respuesta a estrés (Lippuner *et al.*, 1994; Dominguez-Solis *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2013). Plantas mutantes carentes de CYP-20 son hipersensibles al estrés oxidativo y muestran fenotipos asociados a la senescencia más marcados que las plantas WT bajo situaciones de estrés (Dominguez-Solis *et al.*, 2008). CYP20-3 es principalmente cloroplástica (Lippuner *et al.*, 1994; Hooper *et al.*, 2016), y según el software Plant-mPloc (Chou y Shen, 2010) puede ser secretada, pero no había sido identificada en FA.

-GDCH (At2g35370): la deficiencia de la glicina descarboxilasa GDCH (GDH1) causa senescencia prematura en las plantas de arroz (Zhou *et al.*, 2013). GDCH se localiza en las mitocondrias y cloroplastos y no ha sido identificada previamente en el espacio extracelular (Kleffmann *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2015).

-AGD2 (At4g33680): la aminotransferasa AGD2 (DAP) se localiza en los cloroplastos, y si bien no presenta péptido señal, ha sido identificada en la pared celular de raíces (Song *et al.*, 2004; Nguyen-Kim *et al.*, 2016). La falta de AGD2 en plantas de *Arabidopsis* mutantes *agd2* da lugar a un fenotipo asociado a respuestas de defensa constitutivas, que incluye niveles elevados de AS y de transcritos de genes relacionados con la defensa, deposición de calosa y muerte celular, sugiriendo que AGD2 promueve el desarrollo y suprime las respuestas de defensa y la muerte celular (Rate y Greenberg, 2001; Song *et al.*, 2004).

-Fd-GOGAT 1 (At5g04140): la enzima glutamato sintasa Fd-GOGAT 1 (GLU1) se localiza principalmente en cloroplastos y mitocondrias, sin embargo también ha sido identificada en el apoplasto de *Arabidopsis* (Bindschedler *et al.*, 2006; Jamai *et al.*, 2009). La expresión de At5g04140 se regula negativamente durante la senescencia foliar (Winter *et al.*, 2007). La falta

de Fd-GOGAT 1 en la línea de Arabidopsis mutante *glu1-2* reguló negativamente la fotosíntesis, la fotorrespiración y la biosíntesis de clorofila (Jamai *et al.*, 2009).



## CONCLUSIONES

- En este capítulo se demostró que la composición del FA se modifica durante la senescencia foliar al determinar, mediante perfiles de proteínas en geles SDS PAGE y proteómica, la reducción de los niveles relativos de muchas proteínas y la acumulación de otras cuando se comparan los FA de hojas S2 y S3.
- Las proteínas identificadas en el fluido apoplástico de las hojas de Arabidopsis están implicadas en diversos procesos fisiológicos, principalmente en la respuesta frente a distintos tipos de estrés y en el metabolismo de hidratos de carbono.
- Una gran proporción de las proteínas acumuladas en el FA de hojas senescentes corresponde a proteínas de respuesta a estrés. Este resultado refleja la existencia de cierta superposición entre los programas extracelulares de defensa y de senescencia natural. De hecho, muchos mutantes afectados en proteínas apoplásticas de respuesta a estrés también se ven afectados en la senescencia foliar. Aunque las finalidades de la senescencia natural y la respuesta de defensa son muy distintas, no resulta extraño que dos procesos que conducen al mismo desenlace, la muerte celular, compartan ciertos elementos regulatorios.
- Más del 50% de las proteínas acumuladas diferencialmente en el apoplasto de las hojas no senescentes correspondería a LSPs (*leaderless secretory proteins*) exportadas por rutas no convencionales. Las funciones intracelulares de muchas de estas proteínas son conocidas, e incluso varias de ellas intervienen en la regulación de la senescencia y en el metabolismo de aminoácidos, sin embargo se desconocen sus funciones en el espacio extracelular. A partir de estos resultados será importante determinar si estas LSPs ejercen alguna función específica en el espacio extracelular, o bien se relocalizan al FA como parte de una vía meramente catabólica dado que el apoplasto de estas hojas contiene diversas proteasas.
- La totalidad de las proteínas acumuladas diferencialmente en el apoplasto de hojas senescentes presentan péptido señal, lo cual permite su exportación inmediatamente luego de traducirse. En cierta medida este resultado es esperable, ya que las células deben asegurar de alguna forma la secreción de aquellas proteínas destinadas a participar en la ejecución los procesos extracelulares asociados a la senescencia.
- Se ha sugerido que la presencia de glicosilaciones es un factor común entre las proteínas que entran en la ruta convencional de secreción proteica. Sin embargo, en este estudio sólo el 45% de las proteínas que presentan péptido señal estarían glicosiladas.

- Es posible que las glicosilaciones cumplan alguna función durante el desarrollo. Por lo tanto, sería interesante poder identificar qué proporción de las proteínas apoplásticas que presentan potenciales sitios de glicosilación se encuentran realmente glicosiladas en cada uno de los estadios.

En conjunto, los resultados obtenidos aportan evidencia sobre el rol de las proteínas apoplásticas en la regulación y ejecución de la senescencia foliar en *Arabidopsis*. Estudios funcionales futuros permitirán ampliar nuestra comprensión sobre el papel del apoplasto en la regulación de la senescencia natural y la removilización de nutrientes. La articulación de los eventos extracelulares e intracelulares es fundamental para profundizar el conocimiento sobre los eventos celulares y moleculares en las etapas finales del desarrollo de la planta.

**TABLA 6.2. Proteínas identificadas**

Proteína	Proteína ID	Gen ID	PM (kDa)	LS	Proceso biológico	Niveles de proteína durante la senescencia	expresión durante la senescencia	PS	Glic	NC
Probable LRR receptor-like protein kinase	C0LGG6	At1g51890	98,5	<b>Ap, M, MP, N, RE, G</b>	Fosforilación de proteínas, defensa frente a bacterias	↑	↑	SI	SI	**
PLC-like phosphodiesterases superfamily protein.	F4JQJ7	At4g36945	44,3	<b>Ap, MP, RE, N, G, V</b>	Metabolismo de lípidos	↑	no hay información	SI	NO	***
Endochitinase At2g43580	O24598	At2g43580	28,8	<b>Ap, RE, G, V</b>	catabolismo de macromoléculas de la pared celular, defensa frente a hongos	↑	—	SI	SI	***
Endochitinase (CHI, LSC222)	O24603	At2g43570	29,8	<b>Ap, Mit, MP, RE, G, V</b>	catabolismo de macromoléculas de la pared celular, senescencia foliar, respuesta a virus, resistencia sistémica adquirida	↑	↑	SI	SI	****
Pathogenesis-related protein 5 (PR5)	P28493	At1g75040	25,2	<b>Ap, V, Mit, RE, G, Cit</b>	regulación de la biosíntesis de antocianinas, respuesta a UV-B, respuesta a iones de cadmio, respuesta a estímulos bióticos, respuesta a virus, resistencia sistémica adquirida	↑	↑	SI	NO	****
Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic isoform (PR2, BGL2)	P33157	At3g57260	37,3	<b>Ap, MP, RE, V, G, Cit, Chl</b>	metabolismo de carbohidratos, respuesta al frío, resistencia sistémica adquirida, respuesta a estímulos bióticos	↑	↑	SI	NO	****
Ribonuclease 1 (RNS1)	P42813	At2g02990	25,4	<b>Ap, MP, RE, V, G</b>	envejecimiento, biosíntesis de compuestos que contienen antocianina, respuesta celular a la deficiencia de fosfato, respuesta a heridas	↑	↑	SI	NO	****
Hevein-like preproprotein (HEL, PR4)	P43082	At3g04720	22,9	<b>Ap, RE, G, V, Chl</b>	defensa frente a bacterias y hongos, destrucción de células de otros organismos, respuesta a etileno, respuesta a ácido salicílico, respuesta a herbívoros, respuesta a estrés salino, respuesta a virus, resistencia sistémica adquirida	↑	↑	SI	NO	***
Peroxidase 58 (PRX58)	P59120	At5g19880	35,4	<b>Ap, Cit, RE,</b>	catabolismo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , oxidación-reducción, respuesta	↑	↑	SI	SI	**

				G, MP, Chl	a etileno, respuesta a estrés oxidativo, respuesta a patógenos					
Germin-like protein subfamily 1 member 13 (GLP6)	P92997	At5g39100	24,1	Ap, Cit, RE, G, Mit, N, Chl	desconocido	↑	↑	SI	SI	**
Peroxidase 53 (PRX53)	Q42578	At5g06720	35,0	Ap, G, Cit, RE, N, Chl, V	catabolismo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , oxidación-reducción, defensa frente a nematodos, respuesta a estrés oxidativo, desarrollo floral	↑	—	SI	SI	****
Metalloendoproteinase 3-MMP (At3-MMP)	Q5XF51	At1g24140	43,0	Ap, MP, M, G, RE, Mit, PX, Chl	Proteólisis, respuesta a estrés	↑	↑	SI	SI	**
Alpha-amylase 1 (AMY1)	Q8VZ56	At4g25000	47,3	Ap, Cit, RE, G, Chl	metabolismo de carbohidratos, respuesta a ABA, respuesta a giberelinas, respuesta a estrés	↑	↑	SI	NO	***
Probable glucan endo-1,3-beta-glucosidase	Q8VZJ2	At4g16260	37,7	Ap, T, MP, RE, G, Chl	metabolismo de carbohidratos, defensa frente a hongos, defensa frente a nematodos, respuesta a estrés salino	↑	↑	SI	NO	***
Peroxidase 54 (PRX54)	Q9FG34	At5g06730	37,3	Ap, T, V, RE, Cit, G, N, MP, Chl	catabolismo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , oxidación-reducción, respuesta a estrés oxidativo	↑	↑	SI	SI	***
Peroxidase 52 (PRX52)	Q9FLC0	At5g05340	34,2	Ap, Cit, G, RE, N,	catabolismo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , biosíntesis de lignina, oxidación-reducción, respuesta a estrés oxidativo, desarrollo del xilema	↑	↑	SI	SI	**
Early nodulin-like protein 1 (ENODL1)	Q9FN39	At5g53870	38,4	Ap, MP, M, RE, G, N, V	cadena de transporte de electrones, respuesta a estrés	↑	↑	SI	NO	**
Lectin-like protein LEC (LEC)	Q9LJR2	At3g15356	29,7	Ap, Mit, MP, Chl, G, RE, Cit, N	respuesta a quitina, respuesta a etileno, respuesta a ácido jasmónico, defensa frente a hongos, vía de señalización activada por etileno, respuesta a heridas	↑	no hay info	SI	SI	**
Lectin-like protein	Q9LK72	At3g16530	30,5	Ap, N, MP, RE, Cit, G	defensa frente a hongos, respuesta a quitina	↑	—	SI	SI	***
Non-specific lipid-transfer protein 4 (LTP4)	Q9LLR6	At5g59310	11,4	Ap, M, RE, G, Mit, Chl	transporte de lípidos, respuesta a ABA, respuesta a estrés salino, respuesta a la deficiencia de agua	↑	↑	SI	NO	**

Cysteine protease-like protein	Q9SG15	At3g49340	37,7	Ap, RE, Cit, G, Chl, V	Proteólisis	↑	↑	SI	NO	**
Peroxidase 34 (PRX34)	Q9SMU8	At3g49120	38,8	Ap, G, T, V, RE, Mit, N, MP, Chl	defensa frente a bacterias, defensa frente a hongos, catabolismo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , oxidación-reducción, respuesta a citoquininas, respuesta a estímulos de luz, respuesta a estrés oxidativo, crecimiento celular unidimensional	↑	↑	SI	SI	****
Defensin-like protein 195 (ATTI-1)	Q42328	At2g43510	9,9	Ap, G, Cit, V, RE	respuesta de defensa, defensa frente a hongos, muerte de células de otro organismo	↑	↑	SI	NO	**
Endochitinase EP3 (EP3)	Q9M2U5	At3g54420	29,4	Ap, G, Chl, V, RE	catabolismo de macromoléculas de la pared celular, catabolismo de quitina, respuesta de defensa, respuesta hipersensible, catabolismo de polisacáridos, defensa frente a bacterias, respuesta a heridas, embriogénesis somática	↑	↑	SI	SI	**
Carbonic anhydrase (CA2)	A8MQY4	At5g14740	34,4	Ap, EV, Mit, G, T, V, MP, Chl, Cit, N	utilización de carbono, defensa frente a bacterias	↓	↓	—	—	**
Aldolase-type TIM barrel family protein (GOX1)	A8MS37	At3g14420	39,4	Ap, Mit, MP, Chl, PX, N, M, Cit	defensa frente a bacterias, biosíntesis de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , oxidación-reducción, ruta oxidativa del carbono fotosintético, respuesta a citoquininas	↓	↓	—	—	**
Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein (LTPG6)	F4I083	At1g55260	25,0	EV, N, MP, M, Cit, Mit	transporte de lípidos	↓	↓	—	—	**
Lactoylglutathione lyase GLX1 (GLX1)	O65398=F4IAH9	At1g11840	31,9	Ap, Cit, Mit, PX, MP, Chl, V, N	metabolismo de carbohidratos, catabolismo de metilglioxal a D-lactato, oxidación-reducción, respuesta a iones de cadmio	↓	↓	NO	NO	***
Beta-galactosidase 8 (BGAL8)	F4IIQ3	At2g28470	92,5	Ap, V, RE, G, Mit, N, Chl,	metabolismo de carbohidratos	↓	↓	SI	SI	**
Sinapoylglucose 1 (SNG1)	F4IKK4	At2g22990	36,7	Ap, V, Cit, RE, G, MP	metabolismo de fenilpropanoides, proteólisis	↓	↓	—	—	**
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	F4IX28	At3g62030	28,1	Ap, Mit, MP,	plegamiento de proteínas, biosíntesis de cisteína,	↓	↓	—	—	**

(CYP20-3, ROC4)				Cit, Chl, RE, N	defensa frente a bacterias, isomerización peptidil-prolil de proteínas , respuesta a ABA, respuesta a citoquininas, respuesta a la intensidad de la luz, respuesta a manitol, respuesta a estrés oxidativo, respuesta a estrés salino, transducción de señales					
Probable glucan endo-1,3-beta-glucosidase BG3 (BG3)	F4J270	At3g57240	37,6	AP, MP, V, RE, G, Mit, Chl	respuesta frente a bacterias, metabolismo de carbohidratos	↓	↓	SI	SI	***
Transketolase (TKL1)	F4JBY2	At3g60750	79,8	Ap, EV, T, G, Mit, MP, Chl, V, Cit	metabolismo, ciclo reductivo de las pentosas-fosfato, respuesta al ion cadmio, respuesta a estrés salino	↓	↓	—	—	**
Receptor Serine/Threonine kinase-like protein	F4JQT1	At4g18250	95,2	MP, M, Ap, Cit, RE, G, N, Chl	fosforilación de proteínas	↓	↑	—	—	***
Early nodulin-like protein 19 (ENODL19)	F4JRH9	At4g12880	12,0	Ap, G, MP, Mit, Chl, RE	cadena de transporte de electrones	↓	↓	—	—	**
Aspartate aminotransferase (ASP5)	F4JTH0	At4g31990	49,3	Ap, Mit, Chl, amiloplasto	metabolismo de aminoácidos, respuesta a cadmio, respuesta al frío	↓	↓	—	—	**
Ferredoxin--NADP reductase (FNR1)	F4JZ46	At5g66190	29,7	Ap, T, N, Mit, G, Chl, MP, Cit	defensa frente a bacterias, oxidación-reducción, cadena de transporte de electrones	↓	↓	—	—	**
Ribulose biphosphate carboxylase large chain (RBCL)	O03042	AtCg00490	52,9	Ap, EV, G, Mit, N, MP, M, Chl, T, Cit	fijación de carbono, oxidación-reducción, fotorrespiración, ciclo de las pentosas-fosfato, respuesta a ABA, respuesta al ion cadmio	↓	↓	NO	NO	****
Aspartyl protease AED3 (AED3)	O04496	At1g09750	47,6	Ap, G, Mit, T, MP, Chl, N, V, RE	proteólisis, resistencia sistémica adquirida, regulación de la muerte celular programada	↓	↓	SI	SI	****
Calvin cycle protein CP12-1 (CP12-1)	O22914	At2g47400	13,5	Chl, Ap, RE, Cit, G, Mit,	regulación negativa del ciclo de las pentosas-fosfato, respuesta a la sacarosa	↓	↓	NO	NO	**

				N						
Serine hydroxymethyltransferase 4 (SHM4)	O23254	At4g13930	51,7	<b>Ap, Cit, G, Mit, MP, M, Chl, N</b>	metabolismo de L-serina, ritmo circadiano, metabolismo de glicina, respuesta a iones de cadmio, interconversión de tetrahidrofolato	↓	↓	NO	NO	**
Thioredoxin M1 (THM1)	O48737	At1g03680	19,7	<b>Ap, Mit, Chl</b>	homeostasis redox celular, respuesta a estrés oxidativo, metabolismo de éter de glicerol, regulación de la actividad catalítica, oxidación-reducción, regulación del metabolismo de hidratos de carbono, respuesta al frío	↓	↓	NO	NO	****
Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	O49297	At1g23205	22,7	<b>Ap, RE, G, N, MP, Chl, v</b>	regulación negativa de la actividad catalítica	↓	↓	SI	NO	**
20 kDa chaperonin (CPN20)	O65282	At5g20720	26,8	<b>Ap, G, Mit, PX, Chl, Cit</b>	plegamiento de proteínas, regulación negativa de la vía de señalización activada por ABA, regulación positiva de la actividad superóxido dismutasa, heterotetramerización de proteínas, respuesta al ion cadmio, respuesta al frío, respuesta a proteínas desplegadas	↓	↓	NO	NO	**
Subtilisin-like protease SBT1.7 (SBT1.7)	O65351	At5g67360	79,4	<b>Ap, G, T, RE, Mit, MP, Chl, V</b>	proteólisis, metabolismo del mucílago involucrado en el desarrollo de la cubierta de las semillas	↓	—	SI	SI	***
Putative cysteine-rich receptor-like protein kinase 9 (CRK9, EP1)	O65469	At4g23170	29,7	<b>Ap, MP, G, Chl, Mit, RE</b>	muerte celular programada, respuesta a ácido salicílico, resistencia sistémica adquirida	↓	no hay info	SI	SI	**
Superoxide dismutase [Cu-Zn] 2 (CSD2)	O78310	At2g28190	22,2	<b>Ap, Chl, Mit</b>	respuesta a UV-B, respuesta a la intensidad de luz, respuesta a estrés oxidativo, respuesta al ozono, respuesta a estrés salino, respuesta a sacarosa, silenciamiento génico por miRNA, oxidación-reducción, eliminación de radicales superóxido, respuesta a iones cobre, respuesta a iones hierro	↓	↓	NO	NO	***
Pectin acetylerase 3 (PAE3)	O80731	At2g46930	45,9	<b>Ap, MP, RE, G, Mit, N, V</b>	organización de la pared celular	↓	↓	SI	SI	**

NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	O80934	At2g37660	34,9	<b>Ap, Mit, Chl</b>	defensa frente a bacterias	↓	↓	NO	NO	**
Pectin lyase-like superfamily protein	O81746	At4g23500	54,7	<b>Ap, Mit, Chl, G, RE, MP, Cit</b>	metabolismo de carbohidratos	↓	no hay info	SI	NO	**
Phosphoglycolate phosphatase 1A (PGLP1A)	P0DKC3	At5g36700	39,7	<b>Cit, Chl, Mit, N, MP, V</b>	metabolismo, fotorrespiración, desfosforilación	↓	↓	NO	NO	**
Ribulose biphosphate carboxylase small chain 1A (RBCS-1A)	P10795	At1g67090	20,2	<b>Ap, EV, G, Mit, N, PX, MP, Chl</b>	fijación de carbono, biogénesis del complejo cloroplasto ribulosa bifosfato carboxilasa, oxidación-reducción, fotorrespiración, fotosíntesis, ciclo de las pentosas-fosfato, respuesta a la luz azul, respuesta al frío, respuesta a la luz roja lejana, respuesta a la luz roja	↓	↓	NO	NO	****
Ribulose biphosphate carboxylase small chain 1B (RBCS-1B)	P10796	At5g38430	20,3	<b>Ap, MP, M, Chl, RE, G, Mit, N,</b>	fijación de carbono, oxidación-reducción, fotorrespiración, ciclo de las pentosas-fosfato, respuesta a la luz azul, respuesta a la luz roja lejana, respuesta a la luz roja	↓	↓	NO	NO	****
Ribulose biphosphate carboxylase small chain 2B (RBCS-2B)	P10797	At5g38420	20,3	<b>Ap, MP, M, Chl, G, Mit, N</b>	fijación de carbono, oxidación-reducción, fotorrespiración, ciclo de las pentosas-fosfato, respuesta a la luz azul, respuesta a la luz roja lejana, respuesta a la luz roja	↓	↓	NO	NO	***
Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase (RCA)	P10896	At2g39730	51,9	<b>Ap, G, Chl, Mit, T, N, MP, M, Cit</b>	defensa frente a bacterias, senescencia de las hojas, respuesta al frío, respuesta al ácido jasmónico, respuesta a la luz	↓	↓	NO	NO	****
Chaperonin 60 subunit alpha 1 (CPN60A1)	P21238	At2g28000	62,0	<b>Ap, G, Mit, T, N, MP, M, Chl, V, Cit</b>	plegamiento de proteínas "de novo", plegamiento de proteínas mediado por chaperonas, organización de cloroplastos, desarrollo de embriones, organización de mitocondrias, replegamiento de proteínas	↓	↓	NO	NO	***
Chaperonin 60 subunit beta 1 (CPN-60 β1)	P21240	At1g55490	63,8	<b>Ap, T, G, M, N, MP, Chl, Mit</b>	muerte celular, plegamiento de proteínas mediado por chaperonas, organización de mitocondrias, replegamiento de proteínas, respuesta al frío,	↓	↓	NO	NO	**

					resistencia sistémica adquirida					
Oxygen-evolving enhancer protein 1-1 (OEE1)	P23321	At5g66570	35,1	<b>Ap, Mit, G, T, MP, M, Chl</b>	defensa frente a bacterias, fotoinhibición, fotosíntesis, reacción a la luz, ensamblaje del fotosistema II, regulación de la defosforilación de proteínas	↓	↓	NO	NO	***
Phosphoribulokinase (PRK)	P25697	At1g32060	44,4	<b>Ap, Mit, Cit, N, MP, M, Chl</b>	metabolismo de carbohidratos, defensa frente a bacterias, fosforilación, metabolismo de bases nitrogenadas pirimidinas, ciclo de las pentosas-fosfato, respuesta al frío, respuesta a citoquininas	↓	↓	NO	NO	**
Fructose-1,6-bisphosphatase 1 (FBPase1)	P25851	At3g54050	45,1	<b>Ap, Mit, MP, Chl, Cit, N</b>	metabolismo de la fructosa, gluconeogénesis, fotosíntesis, transporte fotosintético de electrones en el fotosistema I, ciclo reductor de las pentosas-fosfato, respuesta al frío, respuesta a las citoquininas, biosíntesis de sacarosa	↓	↓	NO	NO	***
Glycine cleavage system H protein 1 (GDH1, GDCH)	P25855	At2g35370	17,9	<b>Mit, N, Chl</b>	descarboxilación de la glicina, fotorrespiración	↓	↓	NO	NO	**
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPB)	P25857	At1g42970	47,6	<b>Ap, G, Mit, T, N, MP, M, Chl, Cit</b>	metabolismo de la glucosa, glucólisis, oxidación-reducción, ciclo de las pentosas-fosfato, respuesta al ion cadmio, respuesta al frío, respuesta a la luz, respuesta a la sacarosa	↓	↓	NO	NO	**
Beta carbonic anhydrase 1 (BCA1)	P27140	At3g01500	37,4	<b>G, Mit, N, MP, M, Chl, Ap, Cit, RE</b>	utilización de carbono, defensa frente a bacterias, defensa frente a hongos, regulación negativa del desarrollo de complejos estomáticos, fotosíntesis, regulación del movimiento estomático, respuesta al dióxido de carbono, respuesta al frío	↓	↓	NO	NO	***
Stress-induced protein KIN2	P31169	At5g15970	6,5	<b>PX, MP, Chl, Cit, N, Mit, Ap</b>	respuesta a ABA, respuesta al frío, respuesta a estrés osmótico, respuesta al déficit de agua	↓	—	NO	NO	****
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (CYP18-3)	P34790	At4g38740	18,4	<b>Ap, Cit, Mit, PX, MP, Chl, N, G, RE</b>	vía de señalización de luz azul, vía de señalización mediada por brasinoesteroides, des-etiolación, respuesta hipersensible, plegamiento de proteínas, isomerización de proteínas, regulación de la	↓	↓	NO	NO	**

					fosforilación de proteínas, respuesta al ion cadmio, respuesta a citoquininas, respuesta a la luz, transducción de señales					
Myrosinase 1 (TGG1)	P37702	At5g26000	61,1	<b>Ap, RE, V, T, PX, Chl, MP, N, Mit, Cit, G</b>	vía de señalización activada por ABA, metabolismo de hidratos de carbono, defensa frente a insectos, catabolismo de glucosinolato, regulación del movimiento estomático, respuesta a estrés salino	↓	↓	SI	SI	****
Probable cinnamyl alcohol dehydrogenase 9 (CAD9)	P42734	At4g39330	38,9	<b>Ap, MP, Cit, T, Mit, N, Chl</b>	biosíntesis de lignina, oxidación-reducción, respuesta a citoquininas	↓	↓	NO	NO	**
Beta carbonic anhydrase 2 (BCA2)	P42737	At5g14740	36,6	<b>Ap, EV, N, G, MP, Chl, T, Cit, Mit, RE</b>	utilización de carbono, defensa frente a bacterias	↓	↓	NO	NO	**
Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase 1 (GSA 1)	P42799	At5g63570	50,3	<b>Ap, Mit, Chl, PX, Cit</b>	biosíntesis de clorofila, biosíntesis de compuestos que contienen porfirina, biosíntesis de protoporfirinógeno IX, respuesta a la luz, biosíntesis de tetrapirrol	↓	↓	NO	NO	**
Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase)	P46283	At3g55800	42,4	<b>Ap, G, N, MP, Chl, Mit</b>	biosíntesis de carbohidratos, defensa frente a bacterias, metabolismo de fructosa, gluconeogénesis, ciclo de las pentosas-fosfato, biosíntesis de almidón, biosíntesis de sacarosa	↓	↓	NO	NO	***
Cysteine synthase 1 (OASA1, OLD3)	P47998	At4g14880	33,8	<b>Ap, EV, G, Cit, Mit, N, PX, MP, M, Chl, V, T, RE</b>	envejecimiento, biosíntesis de cisteína, doble fecundación, crecimiento del tubo polínico, respuesta a iones de cadmio	↓	↓	NO	NO	**
Cysteine synthase, chloroplastic/chromoplastic (OASB)	P47999	At2g43750	41,6	<b>Ap, G, Mit, MP, Chl, Cit</b>	biosíntesis de cisteína, doble fecundación, crecimiento del tubo polínico, respuesta al ion cadmio, respuesta a citoquininas	↓	↓	NO	NO	**
Triosephosphate isomerase (TIM)	P48491	At3g55440	27,2	<b>Ap, EV, Cit, G, Mit, MP,</b>	metabolismo de carbohidratos, gluconeogénesis, biosíntesis de gliceraldehído-3-fosfato, catabolismo de	↓	↓	NO	NO	****

				<b>Chl, V, T, PX, N</b>	glicerol, glucólisis, ruta de las péntosas fosfato, respuesta al ion cadmio, respuesta a citoquininas, respuesta a estrés salino, respuesta a iones zinc					
Glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit (ADG1)	P55228	At5g48300	56,6	<b>Ap, G, Mit, Chl, Cit</b>	biosíntesis de glucógeno, fotoperiodismo y floración, biosíntesis de almidón	↓	↓	NO	NO	**
Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 22 (XTH-22)	Q38857	At5g57560	32,1	<b>Ap, G, Chl, Mit, Cit, RE, N</b>	biogénesis de la pared celular, organización de la pared celular, respuesta a auxinas, respuesta a brasinoesteroides, respuesta al frío, respuesta al calor, respuesta a estímulos mecánicos, metabolismo de xiloglucano, transducción de señales	↓	↓	SI	SI	**
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (CYP19-1, ROC3)	Q38900	At2g16600	18,5	<b>Ap, EV, Cit, G, Mit, MP, Chl, PX, N</b>	plegamiento de proteínas, isomerización de proteínas, transducción de señales	↓	↓	NO	NO	***
Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 4 (XTH-4)	Q39099	At2g06850	34,3	<b>Ap, Cit, G, Mit, MP, M, Chl, T, V, RE</b>	biogénesis de la pared celular, organización de la pared celular, respuesta a auxinas, respuesta al estímulo de baja intensidad de la luz, respuesta a estímulos mecánicos, crecimiento celular unidimensional, metabolismo de xiloglucano	↓	↓	SI	SI	**
Ferredoxin--nitrite reductase (NIR1)	Q39161	At2g15620	65,5	<b>Ap, G, Mit, MP, M, Chl, Cit</b>	asimilación de nitrato, oxidación-reducción, respuesta al nitrato	↓	↓	NO	NO	**
Oxygen-evolving enhancer protein 2-1 (OEE2)	Q42029	At1g06680	28,1	<b>Ap, G, Mit, Chl, M, Cit, N</b>	defensa frente a bacterias, fotosíntesis (reacción lumínica)	↓	↓	NO	NO	****
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (CYP18-4)	Q42406	At4g34870	18,4	<b>Ap, Cit, G, Mit, PX, MP, Chl, V, T, N</b>	plegamiento de proteínas, isomerización de proteínas, transducción de señales	↓	↓	NO	NO	**
Profilin-2 (PRO2)	Q42418	At4g29350	14,0	<b>Ap, MP, Chl, Cit, RE, N, Mit,</b>	polimerización o despolimerización de la actina, organización del citoesqueleto, desarrollo de la inflorescencia, desarrollo de raíces laterales, desarrollo	↓	↑	NO	NO	**

				G	foliar, secuestro de monómeros de actina					
Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase 2 (GSA 2)	Q42522	At3g48730	50,1	G, Chl, T, Cit, PX, Mit	biosíntesis de clorofila, biosíntesis de compuestos que contienen porfirina, proceso biosintético de protoporfirinógeno IX	↓	↓	NO	NO	**
Non-specific lipid-transfer protein 1 (LTP 1)	Q42589	At2g38540	11,7	Ap, G, PX, MP, Chl, T, Cit, Mit, RE, V	organización de la pared celular, transporte de lípidos	↓	↓	SI	NO	***
Glutamine synthetase (GS2)	Q43127	At5g35630	47,4	Ap, G, Mit, MP, Chl, T, Cit	envejecimiento, ciclo de asimilación de amoníaco, biosíntesis de glutamina, respuesta al ion cadmio, respuesta a citoquininas, respuesta a estrés salino	↓	↓	NO	NO	***
Porphobilinogen deaminase (PBG)	Q43316	At5g08280	41,0	Ap, G, Chl, T, Mit, Cit	biosíntesis de clorofila, modificación del ARN del cloroplasto, defensa frente a bacterias, biosíntesis de hemo, enlace del cofactor peptidil-pirrometano, biosíntesis de compuestos que contienen porfirina, biosíntesis de protoporfirinógeno IX	↓	↓	NO	NO	**
Serine-glyoxylate aminotransferase (AGT)	Q56YA5	At2g13360	44,2	Ap, Mit, PX, MP, M, Chl, Cit, N	biosíntesis de glicina, fotorrespiración	↓	↓	NO	NO	**
Glycerophosphodiester phosphodiesterase (GDPDL1)	Q7Y208	At1g66970	83,7	Ap, EV, MP, M, Chl, G, RE	homeostasis celular de iones fosfato, metabolismo de glicerol, metabolismo de lípidos	↓	↓	SI	SI	**
Cysteine proteinase inhibitor 4 (CYS4)	Q84WT8	At4g16500	12,5	Ap, Cit, V, T, Chl, G, RE, MP, Mit	respuesta de defensa, regulación negativa de la actividad endopeptidasa cisteínica	↓	↓	SI	SI	**
Eukaryotic aspartyl protease family protein	Q84WU7	At3g51330	57,8	Ap, EV, MP, M, RE, Mit, G, V, Cit	proteólisis	↓	↑	SI	NO	**
Alpha-L-fucosidase 1 (AtFUC1)	Q8GW72	At2g28100	57,2	Ap, V, MP, Mit, Chl, RE, G, Cit	metabolismo de carbohidratos, catabolismo de glicoproteínas	↓	↓	SI	SI	****

Serine carboxypeptidase-like 20 (SCPL20)	Q8L7B2	At4g12910	55,8	<b>Ap, PX, V, Cit, RE, G, MP</b>	proteólisis, metabolismo secundario	↓	↑	SI	SI	***
Probable prolyl 4-hydroxylase (AtP4H4)	Q8LAN3	At5g18900	33,0	<b>RE, G, Cit, N, Ap, MP, M, Mit, Chl</b>	oxidación-reducción, hidroxilación peptidil-prolina a 4-hidroxi-L-prolina	↓	↑	NO	SI	**
S-formylglutathione hydrolase (AtSFGH)	Q8LAS8	At2g41530	31,6	<b>Ap, Mit, MP, Cit, N, Chl</b>	catabolismo de formaldehído, respuesta al ion cadmio	↓	↓	NO	NO	**
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (CYP23)	Q8LDR3	At1g26940	25,5	<b>G, Ap, Mit, Cit, V, RE</b>	plegamiento de proteínas, isomerización peptidil-prolil de proteínas	↓	—	SI	NO	**
Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 6 (XTH-6)	Q8LF99	At5g65730	33,7	<b>Ap, Cit, RE, G, Chl</b>	biogénesis de la pared celular, organización de la pared celular, respuesta al déficit de agua, metabolismo de xiloglucano	↓	↓	SI	SI	**
Probable alpha-mannosidase	Q8LPJ3	At5g13980	115,8	<b>Ap, V, T, Mit, MP, RE, G, Cit</b>	metabolismo de manosa, desglicosilación de proteínas	↓	↓	SI	SI	**
Eukaryotic aspartyl protease family protein	Q8RX60	At1g79720	52,4	<b>Ap, MP, V, N, RE, G</b>	proteólisis	↓	↓	SI	NO	****
Probable pectinesterase/pectinesterase inhibitor 41 (PE 41)	Q8RXK7	At4g02330	63,9	<b>Ap, Chl, RE, G, Mit</b>	modificación de la pared celular, catabolismo de pectina, respuesta a brasinosteroides, respuesta al frío, respuesta a hongos, regulación negativa de la actividad catalítica	↓	↓	SI	SI	**
Ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme 2 (FNR-2)	Q8W493	At1g20020	41,1	<b>Ap, Mit, G, N, Chl, Cit</b>	defensa frente a bacterias, defensa frente a hongos, oxidación-reducción, fotosíntesis, respuesta a citoquininas	↓	↓	NO	NO	**
GDSL esterase/lipase	Q93YW8	At4g18970	39,6	<b>Ap, Cit, PX, N, MP, G, V, RE</b>	catabolismo de lípidos	↓	↓	SI	NO	**
Beta-galactosidase 17 (BGAL17)	Q93Z24	At1g72990	78,6	<b>Ap, V, Cit, Mit, Chl, G, RE</b>	metabolismo de carbohidratos	↓	↑	SI	SI	**

LL-diaminopimelate aminotransferase (DAP-AT)	Q93ZN9	At4g33680	50,4	<b>Ap, Mit, MP, Chl</b>	biosíntesis de lisina a través de ácido diaminopimélico, respuesta a citoquininas, resistencia sistémica adquirida, vía de señalización mediada por ácido salicílico	↓	↓	NO	NO	***
Fructose-bisphosphate aldolase 2 (AtFBA2)	Q944G9	At4g38970	43,0	<b>Ap, G, Mit, N, MP, M, Chl, T</b>	gluconeogénesis, glucólisis, ruta de las pentosas-fosfato, respuesta a ABA, respuesta al ion cadmio	↓	↓	NO	NO	****
Peroxiredoxin-2E (PRXIIIE)	Q949U7	At3g52960	24,7	<b>Ap, G, Mit, Chl, N, PX</b>	homeostasis redox celular, defensa frente a bacterias, oxidación-reducción	↓	↓	NO	NO	**
Bifunctional purple acid phosphatase 26 (AtPAP26)	Q949Y3	At5g34850	55,0	<b>Ap, Cit, G, V, RE</b>	desfosforilación, catabolismo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , oxidación-reducción, homeostasis de iones fosfato	↓	↑	SI	SI	**
unknown protein	Q94A98	At1g65900	45,2	<b>Ap, G, MP, Chl, V, RE</b>	desconocido	↓	↓	SI	NO	**
Glycine dehydrogenase (decarboxylating) 1 (AtGLDP1)	Q94B78	At4g33010	112,9	<b>Ap, Mit, Chl, Cit, V</b>	descarboxilación de glicina, oxidación-reducción, respuesta al ión cadmio	↓	↓	NO	NO	**
Reactive Intermediate Deaminase A (RIDA)	Q94JQ4	At3g20390	19,8	<b>Ap, Mit, Chl, V, Cit</b>	biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada, biosíntesis de isoleucina, respuesta al ion cadmio, respuesta a sustancias tóxicas	↓	↓	NO	NO	**
Cyclase family protein	Q94JT5	At4g35220	30,0	<b>AP, G, T, RE, Cit, MP, N, Mit, Chl</b>	catabolismo de triptófano a quinurenina	↓	—	SI	NO	**
Myrosinase 2 (TGG2)	Q9C5C2	AT5G25980	62,7	<b>Ap, N, G, PX, MP, Chl, V, Cit, RE</b>	vía de señalización activada por ABA, metabolismo de hidratos de carbono, defensa frente a insectos, catabolismo de glucosinolatos, regulación del movimiento estomático, respuesta a ABA, respuesta a estrés salino	↓	↓	SI	SI	***
2-Cys peroxiredoxin BAS1-like (2-Cys Prx B)	Q9C5R8	At5g06290	29,8	<b>Chl, Ap, Cit, Mit</b>	homeostasis redox celular, defensa frente a bacterias, oxidación-reducción, respuesta al frío	↓	↓	NO	NO	**
Uncharacterized protein T8G24.2	Q9C6U3	At3g08030	34,7	<b>Ap, G, Mit, MP, T, Chl, Cit, RE</b>	desconocido	↓	↓	—	—	**

GDSL esterase/lipase At1g29670	Q9C7N4	At1g29670	39,8	<b>Ap, G, Mit, MP, Chl, T, RE</b>	catabolismo de lípidos	↓	↓	SI	NO	****
GDSL esterase/lipase At1g29660	Q9C7N5	At1g29660	40,1	<b>Ap, Mit, N, RE, Cit, G</b>	catabolismo de lípidos, resistencia sistémica adquirida	↓	↓	SI	NO	****
Probable thionin-2.4	Q9C8D6	At1g66100	14,1	<b>Ap, Chl, V, G, N, RE</b>	defensa, patogénesis	↓	↓	SI	NO	**
Glycerate dehydrogenase HPR (AtHPR1)	Q9C9W5	At1g68010	42,2	<b>Ap, Cit, Mit, N, PX, MP, Chl</b>	respuesta a la luz, respuesta al déficit de agua, oxidación-reducción, fotorrespiración	↓	↓	NO	NO	**
MD-2-related lipid-recognition protein 3 (ML3)	Q9FF98	AT5G23820	17,9	<b>Ap, T, V, N, MP, G, RE, Mit</b>	defensa	↓	↓	SI	NO	**
Subtilisin-like protease SBT2.3 (AtSBT2.3)	Q9F112	At5g44530	90,6	<b>Ap, G, Mit, MP, V, Chl, RE</b>	proteólisis	↓	↓	SI	SI	**
Pectin lyase-like superfamily protein	Q9FJ27	At5g41870	48,6	<b>Ap, G, Cit, MP, Chl, RE</b>	metabolismo de carbohidratos, organización de la pared celular	↓	↑	SI	NO	**
Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	Q9FJ65	At5g55450	11,0	<b>Ap, RE, Chl, G, MP</b>	transporte de lípidos, respuesta a otros organismos	↓	↓	SI	NO	****
Carbohydrate-binding X8 domain superfamily protein	Q9FKH4	At5g35740	13,4	<b>MP, Ap, G, Chl, RE</b>	desconocido	↓	↓	SI	NO	**
Ferredoxin--NADP reductase (LFNR1)	Q9FKW6	At5g66190	40,3	<b>Ap, G, Mit, N, MP, Chl, T, Cit</b>	defensa frente a bacterias, oxidación-reducción, cadena de transporte de electrones fotosintéticos	↓	↓	NO	NO	**
Fasciclin-like arabinogalactan protein 1 (FLA1)	Q9FM65	At5g55730	44,8	<b>Ap, EV, G, MP, M, Mit, N, RE</b>	desarrollo de raíces, desarrollo de la parte aérea	↓	↓	SI	SI	****
Alpha-galactosidase 1 (AtAGAL1)	Q9FT97	At5g08380	45,7	<b>Ap, RE, Mit, N, G, Cit</b>	metabolismo de carbohidratos, organización de la pared celular	↓	↑	SI	SI	**

Leucine-rich repeat (LRR) family protein	Q9FXA1	At1g49750	54,4	<b>Ap, G, Mit, N, MP, Chl, RE, V</b>	desconocido	↓	↓	SI	NO	**
Beta-glucosidase 40 (AtBGLU40)	Q9FZE0	At1g26560	58,1	<b>Ap, Chl, N, V, G, RE, Mit</b>	metabolismo de carbohidratos, metabolismo de glucósidos	↓	↓	SI	SI	**
Phosphoglycerate kinase 1 (PGK1)	Q9LD57	At3g12780	50,1	<b>Cit, G, Mit, N, MP, M, T, Chl</b>	fosforilación de proteínas, glucólisis, ruta de las pentosas-fosfato, respuesta al ion cadmio, respuesta al frío	↓	↓	NO	NO	****
Non-specific lipid-transfer protein 6 (LTP 6)	Q9LDB4	At3g08770	11,9	<b>Ap, M, RE, G, V</b>	transporte de lípidos, respuesta al déficit de agua	↓	↓	SI	NO	**
Fructose-bisphosphate aldolase 8 (AtFBA8)	Q9LF98	At3g52930	38,5	<b>Ap, Cit, G, Mit, N, MP, Chl, T, RE</b>	gluconeogénesis, glucólisis, ruta de las pentosas-fosfato, respuesta al ion cadmio, respuesta a estrés salino	↓	↓	NO	NO	***
Probable inactive purple acid phosphatase 2 (PAP2)	Q9LMG7	At1g13900	73,7	<b>Ap, G, Chl, T, Mit, Cit, V, MP, N, RE</b>	importación de proteínas en la membrana externa mitocondrial, direccionamiento de proteínas a la mitocondria, regulación del metabolismo de carbohidratos	↓	↑	SI	SI	**
Probable inactive purple acid phosphatase 1 (PAP1)	Q9LMX4	At1g13750	68,2	<b>Ap, N, V, RE, G, MP</b>	desfosforilación	↓	↑	SI	SI	**
CO(2)-response secreted protease (AtSBT5.2)	Q9LNU1	At1g20160	81,4	<b>Ap, RE, G, V, MP</b>	regulación negativa de la respuesta de defensa frente a bacterias, regulación negativa del desarrollo de complejos estomáticos, proteólisis, respuesta al dióxido de carbono	↓	↓	SI	NO	****
Glycine cleavage system H protein 3 (GDH3)	Q9LQL0	At1g32470	17,9	<b>Mit, Chl</b>	catabolismo de glicina, descarboxilación de glicina	↓	↓	NO	NO	**
Glutamate--glyoxylate aminotransferase 1 (AtGGT2)	Q9LR30	At1g23310	53,3	<b>Ap, EV, Mit, N, PX, MP, M Chl, V, G, Cit, RE,</b>	catabolismo de L-alanina, biosíntesis de glicina, fotorrespiración, respuesta a la hipoxia	↓	↓	NO	NO	***
(S)-2-hydroxy-acid oxidase GLO2	Q9LRS0	At3g14415	40,3	<b>Ap, G, Mit,</b>	defensa frente a bacterias, biosíntesis de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ,	↓	↓	NO	NO	**

(GOX 2)				<b>N, PX, MP, Chl, V, T, Cit</b>	oxidación-reducción, fotorrespiración					
Leucine-rich repeat (LRR) family protein	Q9LUN3	At3g17640	42,9	Ap, G, Mit, Chl, RE, V, N	transducción de señales	↓	↓	SI	NO	**
S-adenosylmethionine synthase 4 (METK4)	Q9LUT2	At3g17390	42,8	<b>Ap, G, Mit, N, MP, M, Chl, V, Cit, RE</b>	biosíntesis de S-adenosilmetionina, biosíntesis de lignina, metabolismo de metionina, metabolismo de un carbono, respuesta al frío	↓	↓	NO	NO	**
Encodes a protein with similarity to a lipid transfer protein that may contribute to systemic acquired resistance (SAR)	Q9LV65	At5g48490	10,7	<b>Ap, MP, G, RE</b>	transporte de lípidos	↓	↓	SI	NO	**
Probable beta-D-xylosidase 6 (AtBXL6)	Q9LXA8	At5g10560	87,1	<b>Ap, V, T, Cit, Mit, RE, G, N, Chl, MP</b>	metabolismo de carbohidratos	↓	↓	SI	SI	****
Soluble inorganic pyrophosphatase 6 (PPA6)	Q9LXC9	At5g09650	33,4	<b>Ap, Mit, MP, M, Chl, Cit</b>	defensa frente a bacterias, metabolismo de compuestos que contienen fosfato, respuesta al ion cadmio, respuesta a estrés salino	↓	↓	NO	NO	**
Probable pectinesterase/pectinesterase inhibitor 51 (PME51)	Q9LXD9	At5g09760	60,4	<b>Ap, Chl, Cit, Mit, M, RE, G, V</b>	modificación de la pared celular, catabolismo de pectina	↓	↓	SI	SI	****
Proline-tRNA ligase (DUF1680)	Q9LXU4	At5g12950	96,2	<b>Ap, V, RE, Mit, MP, Chl, G</b>	desconocido	↓	—	SI	NO	**
Alpha-glucosidase 1	Q9LYF8	At5g11720	101,1	<b>Ap, MP, V, RE, G, Chl, Mit</b>	metabolismo de carbohidratos	↓	↓	SI	NO	**
Calvin cycle protein (CP12-2)	Q9LZP9	At3g62410	14,2	<b>Chl, N, Cit,</b>	respuesta a la anoxia, respuesta al frío, ensamblaje de	↓	↓	NO	NO	**

				Mit	complejos de proteínas, respuesta al calor, regulación negativa de la ruta de las pentosas-fosfato, cross-linking de péptidos a través de L-cistina, respuesta a la luz, respuesta a la sacarosa					
Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	Q9M329	At3g53980	11,7	Ap, MP, RE, G	transporte de lípidos	↓	—	SI	NO	**
GDSL esterase/lipase At3g05180	Q9MAA1	At3g05180	42,3	Ap, MP, G, RE, Chl	catabolismo de lípidos, resistencia sistémica adquirida	↓	↓	SI	SI	**
Probable ribose-5-phosphate isomerase 3 (RPI3)	Q9S726	At3g04790	29,3	Ap, G, Mit, MP, Chl, RE, Cit	defensa frente a bacterias, ruta de las pentosas-fosfato, respuesta a las citoquininas	↓	↓	NO	NO	***
Phosphoglycerate kinase 3 (PGK3)	Q9SAJ4	At1g79550	42,1	Ap, Cit, G, N, MP, Chl, V, T, Mit	glucólisis, fosforilación, respuesta a la glucosa, respuesta al calor, respuesta la luz, respuesta a moléculas de origen bacteriano	↓	↓	NO	NO	**
Beta-galactosidase 3 (BGAL3)	Q9SCV9	At4g36360	95,1	Ap, V, G, N, RE, Cit, Mit, MP	metabolismo de carbohidratos	↓	↓	SI	SI	**
Beta-galactosidase 1 (BGAL1)	Q9SCW1	At3g13750	93,6	Ap, N, V, G, Mit, RE, MP, Chl	metabolismo de carbohidratos	↓	↓	SI	SI	**
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (FKBP13)	Q9SCY2	At5g45680	22,0	Chl, Ap, N, Cit	plegamiento de proteínas mediado por chaperonas, isomerización peptidil-prolil de proteínas	↓	↓	NO	NO	**
Thioredoxin M4	Q9SEU6	At3g15360	21,2	Ap, Chl, Mit, N	homeostasis redox celular, respuesta a estrés oxidativo, metabolismo del éter de glicerol, regulación de la actividad catalítica, oxidación-reducción, regulación del metabolismo de hidratos de carbono, respuesta a citoquininas.	↓	↓	NO	NO	**
Adenosine kinase 1 (ADK1)	Q9SF85	At3g09820	37,8	Ap, EV, Cit, G, MP, M, Chl, N, Mit,	Recuperación de AMP, rescate de adenosina, respuesta al ion cadmio, respuesta a trehalosa-6-fosfato, proceso viral	↓	↓	NO	NO	**

				RE						
Protein of unknown function	Q9SFB1	At3g08030	39,0	<b>Ap, G, Mit, MP, T, Chl, RE, Cit</b>	desconocido	↓	↓	SI	NO	***
Alpha-L-arabinofuranosidase 1 (ASD1)	Q9SG80	At3g10740	75,0	<b>Ap, V, T, G, MP, Cit, RE</b>	metabolismo de L-arabinosa, catabolismo de xilano	↓	↑	SI	SI	***
AT1G76160 protein (SKU5 similar 5)	Q9SGR6	At1g76160	60,0	<b>Ap, G, Mit, MP, V, RE</b>	oxidación-reducción	↓	↓	SI	NO	****
Receptor-like kinase (TMK3)	Q9SIT1	At2g01820	101,9	<b>Ap, MP, M, N, RE, Chl, Cit, G</b>	fosforilación de proteínas, desarrollo de polen, señalización	↓	↓	SI	SI	***
Fructose-bisphosphate aldolase 6 (FBA6)	Q9SJQ9	At2g36460	38,4	<b>Ap, Cit, Mit, MP, M, Chl, T, N</b>	gluconeogénesis, glucólisis, vía de señalización mitocondria-núcleo, ruta de las pentosas-fosfato, respuesta al ion cadmio, respuesta a citoquininas, respuesta a estrés salino	↓	↑	NO	NO	**
Fructose-bisphosphate aldolase 1 (FBA1)	Q9SJU4	At2g21330	42,9	<b>Ap, G, Chl, T, Mit, N</b>	gluconeogénesis, glucólisis, ruta de las pentosas-fosfato, respuesta al ion cadmio	↓	↓	NO	NO	***
Probable steroid-binding protein 3 (MP3)	Q9SK39	At2g24940	11,0	<b>Ap, Cit, MP, Chl, M, N, Mit</b>	desconocido	↓	↓	NO	NO	**
Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	Q9SKI0	At2g10940	29,6	<b>Ap, G, Mit, N, MP, M, Chl, T, PX, RE, V</b>	transporte de lípidos	↓	↓	SI	NO	***
Triosephosphate isomerase (TIM)	Q9SKP6	At2g21170	33,3	<b>Ap, Cit, Mit, MP, Chl</b>	organización de los cloroplastos, gluconeogénesis, biosíntesis de gliceraldehído-3-fosfato, catabolismo de glicerol, glucólisis, desarrollo de raíces primarias, ruta de las pentosas-fosfato, movilización de triglicéridos	↓	↓	NO	NO	**
Cytosolic isocitrate dehydrogenase [NADP] (CICDH)	Q9SRZ6	At1g65930	45,7	<b>Ap, EV, Cit, G, MP, Chl, T, V Mit, RE,</b>	metabolismo de NADP, defensa frente a bacterias, metabolismo de isocitrato, respuesta al ion cadmio, respuesta a estrés salino, respuesta al ion zinc, ciclo	↓	↓	NO	NO	**

				N	de Krebs, oxidación-reducción					
Monocopper oxidase-like protein (SKU5)	Q9SU40	At4g12420	65,6	<b>Ap, EV, G, MP, V, RE, Cit</b>	oxidación-reducción, crecimiento celular polar	↓	↓	SI	SI	**
Trehalase (TRE1)	Q9SU50	At4g24040	71,3	<b>MP, M, Ap, Mit, Chl, G, RE</b>	catabolismo de trehalosa	↓	↑	NO	NO	**
Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein	Q9SUR0	At4g23670	17,5	<b>Ap, EV, MP, Chl, V, Cit, Mit, N</b>	defensa frente a bacterias, respuesta al ion cadmio, respuesta a estrés salino	↓	↓	—	—	**
Berberine bridge enzyme-like 21 (AtBBE-like 21)	Q9SVG3	At4g20840	60,1	<b>Ap, MP, Chl, RE, Mit, Cit, G, PX</b>	oxidación-reducción	↓	↓	SI	SI	**
GDSL esterase/lipase.	Q9SVU5	At4g28780	39,9	<b>Ap, G, Cit, Chl, V, Mit, RE, N, MP</b>	catabolismo de lípidos	↓	↓	SI	SI	**
Annexin D1 (AnnAt1)	Q9SYT0	At1g35720	36,2	<b>Ap, EV, Cit, Mit, N, PX, MP, Chl, V, T, M, G, RE</b>	transporte transmembrana de iones calcio, exportación de iones potasio, respuesta a ABA, respuesta al ion cadmio, respuesta al frío, respuesta al calor, respuesta a estrés osmótico, respuesta a estrés oxidativo, respuesta a estrés salino, respuesta al déficit de agua	↓	↓	NO	NO	**
Peroxidase 51 (PRX51)	Q9SZE7	At4g37530	36,0	<b>Ap, RE, V, N, G, Cit</b>	catabolismo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , oxidación-reducción, respuesta a estrés oxidativo, respuesta a estrés salino	↓	↑	SI	SI	***
Thioredoxin F1 (AtTrxf1)	Q9XFH8	At3g02730	19,3	<b>Mit, Chl, Cit</b>	homeostasis redox celular, respuesta a estrés oxidativo, metabolismo de éter de glicerol, regulación negativa de la actividad catalítica, oxidación-reducción, regulación positiva de la actividad catalítica, regulación del metabolismo de carbohidratos, respuesta a la intensidad de luz	↓	↓	NO	NO	**
Involved in response to salt stress	Q9XI93	At1g13930	16,2	<b>EV, MP,</b>	respuesta al ion cadmio, respuesta a citoquininas,	↓	↓	—	—	***

				<b>Chl, Mit, N, Cit</b>	respuesta a estrés salino					
Ferredoxin-dependent glutamate synthase 1 (Fd-GOGAT 1)	Q9ZNZ7	At5g04140	176,6	<b>Ap, Mit, G, Chl, M, Cit</b>	biosíntesis de L-glutamato, ciclo de asimilación del amonio, biosíntesis de glutamato, oxidación-reducción, fotorrespiración, regulación positiva de la actividad de la glicina hidroximetiltransferasa, respuesta a la luz, respuesta a sacarosa	↓	↓	NO	NO	***
Malate dehydrogenase 1 (MDH1)	Q9ZP06	At1g53240	35,8	<b>Ap, G, Mit, MP, T, Chl</b>	metabolismo de carbohidratos, defensa frente a bacterias, metabolismo de malato, respuesta al ion cadmio, respuesta al frío, respuesta al estrés salino, ciclo de Krebs	↓	↓	NO	NO	**
Putative uncharacterized protein At1g09310	Q9ZPZ4	At1g09310	19,9	<b>Ap, EV, MP, Chl, N, Mit, Cit</b>	desconocido	↓	↓	–	–	**
Cysteine proteinase	Q9ZQH7	At2g27420	38,7	<b>Ap, RE, MP, G, Cit, Chl, V</b>	proteólisis	↓	↓	SI	NO	**
NADPH-dependent alkenal/one oxidoreductase (AOR)	Q9ZUC1	At1g23740	41,0	<b>Ap, Chl, Mit, Cit</b>	oxidación-reducción, respuesta al frío	↓	↓	NO	NO	***
Non-specific lipid-transfer protein (LTP6)	F4IXC6	At3g08770	12,3	<b>Ap, M, G, RE, V</b>	transporte de lípidos, respuesta al déficit de agua	↓	↓	SI	NO	**
Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37e (AtHsp70-1)	P22953	At5g02500	71,3	<b>Ap, EV, Cit, G, Mit, N, PX, MP, M, Chl, V, T, RE</b>	defensa frente a bacterias, defensa frente a hongos, regulación negativa de la germinación de la semilla, regulación de la transcripción, respuesta al ion cadmio, respuesta al frío, respuesta al calor, respuesta a virus, cierre estomacal	↓	↓	NO	NO	**
Superoxide dismutase [Cu-Zn] 1 (CSD1)	P24704	At1g08830	15,1	<b>Ap, Mit, Cit, MP, N, RE, Chl, G</b>	respuesta a UV-B, respuesta a la intensidad de luz, respuesta a estrés oxidativo, respuesta al ozono, respuesta a estrés salino, respuesta a sacarosa, defensa frente a bacterias, silenciamiento génico por miARN, oxidación-reducción, eliminación de radicales	↓	↓	NO	NO	**

					superóxido, respuesta al ion de cobre, respuesta al ion hierro					
Nucleoside diphosphate kinase 1 (NDK1)	P39207	At4g09320	16,5	<b>Ap, EV, Cit, G, Mit, PX, MP, Chl, V, N, RE</b>	biosíntesis de CTP, GTP y UTP, respuesta al H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , fosforilación de nucleósidos difosfato, respuesta al ion cadmio, respuesta a estrés salino	↓	↓	NO	NO	**
Presequence protease 1, chloroplastic/mitochondrial (PREP1)	Q9LJL3	At3g19170	120,9	<b>Ap, Mit, Chl, G, Cit</b>	procesamiento de proteínas, proteólisis, respuesta a iones de cadmio	↓	↓	NO	NO	**
Heat shock 70 kDa protein 6 (HSP70-6)	Q9STW6	At4g24280	76,5	<b>Ap, G, Mit, N, MP, Chl, T</b>	plegamiento de proteínas, direccionamiento de proteínas a cloroplasto, respuesta al ion cadmio, respuesta al frío, proceso viral	↓	↓	NO	NO	**

**Tabla 6.2: Cambios en los niveles de proteínas en el FA de las hojas durante la senescencia.**

Se analizaron 4 réplicas biológicas de cada estadio. Se consideraron sólo las proteínas cuyos niveles cambiaron más de dos veces entre un estadio y el otro o las que estuvieron presentes en un solo estadio y aquellas que no mostraron contradicciones entre réplicas biológicas en cuanto a su acumulación diferencial entre estadios. Se asignó un nivel de confianza (NC) a cada proteína en base a la cantidad de réplicas biológicas en las que aparece en el estadio en el que se acumuló diferencialmente: \*\*, presente en dos réplicas biológicas; \*\*\*, presente en tres réplicas biológicas y \*\*\*\*, presente en las cuatro réplicas biológicas.

Filas sombreadas en naranja: proteínas cuyos niveles aumentan en el apoplasto de hojas S3, las proteínas sombreadas en naranja más oscuro sólo se detectaron en S3. Filas sombreadas en verde: proteínas cuyos niveles disminuyen en el apoplasto de hojas S3, las proteínas sombreadas con verde más oscuro se detectaron sólo en S2.

Los cambios en los patrones de expresión génica asociados con la senescencia (columna “expresión durante la senescencia”) se examinaron usando el software eFP Browser (Winter *et al.*, 2007). Las localizaciones subcelulares y las funciones de las proteínas se determinaron utilizando las bases de datos SUBA4 (Hooper *et al.*, 2016), UniProt KB (The UniProt Consortium, 2017) y Gene Ontology (Ashburner *et al.*, 2000; Consortium, 2016). En negrita se marcan las localizaciones predichas experimentalmente o asignadas manualmente y en letra normal las inferidas solo por anotación electrónica (IEA).

Abreviaturas: ID=identificación, LS=localización subcelular, PS= péptido señal, Glic= glicosilaciones, NC= nivel de confianza, M=membrana, MP=membrana plasmática, G=Golgi, N=Núcleo, Cit=citoplasma, Chl=cloroplastos, Mit=mitocondrias, Ap=apoplasto, RE=retículo endoplasmático, PX=peroxisomas, V=vacuola, T=tonoplasto, EV=vesículas extracelulares (Rutter y Innes, 2017).

**CAPÍTULO 7: EL APOPLASTO Y LA  
REMOVILIZACIÓN DE NITRÓGENO DURANTE  
LA SENESCENCIA.**



## RESUMEN

El N es removilizado desde las hojas senescentes principalmente en forma de aminoácidos, que son transportados vía floema hacia otros órganos. En *Arabidopsis*, como en la mayoría de las plantas cultivadas, la carga de aminoácidos al floema sigue un camino apoplástico, es decir que los aminoácidos deben volcarse al apoplasto para luego ser cargados al floema. El espacio extracelular podría ser un escenario regulatorio en la removilización de aminoácidos, e incluso en la degradación de proteínas durante la senescencia. Los mecanismos que median la exportación de aminoácidos desde el interior celular al apoplasto son poco conocidos. La autofagia es un mecanismo universal de degradación de componentes celulares, y en las plantas participaría, entre otros procesos, en la removilización de nitrógeno durante la senescencia. Las plantas donde la vía autofágica se encuentra bloqueada muestran senescencia foliar acelerada, una alteración en la degradación de proteínas y un aumento en los niveles de aminoácidos en las hojas fuente. Este genotipo resulta una herramienta útil para estudiar los mecanismos fisiológicos y celulares implicados en la degradación de proteínas y exportación de aminoácidos durante la senescencia. Además del uso de plantas de genotipos particulares, otro recurso ampliamente utilizado en el estudio de la degradación masiva de proteínas y removilización de nutrientes es la manipulación del ritmo de senescencia foliar “natural”; por ejemplo sometiendo a plantas y /o sus hojas a determinadas condiciones ambientales extremas, como la oscuridad.

En este capítulo se analizó el rol del apoplasto en la degradación de proteínas foliares y la removilización de nitrógeno durante la senescencia, natural y acelerada por oscuridad. Se examinaron hojas maduras y senescentes (S2 y S3, respectivamente). Se examinó el papel de la autofagia en la exportación de aminoácidos al apoplasto.





### **fotosintéticamente activas.**

(A) La nitrato reductasa (NR) y la asparagina sintetasa (AsnS) se localizan en el citosol, y la nitrito reductasa (NiR), la isoenzima glutamina sintetasa 2 (GS2) y la glutamato sintasa (GOGAT) se encuentran dentro de los cloroplastos de células del mesófilo. La isoenzima glutamina sintetasa 1 (GS1) y AsnS se encuentran en el citosol de las células acompañantes. Brevemente, las enzimas NR, NiR, GS2 GOGAT catalizan la síntesis de glutamina (Gln) y glutamato (Glu) a partir de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2012; Krapp, 2015). La Gln y el Glu dan lugar al resto de los aminoácidos por actividad de distintas transaminasas. La AsnS participa en la asimilación de  $\text{NH}_4^+$  en el citosol, incorporando una molécula de amonio a una molécula de aspartato (Asp) generando asparagina (Asn) (Lam *et al.*, 2003; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006; Gaufichon *et al.*, 2013). Tomado con modificaciones de Masclaux-Daubresse *et al.* (2010).

## **2. Reciclado y removilización de N durante la senescencia**

Durante la senescencia, las proteínas de las hojas senescentes, (hojas “fuente”), en particular las proteínas fotosintéticas, son degradadas casi por completo proporcionando una enorme fuente de nitrógeno que es redistribuido hacia los órganos “destino” en crecimiento, como las hojas jóvenes, las raíces y las semillas. El N se removiliza de las hojas fuente a los destinos vía floema, principalmente en forma de aminoácidos y péptidos (Diaz *et al.*, 2008; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010; Havé *et al.*, 2016). La cantidad de N removilizado desde las hojas senescentes es determinante en el número de flores, frutos y/o semillas que se desarrollan, así como en la cantidad de proteínas que se almacenan en las semillas (Crawford, 1995; Schmidt *et al.*, 2007; Sanders *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2015). En las plantas con metabolismo fotosintético C3, Rubisco representa más del 50% de las proteínas solubles totales de las hojas, y, junto con el resto de las proteínas cloroplásticas, constituye la principal fuente de N removilizable durante la senescencia (Diaz *et al.*, 2008; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010).

### **2.1. Degradación de proteínas cloroplásticas durante la senescencia**

La degradación de las proteínas fotosintéticas involucra eventos cloroplásticos y extraplastidiales, que en última instancia conducen a la acumulación de productos de proteólisis en la vacuola central (Michaeli *et al.*, 2016; Otegui, 2018). Se han descrito distintas vías extraplastidiales, *Senescence Associated Vacuoles* (SAVs) (Otegui *et al.*, 2005), *CV Vesicles* (CCVs) (Wang y Blumwald, 2014), *Rubisco containing bodies* (RCBs) (Chiba *et al.*, 2003), *ATG8-interacting Protein1* (ATI1-PSs) (Michaeli *et al.*, 2014). De estas vías se ha demostrado capacidad proteolítica solo en las SAVs, que albergan proteasas activas y acumulan productos de degradación de las proteínas fotosintéticas solubles Rubisco y GS2 (Otegui *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2008). Es probable que las SAVs transfieran su contenido en la vacuola central,

a través de un mecanismo todavía no dilucidado. El origen y el destino de las SAVs se desconoce. Las vesículas CCVs, RCBs, y ATI1-PSs no evidencian actividad proteolítica y operarían en el desensamblado y transporte de complejos y proteínas cloroplásticas hacia la vacuola central. RCBs, y ATI1-PSs son dependientes de la autofagia, ya sea para su formación (RCBs) o para su direccionamiento a la vacuola central (RCBs y ATI1-PSs). La autofagia es un mecanismo universal en células eucariotas que implica el secuestro de componentes celulares seguido de su degradación en la vacuola central (Marshall y Vierstra, 2018). La autofagia en plantas y su papel en la removilización de nutrientes durante la senescencia se describen en mayor detalle más adelante en esta sección.

## 2.2. Proteasas extracelulares y su papel durante la senescencia

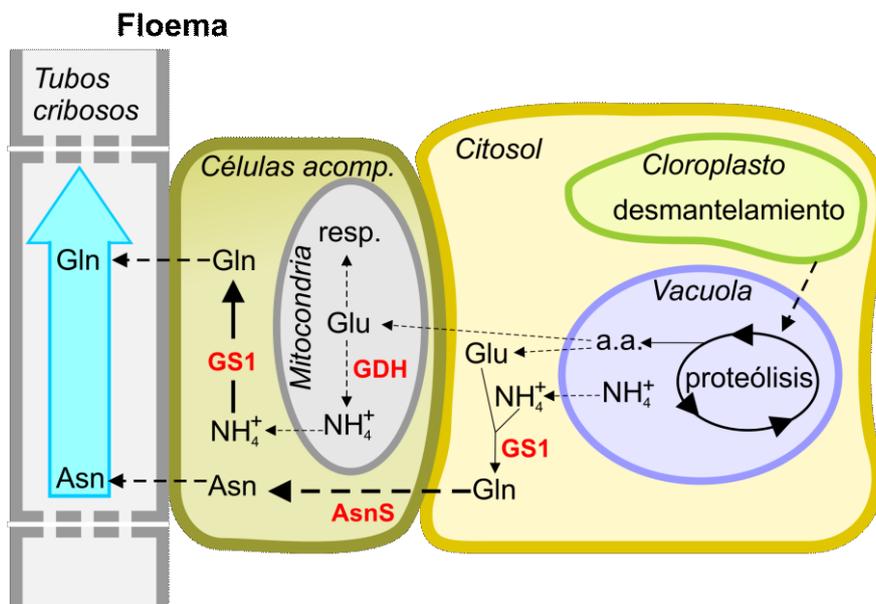
La actividad proteolítica en hojas senescentes se localiza principalmente en compartimientos de naturaleza vacuolar (Martínez *et al.*, 2008; Otegui *et al.*, 2005), mientras que, a nivel de expresión génica, las proteasas reguladas positivamente durante la senescencia se localizan un 13% en la vacuola central, un 26% en el citosol, y en 24% serían direccionadas a apoplasto (Breeze *et al.*, 2011; Havé *et al.*, 2016). Diversos estudios indican que las proteasas extracelulares cumplirían funciones regulatorias durante la senescencia y la muerte celular programada (Golldack *et al.*, 2002; Chichkova *et al.*, 2010; Martinez *et al.*, 2015; Zimmermann *et al.*, 2016). Varias de estas enzimas podrían formar parte de rutas de señalización participando en el procesamiento de proteínas diana específicas localizadas en la matriz extracelular o en la membrana plasmática (Delorme *et al.*, 2000; Golldack *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2015). No hay evidencias sobre la participación directa de proteasas extracelulares en la proteólisis masiva durante la senescencia.

## 2.3. Metabolismo de aminoácidos y removilización de N durante la senescencia

La expresión y actividad de las enzimas cloroplásticas involucradas en la síntesis de aminoácidos NiR, GS2 y GOGAT, disminuye durante la senescencia y otras enzimas extraplastidiales participan en la reasimilación del nitrógeno (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010).

Las principales vías metabólicas involucradas en la removilización de nitrógeno durante la senescencia se resumen en la Figura 7.2. La síntesis de Gln se relocaliza en el citosol, donde el aumento de expresión y actividad de la Glutamina sintetasa citosólica (GS1) compensa parcialmente la caída de GS2 (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010; Guiboileau *et al.*, 2013; Avila-

Ospina *et al.*, 2014). Se ha propuesto que a partir del conjunto de aminoácidos liberados a través de la proteólisis de las proteínas cloroplásticas, por reacciones de transaminación se produce Glu que luego es desaminado por la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH), y el amonio liberado es re-asimilado por la enzima GS1 generando Gln, que es exportada (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Las interconversiones de Glu y Asp a Gln y Asn parecen ser más activas durante la senescencia (Watanabe *et al.*, 2013). Adicionalmente, los aumentos en las concentraciones de Asn y Gln en el floema sugieren que estos dos aminoácidos cumplen un papel clave en la removilización de N en las hojas senescentes (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010).



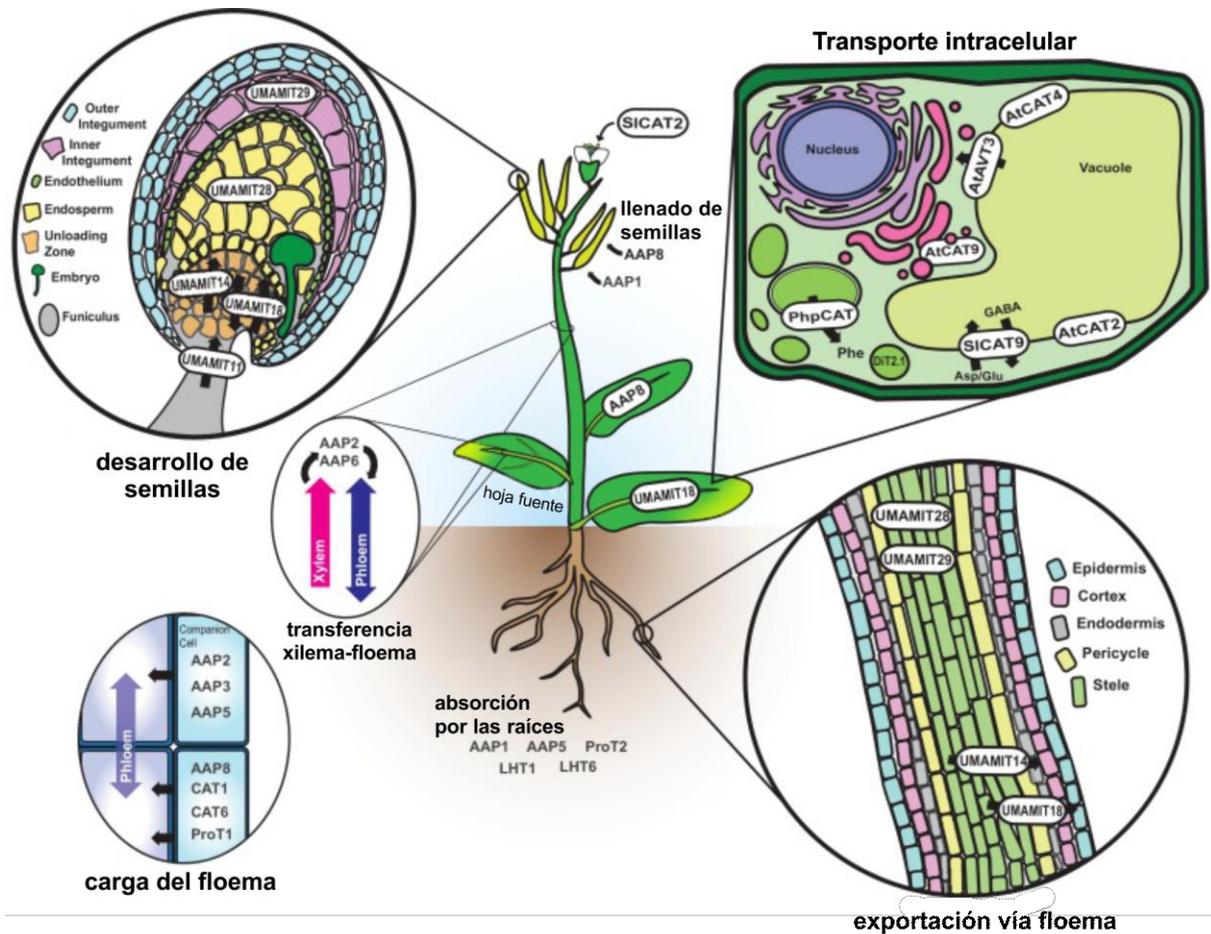
**Figura 7.2. Representación de las principales enzimas que intervienen en los procesos de removilización del N en las hojas senescentes.**

Los eventos asociados a la senescencia incluyen el desmantelamiento de los cloroplastos, la degradación extraplasmática de proteínas cloroplásticas, y la acumulación de los aminoácidos resultantes en la vacuola central. El reciclaje de aminoácidos se produce en las mitocondrias y el citosol de las células del mesófilo y las células acompañantes. Tomado con modificaciones de Masclaux-Daubresse *et al.* (2010).

## 2.4. Transporte intracelular de aminoácidos

La vacuola central es el principal compartimiento lítico, y reservorio celular de productos de proteólisis. El transporte de aminoácidos a través del tonoplasto para su exportación hacia fuera de la célula es uno de los aspectos menos conocidos de la removilización de N. Los miembros

de la familia CAT (Cation exchanger), AtCAT2 y AtCAT4, se localizan en el el tonoplasto y podrían estar implicados en la regulación de los niveles de aminoácidos en hojas (Yang *et al.*, 2014). Se ha demostrado que el transportador de fenilalanina (Phe) en petunia, PhpCAT, participa en el transporte de Phe del cloroplasto al citosol (Widhalm *et al.*, 2015). En *Arabidopsis* AtCAT9 se localiza en vesículas que podrían tener un rol en el transporte intracelular de aminoácidos (Yang *et al.*, 2015). El estudio proteómico de tonoplasto aislado de frutos de tomate maduros permitió identificar a SICAT9, un transportador que acumula Glu y Asp en la vacuola, en intercambio por GABA (Snowden *et al.*, 2015) (Figura 7.3).



**Figura 7.3. Resumen del papel de los transportadores de aminoácidos en los tejidos vegetales.**

Se representan los procesos de absorción por las raíces, exportación vía floema en la raíz, carga del floema, la transferencia xilema-floema, desarrollo de semillas y transporte intracelular de aminoácidos. Las flechas negras indican la dirección de transporte cuando se conocen. Las referencias sobre los roles de los distintos transportadores se pueden encontrar en las revisiones de Tegeder y Rentsch (2010), Tegeder (2012; 2014), Tegeder y Hammes (2018) y Dinkeloo et al. (2018). Adaptado de Dinkeloo et al. (2018).

## 2.5. Transporte y partición de aminoácidos en la planta

El transporte de aminoácidos desde las fuentes hacia los destinos ocurre a través de los haces floemáticos. En *Arabidopsis* y en la mayoría de las plantas cultivadas, la carga del floema es apoplástica y se produce en los haces floemáticos menores (Rennie y Turgeon, 2009; Patrick, 2012). En primer lugar, los aminoácidos se liberan al apoplasto de la hoja, presumiblemente a través de la difusión facilitada (Okumoto y Pilot, 2011). Sin embargo, curiosamente se sabe muy poco sobre la identidad molecular de los transportadores y los mecanismos de exportación de aminoácidos al apoplasto en las hojas fuente.

Desde el apoplasto, los aminoácidos son importados activamente en el complejo “célula acompañante- elemento criboso” del floema, por medio de transportadores de aminoácidos localizados en la membrana plasmática de la célula acompañante (Tegeder y Hammes, 2018). Una vez en el floema, los aminoácidos se transportarían a los órganos destino a través de una diferencia de presión hidrostática entre la fuente y el destino (Patrick, 2013; Knoblauch *et al.*, 2016).

### 2.5.1. Liberación al apoplasto a través de la membrana plasmática

Se sabe muy poco sobre los mecanismos moleculares responsables de la salida de los aminoácidos de la célula, principalmente debido a la falta de un método eficiente para la identificación de proteínas con actividad exportadora (Okumoto y Pilot, 2011). La composición de aminoácidos del apoplasto foliar es muy similar a la composición del citosol, lo que sugiere que el mecanismo de exportación de aminoácidos de las células del parénquima de la hoja podría ser mediado por transportadores con baja (o nula) selectividad (Lohaus *et al.*, 1995).

Se ha observado que plantas de *Arabidopsis* sobreexpresoras de la proteína transmembrana GDU1 (plantas *gdu1-1D*) acumulan aminoácidos libres, especialmente Gln, en el fluido apoplástico y en el xilema. El proceso de exportación estimulado en *gdu1-1D* es pasivo, específico para aminoácidos, y muestra una preferencia débil por Gln sobre los otros aminoácidos (Pratelli *et al.*, 2010). El mecanismo por el cual GDU1 regula la exportación de aminoácidos permanece desconocido. La sobreexpresión de cada uno de los siete genes GDU de *Arabidopsis* condujo a fenotipos similares, incluido un aumento del flujo de aminoácidos y plantas de tamaño reducido respecto de las salvajes, sugiriendo que las proteínas GDU tienen una función redundante o muy similar en la regulación de la exportación de aminoácidos de las células al apoplasto (Pratelli *et al.*, 2010). De los siete genes GDU, GDU3 y GDU5 se regulan positivamente durante la senescencia foliar (Pratelli *et al.*, 2010).

El transportador bidireccional SiAR1/UMAMIT18 se expresa fuertemente en las semillas en desarrollo y en el tejido vascular de las hojas fuente, mientras que su expresión en las hojas destino es mucho más débil (Ladwig *et al.*, 2012). Se ha propuesto que SiAR1/UMAMIT18 intervendría en la exportación de Gln y posiblemente otros aminoácidos al apoplasto, para luego ser recogidos por el complejo “célula acompañante- elemento criboso” del floema (Ladwig *et al.*, 2012) (Figura 7.3).

### 2.5.2. Carga de los aminoácidos en el floema de las hojas fuente

AAP (*AMINO ACID PERMEASE*) es una familia de transportadores simporte aminoácidos / H<sup>+</sup>, localizados en la membrana plasmática (Fischer *et al.*, 2002). Las AAP estarían involucradas en la carga de aminoácidos en el floema (Tegeder y Hammes, 2018) (Figura 7.3). AAP1, AAP2 y AAP8 se localizan en la membrana plasmática de las células floemáticas de las hojas fuente, y distintas evidencias sugieren que cumplen un papel relevante en la removilización de N (Koch *et al.*, 2003; Tegeder *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010; Tegeder y Ward, 2012; Zhang *et al.*, 2015; Santiago y Tegeder, 2016). Los mutantes *aap2* de *Arabidopsis* exhiben senescencia foliar retrasada, inflorescencias más ramificadas, mayor rendimiento de semillas y menor contenido de N en las semillas en comparación con el genotipo salvaje (Zhang *et al.*, 2010). Las plantas *aap8* presentan mayor cantidad de aminoácidos y proteínas remanentes en las hojas, sin que se vea afectado el contenido de N en la semillas, pero estos mutantes alcanzan un menor rendimiento (menor número de semillas) que las plantas salvajes (Santiago y Tegeder, 2016). La sobreexpresión de *AAP1* en las células acompañantes del floema de las hojas de *Pisum sativum* genera altos niveles de carga de aminoácidos y transporte en el floema (Zhang *et al.*, 2015). La expresión de los genes *AtAAP1*, *AtAAP2*, *AtAAP8*, y otros AAPs que se expresan en el floema de las hojas, se induce durante la senescencia (Winter *et al.*, 2007; Havé *et al.*, 2016).

### 2.5.3. Transporte y descarga de aminoácidos en los órganos destino

Una vez en el floema, los aminoácidos se transportan por los tubos cribosos a los órganos destino debido a una diferencia de presión hidrostática entre fuente y destino (Knoblauch *et al.*, 2016). La sacarosa es el principal impulsor del flujo en el floema (Knoblauch *et al.*, 2016). La carga de sacarosa en los tubos cribosos del floema en las hojas fuente hace que el líquido dentro de los vasos se concentre más, provocando que el agua difunda al floema desde los vasos xilemáticos vecinos. Esto crea una presión que empuja el líquido y los metabolitos (principalmente aminoácidos y sacarosa) a lo largo del floema hacia los órganos destino donde son consumidos (Patrick, 2013; Knoblauch *et al.*, 2016). Se ha observado que la tasa de

transporte de aminoácidos por el floema se duplica durante la senescencia natural en *Arabidopsis* (Bohner *et al.*, 2015), posiblemente como consecuencia de un aumento en el gradiente de presión osmótica entre fuente y destino (Tegeder y Hammes, 2018).

La descarga del floema en los órganos destino generalmente implica el movimiento de los aminoácidos (y sacarosa) desde el tubo criboso a las células acompañantes, seguido del transporte post-floema a las células terminales del destino. En *Arabidopsis* la descarga de fotoasimilados se produce por un mecanismo simplástico y apoplástico (Sauer, 2007; Müller *et al.*, 2015). Varios transportadores de la familia UMAMIT estarían involucrados en la descarga de aminoácidos al apoplasto de las semillas en desarrollo (Müller *et al.*, 2015) (Figura 7.3). Plantas mutantes KO para UMAMITs producen semillas más pequeñas que las plantas salvajes (Müller *et al.*, 2015). Una vez liberados en el apoplasto de la semilla, los transportadores AAP y CAT6 probablemente faciliten la carga de aminoácidos en el embrión (Hammes *et al.*, 2006; Sanders *et al.*, 2009).

## 2.6. Senescencia natural vs senescencia inducida por oscuridad

La senescencia natural no ocurre de manera sincrónica en la misma hoja. Las células de la parte distal de la lámina foliar “senescen” primero, mientras que las células que rodean los haces vasculares tienden a permanecer activas más tiempo, posiblemente para permitir el transporte de nutrientes (Niewiadomska *et al.*, 2009). Además, muchas veces es necesario acelerar la senescencia en forma reproducible. Esto ha llevado a recurrir al uso de la senescencia inducida por oscuridad como un método conveniente para sincronizar y acelerar el proceso de senescencia. La senescencia inducida por oscuridad muestra procesos característicos de la senescencia natural como la degradación de clorofila, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Sin embargo, al menos en *Arabidopsis*, la senescencia “inducida” puede diferenciarse de la “natural” a nivel de expresión génica y metabólico (Quirino *et al.*, 2000; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). El balance entre el contenido de Carbono (C) y Nitrógeno (N) es distinto en las hojas senescentes naturales y en las hojas inducidas a senescer en oscuridad. Durante la senescencia natural la relación C:N aumenta, mientras que durante la inducción de la senescencia por oscuridad, la relación C:N se reduce (Brouquisse *et al.*, 1998; Pourtau *et al.*, 2004; Parrott *et al.*, 2005; Wingler y Roitsch, 2008; Law *et al.*, 2018). Tanto la reducción como el aumento en la relación C:N pueden inducir la senescencia (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Wingler y Roitsch, 2008). Durante la senescencia natural, la mayor proporción C:N en las hojas permite la síntesis de Gln como aminoácido preferencial

para la removilización de N (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010), mientras que en hojas “senesciendo” en oscuridad la baja proporción C:N favorece la síntesis y exportación de Asn en lugar de Gln (Lin y Wu, 2004; Law *et al.*, 2018). En la senescencia natural, la fotosíntesis continúa, aunque a un ritmo reducido, presumiblemente proporcionando energía para que el proceso tenga lugar. Por el contrario, en las hojas que “senescen” en oscuridad, la rápida reducción de los niveles de azúcar conduce a un aumento en la degradación de lípidos como fuente de energía (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Law *et al.*, 2018).

Una diferencia clara a nivel molecular entre ambos tipos de senescencia es que la vía del ácido salicílico (AS), es activa solo durante la senescencia natural (Genoud *et al.*, 2002; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Se ha sugerido que durante la senescencia natural, la inducción de la ruta de señalización de AS podría reprimir la expresión génica inducida por la ruta del ácido jasmónico / etileno (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005).

En el caso de hojas cortadas e incubadas en oscuridad, dada la falta de conexión física con los órganos destino, la senescencia ocurre sin removilización de nutrientes y en consecuencia los aminoácidos y otros productos de degradación de macromoléculas se acumulan en las hojas (Mattsson y Schjoerring, 2003; Soudry *et al.*, 2004).

A pesar de las diferencias con la senescencia natural, la inducción de la senescencia por oscuridad en hojas adheridas a la planta proporciona ventajas metodológicas y es un sistema útil en el estudio de ciertos aspectos de la senescencia como la degradación de proteínas y la removilización de nutrientes.

## 2.7. Rol de la autofagia en la removilización de N durante la senescencia

En su variante canónica la autofagia consiste en la formación de una vesícula de doble membrana (autofagosoma) en el citosol, que a medida que se extiende incorpora, de manera selectiva o no-selectiva, agregados de proteínas, organelas dañadas, etc, que son degradadas una vez que el autofagosoma se fusiona a la vacuola central (Revisado en Masclaux-Daubresse *et al.*, 2017).

Distintos estudios evidencian un rol de la autofagia en la degradación de proteínas asociada a la senescencia, la remobilización de N, y el llenado de granos (Guiboileau *et al.*, 2012; Guiboileau *et al.*, 2013; Avila-Ospina *et al.*, 2014; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2017). La maquinaria autofágica requiere de la expresión de distintos genes, denominados genes “AUTOPHAGY” (ATG). En plantas se han caracterizado mutantes *knock-out* de distintos genes ATG, y sus

fenotipos se caracterizan por hipersensibilidad al “hambre” de carbono, senescencia foliar acelerada, particularmente en condiciones de oscuridad, y disminución del crecimiento de la planta y del rendimiento de semillas (Thompson *et al.*, 2005; Xiong *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2015). Se ha identificado a la mayoría de los genes *ATG* responsables de la formación del autofagosoma, entre ellos *ATG5*, que es, hasta el momento, el único gen *ATG* de una sola copia en animales y plantas, cuya expresión es necesaria para la formación de la vesícula. En *Arabidopsis*, las plantas *atg5* han sido extensamente estudiadas, y se caracterizan por hipersensibilidad a la falta de C y N, anormalidades en la redistribución de N, y disminución en la producción de semillas (Thompson *et al.*, 2005; Guiboileau *et al.*, 2012). En plantas *atg5*, *atg18RNAi*, y *atg9*, donde la ruta autofágica se encuentra interrumpida, la removilización de <sup>15</sup>N disminuye notoriamente en comparación con el genotipo salvaje (WT), principalmente en condiciones limitantes de N (Guiboileau *et al.*, 2012; Guiboileau *et al.*, 2013).

Llamativamente, los mutantes *atg* acumulan más proteínas y péptidos, aminoácidos y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en sus hojas de la roseta que las plantas WT, mientras que los niveles de proteasas vacuolares son iguales o incluso mayores a WT (Guiboileau *et al.*, 2013). La acumulación de proteínas observada en las plantas *atg* no se debería a una falta de actividad proteolítica, sino a defectos en el tráfico (autofágico) de estos sustratos a la vacuola central, donde residen las proteasas (Guiboileau *et al.*, 2013; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2017). Mientras que la acumulación de proteínas en las hojas de *Arabidopsis* mutantes para *atg* parecería lógica, la acumulación de aminoácidos y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> aún no se ha podido explicar fehacientemente. El papel potencial de la autofagia en el transporte de aminoácidos y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> es menos conocido.

## HIPÓTESIS

1. Los niveles estables de proteínas, péptidos y de aminoácidos del fluido apoplástico varían durante la senescencia, reflejando las variaciones que ocurren en el interior celular.
2. El bloqueo de la autofagia afecta los niveles estables de proteínas, péptidos y de aminoácidos foliares, y la partición entre el interior celular y el fluido apoplástico.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Examinar los niveles estables de proteínas, péptidos y aminoácidos del FA, y su relación con los contenidos correspondientes intracelulares, en hojas no senescentes (S2), senescentes naturales (S3), y en hojas S2 donde la senescencia se aceleró por oscuridad.
2. Examinar posibles cambios en los niveles de proteínas, péptidos y aminoácidos del FA y su relación con los contenidos correspondientes intracelulares, en plantas *atg5*, donde la autofagia se encuentra bloqueada.



## DISEÑO EXPERIMENTAL

### 1. Senescencia foliar natural e inducción de la senescencia foliar en plantas salvajes S2 y en plantas donde la autofagia se encuentra bloqueada

Para examinar el rol del apoplasto en la removilización de N durante la senescencia foliar, y las posibles consecuencias de la falta de autofagia en la exportación de aminoácidos al apoplasto se utilizaron plantas de *Arabidopsis* de genotipo salvaje (WT) y mutantes *knock-out atg5*. La línea *atg5-1 (atg5)* presenta una inserción de T-DNA en el gen de autofagia *AUTOPHAGYC 5 (ATG5)*.

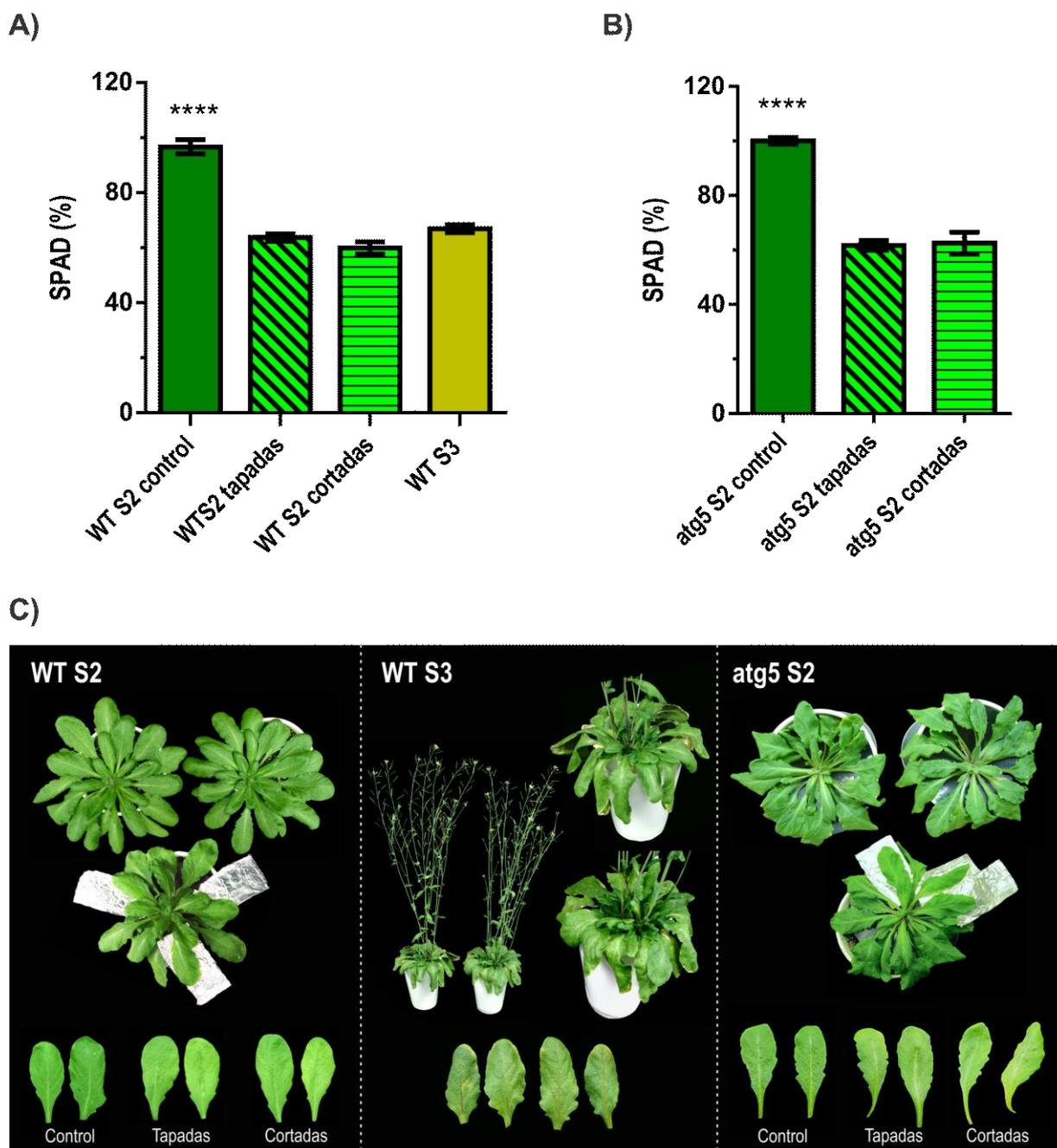
Se analizó el contenido de aminoácidos, péptidos y proteínas del FA y de extractos totales de hojas WT S2 (WT S2 control), WT S3, *atg5* S2 (*atg5* S2 control) y de hojas S2 WT y *atg5* sometidas a distintos tratamientos de oscuridad para inducir la senescencia. Cabe aclarar que del genotipo *atg5-1* solo se utilizaron hojas S2 ya que el estadio S3 en plantas *atg5-1* es efímero, con un alto grado de muerte celular y estas hojas no resultaron aptas para la extracción de fluido apoplástico libre de contenido citosólico (ver capítulo 4).

La inducción de la senescencia en oscuridad se realizó sobre hojas unidas a la planta y sobre hojas cortadas. Las hojas unidas a la planta se cubrieron con papel aluminio (“tapadas”) y las hojas cortadas se colocaron en un recipiente oscuro, con suficiente aireación y humedad (“cortadas”). Antes de someter las hojas a oscuridad se cuantificó (en forma no destructiva) el nivel de clorofila foliar. Se seleccionaron aquellas hojas senescentes con un mismo contenido de clorofila (SPAD), como índice de senescencia (Figura 7.4 A y B). Los tratamientos de oscuridad se extendieron por distintos períodos, según los estadios y genotipos, hasta registrar una caída del 35-40% del contenido de clorofila respecto del valor inicial:

Las hojas WT S2 tapadas y S2 cortadas se mantuvieron en oscuridad durante 5-6 días, hasta que los niveles de clorofila cayeron un 35-40 % respecto del valor inicial, o sea respecto del valor de WT S2 control, (Figura 7.4 A y C).

Las hojas WT S3 (senescentes naturales) contienen un 35-40% menos de clorofila que las hojas WT S2 control (Figura 7.4 A y C).

Las hojas *atg5* S2 tapadas y *atg5* S2 cortadas requirieron 3-4 días de oscuridad para que los niveles de clorofila cayeran un 35-40% respecto del valor en hojas *atg5* S2 control (Figura 7.4 B y C). Las hojas *atg5* S2 control y WT S2 control mostraron los mismos valores de clorofila.



**Figura 7.4. Hojas utilizadas en los ensayos.** A) y B) contenido de clorofila de las hojas analizadas. Los valores se expresaron como % de SPAD en relación al promedio de S2 control para A) WT y B) atg5. Se calcularon diferencias significativas entre las condiciones, utilizando la prueba de Tukey: \*\*\*\*,  $P < 0,0001$ . Los datos mostrados corresponden a la media  $\pm$  SEM.

C) Fotos representativas de las plantas y hojas analizadas.

## 2. Contenido de proteínas, péptidos y aminoácidos

La concentración de péptidos y proteínas solubles en extractos de hoja y en fluidos apoplásticos (FAs) se determinó con el kit de BCA de Pierce (ver punto 5.2.2 de Materiales y Métodos) y se

expresó como  $\mu\text{g}$  de proteínas y péptidos (prot.+pépt.) por  $\text{cm}^2$  de hoja y por gramo de peso fresco (PF) de hoja. Los distintos tipos de hojas presentaron distintas cantidades de FA por unidad de área y por PF, por tal motivo, también se incluyeron las concentraciones de péptidos y proteínas presentes en cada FA [ $\mu\text{g}$  (prot.+pept.) /  $\mu\text{l}$  FA] (Figura 7.9) y los  $V_{\text{FA}}$  (Tabla 7.1).

Dado que el método BCA no discrimina entre péptidos y proteínas, se realizaron geles SDS-PAGE teñidos con coomassie blue donde se comparó la cantidad de proteínas solubles de más de 14 kDa ( $> 14$  kDa) por unidad de área foliar. Los perfiles de proteína se cuantificaron por densitometría, utilizando el software ImageJ y la cantidad de proteínas se expresó como la intensidad de pixeles por área de hoja (ver punto 5.3 de Materiales y Métodos).

La combinación de los métodos, cuantificación de péptidos y proteínas por BCA y de cuantificación de proteínas a partir de geles SDS-PAGE, permite estimar una partición entre péptidos y proteínas de menos de 14 kDa, y proteínas de masas superiores a 14 kDa.

La cantidad de aminoácidos totales en hojas y en FA se determinó mediante el método de la ninhidrina (ver punto 8 de Materiales y Métodos) y se expresó como  $\mu\text{g}$  de aminoácidos por  $\text{cm}^2$  de hoja, como  $\mu\text{g}$  de aminoácidos por gramo de PF de hoja y como concentración de aminoácidos por volumen de fluido apoplástico ( $\mu\text{g}$  a.a /  $\mu\text{l}$  FA).

### 3. Análisis estadístico

El experimento se organizó en dos **grupos**: **WT** y **atg5**; el grupo WT se subdividió en cuatro condiciones: “S2 control”, “S2 tapadas”, “S2 cortadas” y “S3” y el grupo atg5 se subdividió en tres condiciones: “S2 control”, “S2 tapadas” y “S2 cortadas”. Dentro de cada grupo se calcularon diferencias significativas entre las condiciones a  $P \leq 0,05$  mediante el test de comparaciones múltiples de Fisher y se marcaron con distintas letras dentro de las barras. Para las condiciones S2 control, S2 tapadas y S2 cortadas, se calcularon diferencias significativas entre WT y atg5 a  $P \leq 0,05$  mediante el test de comparaciones múltiples de Fisher, y se marcaron con asteriscos encima de las barras: \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0,0001$ .



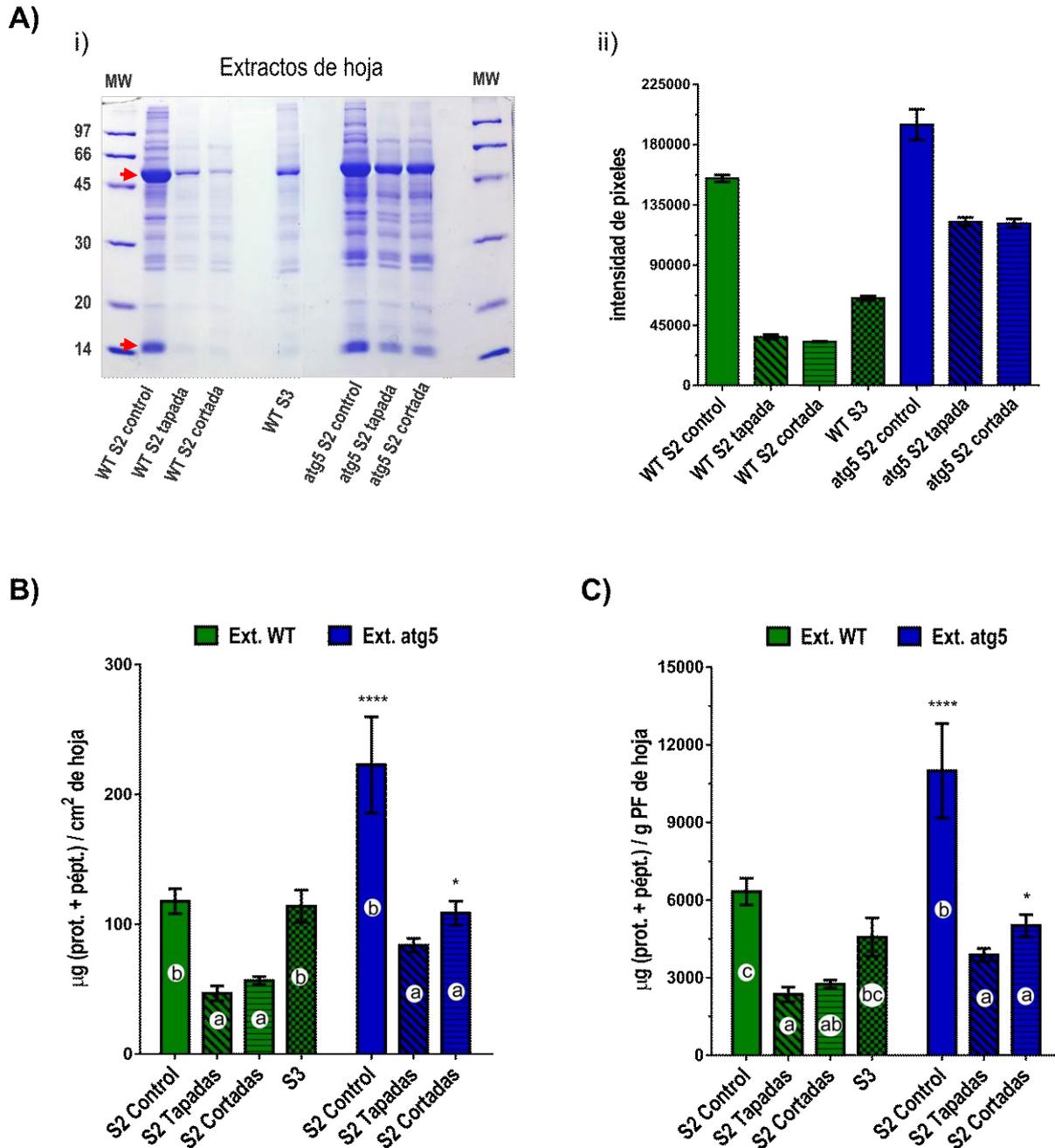
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Niveles estables de péptidos y proteínas foliares durante la senescencia natural e inducida por oscuridad en plantas de genotipo salvaje

#### 1.1. Péptidos y proteínas de extractos de hojas

La comparación entre hojas senescentes (Ext. WT S3) y no senescentes (Ext. WT S2 control) muestra que durante la senescencia natural el contenido de proteínas foliares mayores a 14 kDa cae marcadamente (Figura 7.5 Ai y ii, columnas verdes, lisas vs a cuadros), mientras que el nivel de péptidos y proteínas totales permanece estable (Figura 7.5 B, columnas verdes, lisas vs a cuadros). Este resultado refleja la degradación masiva de proteínas > 14 kDa, particularmente de la proteína mayoritaria en hojas C3, Rubisco (Figura 7.5 Ai y ii), y la acumulación de productos parciales de esta proteólisis (i.e. péptidos, fragmentos de proteínas menores a 14 kDa) en WT S3 (Figura 7.5 B). La expresión de los valores obtenidos por el método de BCA en función del peso fresco foliar, PF, no altera sustancialmente los resultados expresados por área foliar (Figura 7.5 C).

Durante la senescencia de hojas S2 inducida por oscuridad (Ext. WT S2 tapadas y S2 cortadas), el nivel estable de péptidos y proteínas totales se reduce de manera pronunciada respecto a las hojas S2 control (Ext. WT S2 control) (Figura 7.5 B y C, columnas verdes, lisas vs rayadas oblicuas y rayadas horizontales), alcanzando niveles incluso menores a los determinados para hojas S3, lo mismo ocurre con el nivel estable de proteínas >14 kDa (Figura 7.5 Ai y ii). No se observaron diferencias significativas entre la inducción de la senescencia por oscuridad de hojas adheridas tapadas y hojas cortadas, en hojas S2 (Figura 7.5 columnas verdes, rayadas oblicuas vs rayadas horizontales).



**Figura 7.5. Contenido de proteínas y péptidos en EXTRACTOS DE HOJA (Ext.).** A) Perfil de proteínas en gel SDS-PAGE (i) y su densitograma correspondiente (ii). Las calles se sembraron por unidad de área de hoja, cada calle corresponde a 0,12 cm<sup>2</sup> de hoja, las flechas rojas indican las subunidades mayor (~55 kDa) y menor (~14 kDa) de Rubisco. B) Contenido de proteínas y péptidos solubles (prot.+pépt.) expresado como µg por cm<sup>2</sup> de hoja. C) Contenido de proteínas y péptidos solubles (prot.+pépt.) expresado como µg por g de peso fresco (PF) de hoja. Los datos mostrados corresponden a la media ± SEM. El experimento se organizó en dos grupos: WT (verde) y atg5 (azul); el grupo WT se subdividió en cuatro condiciones: “S2 control” (lisas), “S2 tapadas” (rayas oblicuas), “S2 cortadas” (rayas horizontales) y “S3” (a cuadros); y el grupo atg5 se subdividió en tres condiciones: “S2 control” (lisas), “S2 tapadas” (rayas oblicuas), “S2 cortadas” (rayas horizontales). En B) y C), dentro de cada grupo se calcularon diferencias significativas entre las condiciones a  $P \leq 0,05$  mediante el test de comparaciones múltiples de Fisher y se marcaron con distintas letras dentro de las barras. Para las condiciones S2 control, S2 tapadas y S2 cortadas se calcularon diferencias significativas entre WT y atg5 a  $P \leq 0,05$  mediante el test de comparaciones múltiples de Fisher, y se marcaron con asteriscos encima de las

barras: \*, P < 0,05; \*\*, P < 0,01; \*\*\*, P < 0,001; \*\*\*\*, P < 0,0001.

## **1.2. Niveles estables de péptidos y proteínas del fluido apoplástico durante la senescencia natural e inducida por oscuridad en plantas de genotipo salvaje**

En el capítulo 6 se comparó el perfil de proteínas de FA de hojas S2 y S3 en geles SDS PAGE (Figura 6.1), y se observaron disminuciones y aumentos de distintas proteínas del FA asociados a la senescencia natural. En particular, se detectó un marcado incremento de las proteínas PR2 y PR5 en FA de hojas S3.

Durante la senescencia natural (FA S2 vs FA S3), mientras los niveles estables de péptidos y proteínas del FA disminuyen levemente, un 12-20% (Figura 7.6 B y C columnas verdes, lisas vs a cuadros), los niveles de proteínas > 14 kDa del FA aumentan un 22% en S3 (Figura 7.6 Ai y ii). Esto sugiere que en el apoplasto de hojas senescentes naturales predominaría la acumulación de proteínas >14 kDa y la degradación de péptidos y proteínas de bajo peso molecular. En respuesta a la aceleración de la senescencia por oscuridad (FA S2 control vs FA S2 tapadas y S2 cortadas), el nivel de péptidos y proteínas del FA disminuye pronunciadamente, un 50-60% (Figura 7.6 B y C columnas verdes, lisas vs rayadas oblicuas y rayadas horizontales), y el nivel de proteínas >14 kDa registra una caída similar, del 60-65% (Figura 7.6 Ai y ii), sin que se aprecien diferencias significativas entre el FA de hojas tapadas adheridas y hojas cortadas (Figura 7.6 columnas verdes, rayadas oblicuas vs rayadas horizontales). Estos resultados indican que los niveles estables de proteínas y péptidos del FA decrecen notoriamente cuando se acelera la senescencia por oscuridad, lo cual podría deberse a mayores tasas de degradación de proteínas y péptidos del FA, y/o de productos de degradación proteolítica provenientes del interior celular.

En conjunto, estos resultados muestran una notoria diferencia en el comportamiento de las proteínas y péptidos apoplásticos entre la senescencia natural y la senescencia inducida por oscuridad. Además estos resultados apoyan la hipótesis de que el apoplasto contribuye en los procesos degradativos asociados a la removilización de N, hecho que se observa especialmente durante la senescencia inducida por oscuridad.

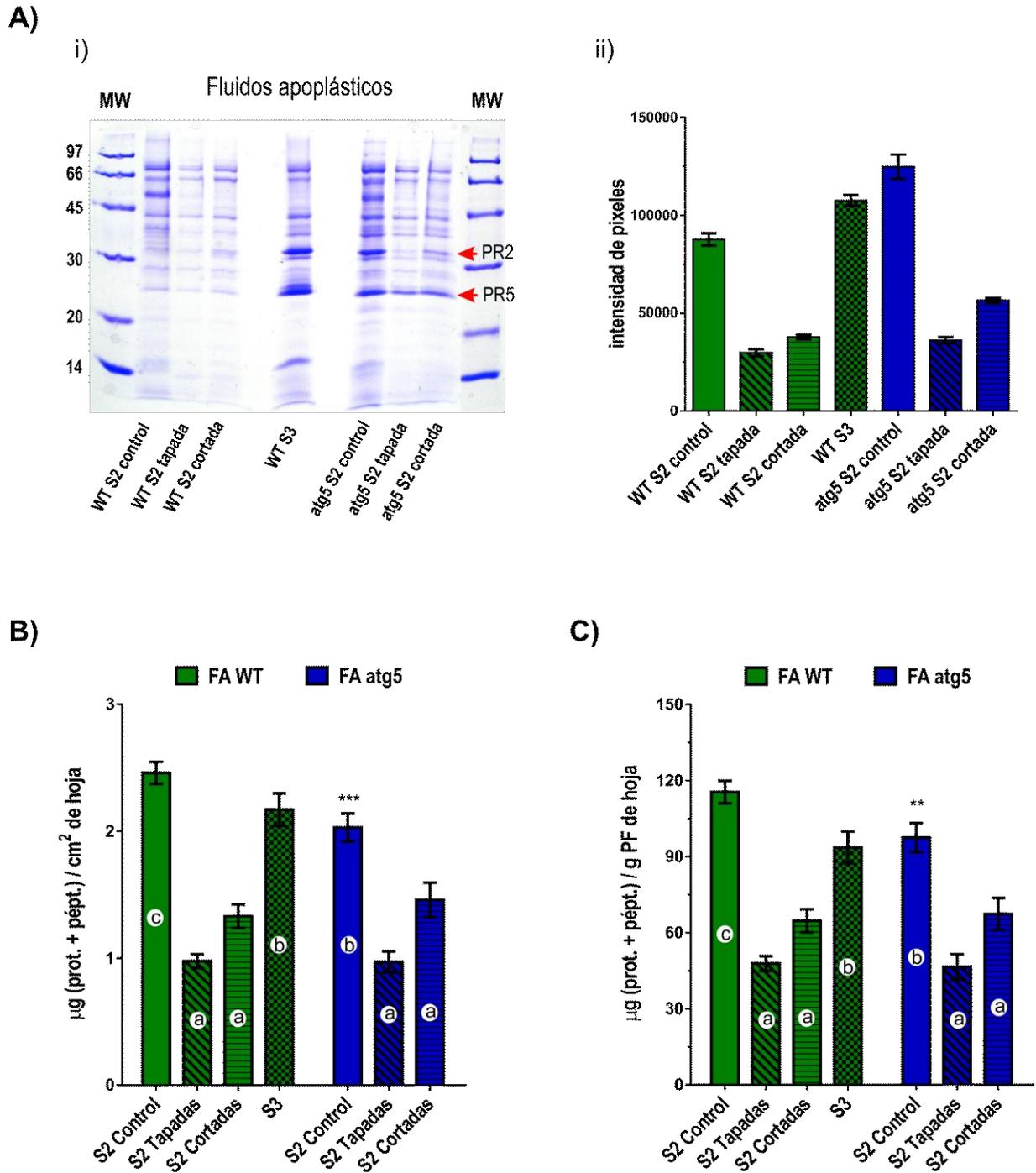
### **1.2.1. PR2 y PR5 se acumulan en el FA durante la senescencia natural, pero no en respuesta a la inducida por oscuridad**

La inducción de la senescencia por oscuridad de hojas S2 conduce a una caída del nivel estable de péptidos y proteínas totales del FA, sin que se observe un aumento de los niveles de las

proteínas mayoritarias de FA asociadas a la senescencia natural, PR5 y PR2 (Figura 7.6 Ai y ii WT S2 control vs WT S2 tapadas y WT S2 cortadas). Estos resultados sugieren que la acumulación apoplástica de las proteínas PR2 y PR5 estaría asociada específicamente a la inducción de la senescencia foliar natural, y no al proceso de senescencia inducida por oscuridad.

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, una característica particular y específica de la senescencia natural, es la activación de la vía del ácido salicílico, la cual se encuentra inactiva durante la senescencia inducida por oscuridad. La inducción de la vía del ácido salicílico promueve la expresión de muchos genes asociados a respuestas de defensa en hojas senescentes naturales (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005), lo cual se ve reflejado en la composición proteica del apoplasto al aumentar marcadamente los niveles de PR2 y PR5 durante la senescencia natural (Figura 7.6 Ai, Figura 6.1 y Tablas 6.1).

El FA contiene alrededor del 2,1 % de los niveles estables de péptidos y proteínas totales de la hoja [(prot+pépt.) FA / (prot+pépt.) totales], y esta relación permanece estable durante la senescencia natural y en hojas S2 sometidas a tratamientos de oscuridad.



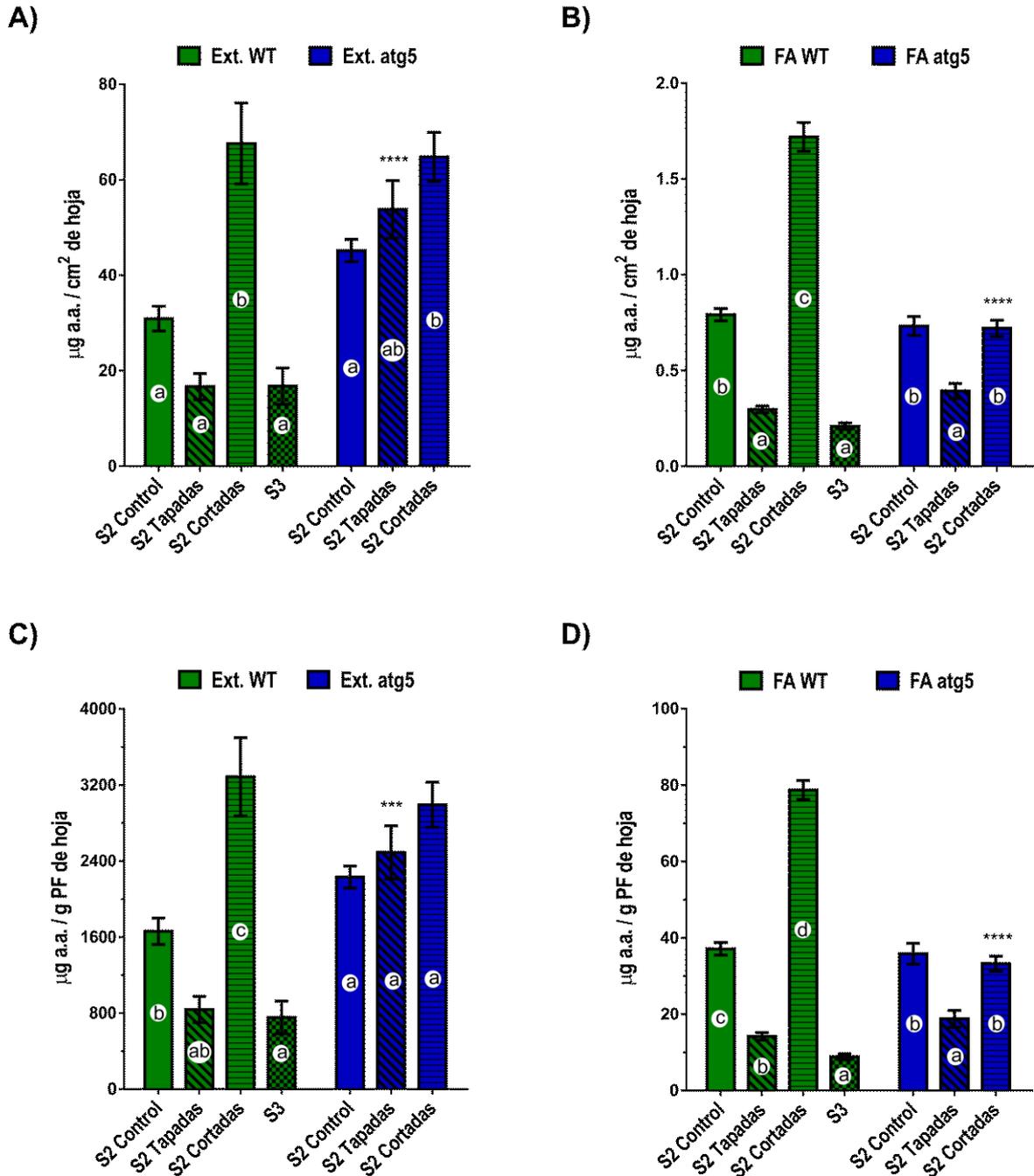
**Figura 7.6. Contenido de proteínas y péptidos en FLUIDOS APOPLÁSTICOS (FA) de hojas.** A) Perfil de proteínas en gel SDS-PAGE (i) y su densitograma correspondiente (ii). Las calles se sembraron por unidad de área de hoja, cada calle corresponde a 20 cm<sup>2</sup> de hoja. Con flechas rojas se marcan las proteínas PR2 y PR5. B) Contenido de proteínas y péptidos solubles (prot.+pépt.) expresado como µg por cm<sup>2</sup> de hoja. C) Contenido de proteínas y péptidos solubles (prot.+pépt.) expresado como µg por g de peso fresco (PF) de hoja. Los datos mostrados corresponden a la media ± SEM. El experimento se organizó en dos grupos: WT (verde) y atg5 (azul); el grupo WT se subdividió en cuatro condiciones: “S2 control” (lisas), “S2 tapadas” (rayas oblicuas), “S2 cortadas” (rayas horizontales) y “S3” (a cuadros); y el grupo atg5 se subdividió en tres condiciones: “S2 control” (lisas), “S2 tapadas” (rayas oblicuas), “S2 cortadas” (rayas horizontales). En B) y C), dentro de cada grupo se calcularon diferencias significativas entre las condiciones a P ≤ 0,05 mediante el test de

comparaciones múltiples de Fisher y se marcaron con distintas letras dentro de las barras. Para las condiciones S2 control, S2 tapadas y S2 cortadas se calcularon diferencias significativas entre WT y *atg5* a  $P \leq 0,05$  mediante el test de comparaciones múltiples de Fisher, y se marcaron con asteriscos encima de las barras: \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0,0001$ .

## 2. Niveles estables de aminoácidos y su partición entre el interior celular y el apoplasto durante la senescencia foliar natural e inducida por oscuridad en plantas salvajes.

Durante la senescencia natural (S2 control vs S3), los niveles estables de aminoácidos (a.a) disminuyen un 50-55% y un 70-75% en extractos foliares y en la fracción apoplástica, respectivamente (Figura 7.7, columnas verdes, lisas vs a cuadros). La relación entre los niveles estables de a.a en el FA y de a.a foliares totales (a.a FA/ a.a totales) cae de 2,5% en hojas S2 (control) a 1,25% en hojas S3. La imposición de oscuridad indujo la senescencia de hojas S2 cortadas y adheridas a la planta, de acuerdo con la disminución observada en el contenido de clorofila (Figura 7.4 A) y proteínas totales (Figura 7.5). En las hojas S2 “tapadas” (adheridas a la planta) este tratamiento generó una disminución del 45-50% en el pool de a.a totales, y de un 60% en el pool de a.a del FA (Figura 7.7 columnas verdes, lisas vs rayadas oblicuas), y la relación a.a FA/ a.a totales se redujo de 2,5% (en S2 control) a 1,8% en S2 tapadas. Estos resultados reflejan un cambio más dinámico en los niveles de a.a del FA, respecto del interior celular, asociado al aumento en la exportación de a.a. durante la senescencia natural e inducida por oscuridad en hojas adheridas a la planta.

Durante la senescencia de hojas S2 cortadas el contenido de a.a totales y el contenido de a.a. del FA se incrementan un 100% (Figura 7.7 columnas verdes, lisas vs rayadas horizontales), manteniéndose la relación a.a FA / a.a totales (2,5%). El incremento en el contenido de a.a en hojas S2 cortadas se debe al aumento de actividad proteolítica sumado a la imposibilidad de exportación de a.a, que se acumulan en la hoja. La estabilidad de la relación a.a FA / a.a totales en hojas S2 cortadas sugiere que la exportación de a.a al espacio apoplástico es independiente de la tasa de carga al floema, y, en última instancia, de la demanda desde otros órganos. Por otra parte, debido a la falta de conexión física con los órganos destino, no existe una diferencia de potencial de presión que impulse y transporte a los aminoácidos (junto a otros metabolitos) a través del floema. Estos resultados concuerdan con los de Soudry y col. (2004), quienes observaron acumulación de aminoácidos en hojas de *Arabidopsis* y avena inducidas a senescer en oscuridad separadas de la planta.



**Figura 7.7. Contenido de aminoácidos en EXTRACTOS DE HOJA (Ext.) (A y C) y FLUIDOS APOPLÁSTICOS (FA) de hoja (B y D).** A y B) Contenido de aminoácidos totales (a.a) expresado como  $\mu\text{g}$  por  $\text{cm}^2$  de hoja en extractos de hoja (A) y FA (B). C y D) Contenido de aminoácidos totales (a.a) expresado como  $\mu\text{g}$  por g de peso fresco (PF) de hoja en extractos de hoja (C) y FA (D). Los datos mostrados corresponden a la media  $\pm$  SEM. El experimento se organizó en dos grupos: WT (verde) y atg5 (azul); el grupo WT se subdividió en cuatro condiciones: “S2 control” (lisas), “S2 tapadas” (rayas oblicuas), “S2 cortadas” (rayas horizontales) y “S3” (a cuadros); y el grupo atg5 se subdividió en tres condiciones: “S2 control” (lisas), “S2 tapadas” (rayas oblicuas), “S2 cortadas” (rayas horizontales). Dentro de cada grupo se calcularon diferencias significativas entre las condiciones a  $P \leq 0,05$  mediante el test de comparaciones múltiples de Fisher y se marcaron con distintas letras dentro de las barras. Para las condiciones S2 control, S2 tapadas y S2 cortadas se calcularon diferencias significativas entre WT y atg5 a  $P \leq 0,05$  mediante el test de comparaciones múltiples de Fisher, y se marcaron

con asteriscos encima de las barras: \*, P < 0,05; \*\*, P < 0,01; \*\*\*, P < 0,001; \*\*\*\*, P < 0,0001.

### 3. Partición del contenido intracelular y apoplástico de proteínas, péptidos y aminoácidos en plantas mutantes para autofagia

#### 3.1. Péptidos y proteínas de extractos de hojas

El nivel estable de proteínas >14 kDa resultó levemente mayor en hojas *atg5* no senescentes (*atg5* S2 control) respecto de hojas WT no senescentes (WT S2 control) (Figura 7.5 Ai y 5Aii columnas lisas, verdes vs azules), mientras que el contenido de péptidos y proteínas totales resultó marcadamente mayor en *atg5* que en WT (Figura 7.5 B y C columnas lisas, verdes vs azules). Estos resultados sugieren que los mutantes *atg5* acumulan péptidos y proteínas, particularmente de peso molecular menor a 14 kDa en sus hojas, y concuerdan con lo evidenciado por Guiboileau y col. (2013), quienes registraron mayores niveles de proteínas, péptidos y aminoácidos foliares en plantas *atg5* que en plantas WT de la misma edad (Guiboileau *et al.*, 2013).

\_\_\_\_\_ En extractos de hojas *atg5* sometidas a oscuridad se registró una disminución de alrededor del 35% de proteínas >14 kDa respecto de los extractos de hojas *atg5* control (Figura 7.5 Ai y ii columnas azules, lisas vs rayadas oblicuas y rayadas horizontales). Esta disminución es menor a la observada en hojas WT S2 con iguales niveles de clorofila (Fig 7.5 Ai y ii columnas verdes, lisas vs rayadas oblicuas y rayadas horizontales). La inducción de la senescencia por oscuridad afectó los niveles estables de péptidos y proteínas totales por igual a plantas *atg5* y WT (S2), que mostraron una reducción del 60% de estos niveles en los extractos de hojas (*atg5* y WT) oscurecidas respecto de sus respectivos controles (*atg5* control y S2 control) (Figura 7.5 B y C, columnas verdes y azules, lisas vs rayadas oblicuas y rayadas horizontales). Estos resultados indican que la autofagia está involucrada en la degradación / acumulación de péptidos y proteínas, pero no es una vía indispensable para la degradación masiva de proteínas, fragmentos de proteínas y péptidos en hojas inducidas a senescer.

#### 3.2. Variación en los niveles estables de péptidos y proteínas del fluido apoplástico durante la senescencia inducida en plantas mutantes para autofagia

El contenido de proteínas >14 kDa del FA de hojas *atg5* no senescentes resultó mayor al registrado en FA de hojas WT no senescentes (Figura 7.6 Ai y ii columnas lisas, verdes vs azules), mientras que el contenido de péptidos y proteínas totales del FA resultó ligeramente

menor en *atg5* que en WT (Figura 7.6 B y C columnas lisas, verdes vs azules). Esto podría deberse a una mayor tasa de secreción de proteínas (>14 kDa) al apoplasto en plantas *atg5*, o bien una menor tasa de degradación y/o exportación de estas proteínas en el FA *atg5*. Curiosamente, gran parte de las proteasas cuyos niveles son menores en *atg5* (respecto de WT) poseen señal de direccionamiento a apoplasto, aunque ninguna de éstas ha sido vinculada a la removilización de N (Havé *et al.*, 2018).

La degradación de péptidos y proteínas apoplásticos no se vería alterada en los mutantes *atg5* durante la senescencia foliar inducida por oscuridad, ya que tanto los niveles de péptidos y proteínas (Figuras 7.6 B y C columnas verdes y azules, lisas vs rayadas oblicuas y rayadas horizontales) como de proteínas >14 kDa (Figura 7.6 Ai y ii) caen en una proporción similar en el FA de hojas *atg5* y WT.

### 3.3. PR2 y PR5 se acumulan en el FA de hojas *atg5* no senescentes

El patrón de proteínas del FA en gel SDS PAGE (Figura 7.6 Ai) evidencia una acumulación de PR2 y PR5 en el FA de hojas *atg5* no senescentes (*atg5* S2 control), similar a la observada durante la senescencia natural en plantas salvajes (WT S3). En plantas *atg5*, como en las plantas salvajes, la acumulación de ácido salicílico aumenta durante el desarrollo, sin embargo en plantas *atg5* es mucho más pronunciada (Morris *et al.*, 2000; Yoshimoto *et al.*, 2009).

Curiosamente, los niveles de las proteínas PR2 y PR5 decrecen marcadamente en el FA de hojas *atg5* cuando éstas son oscurecidas (*atg5* S2 tapadas y *atg5* S2 cortadas). Estos resultados indican que ambas proteínas PR dejan de acumularse en el FA cuando las hojas son sometidas a oscuridad. Esto podría deberse a una disminución de la tasa de secreción al FA de PR2 y PR5, particularmente asociada a la senescencia natural, o a una mayor tasa de degradación de las mismas.

### 3.4. Niveles estables de aminoácidos y su partición entre el interior celular y el apoplasto en ausencia de autofagia

Las hojas *atg5* no senescentes (*atg5* S2) acumulan un 46% más de a.a por área foliar que las hojas WT S2 no senescentes (Figura 7.7 A columnas lisas, verdes vs azules), y la partición de a.a (a.a en FA / a.a totales) es bastante menor en hojas *atg5* (Figura 7.8 columnas lisas, verdes vs azules). El tratamiento de oscuridad genera un aumento (no significativo cuando se expresa por PF) del contenido de a.a. foliar de *atg5* (Figura 7.7 A y C, columnas azules, lisas vs rayadas oblicuas y rayadas horizontales). El FA muestra una disminución del nivel de a.a en el FA de

hojas tapadas (*atg5* tapadas) respecto del de *atg5* control (Figura 7.7 B y D, columnas azules, lisas vs rayadas oblicuas), probablemente asociada a un aumento en la tasa de exportación de a.a desde el apoplasto al floema. En hojas cortadas, el contenido de a.a. del FA refleja fundamentalmente la exportación de a.a. desde el interior celular al apoplasto, ya que no hay conexión con otros órganos que pudieran ser destinos de aminoácidos. El pool de a.a del FA *atg5* no muestra variación alguna en hojas cortadas respecto al control no senescente (Figura 7.7 B y D, columnas azules, lisas vs rayadas horizontales), evidenciando nuevamente una limitación o disminución de la salida de a.a del interior celular al apoplasto de plantas *atg5*. En comparación, el nivel de a.a. en el FA del WT aumenta marcadamente en hojas cortadas, evidenciando la exportación de a.a. desde el citosol al apoplasto (Figura 7.7 B y D, columnas verdes, lisas vs rayadas horizontales). Este hecho también se ve reflejado en la relación a.a en FA / a.a totales, dado que en hojas *atg5* oscurecidas es marcadamente menor que en hojas WT S2 oscurecidas (Figura 7.8, columnas rayadas oblicuas y horizontales, verdes vs azules).

La acumulación de aminoácidos, junto con las de amonio, en hojas *atg5* es una característica que aún no se ha podido explicar fehacientemente. La actividad GS es similar entre el genotipo salvaje y *atg5*, con lo cual la acumulación de a.a. y  $\text{NH}_4^+$  no parece ser el resultado de alteraciones en la asimilación de N en *atg5* (Guiboileau *et al.*, 2013). Guiboileau y col. (2013) propusieron que la carga del floema sería menos eficiente en *atg5*. De ser este el único factor que limita la exportación de aminoácidos en las hojas de *atg5*, éstas deberían presentar una acumulación de aminoácidos en el apoplasto en hojas cortadas, similar a lo observado en hojas WT S2 cortadas, que no ocurre. Por otra parte, cuando se induce la senescencia en hojas unidas a la planta, la tasa de transporte floemático de a.a. es menor en *atg5* que en WT (Carrión, 2012). En *atg5* el pool de a.a celular no se encuentra en equilibrio con el correspondiente pool apoplástico, como ocurre en WT, y esto podría deberse a una limitación en la exportación de aminoácidos del interior celular al apoplasto. Este hecho podría explicar en parte la deficiencia en la removilización de N en hojas *atg5* (Guiboileau *et al.*, 2012; Guiboileau *et al.*, 2013; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2017).

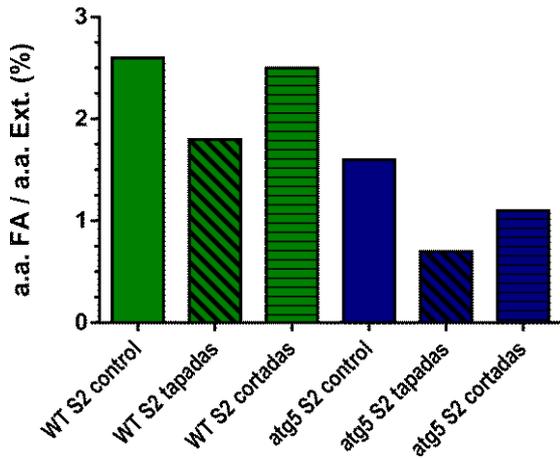


Figura 7.8. Fracción de aminoácidos (a.a) foliares en el FA. Este cálculo se realizó en base a las cantidades promedio de aminoácidos por unidad de área foliar en el FA y en los extractos de hoja (Ext.).

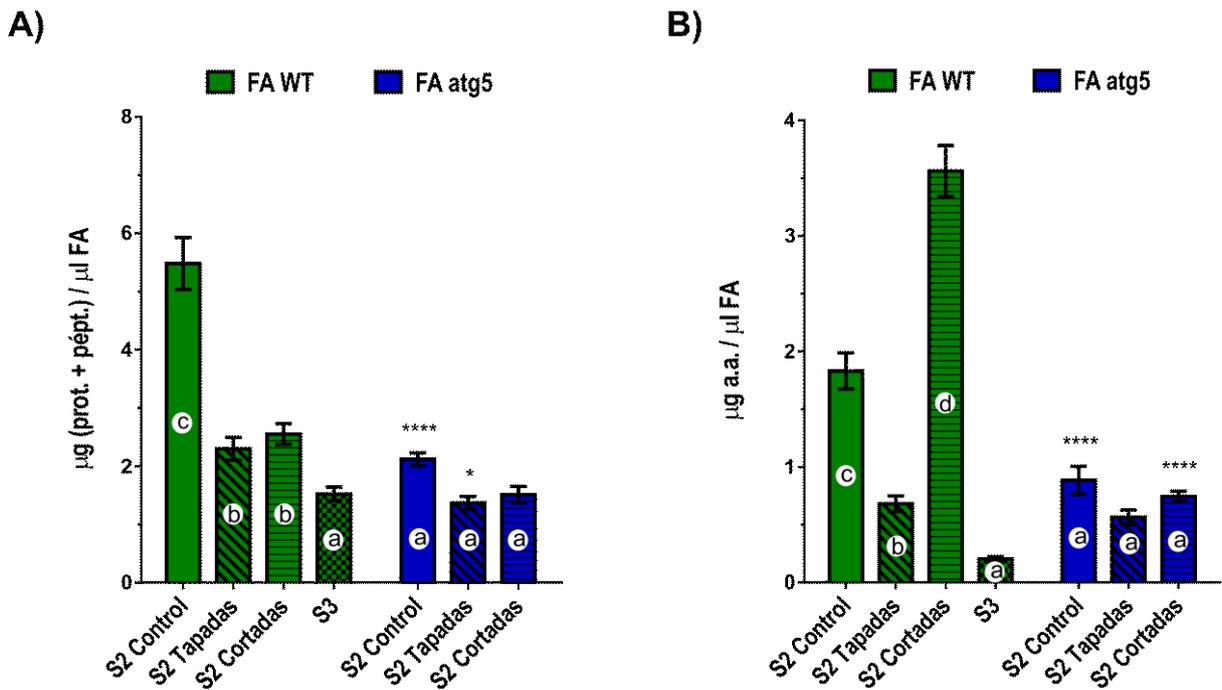


Figura 7.9. Concentración de Proteínas y péptidos solubles (prot.+pépt.) (A) y aminoácidos totales (a.a) (B) en el fluido apoplástico (FA). Las concentraciones se expresan como µg por µl de FA. Los datos mostrados corresponden a la media ± SEM. Se utilizó un ANOVA de dos vías y se calcularon diferencias significativas a  $P \leq 0,05$  mediante el test de comparaciones múltiples de Fisher. El experimento se organizó en dos grupos: WT (verde) y atg5 (azul); el grupo WT se subdividió en cuatro condiciones: “S2 control” (lisas), “S2 tapadas” (rayas oblicuas), “S2 cortadas” (rayas horizontales) y “S3” (a cuadros); y el grupo atg5 se subdividió en tres condiciones: “S2 control” (lisas), “S2 tapadas” (rayas oblicuas), “S2 cortadas” (rayas horizontales). Dentro de cada grupo se calcularon diferencias significativas entre las condiciones a  $P \leq 0,05$  mediante el test de comparaciones múltiples de Fisher y se marcaron con distintas letras dentro de las barras. Para las condiciones S2 control, S2 tapadas y S2 cortadas se calcularon diferencias significativas entre WT y atg5 a  $P \leq 0,05$

mediante el test de comparaciones múltiples de Fisher, y se marcaron con asteriscos encima de las barras: \*, P < 0,05; \*\*, P < 0,01; \*\*\*, P < 0,001; \*\*\*\*, P<0,0001.

	WT S2 control	WT S2 tapadas	WT S2 cortadas	WT S3	atg5 S2 control	atg5 S2 tapadas	atg5 S2 cortadas
V <sub>FA</sub> (μl) / cm <sup>2</sup> hoja	0,45	0,45	0,50	1,30	0,90	0,70	0,95
V <sub>FA</sub> (μl) / g PF hoja	21	21	24	55	43	34	44

**Tabla 7.1. V<sub>FA</sub> expresado por gramo (g) de peso fresco (PF) y por cm<sup>2</sup> de hoja.** Los valores corresponden a los promedios de los V<sub>FA</sub> utilizados para calcular los niveles de péptidos, proteínas y aminoácidos.

## CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este capítulo indican que:

1. El apoplasto contribuiría en los procesos degradativos asociados a la removilización de N, especialmente durante la senescencia inducida por oscuridad.
2. Existe una notoria diferencia en la dinámica de las proteínas del FA entre la senescencia natural y la senescencia inducida por oscuridad:
  - a. Durante la senescencia natural predominaría la acumulación de proteínas (>14 kDa) en el FA, mientras que durante la aceleración de la senescencia por oscuridad predominaría la degradación de proteínas en el FA.
  - b. Muchas proteínas apoplásticas asociadas a la senescencia natural no se asocian a la senescencia inducida por oscuridad.
  - c. El FA de hojas senescentes se caracteriza por la acumulación de las proteínas PR2 y PR5, mientras que estas proteínas no se acumulan en el FA durante la senescencia inducida por oscuridad. Este hecho sugiere que el aumento de los niveles apoplásticos de PR2 y PR5 se relaciona con la ontogenia foliar, y no con la inducción de la senescencia por oscuridad.
3. En plantas salvajes, la secreción celular de aminoácidos durante la senescencia se produciría a favor de un gradiente de concentración entre las células y el apoplasto. Esto permite suponer que durante la senescencia los aminoácidos serían volcados al apoplasto por mecanismos de transporte pasivos.
4. En plantas salvajes, durante la aceleración de la senescencia por oscuridad en hojas extraídas de la planta los aminoácidos continúan exportándose al apoplasto, donde se acumulan como consecuencia de una interrupción del flujo por el floema generado por la falta de conexión física con los órganos destino. La acumulación de aminoácidos en el apoplasto de hojas cortadas evidencia que este paso en la exportación no depende de la demanda.
5. La falta de autofagia se asocia con una acumulación de proteínas apoplásticas asociadas a la senescencia natural en hojas no senescentes. Los perfiles de proteínas del FA de hojas *atg5* no senescentes son muy similares a los de hojas WT senescentes naturales particularmente por la acumulación de PR2 y PR5.

6. Los niveles de las proteínas PR2 y PR5 decrecen marcadamente en el FA de hojas *atg5* cuando éstas son oscurecidas, lo cual podría deberse a una mayor tasa de degradación o a una menor tasa de secreción al FA de proteínas asociadas a la senescencia natural en respuesta a los tratamientos de oscuridad.
7. La falta de autofagia se asocia a una limitación del transporte de aminoácidos desde las células al apoplasto. En los mutantes *atg5* la relación a.a. FA / a.a. totales es marcadamente menor que en plantas salvajes, tanto en hojas no senescentes como en hojas inducidas a senescer en oscuridad adheridas a la planta y extraídas de la planta.
8. La autofagia no es una vía indispensable para la degradación masiva de proteínas, fragmentos de proteínas y péptidos en hojas inducidas a senescer. La inducción de la senescencia por oscuridad afectó los niveles estables de péptidos y proteínas totales por igual en plantas *atg5* y WT.
9. La falta de autofagia no altera la degradación de proteínas apoplásticas durante la senescencia inducida por oscuridad. Durante la aceleración de la senescencia en hojas S2 tapadas y S2 cortadas, los niveles de proteínas del FA disminuyen en una misma proporción en plantas *atg5* y en plantas salvajes.

# **CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS**



## CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

El presente trabajo de tesis tuvo el objetivo principal de profundizar el conocimiento sobre los cambios fisiológicos y moleculares que ocurren en el apoplasto durante el inicio y transcurso de la senescencia foliar.

La primera etapa de la tesis (capítulos 3 y 4) estuvo enfocada en adaptar, para *Arabidopsis*, la técnica de infiltración-centrifugación para extraer el fluido apoplástico foliar y la técnica del índigo carmín para calcular los  $V_{FA}$  y los  $F_{dil}$  de los FA. La implementación conjunta de ambas técnicas es imprescindible para determinar de manera precisa las concentraciones fisiológicas de los diversos metabolitos. Además, durante esta etapa se seleccionaron los estadios ontogénicos de las hojas que se utilizaron en el resto de los experimentos.

Para el análisis de muchos parámetros del apoplasto, como la estimación del volumen de FA, ó la composición cuali-cuantitativa de proteínas, aminoácidos y otros metabolitos, es necesaria la extracción del FA de las hojas. Las técnicas extractivas, como la técnica de *infiltración-centrifugación* utilizada en esta tesis, pueden provocar la fuga de componentes citosólicos al apoplasto, resultando en contaminación de los FLA obtenidos y por lo tanto en estimaciones erróneas de los parámetros analizados. En este sentido, en primera instancia se logró optimizar la técnica de infiltración-centrifugación para poder extraer fluidos apoplásticos con niveles mínimos de contaminación citosólica a partir de hojas de *Arabidopsis* de distinto grado de desarrollo. Específicamente, se evaluaron varias fuerzas centrífugas y tiempos de centrifugado, así como también distintas soluciones de infiltración y distintas técnicas de infiltración en vacío, y se optó por realizar las infiltraciones utilizando jeringas de 60 ml y ddH<sub>2</sub>O como solución de infiltración, y centrifugaciones a 600 xg durante 38 min, ya que es la manera más directa y sencilla posible de obtener un alto porcentaje del FA foliar y sin actividad detectable del marcador citosólico G6PDH.

Además, para estimar las concentraciones fisiológicas de los distintos metabolitos a partir de las soluciones de FLA es necesario conocer el factor de dilución del FA recuperado ( $F_{dil FA}$ ) y el volumen real de FA ( $V_{FA}$ ) presente en las hojas. La técnica del Índigo Carmín es la mejor establecida para ambos fines y la que más se ha evaluado en especies herbáceas, sin embargo, para mi conocimiento, hasta la fecha no hay reportes previos para *Arabidopsis*. Por lo tanto fue necesario evaluar y adaptar esta técnica de modo de poder utilizarla para hojas de *Arabidopsis* de diferentes edades. Si bien no hay manera de establecer si los volúmenes de FA calculados con la técnica del IC son los reales, ya que no existe hasta el momento una técnica que permita

cuantificar el volumen de FA *in vivo*, los valores obtenidos para *Arabidopsis* presentaron una alta reproducibilidad entre las réplicas y estuvieron dentro del orden de los valores reportados previamente, y mediante diferentes técnicas, para otras especies de dicotiledóneas herbáceas.

A fin de seleccionar el material vegetal para la obtención de FLA, en función de parámetros fisiológicos indicadores del grado de senescencia foliar se definieron 4 estadios ontogénicos representativos de distintas etapas del desarrollo foliar: S1, S2, S3 y S4. Todos los parámetros analizados a lo largo de S1 a S4 muestran un cambio marcado entre S2 y S3, sugiriendo que el inicio de la senescencia se ubicaría entre esos estadios. En las hojas S3 los contenidos de clorofila y proteínas se reducen un 30-35 % y un 60% respectivamente en relación a S2, y la capacidad fotosintética cae un 8-10%. A pesar de mostrar síntomas claros de senescencia, las hojas S3 mantienen un estado hídrico similar (CRA) a las hojas no senescentes, con mayores contenidos de materia seca. Las hojas S2 y S3 corresponden a una misma cohorte de hojas muestreadas en una etapa madura no senescente (S2); y en una etapa temprana de senescencia foliar (S3), caracterizada por una activa removilización de nutrientes. Ambos estadios de hojas (S2 y S3) permiten una extracción óptima de sus fluidos apoplásticos por medio de la técnica de *infiltración-centrifugación* optimizada previamente, con niveles no detectables de contaminación citosólica. Estos dos estadios fueron los seleccionados para continuar con el resto de los experimentos, ya que se consideraron los más adecuados en el contexto de este trabajo, enfocado a comprender el papel del apoplasto en el inicio y transcurso de la senescencia foliar, más que en la etapa final del proceso.

Una vez puestas a punto las técnicas para extraer y estimar las concentraciones de iones y metabolitos en el apoplasto y seleccionados los estadios de hojas se comenzaron a analizar cambios en diferentes aspectos fisiológicos y moleculares en el apoplasto durante la senescencia natural (hojas S2 vs S3).

Los principales cambios en el apoplasto foliar de *Arabidopsis* asociados a la senescencia natural son:

1. Una alcalización promedio de alrededor de una unidad de pH. Este aumento del pH apoplástico podría significar menos fuerza motriz para traslocar moléculas desde y hacia las células, y también podría cumplir funciones de señalamiento durante el inicio de la senescencia, regulando por ejemplo la actividad de enzimas apoplásticas.
2. Un aumento del volumen de FA ( $V_{FA}$ ) de aproximadamente un 150%, mientras que el volumen de aire apoplástico permanece prácticamente invariable durante el desarrollo de

la hoja. No se observaron cambios significativos en la cantidad de pared y/o de pectinas entre hojas S2 y S3 que puedan explicar el aumento en el  $V_{FA}$  asociado a la senescencia. Dado que los aumentos en el pH promueven la ionización de las pectinas, y como consecuencia éstas son capaces de retener más agua, podría ser posible que el aumento del  $V_{FA}$  esté relacionado con la alcalinización del apoplasto en hojas S3.

3. Una disminución de la concentración de solutos del FA de un 40%, que no fue significativa probablemente debido a las escasas réplicas biológicas analizadas (3 por estadio) sumado a los altos desvíos estándar. En este sentido, será necesario realizar mayor cantidad de mediciones de potencial soluto del FA a fin de lograr determinaciones más exactas sobre variaciones en este parámetro asociadas a la senescencia.
4. Un aumento en la cantidad de proteínas (>14 kDa) y una disminución en el contenido de péptidos y proteínas de bajo peso molecular en el FA, pese a que la cantidad de proteínas foliares totales disminuye y la cantidad de péptidos y proteínas de bajo peso molecular totales aumenta en hojas senescentes. La menor cantidad de péptidos en el FA de hojas senescentes podría ser reflejo de una mayor tasa de degradación y/o de removilización de péptidos vía floema, algo esperable dado que los péptidos, junto con los aminoácidos, son los principales compuestos involucrados en la removilización de nitrógeno durante la senescencia (Stacey *et al.*, 2002; Dietrich *et al.*, 2004).
5. Una disminución muy pronunciada en el nivel de aminoácidos en el FA, incluso más pronunciada que la disminución en el contenido de aminoácidos totales de las hojas. La baja cantidad de aminoácidos observada en el FA de hojas senescentes probablemente sea reflejo del aumento en la tasa de transporte en el floema. Se ha demostrado que la cantidad de aminoácidos aumenta de manera marcada en el floema de hojas senescentes a pesar de que el contenido de aminoácidos de esas hojas disminuye (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006; Bohner *et al.*, 2015).
6. Diferencias muy marcadas entre los perfiles de proteínas del FA de hojas S2 y S3. Mientras que en el FA S2 las proteínas están distribuidas de manera homogénea entre las distintas bandas; gran parte de las proteínas presentes en el FA S3 está representada por PR2 y PR5, y a su vez los niveles de ambas proteínas aumentan de manera muy marcada en el FA durante la senescencia, lo que sugiere que estas dos proteínas son protagonistas principales de la senescencia en el apoplasto.

7. Grandes variaciones en el proteoma del FA:

- i. Mientras que un gran número de proteínas (al menos 159) muestra una reducción en sus niveles relativos asociada a la senescencia, unas pocas proteínas (al menos 24) se acumulan en el FA de hojas S3. Esto puede deberse a que la gran acumulación de las proteínas PR2 y PR5, da lugar a una disminución relativa del resto de las proteínas, que resultan menos representadas en la muestra. Por otra parte, dado que el FA contiene numerosas proteasas, no se puede descartar que varias de las proteínas identificadas por espectrometría de masas en el FA realmente correspondan a fragmentos de degradación de esas proteínas. En este sentido, sería interesante realizar un análisis proteómico de muestras de FA (S2 y S3) previamente fraccionado por rangos de peso molecular (por ejemplo, utilizando membranas de ultrafiltración de distinto corte).
- ii. Más de la mitad de las proteínas cuyos niveles son mayores en el apoplasto de las hojas no senescentes carecen de péptido señal de direccionamiento a apoplasto y serían exportadas por rutas no convencionales, mientras que la totalidad de las proteínas que se acumulan en el apoplasto de hojas senescentes presentan péptido señal y por lo tanto serían exportadas al apoplasto por la ruta secretoria clásica, RE-Golgi-TGN.
- iii. En este estudio sólo el 45% de las proteínas que presentan péptido señal presentan sitios potenciales de glicosilación, pese a que la presencia de glicosilaciones es un factor común entre las proteínas que entran en la ruta convencional de secreción proteica. En este sentido, sería interesante poder identificar qué proporción de las proteínas apoplásticas se encuentran realmente glicosiladas, por ejemplo, mediante análisis proteómico de muestras de FA previamente enriquecidas en glicoproteínas y de muestras de FA total (sin enriquecer).
- iv. Gran parte de las proteínas cuyos niveles relativos aumentan en el FA de hojas senescentes corresponden a proteínas de respuesta a estrés, reflejando la existencia de cierta superposición entre los programas extracelulares de defensa y de senescencia natural. Estudios funcionales permitirán ampliar nuestra comprensión sobre el papel específico de las proteínas apoplásticas en el inicio y el progreso de la senescencia natural.

- v. Muchas de las proteínas que se acumulan en el FA durante la senescencia natural intervienen en la degradación de polisacáridos, como la  $\alpha$ -amilasa, varias endoquitinasas y glucanasas, sugiriendo que gran parte de las proteínas apoplásticas podrían participar en el remodelamiento de la pared celular y/o en la removilización de C durante la senescencia natural.
- vi. Varias peroxidasas se acumulan en el FA de hojas senescentes. Estas enzimas podrían intervenir en la remodelación de la pared celular y participar en rutas de señalización asociadas a la senescencia mediante la producción de  $H_2O_2$  (Tognetti *et al.*, 2012; Foyer y Noctor, 2013).
- vii. Se identificaron dos proteasas extracelulares que se acumulan en el FA durante la senescencia natural. Una de ellas es una metaloproteasa (3-MMP, At1g24140) que probablemente participe en la regulación de la muerte celular programada (Zimmermann *et al.*, 2016). La otra es una proteasa cisteínica (At3g49340), de función desconocida, si bien se sabe que las proteasas de este grupo mecánico desempeñarían un papel fundamental en la removilización de N durante la senescencia (Thoenen *et al.*, 2007; Parrott *et al.*, 2010; Pružinská *et al.*, 2017). Además, en el FA de hojas senescentes disminuyen los niveles del inhibidor de proteasas cisteínicas, CYS4 (At4g16500). Se ha sugerido que durante la senescencia foliar la proteólisis estaría controlada principalmente a través de la regulación negativa de los inhibidores de proteasas (Desclos *et al.*, 2009). Sería interesante analizar el rol de la proteasa cisteínica At3g49340 y del inhibidor CYS4 durante la senescencia y la removilización de nutrientes.

Estos resultados sugieren que las condiciones en el FA podrían estar modulando la removilización de nutrientes durante la senescencia de *Arabidopsis*. Para examinar esta posibilidad, se compararon los niveles de a.a., péptidos y proteínas y su partición entre el interior celular y el apoplasto durante la senescencia natural e inducida por oscuridad en hojas adheridas a la planta y en hojas cortadas en las cuales la removilización de nutrientes está interrumpida. Este análisis se realizó en plantas de genotipo salvaje y en mutantes *atg5* donde la autofagia se encuentra bloqueada, y la removilización de N está disminuida respecto de plantas salvajes. Los resultados de este análisis sugieren que:

10. El apoplasto contribuiría en los procesos degradativos asociados a la removilización de N, especialmente durante la senescencia inducida por oscuridad en donde la disminución en los niveles de péptidos y proteínas del FA es muy marcada.
11. Las proteínas apoplásticas predominantes durante la senescencia natural, PR2 y PR5, no se acumulan en el FA durante la senescencia inducida por oscuridad.
12. La exportación de a.a al espacio apoplástico sería independiente de la tasa de carga al floema, y, en última instancia, de la demanda desde otros órganos, ya que durante la aceleración de la senescencia por oscuridad en hojas extraídas de plantas salvajes los aminoácidos continúan exportándose al apoplasto pese a que la removilización de nutrientes está interrumpida.
13. La falta de autofagia se asocia con una acumulación de PR2 y PR5, junto a otras proteínas apoplásticas en el FA de hojas no senescentes, y los niveles de estas proteínas disminuyen durante la senescencia inducida por oscuridad (*atg5*). Sería interesante realizar un análisis proteómico de las proteínas que se acumulan en el FA de hojas *atg5* y de aquellas proteínas cuyos niveles disminuyen en el FA de hojas *atg5* oscurecidas.
14. La falta de autofagia se asocia a una limitación del transporte de aminoácidos desde las células al apoplasto, ya que en plantas *atg5* la relación a.a. FA / a.a. totales es marcadamente menor que en plantas salvajes, tanto en hojas no senescentes como en hojas inducidas a senescer en oscuridad, tanto adheridas como separadas de la planta. Sería interesante identificar cuáles son los mecanismos o etapas en la exportación de aminoácidos al apoplasto que están alterados en el mutante *atg5*. Iniciamos este estudio, que continúa en marcha al momento de finalizar la escritura de esta tesis.
15. La autofagia no sería una vía indispensable para la degradación masiva de proteínas, fragmentos de proteínas y péptidos en hojas inducidas a senescer, ya que la inducción de la senescencia por oscuridad afectó los niveles estables de péptidos y proteínas totales y del FA por igual a plantas *atg5* y WT.

### **Perspectivas futuras**

Dado que las proteasas apoplásticas pueden participar en la regulación de la senescencia procesando o degradando proteínas y/o péptidos de señalización extracelulares, considero que sería sumamente relevante poder avanzar en el conocimiento de la proteólisis regulatoria asociada a la senescencia, por ejemplo 1) mediante la identificación de nuevas proteoformas (proteólisis sitio específica de proteínas y maduración de péptidos de señalización), o

proteoformas cambiantes cuyos niveles aumenten o disminuyan a lo largo de la senescencia en hojas de *Arabidopsis* y 2) mediante la identificación y caracterización de los sustratos fisiológicos de las proteasas apoplásticas que han sido vinculadas a rutas de señalización extracelulares asociadas con la senescencia.



# BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, E. y Fereres, E.** (1993) Resistance to abiotic stresses. En *Plant Breeding*. Dordrecht: Springer, pp. 406-421.
- Agrawal, G.K., Jwa, N.S., Lebrun, M.H., Job, D. y Rakwal, R.** (2010) Plant secretome: unlocking secrets of the secreted proteins. *Proteomics*, **10**, 799-827.
- Ahmad, P., Sarwat, M. y Sharma, S.** (2008) Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*, **51**, 167-173.
- Akram, N.A., Shafiq, F. y Ashraf, M.** (2017) Ascorbic acid-A potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Frontiers in plant science*, **8**, 613.
- Ali, A., Alexandersson, E., Sandin, M., Resjo, S., Lenman, M., Hedley, P., Levander, F. y Andreasson, E.** (2014) Quantitative proteomics and transcriptomics of potato in response to *Phytophthora infestans* in compatible and incompatible interactions. *BMC Genomics*, **15**, 497.
- Almagro, L., Gomez Ros, L.V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barcelo, A. y Pedreno, M.A.** (2009) Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, **60**, 377-390.
- Amme, S., Matros, A., Schlesier, B. y Mock, H.-P.** (2006) Proteome analysis of cold stress response in *Arabidopsis thaliana* using DIGE-technology. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 1537-1546.
- Andersen, M., Jensen, C. y Losch, R.** (1991) Derivation of pressure-volume curves by a non-linear regression procedure and determination of apoplastic water. *Journal of Experimental Botany*, **42**, 159-165.
- Antikainen, M., Griffith, M., Zhang, J., Hon, W.-C., Yang, D.S. y Pihakaski-Maunsbach, K.** (1996) Immunolocalization of antifreeze proteins in winter rye leaves, crowns, and roots by tissue printing. *Plant Physiology*, **110**, 845-857.
- Arango, M., Gévaudant, F., Oufattole, M. y Boutry, M.** (2003) The plasma membrane proton pump ATPase: the significance of gene subfamilies. *Planta*, **216**, 355-365.
- Arnér, E.S. y Holmgren, A.** (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *The FEBS Journal*, **267**, 6102-6109.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M. y Sherlock, G.** (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics*, **25**, 25-29.
- Augustijn, D., Roy, U., van Schadewijk, R., de Groot, H.J. y Alia, A.** (2016) Metabolic Profiling of Intact *Arabidopsis thaliana* Leaves during Circadian Cycle Using 1H High Resolution Magic Angle Spinning NMR. *PLoS One*, **11**, e0163258.
- Avila-Ospina, L., Moison, M., Yoshimoto, K. y Masclaux-Daubresse, C.** (2014) Autophagy, plant senescence, and nutrient recycling. *Journal of Experimental Botany*, **65**, 3799-3811.
- Baeuerle, P., Rupec, R. y Pahl, H.** (1996) Reactive oxygen intermediates as second messengers of a general pathogen response. *Pathologie-biologie*, **44**, 29-35.
- Baker, C.J., Kovalskaya, N.Y., Mock, N.M., Owens, R.A., Deahl, K.L., Whitaker, B.D., Roberts, D.P., Hammond, R.W. y Aver'yanov, A.A.** (2012) An internal standard technique for improved quantitative analysis of apoplastic metabolites in tomato leaves. *Physiological and molecular plant pathology*, **78**, 31-37.
- Banerjee, J., Das, N., Dey, P. y Maiti, M.K.** (2010) Transgenically expressed rice germin-like protein1 in tobacco causes hyper-accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and reinforcement of the cell wall components. *Biochemical and biophysical research communications*, **402**, 637-643.
- Barbez, E., Dünser, K., Gaidora, A., Lendl, T. y Busch, W.** (2017) Auxin steers root cell expansion via apoplastic pH regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **114**, E4884-E4893.
- Bariola, P.A., Howard, C.J., Taylor, C.B., Verburg, M.T., Jaglan, V.D. y Green, P.J.** (1994) The *Arabidopsis* ribonuclease gene RNS1 is tightly controlled in response to phosphate limitation. *The Plant Journal*, **6**, 673-685.
- Bariola, P.A., MacIntosh, G.C. y Green, P.J.** (1999) Regulation of S-like ribonuclease levels in *Arabidopsis*. Antisense inhibition of RNS1 or RNS2 elevates anthocyanin accumulation. *Plant Physiology*, **119**, 331-342.
- Barth, C., Moeder, W., Klessig, D.F. y Conklin, P.L.** (2004) The timing of senescence and response to pathogens is altered in the ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant vitamin c-1. *Plant Physiology*, **134**, 1784-1792.

- Becraft, P.W.** (1998) Receptor kinases in plant development. *Trends in plant science*, **3**, 384-388.
- Bechtold, U., Karpinski, S. y Mullineaux, P.M.** (2005) The influence of the light environment and photosynthesis on oxidative signalling responses in plant–biotrophic pathogen interactions. *Plant, Cell & Environment*, **28**, 1046-1055.
- Beers, E.P., Woffenden, B.J. y Zhao, C.** (2000) Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant molecular biology*, **44**, 399-415.
- Bengtsson, T., Weighill, D., Proux-Wera, E., Levander, F., Resjo, S., Burra, D.D., Moushib, L.I., Hedley, P.E., Liljeroth, E., Jacobson, D., Alexandersson, E. y Andreasson, E.** (2014) Proteomics and transcriptomics of the BABA-induced resistance response in potato using a novel functional annotation approach. *BMC Genomics*, **15**, 315.
- Bernstein, L.** (1971) Method for determining solutes in the cell walls of leaves. *Plant Physiology*, **47**, 361-365.
- Besseau, S., Li, J. y Palva, E.T.** (2012) WRKY54 and WRKY70 co-operate as negative regulators of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 2667-2679.
- Beyschlag, W. y Pfanz, H.** (1990) A fast method to detect the occurrence of nonhomogeneous distribution of stomatal aperture in heterobaric plant leaves. *Oecologia*, **82**, 52-55.
- Bindschedler, L.V., Dewdney, J., Blee, K.A., Stone, J.M., Asai, T., Plotnikov, J., Denoux, C., Hayes, T., Gerrish, C., Davies, D.R., Ausubel, F.M. y Bolwell, G.P.** (2006) Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *The Plant Journal*, **47**, 851-863.
- Bindschedler, L.V., Palmblad, M. y Cramer, R.** (2008) Hydroponic isotope labelling of entire plants (HILEP) for quantitative plant proteomics; an oxidative stress case study. *Phytochemistry*, **69**, 1962-1972.
- Bläsing, O.E., Gibon, Y., Günther, M., Höhne, M., Morcuende, R., Osuna, D., Thimm, O., Usadel, B., Scheible, W.-R. y Stitt, M.** (2005) Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **17**, 3257-3281.
- Blumenkrantz, N. y Asboe-Hansen, G.** (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical biochemistry*, **54**, 484-489.
- Bohner, A., Kojima, S., Hajirezaei, M., Melzer, M. y Wirén, N.** (2015) Urea retranslocation from senescing *Arabidopsis* leaves is promoted by DUR3-mediated urea retrieval from leaf apoplast. *The Plant Journal*, **81**, 377-387.
- Bolwell, G.P., Bindschedler, L.V., Blee, K.A., Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S.L., Gerrish, C. y 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.
- Bolwell, G.P., Davies, D.R., Gerrish, C., Auh, C.-K. y Murphy, T.M.** (1998) Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and French bean cells reveals two distinct mechanisms. *Plant Physiology*, **116**, 1379-1385.
- Bolwell, G.P. y Wojtaszek, P.** (1997) Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence—a broad perspective. *Physiological and molecular plant pathology*, **51**, 347-366.
- Boudart, G., Jamet, E., Rossignol, M., Lafitte, C., Borderies, G., Jauneau, A., Esquerre-Tugaye, M.T. y Pont-Lezica, R.** (2005) Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics*, **5**, 212-221.
- Boyer, J.** (1967) Matric potentials of leaves. *Plant Physiology*, **42**, 213-217.
- Bozkurt, T.O., Schornack, S., Win, J., Shindo, T., Ilyas, M., Oliva, R., Cano, L.M., Jones, A.M., Huitema, E. y van der Hoorn, R.A.** (2011) *Phytophthora infestans* effector AVRblb2 prevents secretion of a plant immune protease at the haustorial interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, 20832-20837.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Bradley, D.J., Kjellbom, P. y Lamb, C.J.** (1992) Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell*, **70**, 21-30.
- Breeze, E., Harrison, E., McHattie, S., Hughes, L., Hickman, R., Hill, C., Kiddle, S., Kim, Y.S., Penfold, C.A., Jenkins, D., Zhang, C., Morris, K., Jenner, C., Jackson, S., Thomas, B., Tabrett, A., Legaie, R., Moore, J.D., Wild, D.L., Ott, S., Rand, D., Beynon, J., Denby, K., Mead, A. y Buchanan-Wollaston, V.** (2011) High-resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *The Plant Cell*, **23**, 873-894.
- Brett, C.T. y Waldron, K.W.** (1996) *Physiology and biochemistry of plant cell walls* 2nd edn.: Springer.

- Brini, F., Hanin, M., Mezghani, I., Berkowitz, G.A. y Masmoudi, K. (2007) Overexpression of wheat Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter TNH1 and H<sup>+</sup>-pyrophosphatase TVP1 improve salt- and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 301-308.
- Brisson, L.F., Tenhaken, R. y Lamb, C. (1994) Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *The Plant Cell*, **6**, 1703-1712.
- Brouquisse, R., Gaudillère, J.-P. y Raymond, P. (1998) Induction of a carbon-starvation-related proteolysis in whole maize plants submitted to light/dark cycles and to extended darkness. *Plant Physiology*, **117**, 1281-1291.
- Brunner, Y., Schwartz, D., Couté, Y. y Sanchez, J.C. (2009) Proteomics of regulated secretory organelles. *Mass spectrometry reviews*, **28**, 844-867.
- Buchanan-Wollaston, V. (1997) The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany*, **48**, 181-199.
- Buchanan-Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., Mathas, E., Navabpour, S., Page, T. y Pink, D. (2003) The molecular analysis of leaf senescence--a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal*, **1**, 3-22.
- Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P.O., Nam, H.G., Lin, J.F., Wu, S.H., Swidzinski, J. y Ishizaki, K. (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **42**, 567-585.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. y Jones, R.L. (2015) *Biochemistry and molecular biology of plants* 2nd edn.: John Wiley & Sons.
- Butt, A., Mousley, C., Morris, K., Beynon, J., Can, C., Holub, E., Greenberg, J.T. y Buchanan-Wollaston, V. (1998) Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. *The Plant Journal*, **16**, 209-221.
- Cabello, P., Agüera, E. y De La Haba, P. (2006) Metabolic changes during natural ageing in sunflower (*Helianthus annuus*) leaves: expression and activity of glutamine synthetase isoforms are regulated differently during senescence. *Physiologia Plantarum*, **128**, 175-185.
- Camargo-Ramírez, R., Val-Torregrosa, B. y San Segundo, B. (2018) MiR858-Mediated Regulation of Flavonoid-Specific MYB Transcription Factor Genes Controls Resistance to Pathogen Infection in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, **59**, 190-204.
- Canny, M. (1995) Apoplastic water and solute movement: new rules for an old space. *Annual review of plant biology*, **46**, 215-236.
- Carella, P., Wilson, D.C. y Cameron, R.K. (2015) Some things get better with age: differences in salicylic acid accumulation and defense signaling in young and mature *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science*, **5**, 775.
- Carpita, N., McCann, M. y Griffing, L.R. (1996) The plant extracellular matrix: news from the cell's frontier. *The Plant Cell*, **8**, 1451-1463.
- Carpita, N., Sabulase, D., Montezinos, D. y Delmer, D.P. (1979) Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. *Science*, **205**, 1144-1147.
- Carpita, N.C. y Kanabus, J. (1987) Extraction of starch by dimethyl sulfoxide and quantitation by enzymatic assay. *Analytical Biochemistry*, **161**, 132-139.
- Carrión, C.A. (2012) "Vacuolas asociadas a la senescencia": participación en la degradación de proteínas fotosintéticas e interacción con la vía autofágica (tesis doctoral). Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP, La Plata.
- Carrión, C.A., Costa, M.L., Martínez, D.E., Mohr, C., Humbeck, K. y Guiamet, J.J. (2013) In vivo inhibition of cysteine proteases provides evidence for the involvement of 'senescence-associated vacuoles' in chloroplast protein degradation during dark-induced senescence of tobacco leaves. *Journal of Experimental Botany*, **64**, 4967-4980.
- Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E.L., Girke, T. y Raikhel, N.V. (2004) The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *The Plant Cell*, **16**, 3285-3303.
- Casano, L.M., Martin, M. y Sabater, B. (1994) Sensitivity of superoxide dismutase transcript levels and activities to oxidative stress is lower in mature-senescent than in young barley leaves. *Plant Physiology*, **106**, 1033-1039.
- Casasoli, M., Spadoni, S., Lilley, K.S., Cervone, F., De Lorenzo, G. y Mattei, B. (2008) Identification by 2-D DIGE of apoplastic proteins regulated by oligogalacturonides in *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics*, **8**, 1042-1054.

- Catala, C., Howe, K.J., Hucko, S., Rose, J.K. y Thannhauser, T.W.** (2011) Towards characterization of the glycoproteome of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit using Concanavalin A lectin affinity chromatography and LC-MALDI-MS/MS analysis. *Proteomics*, **11**, 1530-1544.
- Cheng, F.Y., Blackburn, K., Lin, Y.M., Goshe, M.B. y Williamson, J.D.** (2009) Absolute protein quantification by LC/MS(E) for global analysis of salicylic acid-induced plant protein secretion responses. *Journal of Proteome Research*, **8**, 82-93.
- Chiba, A., Ishida, H., Nishizawa, N.K., Makino, A. y Mae, T.** (2003) Exclusion of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. *Plant and Cell Physiology*, **44**, 914-921.
- Chichkova, N.V., Shaw, J., Galiullina, R.A., Drury, G.E., Tuzhikov, A.I., Kim, S.H., Kalkum, M., Hong, T.B., Gorshkova, E.N. y Torrance, L.** (2010) Phytaspase, a relocalisable cell death promoting plant protease with caspase specificity. *The EMBO journal*, **29**, 1149-1161.
- Cho, S.-M., Kang, B.R. y Kim, Y.C.** (2013) Transcriptome analysis of induced systemic drought tolerance elicited by *Pseudomonas chlororaphis* O6 in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Pathology Journal*, **29**, 209-220.
- Cho, W.K., Chen, X.Y., Chu, H., Rim, Y., Kim, S., Kim, S.T., Kim, S.W., Park, Z.Y. y Kim, J.Y.** (2009) Proteomic analysis of the secretome of rice calli. *Physiologia Plantarum*, **135**, 331-341.
- Chou, K.-C. y Shen, H.-B.** (2010) Plant-mPLoc: a top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization. *PLoS One*, **5**, e11335.
- Choudhury, F.K., Rivero, R.M., Blumwald, E. y Mittler, R.** (2017) Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, **90**, 856-867.
- Clark, G.B., Lee, D., Dauwalder, M. y Roux, S.J.** (2005) Immunolocalization and histochemical evidence for the association of two different *Arabidopsis* annexins with secretion during early seedling growth and development. *Planta*, **220**, 621-631.
- Cochard, H., Cruziat, P. y Tyree, M.T.** (1992) Use of positive pressures to establish vulnerability curves further support for the air-seeding hypothesis and implications for pressure-volume analysis. *Plant Physiology*, **100**, 205-209.
- Coffeen, W.C. y Wolpert, T.J.** (2004) Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *The Plant Cell*, **16**, 857-873.
- Cohn, M., Bart, R.S., Shybut, M., Dahlbeck, D., Gomez, M., Morbitzer, R., Hou, B.-H., Frommer, W.B., Lahaye, T. y Staskawicz, B.J.** (2014) *Xanthomonas axonopodis* virulence is promoted by a transcription activator-like effector-mediated induction of a SWEET sugar transporter in cassava. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **27**, 1186-1198.
- Conklin, P. y Barth, C.** (2004) Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant, Cell & Environment*, **27**, 959-970.
- Consortium, G.O.** (2016) Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources. *Nucleic Acids Research*, **45**, D331-D338.
- Cortes, P. y Sinclair, T.** (1985) Extraction of apoplastic water during pressure-volume dehydrations. *Agronomy Journal*, **77**, 798-802.
- Cosgrove, D.J.** (1997) Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annual review of cell and developmental biology*, **13**, 171-201.
- Cosgrove, D.J.** (2005) Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell biology*, **6**, 850-861.
- Cosgrove, D.J. y Cleland, R.E.** (1983) Solutes in the free space of growing stem tissues. *Plant Physiology*, **72**, 326-331.
- Cosio, C. y Dunand, C.** (2008) Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of Experimental Botany*, **60**, 391-408.
- Coupe, S.A., Sinclair, B.K., Watson, L.M., Heyes, J.A. y Eason, J.R.** (2003) Identification of dehydration-responsive cysteine proteases during post-harvest senescence of broccoli florets. *Journal of Experimental Botany*, **54**, 1045-1056.
- Crawford, N.M.** (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *The Plant Cell*, **7**, 859-868.
- Cséke, C. y Buchanan, B.B.** (1986) Regulation of the formation and utilization of photosynthate in leaves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Bioenergetics*, **853**, 43-63.
- Cui, S., Guo, X., Chang, F., Cui, Y., Ma, L., Sun, Y. y Sun, D.** (2005) Apoplastic calmodulin receptor-like binding proteins in suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 31420-31427.

- Dani, V., Simon, W.J., Duranti, M. y Croy, R.R. (2005) Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress. *Proteomics*, **5**, 737-745.
- Dannel, F., Pfeffer, H. y Marschner, H. (1995) Isolation of apoplasmic fluid from sunflower leaves and its use for studies on influence of nitrogen supply on apoplasmic pH. *Journal of Plant Physiology*, **146**, 273-278.
- Daudi, A., Cheng, Z., O'Brien, J.A., Mammarella, N., Khan, S., Ausubel, F.M. y Bolwell, G.P. (2012) The apoplastic oxidative burst peroxidase in Arabidopsis is a major component of pattern-triggered immunity. *The Plant Cell*, **24**, 275-287.
- del Rio, L.A., Pastori, G.M., Palma, J.M., Sandalio, L.M., Sevilla, F., Corpas, F.J., Jiménez, A., López-Huertas, E. y Hernández, J.A. (1998) The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology*, **116**, 1195-1200.
- Delannoy, M., Alves, G., Vertommen, D., Ma, J., Boutry, M. y Navarre, C. (2008) Identification of peptidases in *Nicotiana tabacum* leaf intercellular fluid. *Proteomics*, **8**, 2285-2298.
- Delorme, V.G., McCabe, P.F., Kim, D.-J. y Leaver, C.J. (2000) A matrix metalloproteinase gene is expressed at the boundary of senescence and programmed cell death in cucumber. *Plant Physiology*, **123**, 917-928.
- Dellero, Y., Jossier, M., Glab, N., Oury, C., Tcherkez, G. y Hodges, M. (2016) Decreased glycolate oxidase activity leads to altered carbon allocation and leaf senescence after a transfer from high CO<sub>2</sub> to ambient air in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, **67**, 3149-3163.
- Dengler, N.G., Dengler, R.E., Donnelly, P.M. y Hattersley, P.W. (1994) Quantitative leaf anatomy of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> grasses (Poaceae): bundle sheath and mesophyll surface area relationships. *Annals of Botany*, **73**, 241-255.
- Desclos, M., Etienne, P., Coquet, L., Jouenne, T., Bonnefoy, J., Segura, R., Reze, S., Ourry, A. y Avice, J.-C. (2009) A combined <sup>15</sup>N tracing/proteomics study in *Brassica napus* reveals the chronology of proteomics events associated with N remobilisation during leaf senescence induced by nitrate limitation or starvation. *Proteomics*, **9**, 3580-3608.
- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P. y Thorpe, T.A. (1981) Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, **32**, 93-101.
- Diaz, C., Lemaître, T., Christ, A., Azzopardi, M., Kato, Y., Sato, F., Morot-Gaudry, J.-F., Le Dily, F. y Masclaux-Daubresse, C. (2008) Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in *Arabidopsis* under low nitrogen nutrition. *Plant Physiology*, **147**, 1437-1449.
- Diaz, C., Purdy, S., Christ, A., Morot-Gaudry, J.F., Wingler, A. y Masclaux-Daubresse, C. (2005) Characterization of markers to determine the extent and variability of leaf senescence in *Arabidopsis*. A metabolic profiling approach. *Plant Physiology*, **138**, 898-908.
- Diaz, C., Saliba-Colombani, V., Loudet, O., Belluomo, P., Moreau, L., Daniel-Vedele, F., Morot-Gaudry, J.-F. y Masclaux-Daubresse, C. (2006) Leaf yellowing and anthocyanin accumulation are two genetically independent strategies in response to nitrogen limitation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **47**, 74-83.
- Dietrich, D., Hammes, U., Thor, K., Suter-Grotemeyer, M., Flückiger, R., Slusarenko, A.J., Ward, J.M. y Rentsch, D. (2004) AtPTR1, a plasma membrane peptide transporter expressed during seed germination and in vascular tissue of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **40**, 488-499.
- Dietz, K.J. (1997) Functions and responses of the leaf apoplast under stress. En *Progress in Botany*. Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 221-254.
- Ding, Y., Robinson, D.G. y Jiang, L. (2014) Unconventional protein secretion (UPS) pathways in plants. *Current opinion in cell biology*, **29**, 107-115.
- Dinkeloo, K., Boyd, S. y Pilot, G. (2018) Update on amino acid transporter functions and on possible amino acid sensing mechanisms in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **74**, 105-113.
- Divya, K., Jami, S. y Kirti, P. (2010) Constitutive expression of mustard annexin, AnnBj1 enhances abiotic stress tolerance and fiber quality in cotton under stress. *Plant molecular biology*, **73**, 293-308.
- Dodd, A.N., Salathia, N., Hall, A., Kevei, E., Toth, R., Nagy, F., Hibberd, J.M., Millar, A.J. y Webb, A.A. (2005) Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science*, **309**, 630-633.

- Dominguez-Solis, J.R., He, Z., Lima, A., Ting, J., Buchanan, B.B. y Luan, S. (2008) A cyclophilin links redox and light signals to cysteine biosynthesis and stress responses in chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 16386-16391.
- Doxey, A.C., Yaish, M.W., Moffatt, B.A., Griffith, M. y McConkey, B.J. (2007) Functional divergence in the Arabidopsis beta-1,3-glucanase gene family inferred by phylogenetic reconstruction of expression states. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1045-1055.
- Doyle, E.A., Lane, A.M., Sides, J.M., Mudgett, M.B. y Monroe, J.D. (2007) An  $\alpha$ -amylase (At4g25000) in Arabidopsis leaves is secreted and induced by biotic and abiotic stress. *Plant, Cell & Environment*, **30**, 388-398.
- Dunwell, J.M., Gibbings, J.G., Mahmood, T. y Saqlan Naqvi, S. (2008) Germin and germin-like proteins: evolution, structure, and function. *Critical reviews in plant sciences*, **27**, 342-375.
- Dupoiron, S., Zischek, C., Ligat, L., Carbonne, J., Boulanger, A., de Bernonville, T.D., Lautier, M., Rival, P., Arlat, M. y Jamet, E. (2015) The N-Glycan Cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: a toolbox for sequential plant N-glycan processing. *Journal of Biological Chemistry*, **290**, 6022-6036.
- Elbers, I.J., Stoopen, G.M., Bakker, H., Stevens, L.H., Bardor, M., Molthoff, J.W., Jordi, W.J., Bosch, D. y Lommen, A. (2001) Influence of Growth Conditions and Developmental Stage on N-Glycan Heterogeneity of Transgenic Immunoglobulin G and Endogenous Proteins in Tobacco Leaves. *Plant Physiology*, **126**, 1314-1322.
- Espinoza, C., Medina, C., Somerville, S. y Arce-Johnson, P. (2007) Senescence-associated genes induced during compatible viral interactions with grapevine and Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 3197-3212.
- Fahn, A. (1974) *Plant anatomy* 2d edn. Oxford, New York: Pergamon Press.
- Faye, L., Boulaflous, A., Benchabane, M., Gomord, V. y Michaud, D. (2005) Protein modifications in the plant secretory pathway: current status and practical implications in molecular pharming. *Vaccine*, **23**, 1770-1778.
- Felle, H. (2001) pH: signal and messenger in plant cells. *Plant Biology*, **3**, 577-591.
- Felle, H., Herrmann, A., Hückelhoven, R. y Kogel, K.-H. (2005) Root-to-shoot signalling: apoplastic alkalization, a general stress response and defence factor in barley (*Hordeum vulgare*). *Protoplasma*, **227**, 17-24.
- Felle, H.H. (2006) Apoplastic pH during low-oxygen stress in barley. *Annals of Botany*, **98**, 1085-1093.
- Felle, H.H., Herrmann, A., Hanstein, S., Hückelhoven, R. y Kogel, K.-H. (2004) Apoplastic pH signaling in barley leaves attacked by the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17**, 118-123.
- Ferguson, C.H. y Simon, E. (1973) Membrane Lipids in Senescing Green Tissues2. *Journal of Experimental Botany*, **24**, 307-316.
- Fernández, M. y Gyenge, J. (2010) Técnicas de medición en ecofisiología vegetal. *Conceptos y procedimientos*. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Buenos Aires.
- Ferrari, S., Savatin, D.V., Sicilia, F., Gramegna, G., Cervone, F. y De Lorenzo, G. (2013) Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Frontiers in plant science*, **4**, 49.
- Filisetti-Cozzi, T.M. y Carpita, N.C. (1991) Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical biochemistry*, **197**, 157-162.
- Filleur, S., Dorbe, M.-F., Cerezo, M., Orsel, M., Granier, F., Gojon, A. y Daniel-Vedele, F. (2001) An Arabidopsis T-DNA mutant affected in Nrt2 genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS letters*, **489**, 220-224.
- Fischer, W.N., Loo, D.D., Koch, W., Ludewig, U., Boorer, K.J., Tegeder, M., Rentsch, D., Wright, E.M. y Frommer, W.B. (2002) Low and high affinity amino acid H<sup>+</sup>-cotransporters for cellular import of neutral and charged amino acids. *The Plant Journal*, **29**, 717-731.
- Fiume, E. y Fletcher, J.C. (2012) Regulation of Arabidopsis embryo and endosperm development by the polypeptide signaling molecule CLE8. *The Plant Cell*, **24**, 1000-1012.
- Floerl, S., Druebert, C., Majcherczyk, A., Karlovsky, P., Kües, U. y Polle, A. (2008) Defence reactions in the apoplastic proteome of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) attenuate *Verticillium longisporum* growth but not disease symptoms. *BMC Plant Biology*, **8**, 129.
- Floerl, S., Majcherczyk, A., Possienke, M., Feussner, K., Tappe, H., Gatz, C., Feussner, I., Kues, U. y Polle, A. (2012) *Verticillium longisporum* infection affects the leaf apoplastic proteome, metabolome, and cell wall properties in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, **7**, e31435.

- Flowers, T.J., Munns, R. y Colmer, T.D. (2015) Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. *Annals of Botany*, **115**, 419-431.
- Foyer, C.H. y Noctor, G. (2013) Redox signaling in plants. *Antioxidants & Redox Signaling*, **18**, 2087-2090.
- Fry, S.C. (1986) Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual review of plant physiology*, **37**, 165-186.
- Fry, S.C. (2004) Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytologist*, **161**, 641-675.
- Gaff, D. y Carr, D. (1961) The quantity of water in the cell wall and its significance. *Australian Journal of Biological Sciences*, **14**, 299-311.
- Gan, S. y Amasino, R.M. (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, **270**, 1986-1988.
- Gan, S. y Amasino, R.M. (1997) Making sense of senescence (molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence). *Plant Physiology*, **113**, 313-319.
- Gao, D., Knight, M.R., Trewavas, A.J., Sattelmacher, B. y Plieth, C. (2004) Self-reporting Arabidopsis expressing pH and [Ca<sup>2+</sup>] indicators unveil ion dynamics in the cytoplasm and in the apoplast under abiotic stress. *Plant Physiology*, **134**, 898-908.
- Gao, L.-L. y Xue, H.-W. (2012) Global analysis of expression profiles of rice receptor-like kinase genes. *Molecular plant*, **5**, 143-153.
- Gao, S., Gao, J., Zhu, X., Song, Y., Li, Z., Ren, G., Zhou, X. y Kuai, B. (2016) ABF2, ABF3, and ABF4 promote ABA-mediated chlorophyll degradation and leaf senescence by transcriptional activation of chlorophyll catabolic genes and senescence-associated genes in Arabidopsis. *Molecular plant*, **9**, 1272-1285.
- Garchery, C., Gest, N., Do, P.T., Alhagdow, M., Baldet, P., Menard, G., Rothan, C., Massot, C., Gautier, H. y Aarouf, J. (2013) A diminution in ascorbate oxidase activity affects carbon allocation and improves yield in tomato under water deficit. *Plant, Cell & Environment*, **36**, 159-175.
- Gaufichon, L., Masclaux-Daubresse, C., Tcherkez, G., Reisdorf-Cren, M., Sakakibara, Y., Hase, T., Clement, G., Avice, J.C., Grandjean, O., Marmagne, A., Boutet-Mercey, S., Azzopardi, M., Soulay, F. y Suzuki, A. (2013) Arabidopsis thaliana ASN2 encoding asparagine synthetase is involved in the control of nitrogen assimilation and export during vegetative growth. *Plant, Cell & Environment*, **36**, 328-342.
- Ge, W., Song, Y., Zhang, C., Zhang, Y., Burlingame, A.L. y Guo, Y. (2011) Proteomic analyses of apoplastic proteins from germinating Arabidopsis thaliana pollen. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1814**, 1964-1973.
- Geilfus, C.M. (2017) The pH of the Apoplast: Dynamic Factor with Functional Impact Under Stress. *Molecular Plant*, **10**, 1371-1386.
- Geilfus, C.M., Mithofer, A., Ludwig-Muller, J., Zorb, C. y Muehling, K.H. (2015) Chloride-inducible transient apoplastic alkalizations induce stomata closure by controlling abscisic acid distribution between leaf apoplast and guard cells in salt-stressed *Vicia faba*. *New Phytologist*, **208**, 803-816.
- Geilfus, C.M. y Muhling, K.H. (2011) Real-Time Imaging of Leaf Apoplastic pH Dynamics in Response to NaCl Stress. *Frontiers in Plant Science*, **2**, 13.
- Genoud, T., Buchala, A.J., Chua, N.H. y Métraux, J.P. (2002) Phytochrome signalling modulates the SA-perceptive pathway in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **31**, 87-95.
- Gepstein, S., Sabehi, G., Carp, M.J., Hajouj, T., Neshler, M.F.O., Yariv, I., Dor, C. y Bassani, M. (2003) Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *The Plant Journal*, **36**, 629-642.
- Gibon, Y., Usadel, B., Blaesing, O.E., Kamlage, B., Hoehne, M., Trethewey, R. y Stitt, M. (2006) Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in Arabidopsis rosettes. *Genome Biology*, **7**, R76.
- Gilroy, E.M., Hein, I., Van Der Hoorn, R., Boevink, P.C., Venter, E., McLellan, H., Kaffarnik, F., Hrubikova, K., Shaw, J. y Holeva, M. (2007) Involvement of cathepsin B in the plant disease resistance hypersensitive response. *The Plant Journal*, **52**, 1-13.
- Gjetting, K.S., Ytting, C.K., Schulz, A. y Fuglsang, A.T. (2012) Live imaging of intra- and extracellular pH in plants using pHusion, a novel genetically encoded biosensor. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 3207-3218.

- Godfrey, D., Able, A.J. y Dry, I.B. (2007) Induction of a grapevine germin-like protein (VvGLP3) gene is closely linked to the site of Erysiphe necator infection: a possible role in defense? *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **20**, 1112-1125.
- Golldack, D., Popova, O.V. y Dietz, K.-J. (2002) Mutation of the matrix metalloproteinase At2-MMP inhibits growth and causes late flowering and early senescence in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 5541-5547.
- González, L. y González-Vilar, M. (2001) Determination of relative water content. En *Handbook of plant ecophysiology techniques*. Dordrecht: Springer, pp. 207-212.
- Goulas, E., Schubert, M., Kieselbach, T., Kleczkowski, L.A., Gardeström, P., Schröder, W. y Hurry, V. (2006) The chloroplast lumen and stromal proteomes of Arabidopsis thaliana show differential sensitivity to short-and long-term exposure to low temperature. *The Plant Journal*, **47**, 720-734.
- Grenier, J., Potvin, C., Trudel, J. y Asselin, A. (1999) Some thaumatin-like proteins hydrolyse polymeric  $\beta$ -1, 3-glucans. *The Plant Journal*, **19**, 473-480.
- Grignon, C. y Sentenac, H. (1991) pH and ionic conditions in the apoplast. *Annual review of plant biology*, **42**, 103-128.
- Guerra-Guimarães, L., Pinheiro, C., Chaves, I., Barros, D.R. y Ricardo, C.P. (2016) Protein dynamics in the plant extracellular space. *Proteomes*, **4**, 22.
- Guerra-Guimarães, L., Tenente, R., Pinheiro, C., Chaves, I., Silva Mdo, C., Cardoso, F.M., Planchon, S., Barros, D.R., Renaut, J. y Ricardo, C.P. (2015) Proteomic analysis of apoplastic fluid of *Coffea arabica* leaves highlights novel biomarkers for resistance against *Hemileia vastatrix*. *Frontiers in Plant Science*, **6**, 478.
- Guiboileau, A., Avila-Ospina, L., Yoshimoto, K., Soulay, F., Azzopardi, M., Marmagne, A., Lothier, J. y 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., Sormani, R., Meyer, C. y Masclaux-Daubresse, C. (2010) Senescence and death of plant organs: nutrient recycling and developmental regulation. *Comptes rendus biologiques*, **333**, 382-391.
- Guiboileau, A., Yoshimoto, K., Soulay, F., Bataillé, M.P., Avice, J.C. y 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.
- Gully, K., Hander, T., Boller, T. y Bartels, S. (2015) Perception of Arabidopsis AtPep peptides, but not bacterial elicitors, accelerates starvation-induced senescence. *Frontiers in plant science*, **6**, 14.
- Guo, P., Li, Z., Huang, P., Li, B., Fang, S., Chu, J. y Guo, H. (2017) A Tripartite Amplification Loop Involving the Transcription Factor WRKY75, Salicylic Acid, and Reactive Oxygen Species Accelerates Leaf Senescence. *The Plant Cell*, **29**, 2854-2870.
- Guo, Y. y Gan, S.-S. (2012) Convergence and divergence in gene expression profiles induced by leaf senescence and 27 senescence-promoting hormonal, pathological and environmental stress treatments. *Plant, Cell & Environment*, **35**, 644-655.
- Hager, A. (2003) Role of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *Journal of Plant Research*, **116**, 483-505.
- Hajouj, T., Michelis, R. y Gepstein, S. (2000) Cloning and characterization of a receptor-like protein kinase gene associated with senescence. *Plant Physiology*, **124**, 1305-1314.
- Hammes, U.Z., Nielsen, E., Honaas, L.A., Taylor, C.G. y Schachtman, D.P. (2006) AtCAT6, a sink-tissue-localized transporter for essential amino acids in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **48**, 414-426.
- Hamouda, I., Badri, M., Mejri, M., Cruz, C., Siddique, K. y Hessini, K. (2016) Salt tolerance of *Beta macrocarpa* is associated with efficient osmotic adjustment and increased apoplastic water content. *Plant Biology*, **18**, 369-375.
- Harbron, S., Foyer, C. y Walker, D. (1981) The purification and properties of sucrose-phosphate synthetase from spinach leaves: the involvement of this enzyme and fructose biphosphatase in the regulation of sucrose biosynthesis. *Archives of biochemistry and biophysics*, **212**, 237-246.
- Hartung, W., Radin, J.W. y Hendrix, D.L. (1988) Abscisic Acid Movement into the Apoplastic solution of Water-Stressed Cotton Leaves: Role of Apoplastic pH. *Plant Physiology*, **86**, 908-913.
- Haruta, M., Sabat, G., Stecker, K., Minkoff, B.B. y Sussman, M.R. (2014) A peptide hormone and its receptor protein kinase regulate plant cell expansion. *Science*, **343**, 408-411.
- Havé, M., Balliau, T., Cottyn-Boitte, B., Déron, E., Cuff, G., Soulay, F., Lornac, A., Reichman, P., Dissmeyer, N. y Avice, J.-C. (2018) Increases in activity of proteasome and papain-like cysteine

- protease in Arabidopsis autophagy mutants: back-up compensatory effect or cell-death promoting effect? *Journal of Experimental Botany*, **69**, 1369-1385.
- Havé, M., Marmagne, A., Chardon, F. y Masclaux-Daubresse, C.** (2016) Nitrogen remobilization during leaf senescence: lessons from Arabidopsis to crops. *Journal of Experimental Botany*, **68**, 2513-2529.
- Hayashi, K., Hiradate, S., Ishikawa, S. y Nouchi, I.** (2008) Ammonia exchange between rice leaf blades and the atmosphere: effect of broadcast urea and changes in xylem sap and leaf apoplastic ammonium concentrations. *Soil Science & Plant Nutrition*, **54**, 807-818.
- Hayashi, Y., Takahashi, K., Inoue, S.-i. y Kinoshita, T.** (2014) Abscisic acid suppresses hypocotyl elongation by dephosphorylating plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, **55**, 845-853.
- Hebert, D.N., Lamriben, L., Powers, E.T. y Kelly, J.W.** (2014) The intrinsic and extrinsic effects of N-linked glycans on glycoproteostasis. *Nature chemical biology*, **10**, 902-910.
- Himelblau, E. y Amasino, R.M.** (2001) Nutrients mobilized from leaves of Arabidopsis thaliana during leaf senescence. *Journal of Plant Physiology*, **158**, 1317-1323.
- Hinder, B., Schellenberg, M., Rodoni, S., Ginsburg, S., Vogt, E., Martinoia, E., Matile, P. y Hörtensteiner, S.** (1996) How Plants Dispose of Chlorophyll Catabolites: Directly Energized Uptake Of Tetrapyrrolic Breakdown Products Into Isolated Vacuoles. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 27233-27236.
- Hohl, M. y 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.
- Hooper, C.M., Castleden, I.R., Tanz, S.K., Aryamanesh, N. y Millar, A.H.** (2016) SUBA4: the interactive data analysis centre for Arabidopsis subcellular protein locations. *Nucleic Acids Research*, **45**, D1064-D1074.
- Horemans, N., Foyer, C.H. y Asard, H.** (2000) Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends in plant science*, **5**, 263-267.
- Hortensteiner, S. y Feller, U.** (2002) Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 927-937.
- Hoson, T.** (1998) Apoplast as the site of response to environmental signals. *Journal of Plant Research*, **111**, 167-177.
- Hu, X., Jiang, M., Zhang, A. y Lu, J.** (2005) Abscisic acid-induced apoplastic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. *Planta*, **223**, 57-68.
- Huang, S., Nelson, C.J., Li, L., Taylor, N.L., Ströher, E., Petereit, J. y Millar, A.H.** (2015) INTERMEDIATE CLEAVAGE PEPTIDASE55 modifies enzyme amino termini and alters protein stability in Arabidopsis mitochondria. *Plant Physiology*, **168**, 415-427.
- Huffaker, A. y Ryan, C.A.** (2007) Endogenous peptide defense signals in Arabidopsis differentially amplify signaling for the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 10732-10736.
- Hurley, B.A., Tran, H.T., Marty, N.J., Park, J., Snedden, W.A., Mullen, R.T. y Plaxton, W.C.** (2010) The dual-targeted purple acid phosphatase isozyme AtPAP26 is essential for efficient acclimation of Arabidopsis to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiology*, **153**, 1112-1122.
- Husted, S. y Schjoerring, J.K.** (1995) Apoplastic pH and Ammonium Concentration in Leaves of *Brassica napus* L. *Plant Physiology*, **109**, 1453-1460.
- Iiyama, K., Lam, T.B.-T. y Stone, B.A.** (1994) Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiology*, **104**, 315-320.
- Initiative, T.A.G.** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**, 796-815.
- Ishida, H., Yoshimoto, K., Izumi, M., Reisen, D., Yano, Y., Makino, A., Ohsumi, Y., Hanson, M.R. y Mae, T.** (2008) Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiology*, **148**, 142-155.
- Ishikawa, A., Tanaka, H., Nakai, M. y Asahi, T.** (2003) Deletion of a chaperonin 60 $\beta$  gene leads to cell death in the Arabidopsis lesion initiation 1 mutant. *Plant and Cell Physiology*, **44**, 255-261.
- Izumi, M., Ishida, H., Nakamura, S. y Hidema, J.** (2017) Entire photodamaged chloroplasts are transported to the central vacuole by autophagy. *The Plant Cell*, **29**, 377-394.

- Jamai, A., Salomé, P.A., Schilling, S.H., Weber, A.P. y McClung, C.R. (2009) Arabidopsis photorespiratory serine hydroxymethyltransferase activity requires the mitochondrial accumulation of ferredoxin-dependent glutamate synthase. *The Plant Cell*, **21**, 595-606.
- Jamet, E., Canut, H., Boudart, G. y Pont-Lezica, R.F. (2006) Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends in plant science*, **11**, 33-39.
- Jami, S.K., Clark, G.B., Turlapati, S.A., Handley, C., Roux, S.J. y Kirti, P.B. (2008) Ectopic expression of an annexin from *Brassica juncea* confers tolerance to abiotic and biotic stress treatments in transgenic tobacco. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**, 1019-1030.
- Jami, S.K., Dalal, A., Divya, K. y Kirti, P. (2009) Molecular cloning and characterization of five annexin genes from Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern and Coss). *Plant Physiology and Biochemistry*, **47**, 977-990.
- Jia, W. y Davies, W.J. (2007) Modification of leaf apoplastic pH in relation to stomatal sensitivity to root-sourced abscisic acid signals. *Plant Physiology*, **143**, 68-77.
- Jiang, L., He, L. y Fountoulakis, M. (2004) Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *Journal of Chromatography A*, **1023**, 317-320.
- Jie, W., Dashi, Y., XinHong, G. y Xuanming, L. (2009) Arabidopsis AMY1 expressions and early flowering mutant phenotype. *BMB reports*, **42**, 101-105.
- Jin, J., Hewezi, T. y Baum, T.J. (2011) Arabidopsis peroxidase AtPRX53 influences cell elongation and susceptibility to *Heterodera schachtii*. *Plant Signaling & Behavior*, **6**, 1778-1786.
- Jin, Y., Ni, D.-A. y Ruan, Y.-L. (2009) Posttranslational elevation of cell wall invertase activity by silencing its inhibitor in tomato delays leaf senescence and increases seed weight and fruit hexose level. *The Plant Cell*, **21**, 2072-2089.
- Jing, H.C., Sturre, M.J., Hille, J. y Dijkwel, P.P. (2002) Arabidopsis onset of leaf death mutants identify a regulatory pathway controlling leaf senescence. *The Plant Journal*, **32**, 51-63.
- Jing, S., Zhou, X., Song, Y. y Yu, D. (2009) Heterologous expression of OsWRKY23 gene enhances pathogen defense and dark-induced leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Growth Regulation*, **58**, 181-190.
- John, C., Morris, K., Jordan, B., Thomas, B. y A-H-Mackerness, S. (2001) Ultraviolet-B exposure leads to up-regulation of senescence-associated genes in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, **52**, 1367-1373.
- Jones, A.M., Thomas, V., Bennett, M.H., Mansfield, J. y Grant, M. (2006) Modifications to the Arabidopsis defense proteome occur prior to significant transcriptional change in response to inoculation with *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiology*, **142**, 1603-1620.
- Ju, Y., Liu, C., Lu, W. y Zhang, Q. (2016) Arabidopsis mitochondrial protein slow embryo development1 is essential for embryo development. *Biochemical and biophysical research communications*, **474**, 371-376.
- Jung, J., Kumar, K., Lee, H.Y., Park, Y.-I., Cho, H.-T. y Ryu, S. (2012) Translocation of phospholipase A2 $\alpha$  to apoplasts is modulated by developmental stages and bacterial infection in Arabidopsis. *Frontiers in plant science*, **3**, 126.
- Jung, Y.-H., Jeong, S.-H., Kim, S.H., Singh, R., Lee, J.-e., Cho, Y.-S., Agrawal, G.K., Rakwal, R. y Jwa, N.-S. (2008) Systematic secretome analyses of rice leaf and seed callus suspension-cultured cells: workflow development and establishment of high-density two-dimensional gel reference maps. *Journal of proteome research*, **7**, 5187-5210.
- Juvany, M., Müller, M. y Munné-Bosch, S. (2013) Photo-oxidative stress in emerging and senescing leaves: a mirror image? *Journal of Experimental Botany*, **64**, 3087-3098.
- Kaffarnik, F.A., Jones, A.M., Rathjen, J.P. y Peck, S.C. (2009) Effector proteins of the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* alter the extracellular proteome of the host plant, *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & Cellular Proteomics*, **8**, 145-156.
- Kaiser, B.N., Rawat, S.R., Siddiqi, M.Y., Masle, J. y Glass, A.D. (2002) Functional analysis of an Arabidopsis T-DNA "knockout" of the high-affinity NH $_4^+$  transporter AtAMT1; 1. *Plant Physiology*, **130**, 1263-1275.
- Kang, J.S., Frank, J., Kang, C.H., Kajiura, H., Vikram, M., Ueda, A., Kim, S., Bahk, J.D., Triplett, B. y Fujiyama, K. (2008) Salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* requires maturation of N-glycosylated proteins in the Golgi apparatus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 5933-5938.
- Kaurilind, E. y Brosché, M. (2017) Stress Marker Signatures in Lesion Mimic Single and Double Mutants Identify a Crucial Leaf Age-Dependent Salicylic Acid Related Defense Signal. *PLoS One*, **12**, e0170532.

- Kawano, T.** (2003) Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Reports*, **21**, 829-837.
- Keller, B.** (1993) Structural cell wall proteins. *Plant Physiology*, **101**, 1127-1130.
- Khan, M., Rozhon, W. y Poppenberger, B.** (2014) The role of hormones in the aging of plants - a mini-review. *Gerontology*, **60**, 49-55.
- Kiba, T., Fera-Bourrellier, A.-B., Lafouge, F., Lezhneva, L., Boutet-Mercey, S., Orsel, M., Bréhaut, V., Miller, A., Daniel-Vedele, F. y Sakakibara, H.** (2012) The Arabidopsis nitrate transporter NRT2.4 plays a double role in roots and shoots of nitrogen-starved plants. *The Plant Cell*, **24**, 245-258.
- Kim, S.T., Kang, Y.H., Wang, Y., Wu, J., Park, Z.Y., Rakwal, R., Agrawal, G.K., Lee, S.Y. y Kang, K.Y.** (2009) Secretome analysis of differentially induced proteins in rice suspension-cultured cells triggered by rice blast fungus and elicitor. *Proteomics*, **9**, 1302-1313.
- Kissen, R., Winge, P., Tran, D.H.T., Jørstad, T.S., Størseth, T.R., Christensen, T. y Bones, A.M.** (2010) Transcriptional profiling of an Fd-GOGAT1/GLU1 mutant in Arabidopsis thaliana reveals a multiple stress response and extensive reprogramming of the transcriptome. *BMC Genomics*, **11**, 190.
- Kleffmann, T., Russenberger, D., von Zychlinski, A., Christopher, W., Sjölander, K., Gruissem, W. y Baginsky, S.** (2004) The Arabidopsis thaliana chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Current Biology*, **14**, 354-362.
- Klement, Z.** (1965) Method of obtaining fluid from the intercellular spaces of foliage and the fluid's merit as substrate for phyto-bacterial pathogens. *Phytopathology*, **55**, 1033-1034.
- Klepper, B. y Barrs, H.D.** (1968) Effects of salt secretion on psychrometric determinations of water potential of cotton leaves. *Plant Physiology*, **43**, 1138-1140.
- Knoblauch, M., Knoblauch, J., Mullendore, D.L., Savage, J.A., Babst, B.A., Beecher, S.D., Dodgen, A.C., Jensen, K.H. y Holbrook, N.M.** (2016) Testing the Münch hypothesis of long distance phloem transport in plants. *Elife*, **5**, e15341.
- Koch, W., Kwart, M., Laubner, M., Heineke, D., Stransky, H., Frommer, W.B. y Tegeder, M.** (2003) Reduced amino acid content in transgenic potato tubers due to antisense inhibition of the leaf H<sup>+</sup>/amino acid symporter StAAP1. *The Plant Journal*, **33**, 211-220.
- Koiwai, A., Matsuzaki, T., Suzuki, F. y Kawashima, N.** (1981) Changes in total and polar lipids and their fatty acid composition in tobacco leaves during growth and senescence. *Plant and Cell Physiology*, **22**, 1059-1065.
- Kondo, Y., Ito, T., Nakagami, H., Hirakawa, Y., Saito, M., Tamaki, T., Shirasu, K. y Fukuda, H.** (2014) Plant GSK3 proteins regulate xylem cell differentiation downstream of TDIF-TDR signalling. *Nature communications*, **5**, 3504.
- Kong, L., Anderson, J.M. y Ohm, H.W.** (2005) Induction of wheat defense and stress-related genes in response to *Fusarium graminearum*. *Genome*, **48**, 29-40.
- Krapp, A.** (2015) Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Current opinion in plant biology*, **25**, 115-122.
- Krause, C., Richter, S., Knöll, C. y Jürgens, G.** (2013) Plant secretome—from cellular process to biological activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, **1834**, 2429-2441.
- Kreps, J.A. y Kay, S.A.** (1997) Coordination of Plant Metabolism and Development by the Circadian Clock. *The Plant Cell*, **9**, 1235-1244.
- Krupinska, K.** (2007) Fate and activities of plastids during leaf senescence. En *The structure and function of plastids. Advances in photosynthesis and respiration*. Dordrecht: Springer, pp. 433-449.
- Ladwig, F., Stahl, M., Ludewig, U., Hirner, A.A., Hammes, U.Z., Stadler, R., Harter, K. y Koch, W.** (2012) Siliques are Red1 from Arabidopsis acts as a bidirectional amino acid transporter that is crucial for the amino acid homeostasis of siliques. *Plant Physiology*, **158**, 1643-1655.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lalonde, S., Tegeder, M., Throne-Holst, M., Frommer, W. y Patrick, J.** (2003) Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant, Cell & Environment*, **26**, 37-56.
- Lam, H.-M., Wong, P., Chan, H.-K., Yam, K.-M., Chen, L., Chow, C.-M. y Coruzzi, G.M.** (2003) Overexpression of the ASN1 gene enhances nitrogen status in seeds of Arabidopsis. *Plant Physiology*, **132**, 926-935.

- Lamb, C. y Dixon, R.A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual review of plant biology*, **48**, 251-275.
- Lannoo, N. y Van Damme, E.J. (2015) Review/N-glycans: The making of a varied toolbox. *Plant Science*, **239**, 67-83.
- Lara, M.E.B., Garcia, M.-C.G., Fatima, T., Ehneß, R., Lee, T.K., Proels, R., Tanner, W. y Roitsch, T. (2004) Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *The Plant Cell*, **16**, 1276-1287.
- Latif, M., Akram, N. y Ashraf, M. (2016) Regulation of some biochemical attributes in drought-stressed cauliflower (*Brassica oleracea* L.) by seed pre-treatment with ascorbic acid. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **91**, 129-137.
- Law, S.R., Chrobok, D., Juvany, M., Delhomme, N., Lindén, P., Brouwer, B., Ahad, A., Moritz, T., Jansson, S., Gardestrom, P. y Keech, O. (2018) Darkened leaves use different metabolic strategies for senescence and survival. *Plant Physiology*, **177**, 132-150.
- Lee, I.C., Hong, S.W., Whang, S.S., Lim, P.O., Nam, H.G. y Koo, J.C. (2011) Age-dependent action of an ABA-inducible receptor kinase, RPK1, as a positive regulator of senescence in Arabidopsis leaves. *Plant and Cell Physiology*, **52**, 651-662.
- Lee, R.H., Wang, C.H., Huang, L.T. y Chen, S.C. (2001) Leaf senescence in rice plants: cloning and characterization of senescence up-regulated genes. *Journal of Experimental Botany*, **52**, 1117-1121.
- Lee, S., Lee, E.J., Yang, E.J., Lee, J.E., Park, A.R., Song, W.H. y Park, O.K. (2004) Proteomic identification of annexins, calcium-dependent membrane binding proteins that mediate osmotic stress and abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **16**, 1378-1391.
- León, P. y Sheen, J. (2003) Sugar and hormone connections. *Trends in plant science*, **8**, 110-116.
- Li, F., Chung, T., Pennington, J.G., Federico, M.L., Kaeppler, H.F., Kaeppler, S.M., Otegui, M.S. y Vierstra, R.D. (2015) Autophagic recycling plays a central role in maize nitrogen remobilization. *The Plant Cell*, **27**, 1389-1408.
- Li, J., Zhong, R. y Palva, E.T. (2017) WRKY70 and its homolog WRKY54 negatively modulate the cell wall-associated defenses to necrotrophic pathogens in Arabidopsis. *PLoS One*, **12**, e0183731.
- Li, X.-P., Gan, R., Li, P.-L., Ma, Y.-Y., Zhang, L.-W., Zhang, R., Wang, Y. y Wang, N.N. (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, Z.C., McClure, J.W. y Hagerman, A.E. (1989) Soluble and Bound Apoplastic Activity for Peroxidase, beta-d-Glucosidase, Malate Dehydrogenase, and Nonspecific Arylesterase, in Barley (*Hordeum vulgare* L.) and Oat (*Avena sativa* L.) Primary Leaves. *Plant Physiology*, **90**, 185-190.
- Lichtenthaler, H.K. y Miehé, J.A. (1997) Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends in plant science*, **2**, 316-320.
- Lim, P.O., Kim, H.J. y Nam, H.G. (2007) Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology*, **58**, 115-136.
- Lin, J.F. y Wu, S.H. (2004) Molecular events in senescing Arabidopsis leaves. *The Plant Journal*, **39**, 612-628.
- Ling, Q., Huang, W. y Jarvis, P. (2011) Use of a SPAD-502 meter to measure leaf chlorophyll concentration in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthesis Research*, **107**, 209-214.
- Linthorst, H.J. y Van Loon, L. (1991) Pathogenesis-related proteins of plants. *Critical reviews in plant sciences*, **10**, 123-150.
- Lippuner, V., Chou, I.T., Scott, S.V., Ettinger, W.F., Theg, S.M. y Gasser, C.S. (1994) Cloning and characterization of chloroplast and cytosolic forms of cyclophilin from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 7863-7868.
- Liu, C., Niu, G., Zhang, H., Sun, Y., Sun, S., Yu, F., Lu, S., Yang, Y., Li, J. y Hong, Z. (2018) Trimming of N-Glycans by the Golgi-Localized  $\alpha$ -1, 2-Mannosidases, MNS1 and MNS2, Is Crucial for Maintaining RSW2 Protein Abundance during Salt Stress in Arabidopsis. *Molecular plant*, **11**, 678-690.
- Lloyd, J.C. y Zakhleniuk, O.V. (2004) Responses of primary and secondary metabolism to sugar accumulation revealed by microarray expression analysis of the Arabidopsis mutant, *pho3*. *Journal of Experimental Botany*, **55**, 1221-1230.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. y Darnell, J. (2000) *Molecular cell biology* 4th edn. New York: W.H. Freeman.
- Lohaus, G., Hussmann, M., Pennewiss, K., Schneider, H., Zhu, J.J. y Sattelmacher, B. (2000) Solute balance of a maize (*Zea mays* L.) source leaf as affected by salt treatment with special emphasis on phloem retranslocation and ion leaching. *Journal of Experimental Botany*, **51**, 1721-1732.

- Lohaus, G., Pennewiss, K., Sattelmacher, B., Hussmann, M. y Hermann Muehling, K. (2001) Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiologia Plantarum*, **111**, 457-465.
- Lohaus, G., Winter, H., Riens, B. y Heldt, H. (1995) Further studies of the phloem loading process in leaves of barley and spinach. The comparison of metabolite concentrations in the apoplastic compartment with those in the cytosolic compartment and in the sieve tubes. *Plant Biology*, **108**, 270-275.
- Long, J.M. y Widders, I.E. (1990) Quantification of Apoplastic Potassium Content by Elution Analysis of Leaf Lamina Tissue from Pea (*Pisum sativum* L. cv Argenteum). *Plant Physiology*, **94**, 1040-1047.
- Lopez-Millan, A.F., Morales, F., Abadia, A. y Abadia, J. (2000) Effects of iron deficiency on the composition of the leaf apoplastic fluid and xylem sap in sugar beet. Implications for iron and carbon transport. *Plant Physiology*, **124**, 873-884.
- Loqué, D., Yuan, L., Kojima, S., Gojon, A., Wirth, J., Gazzarrini, S., Ishiyama, K., Takahashi, H. y Von Wirén, N. (2006) Additive contribution of AMT1; 1 and AMT1; 3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient Arabidopsis roots. *The Plant Journal*, **48**, 522-534.
- Lynch, M.A. y Staehelin, L. (1995) Immunocytochemical localization of cell wall polysaccharides in the root tip of *Avena sativa*. *Protoplasma*, **188**, 115-127.
- Mäder, M. y Schloss, P. (1979) Isolation of malate dehydrogenase from cell walls of *Nicotiana tabacum*. *Plant Science Letters*, **17**, 75-80.
- Mammarella, N.D., Cheng, Z., Fu, Z.Q., Daudi, A., Bolwell, G.P., Dong, X. y Ausubel, F.M. (2015) Apoplastic peroxidases are required for salicylic acid-mediated defense against *Pseudomonas syringae*. *Phytochemistry*, **112**, 110-121.
- Mao, C., Lu, S., Lv, B., Zhang, B., Shen, J., He, J., Luo, L., Xi, D., Chen, X. y Ming, F. (2017) A rice NAC transcription factor promotes leaf senescence via ABA biosynthesis. *Plant Physiology*, **174**, 1747-1763.
- Marina, M., Maiale, S.J., Rossi, F.R., Romero, M.F., Rivas, E.I., Gárriz, A., Ruiz, O.A. y Pieckenstein, F.L. (2008) Apoplastic polyamine oxidation plays different roles in local responses of tobacco to infection by the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* and the biotrophic bacterium *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Physiology*, **147**, 2164-2178.
- Marschner, H., Römheld, V., Horst, W. y Martin, P. (1986) Root-induced changes in the rhizosphere: Importance for the mineral nutrition of plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **149**, 441-456.
- Marshall, R.S. y Vierstra, R.D. (2018) Autophagy: The Master of Bulk and Selective Recycling. *Annual Review of Plant Biology*, **69**, 173-208.
- Martin, A., Lee, J., Kichey, T., Gerentes, D., Zivy, M., Tatout, C., Dubois, F., Balliau, T., Valot, B. y Davanture, M. (2006) Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. *The Plant Cell*, **18**, 3252-3274.
- Martínez, D.E., Bartoli, C.G., Grbic, V. y Guamet, J.J. (2007a) Vacuolar cysteine proteases of wheat (*Triticum aestivum* L.) are common to leaf senescence induced by different factors. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 1099-1107.
- Martínez, D.E., Borniego, M.L., Battchikova, N., Aro, E.M., Tyystjarvi, E. y Guamet, J.J. (2015) SASP, a Senescence-Associated Subtilisin Protease, is involved in reproductive development and determination of silique number in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, **66**, 161-174.
- Martínez, D.E., Costa, M.L., Gomez, F.M., Otegui, M.S. y Guamet, J.J. (2008) 'Senescence-associated vacuoles' are involved in the degradation of chloroplast proteins in tobacco leaves. *The Plant Journal*, **56**, 196-206.
- Martínez, D.E., Costa, M.L. y Guamet, J.J. (2008) Senescence-associated degradation of chloroplast proteins inside and outside the organelle. *Plant Biology*, **10**, 15-22.
- Martínez, D.E. y Guamet, J.J. (2014) Senescence-related changes in the leaf apoplast. *Journal of plant growth regulation*, **33**, 44-55.
- Martínez, J.-P., Silva, H., Ledent, J.-F. y Pinto, M. (2007b) Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Journal of Agronomy*, **26**, 30-38.
- Masclaux-Daubresse, C., Chen, Q. y Havé, M. (2017) Regulation of nutrient recycling via autophagy. *Current opinion in plant biology*, **39**, 8-17.

- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L. y Suzuki, A. (2010) Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany*, **105**, 1141-1157.
- Masclaux-Daubresse, C., Reisdorf-Cren, M., Pageau, K., Lelandais, M., Grandjean, O., Kronenberger, J., Valadier, M.-H., Feraud, M., Jouglet, T. y Suzuki, A. (2006) Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. *Plant Physiology*, **140**, 444-456.
- Masclaux-Daubresse, C., Reisdorf-Cren, M. y Orsel, M. (2008) Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. *Plant Biology*, **10**, 23-36.
- Masclaux, C., Valadier, M.H., Brugiere, N., Morot-Gaudry, J.F. y Hirel, B. (2000) Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta*, **211**, 510-518.
- Matile, P., Ginsburg, S., Schellenberg, M. y Thomas, H. (1988) Catabolites of chlorophyll in senescing barley leaves are localized in the vacuoles of mesophyll cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **85**, 9529-9532.
- Matsuzaki, Y., Ogawa-Ohnishi, M., Mori, A. y Matsubayashi, Y. (2010) Secreted peptide signals required for maintenance of root stem cell niche in Arabidopsis. *Science*, **329**, 1065-1067.
- Mattsson, M. y Schjoerring, J.K. (2003) Senescence-induced changes in apoplastic and bulk tissue ammonia concentrations of ryegrass leaves. *New Phytologist*, **160**, 489-499.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B. y Boller, T. (1988) Antifungal hydrolases in pea tissue: II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase. *Plant Physiology*, **88**, 936-942.
- Maxwell, K. y Johnson, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence--a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, **51**, 659-668.
- McLellan, H., Gilroy, E.M., Yun, B.W., Birch, P.R. y Loake, G.J. (2009) Functional redundancy in the Arabidopsis Cathepsin B gene family contributes to basal defence, the hypersensitive response and senescence. *New Phytologist*, **183**, 408-418.
- Meinzer, F.C. y Moore, P.H. (1988) Effect of apoplastic solutes on water potential in elongating sugarcane leaves. *Plant Physiology*, **86**, 873-879.
- Michaeli, S., Galili, G., Genschik, P., Fernie, A.R. y Avin-Wittenberg, T. (2016) Autophagy in plants--what's new on the menu? *Trends in plant science*, **21**, 134-144.
- Michaeli, S., Honig, A., Levanony, H., Peled-Zehavi, H. y Galili, G. (2014) Arabidopsis ATG8-INTERACTING PROTEIN1 is involved in autophagy-dependent vesicular trafficking of plastid proteins to the vacuole. *The Plant Cell*, **26**, 4084-4101.
- Miller, J.D., Arteca, R.N. y Pell, E.J. (1999) Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **120**, 1015-1024.
- Minic, Z., Jamet, E., Negróni, L., Arsene der Garabedian, P., Zivy, M. y Jouanin, L. (2007) A sub-proteome of *Arabidopsis thaliana* mature stems trapped on Concanavalin A is enriched in cell wall glycoside hydrolases. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 2503-2512.
- Misas-Villamil, J.C., Hoorn, R.A. y Doehlemann, G. (2016) Papain-like cysteine proteases as hubs in plant immunity. *New Phytologist*, **212**, 902-907.
- Mishina, T.E. y Zeier, J. (2007) Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **50**, 500-513.
- Mittler, R. y Lam, E. (1996) Sacrifice in the face of foes: pathogen-induced programmed cell death in plants. *Trends in microbiology*, **4**, 10-15.
- Mohapatra, P.K., Patro, L., Raval, M.K., Ramaswamy, N.K., Biswal, U.C. y Biswal, B. (2010) Senescence-induced loss in photosynthesis enhances cell wall  $\beta$ -glucosidase activity. *Physiologia Plantarum*, **138**, 346-355.
- Montrichard, F., Alkhalfioui, F., Yano, H., Vensel, W.H., Hurkman, W.J. y Buchanan, B.B. (2009) Thioredoxin targets in plants: the first 30 years. *Journal of proteomics*, **72**, 452-474.
- Moremen, K.W., Tiemeyer, M. y Nairn, A.V. (2012) Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nature reviews Molecular cell biology*, **13**, 448-462.
- Morris, K., Mackerness, S.A.H., Page, T., John, C.F., Murphy, A.M., Carr, J.P. y Buchanan-Wollaston, V. (2000) Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *The Plant Journal*, **23**, 677-685.
- Moschou, P.N., Paschalidis, K.A., Delis, I.D., Andriopoulou, A.H., Lagiotis, G.D., Yakoumakis, D.I. y Roubelakis-Angelakis, K.A. (2008) Spermidine exodus and oxidation in the apoplast induced by

- abiotic stress is responsible for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signatures that direct tolerance responses in tobacco. *The Plant Cell*, **20**, 1708-1724.
- Mühling, K.H., Wimmer, M. y Goldbach, H.E.** (1998) Apoplastic and membrane-associated Ca<sup>2+</sup> in leaves and roots as affected by boron deficiency. *Physiologia Plantarum*, **102**, 179-184.
- Mukhtar, A., Akram, N., Ashraf, M., Shafiq, S. y Aisha, R.** (2016) Foliar-applied ascorbic acid enhances antioxidative potential and drought tolerance in cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. Botrytis). *Agrochimica*, **60**, 100-113.
- Müller, B., Fastner, A., Karmann, J., Mansch, V., Hoffmann, T., Schwab, W., Suter-Grotemeyer, M., Rentsch, D., Truernit, E. y Ladwig, F.** (2015) Amino acid export in developing Arabidopsis seeds depends on UmamiT facilitators. *Current Biology*, **25**, 3126-3131.
- Münch, E.** (1930) Material flow in plants. Translated 2003 by Milburn JA and Kreeb KH, University of Bremen. Jena, Germany: Gustav Fischer Verlag.
- Munné-Bosch, S. y Alegre, L.** (2004) Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology*, **31**, 203-216.
- Munné-Bosch, S., Jubany-Marí, T. y Alegre, L.** (2001) Drought-induced senescence is characterized by a loss of antioxidant defences in chloroplasts. *Plant, Cell & Environment*, **24**, 1319-1327.
- Muñoz, P. y Munné-Bosch, S.** (2018) Photo-Oxidative Stress during Leaf, Flower and Fruit Development. *Plant Physiology*, **176**, 1004-1014.
- Nam, H.G.** (1997) The molecular genetic analysis of leaf senescence. *Current Opinion in Biotechnology*, **8**, 200-207.
- Nardi, C.F., Villarreal, N.M., Rossi, F.R., Martinez, S., Martinez, G.A. y Civello, P.M.** (2015) Overexpression of the carbohydrate binding module of strawberry expansin2 in *Arabidopsis thaliana* modifies plant growth and cell wall metabolism. *Plant Molecular Biology*, **88**, 101-117.
- Naz, H., Akram, N.A. y Ashraf, M.** (2016) Impact of ascorbic acid on growth and some physiological attributes of cucumber (*Cucumis sativus*) plants under water-deficit conditions. *Pakistan Journal of Botany*, **48**, 877-883.
- Nguyen-Kim, H., San Clemente, H., Balliau, T., Zivy, M., Dunand, C., Albenne, C. y Jamet, E.** (2016) *Arabidopsis thaliana* root cell wall proteomics: Increasing the proteome coverage using a combinatorial peptide ligand library and description of unexpected Hyp in peroxidase amino acid sequences. *Proteomics*, **16**, 491-503.
- Nickel, W.** (2003) The mystery of nonclassical protein secretion. *The FEBS Journal*, **270**, 2109-2119.
- Nickel, W. y Seedorf, M.** (2008) Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. *Annual review of cell and developmental biology*, **24**, 287-308.
- Niewiadomska, E., Polzien, L., Desel, C., Rozpadek, P., Miszalski, Z. y Krupinska, K.** (2009) Spatial patterns of senescence and development-dependent distribution of reactive oxygen species in tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves. *Journal of Plant Physiology*, **166**, 1057-1068.
- Nonami, H. y Boyer, J.S.** (1987) Origin of growth-induced water potential: solute concentration is low in apoplast of enlarging tissues. *Plant Physiology*, **83**, 596-601.
- Noodén, L.D.** (2004) *Plant cell death processes*: Elsevier Academic Press, USA.
- Noodén, L.D., Guíamét, J.J. y John, I.** (1997) Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum*, **101**, 746-753.
- Noodén, L.D. y Leopold, A.C.** (1988) *Senescence and aging in plants*. San Diego: Academic Press.
- Noodén, L.D. y Penney, J.P.** (2001) Correlative controls of senescence and plant death in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Journal of Experimental Botany*, **52**, 2151-2159.
- Nooden, L.D., Singh, S. y Letham, D.S.** (1990) Correlation of xylem sap cytokinin levels with monocarpic senescence in soybean. *Plant Physiology*, **93**, 33-39.
- Nouchi, I., Hayashi, K., Hiradate, S., Ishikawa, S., Fukuoka, M., Chen, C.P. y Kobayashi, K.** (2012) Overcoming the difficulties in collecting apoplastic fluid from rice leaves by the infiltration-centrifugation method. *Plant and Cell Physiology*, **53**, 1659-1668.
- O'Brien, J.A., Daudi, A., Butt, V.S. y Bolwell, G.P.** (2012a) Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta*, **236**, 765-779.
- O'Brien, J.A., Daudi, A., Finch, P., Butt, V.S., Whitelegge, J.P., Souda, P., Ausubel, F.M. y Bolwell, G.P.** (2012b) A peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in cultured Arabidopsis cells functions in MAMP-elicited defense. *Plant Physiology*, **158**, 2013-2027.
- O'Driscoll, D., Read, S. y Steer, M.** (1993) Determination of cell-wall porosity by microscopy: walls of cultured cells and pollen tubes. *Acta botanica neerlandica*, **42**, 237-244.

- Oh, I.S., Park, A.R., Bae, M.S., Kwon, S.J., Kim, Y.S., Lee, J.E., Kang, N.Y., Lee, S., Cheong, H. y Park, O.K. (2005) Secretome analysis reveals an Arabidopsis lipase involved in defense against *Alternaria brassicicola*. *The Plant Cell*, **17**, 2832-2847.
- Okumoto, S. y Pilot, G. (2011) Amino acid export in plants: a missing link in nitrogen cycling. *Molecular plant*, **4**, 453-463.
- O'Leary, B.M., Neale, H.C., Geilfus, C.M., Jackson, R.W., Arnold, D.L. y Preston, G.M. (2016) Early changes in apoplast composition associated with defence and disease in interactions between *Phaseolus vulgaris* and the halo blight pathogen *Pseudomonas syringae* Pv. phaseolicola. *Plant, Cell & Environment*, **39**, 2172-2184.
- O'Leary, B.M., Rico, A., McCraw, S., Fones, H.N. y Preston, G.M. (2014) The infiltration-centrifugation technique for extraction of apoplastic fluid from plant leaves using *Phaseolus vulgaris* as an example. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*.
- Osakabe, Y., Maruyama, K., Seki, M., Satou, M., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2005) Leucine-rich repeat receptor-like kinase1 is a key membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **17**, 1105-1119.
- Otegui, M.S. (2018) Vacuolar degradation of chloroplast components: autophagy and beyond. *Journal of Experimental Botany*, **69**, 741-750.
- Otegui, M.S., Noh, Y.S., Martínez, D.E., Vila Petroff, M.G., Andrew Staehelin, L., Amasino, R.M. y Guamet, J.J. (2005) Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of Arabidopsis and soybean. *The Plant Journal*, **41**, 831-844.
- Pagnussat, L., Burbach, C., Baluška, F. y de la Canal, L. (2012) An extracellular lipid transfer protein is relocalized intracellularly during seed germination. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 6555-6563.
- Palmgren, M.G. (2001) Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Annual review of plant biology*, **52**, 817-845.
- Park, S.-W., Li, W., Viehhauser, A., He, B., Kim, S., Nilsson, A.K., Andersson, M.X., Kittle, J.D., Ambavaram, M.M. y Luan, S. (2013) Cyclophilin 20-3 relays a 12-oxo-phytodienoic acid signal during stress responsive regulation of cellular redox homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**, 9559-9564.
- Parrott, D., Yang, L., Shama, L. y Fischer, A. (2005) Senescence is accelerated, and several proteases are induced by carbon "feast" conditions in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Planta*, **222**, 989-1000.
- Parrott, D.L., Martin, J.M. y Fischer, A.M. (2010) Analysis of barley (*Hordeum vulgare*) leaf senescence and protease gene expression: a family C1A cysteine protease is specifically induced under conditions characterized by high carbohydrate, but low to moderate nitrogen levels. *New Phytologist*, **187**, 313-331.
- Passardi, F., Tognolli, M., De Meyer, M., Penel, C. y Dunand, C. (2006) Two cell wall associated peroxidases from Arabidopsis influence root elongation. *Planta*, **223**, 965-974.
- Pastori, G.M. y Luis, A. (1994) An activated-oxygen-mediated role for peroxisomes in the mechanism of senescence of *Pisum sativum* L. leaves. *Planta*, **193**, 385-391.
- Patrick, J.W. (2012) Fundamentals of phloem transport physiology. En *Phloem: Molecular cell biology, systemic communication, biotic interactions* (Thompson, G.A. y van Bel, A.J.E. eds): John Wiley & Sons, pp. 30-59.
- Patrick, J.W. (2013) Does Don Fisher's high-pressure manifold model account for phloem transport and resource partitioning? *Frontiers in plant science*, **4**, 184.
- Perini, M.A., Sin, I.N., Villarreal, N.M., Marina, M., Powell, A.L., Martinez, G.A. y Civello, P.M. (2017) Overexpression of the carbohydrate binding module from *Solanum lycopersicum* expansin 1 (*Sl-EXP1*) modifies tomato fruit firmness and *Botrytis cinerea* susceptibility. *Plant Physiology and Biochemistry*, **113**, 122-132.
- Pfanz, H. (1991) The possible role of apoplastic peroxidases in detoxifying the air pollutant sulfur dioxide. *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*, 401-417.
- Pic, E., de la Serve, B.T., Tardieu, F. y Turc, O. (2002) Leaf senescence induced by mild water deficit follows the same sequence of macroscopic, biochemical, and molecular events as monocarpic senescence in pea. *Plant Physiology*, **128**, 236-246.
- Pierpoint, W., Jackson, P. y Evans, R.M. (1990) The presence of a thaumatin-like protein, a chitinase and a glucanase among the pathogenesis-related proteins of potato (*Solanum tuberosum*). *Physiological and molecular plant pathology*, **36**, 325-338.

- Pontier, D., Gan, S., Amasino, R.M., Roby, D. y Lam, E. (1999) Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. *Plant molecular biology*, **39**, 1243-1255.
- Potter, S., Uknes, S., Lawton, K., Winter, A.M., Chandler, D., DiMaio, J., Novitzky, R., Ward, E. y Ryals, J. (1993) Regulation of a hevein-like gene in Arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **6**, 680-685.
- Pourtau, N., Jennings, R., Pelzer, E., Pallas, J. y Wingler, A. (2006) Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in Arabidopsis. *Planta*, **224**, 556-568.
- Pourtau, N., Marès, M., Purdy, S., Quentin, N., Ruël, A. y Wingler, A. (2004) Interactions of abscisic acid and sugar signalling in the regulation of leaf senescence. *Planta*, **219**, 765-772.
- Pratelli, R., Voll, L.M., Horst, R.J., Frommer, W.B. y Pilot, G. (2010) Stimulation of nonselective amino acid export by glutamine dumper proteins. *Plant Physiology*, **152**, 762-773.
- Prochazkova, D., Sairam, R., Srivastava, G. y Singh, D. (2001) Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science*, **161**, 765-771.
- Prochazkova, D. y Wilhelmova, N. (2007) Leaf senescence and activities of the antioxidant enzymes. *Biologia plantarum*, **51**, 401-406.
- Pružinská, A., Shindo, T., Niessen, S., Kaschani, F., Tóth, R., Millar, A.H. y van der Hoorn, R.A. (2017) Major Cys protease activities are not essential for senescence in individually darkened Arabidopsis leaves. *BMC Plant Biology*, **17**, 4.
- Quirino, B.F., Noh, Y.-S., Himelblau, E. y Amasino, R.M. (2000) Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in plant science*, **5**, 278-282.
- Ramanjulu, S., Kaiser, W. y Dietz, K.-J. (1999) Salt and drought stress differentially affect the accumulation of extracellular proteins in barley. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **54**, 337-347.
- Ranieri, A., D'urso, G., Nali, C., Lorenzini, G. y Soldatini, G. (1996) Ozone stimulates apoplastic antioxidant systems in pumpkin leaves. *Physiologia Plantarum*, **97**, 381-387.
- Rascio, A., Platani, C., Di Fonzo, N. y Wittmer, G. (1992) Bound Water in Durum Wheat under Drought Stress. *Plant Physiology*, **98**, 908-912.
- Rate, D.N. y Greenberg, J.T. (2001) The Arabidopsis *aberrant growth and death2* mutant shows resistance to *Pseudomonas syringae* and reveals a role for NPR1 in suppressing hypersensitive cell death. *The Plant Journal*, **27**, 203-211.
- Rawlings, N.D. (2013) Protease families, evolution and mechanism of action. En *Proteases: Structure and Function*. Vienna: Springer, pp. 1-36.
- Regente, M., Pinedo, M., Elizalde, M. y de la Canal, L. (2012) Apoplastic exosome-like vesicles: a new way of protein secretion in plants? *Plant Signaling & Behavior*, **7**, 544-546.
- Rennie, E.A. y Turgeon, R. (2009) A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 14162-14167.
- Rico, A. y Preston, G.M. (2008) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 uses constitutive and apoplast-induced nutrient assimilation pathways to catabolize nutrients that are abundant in the tomato apoplast. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**, 269-282.
- Richmond, A.E. y Lang, A. (1957) Effect of kinetin on protein content and survival of detached *Xanthium* leaves. *Science*, **125**, 650-651.
- Richter, H. (1997) Water relations of plants in the field: some comments on the measurement of selected parameters. *Journal of Experimental Botany*, **48**, 1-7.
- Rietz, S., Bernsdorff, F.E. y Cai, D. (2012) Members of the germin-like protein family in *Brassica napus* are candidates for the initiation of an oxidative burst that impedes pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 5507-5519.
- Riewe, D., Grosman, L., Fernie, A.R., Wucke, C. y Geigenberger, P. (2008) The potato-specific apyrase is apoplastically localized and has influence on gene expression, growth, and development. *Plant Physiology*, **147**, 1092-1109.
- Ritchie, G.A. y Hinckley, T.M. (1975) The pressure chamber as an instrument for ecological research. *Advances in ecological research*, **9**, 165-254.
- Roberts, I.N., Caputo, C., Criado, M.V. y Funk, C. (2012) Senescence-associated proteases in plants. *Physiologia Plantarum*, **145**, 130-139.
- Roberts, W.K. y Selitrennikoff, C.P. (1990) Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *Microbiology*, **136**, 1771-1778.
- Robinson, D.G., Ding, Y. y Jiang, L. (2016) Unconventional protein secretion in plants: a critical assessment. *Protoplasma*, **253**, 31-43.

- Robinson, W.D., Carson, I., Ying, S., Ellis, K. y Plaxton, W.C.** (2012a) Eliminating the purple acid phosphatase AtPAP26 in *Arabidopsis thaliana* delays leaf senescence and impairs phosphorus remobilization. *New Phytologist*, **196**, 1024-1029.
- Robinson, W.D., Park, J., Tran, H.T., Del Vecchio, H.A., Ying, S., Zins, J.L., Patel, K., McKnight, T.D. y Plaxton, W.C.** (2012b) The secreted purple acid phosphatase isozymes AtPAP12 and AtPAP26 play a pivotal role in extracellular phosphate-scavenging by *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 6531-6542.
- Rolny, N., Costa, L., Carrión, C. y Guamet, J.J.** (2011) Is the electrolyte leakage assay an unequivocal test of membrane deterioration during leaf senescence? *Plant physiology and biochemistry*, **49**, 1220-1227.
- Rolland, F., Moore, B. y Sheen, J.** (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell*, **14**, S185-S205.
- Rosen, H.** (1957) A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **67**, 10-15.
- Rosli, H.G., Civello, P.M. y Martinez, G.A.** (2004) Changes in cell wall composition of three *Fragaria x ananassa* cultivars with different softening rate during ripening. *Plant Physiology and Biochemistry*, **42**, 823-831.
- Roy, J. y Berger, A.** (1983) Water potential measurement, water compartmentation and water flow in *Dactylis glomerati* L. leaves. *New Phytologist*, **93**, 43-52.
- Rutter, B.D. y Innes, R.W.** (2017) Extracellular Vesicles Isolated from the Leaf Apoplast Carry Stress-Response Proteins. *Plant Physiology*, **173**, 728-741.
- Sahrawy, M., Ávila, C., Chueca, A., Cánovas, F.M. y López-Gorgé, J.** (2004) Increased sucrose level and altered nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants expressing antisense chloroplastic fructose-1, 6-bis phosphatase. *Journal of Experimental Botany*, **55**, 2495-2503.
- Sakurai, N.** (1998) Dynamic function and regulation of apoplast in the plant body. *Journal of Plant Research*, **111**, 133-148.
- Salisbury, F.B. y Ross, C.W.** (1994) *Fisiología vegetal* 4° edn.: Grupo Editorial Iberoamérica.
- Salpeter, K.E., Millemann, D.R., Caputo, M.F., White, B.L. y Touchette, B.W.** (2012) Delayed modifications in plant-water relations in the coastal marsh halophyte *Spartina patens* following sudden increases in soil salinity. *Botanica Marina*, **55**, 307-310.
- Sánchez, F., De Andres, E., Tenorio, J. y Ayerbe, L.** (2004) Growth of epicotyls, turgor maintenance and osmotic adjustment in pea plants (*Pisum sativum* L.) subjected to water stress. *Field Crops Research*, **86**, 81-90.
- Sanders, A., Collier, R., Trethewy, A., Gould, G., Sieker, R. y Tegeder, M.** (2009) AAP1 regulates import of amino acids into developing *Arabidopsis* embryos. *The Plant Journal*, **59**, 540-552.
- Santiago, J.P. y Tegeder, M.** (2016) Connecting source with sink: the role of *Arabidopsis* AAP8 in phloem loading of amino acids. *Plant Physiology*, pp. 00244.02016.
- Sattelmacher, B. y Horst, W.J.** (2007) *The apoplast of higher plants: compartment of storage, transport and reactions: the significance of the apoplast for the mineral nutrition of higher plants* Dordrecht: Springer
- Sauer, N.** (2007) Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS letters*, **581**, 2309-2317.
- Sävenstrand, H., Brosché, M. y Strid, A.** (2004) Ultraviolet-B signalling: *Arabidopsis* brassinosteroid mutants are defective in UV-B regulated defence gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry*, **42**, 687-694.
- Scabone, C.M., Frigerio, L. y Petruccelli, S.** (2011) A fluorescent reporter protein containing AtRMR1 domains is targeted to the storage and central vacuoles in *Arabidopsis thaliana* and tobacco leaf cells. *Plant Cell Reports*, **30**, 1823-1833.
- Scheiffele, P. y Füllekrug, J.** (2000) Glycosylation and protein transport. *Essays in Biochemistry*, **36**, 27-35.
- Schippers, J.H.** (2015) Transcriptional networks in leaf senescence. *Current opinion in plant biology*, **27**, 77-83.
- Schippers, J.H., Jing, H.-C., Hille, J. y Dijkwel, P.P.** (2007) Developmental and hormonal control of leaf senescence. En *Senescence processes in plants*. Oxford: Blackwell Publishing, pp. 145-170.
- Schmidt, R., Stransky, H. y Koch, W.** (2007) The amino acid permease AAP8 is important for early seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **226**, 805-813.

- Schnarrenberger, C., Oeser, A. y Tolbert, N.** (1973) Two isoenzymes each of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in spinach leaves. *Archives of biochemistry and biophysics*, **154**, 438-448.
- Scholander, P.F., Bradstreet, E.D., Hemmingsen, E.A. y Hammel, H.T.** (1965) Sap Pressure in Vascular Plants: Negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science*, **148**, 339-346.
- Schreiber, L., Hartmann, K., Skrabs, M. y Zeier, J.** (1999) Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *Journal of Experimental Botany*, **50**, 1267-1280.
- Seling, S., Wissemeier, A.H., Cambier, P. y Van Cutsem, P.** (2000) Calcium deficiency in potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) leaves and its effects on the pectic composition of the apoplastic fluid. *Physiologia Plantarum*, **109**, 44-50.
- Selvendran, R.R. y O'Neill, M.A.** (1987) Isolation and analysis of cell walls from plant material. *Methods of Biochemical Analysis*, **32**, 25-153.
- Seo, P.J., Lee, A.-K., Xiang, F. y Park, C.-M.** (2008) Molecular and Functional Profiling of Arabidopsis Pathogenesis-Related Genes: Insights into Their Roles in Salt Response of Seed Germination. *Plant and Cell Physiology*, **49**, 334-344.
- Serrato, A.J., Yubero-Serrano, E.M., Sandalio, L.M., Munoz-Blanco, J., Chueca, A., Caballero, J.L. y Sahrawy, M.** (2009) cpFBPaseII, a novel redox-independent chloroplastic isoform of fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant, Cell & Environment*, **32**, 811-827.
- Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C., Clarke, J.D., Cotton, D., Bullis, D., Snell, J., Miguel, T., Hutchison, D., Kimmerly, B., Mitzel, T., Katagiri, F., Glazebrook, J., Law, M. y Goff, S.A.** (2002) A high-throughput Arabidopsis reverse genetics system. *The Plant Cell*, **14**, 2985-2994.
- Shan, X., Wang, J., Chua, L., Jiang, D., Peng, W. y Xie, D.** (2011) The role of Arabidopsis Rubisco activase in jasmonate-induced leaf senescence. *Plant Physiology*, **155**, 751-764.
- Shane, M.W., Stigter, K., Fedosejevs, E.T. y Plaxton, W.C.** (2014) Senescence-inducible cell wall and intracellular purple acid phosphatases: implications for phosphorus remobilization in *Hakea prostrata* (Proteaceae) and *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Journal of Experimental Botany*, **65**, 6097-6106.
- Shapiguzov, A., Vainonen, J., Wrzaczek, M. y Kangasjärvi, J.** (2012) ROS-talk—how the apoplast, the chloroplast, and the nucleus get the message through. *Frontiers in plant science*, **3**, 292.
- Sharp, R. y Davies, W.** (2009) Variability among species in the apoplastic pH signalling response to drying soils. *Journal of Experimental Botany*, **60**, 4363-4370.
- Shi, G., Zhang, Z., Friesen, T.L., Raats, D., Fahima, T., Brueggeman, R.S., Lu, S., Trick, H.N., Liu, Z., Chao, W., Frenkel, Z., Xu, S.S., Rasmussen, J.B. y Faris, J.D.** (2016) The hijacking of a receptor kinase-driven pathway by a wheat fungal pathogen leads to disease. *Science Advances*, **2**, e1600822.
- Shimaoka, T., Ohnishi, M., Sazuka, T., Mitsuhashi, N., Hara-Nishimura, I., Shimazaki, K.-I., Maeshima, M., Yokota, A., Tomizawa, K.-I. y Mimura, T.** (2004) Isolation of intact vacuoles and proteomic analysis of tonoplast from suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **45**, 672-683.
- Shinohara, H. y Matsubayashi, Y.** (2015) Reevaluation of the CLV3-receptor interaction in the shoot apical meristem: dissection of the CLV3 signaling pathway from a direct ligand-binding point of view. *The Plant Journal*, **82**, 328-336.
- Showalter, A.M.** (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell*, **5**, 9-23.
- Smart, C.M.** (1994) Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist*, **126**, 419-448.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B. y Klenk, D.** (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, **150**, 76-85.
- Smith, S.J., Kroon, J.T., Simon, W.J., Slabas, A.R. y Chivasa, S.** (2015) A novel function for Arabidopsis CYCLASE1 in programmed cell death revealed by isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) analysis of extracellular matrix proteins. *Molecular & Cellular Proteomics*, **14**, 1556-1568.
- Snowden, C.J., Thomas, B., Baxter, C.J., Smith, J.A.C. y Sweetlove, L.J.** (2015) A tonoplast Glu/Asp/GABA exchanger that affects tomato fruit amino acid composition. *The Plant Journal*, **81**, 651-660.

- Sobieszczuk-Nowicka, E.** (2017) Polyamine catabolism adds fuel to leaf senescence. *Amino acids*, **49**, 49-56.
- Sobieszczuk-Nowicka, E., Kubala, S., Zmienko, A., Małecka, A. y Legocka, J.** (2015) From accumulation to degradation: reprogramming polyamine metabolism facilitates dark-induced senescence in barley leaf cells. *Frontiers in plant science*, **6**, 1198.
- Sondergaard, T.E., Schulz, A. y Palmgren, M.G.** (2004) Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiology*, **136**, 2475-2482.
- Song, J.T., Lu, H. y Greenberg, J.T.** (2004) Divergent roles in *Arabidopsis thaliana* development and defense of two homologous genes, aberrant growth and death2 and AGD2-LIKE DEFENSE RESPONSE PROTEIN1, encoding novel aminotransferases. *The Plant Cell*, **16**, 353-366.
- Soudry, E., Ulitzur, S. y Gepstein, S.** (2004) Accumulation and remobilization of amino acids during senescence of detached and attached leaves: in planta analysis of tryptophan levels by recombinant luminescent bacteria. *Journal of Experimental Botany*, **56**, 695-702.
- Spartz, A.K., Ren, H., Park, M.Y., Grandt, K.N., Lee, S.H., Murphy, A.S., Sussman, M.R., Overvoorde, P.J. y Gray, W.M.** (2014) SAUR inhibition of PP2C-D phosphatases activates plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases to promote cell expansion in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **26**, 2129-2142.
- Speer, M. y Kaiser, W.M.** (1991) Ion Relations of Symplastic and Apoplastic Space in Leaves from *Spinacia oleracea* L. and *Pisum sativum* L. under Salinity. *Plant Physiology*, **97**, 990-997.
- Spitzer, C., Li, F., Buono, R., Roschztardt, H., Chung, T., Zhang, M., Osteryoung, K.W., Vierstra, R.D. y Otegui, M.S.** (2015) The endosomal protein CHARGED MULTIVESICULAR BODY PROTEIN1 regulates the autophagic turnover of plastids in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **27**, 391-402.
- Stacey, M.G., Koh, S., Becker, J. y Stacey, G.** (2002) AtOPT3, a member of the oligopeptide transporter family, is essential for embryo development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **14**, 2799-2811.
- Stavriniidou, E., Gabrielsson, R., Gomez, E., Crispin, X., Nilsson, O., Simon, D.T. y Berggren, M.** (2015) Electronic plants. *Science advances*, **1**, e1501136.
- Steinebrunner, I., Wu, J., Sun, Y., Corbett, A. y Roux, S.J.** (2003) Disruption of apyrases inhibits pollen germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **131**, 1638-1647.
- Strand, A., Zrenner, R., Trevanion, S., Stitt, M., Gustafsson, P. y Gardestrom, P.** (2000) Decreased expression of two key enzymes in the sucrose biosynthesis pathway, cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase and sucrose phosphate synthase, has remarkably different consequences for photosynthetic carbon metabolism in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **23**, 759-770.
- Strasser, R.** (2014) Biological significance of complex N-glycans in plants and their impact on plant physiology. *Frontiers in plant science*, **5**, 363.
- Strasser, R.** (2016) Plant protein glycosylation. *Glycobiology*, **26**, 926-939.
- Streubel, J., Pesce, C., Hutin, M., Koebnik, R., Boch, J. y Szurek, B.** (2013) Five phylogenetically close rice *SWEET* genes confer TAL effector-mediated susceptibility to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *New Phytologist*, **200**, 808-819.
- Taira, M., Valtersson, U., Burkhardt, B. y Ludwig, R.A.** (2004) *Arabidopsis thaliana* GLN2-encoded glutamine synthetase is dual targeted to leaf mitochondria and chloroplasts. *The Plant Cell*, **16**, 2048-2058.
- Taiz, L. y Zeiger, E.** (2002) *Plant Physiology* 3rd edn. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.
- Takahashi, K., Hayashi, K.-i. y Kinoshita, T.** (2012) Auxin activates the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by phosphorylation during hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, **159**, 632-641.
- Takahashi, T. y Kakehi, J.-I.** (2009) Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Annals of Botany*, **105**, 1-6.
- Takano, S., Matsuda, S., Funabiki, A., Furukawa, J.-i., Yamauchi, T., Tokuji, Y., Nakazono, M., Shinohara, Y., Takamura, I. y Kato, K.** (2015) The rice RCN11 gene encodes  $\beta$ 1, 2-xylosyltransferase and is required for plant responses to abiotic stresses and phytohormones. *Plant Science*, **236**, 75-88.
- Tan, Q., Zhang, L., Grant, J., Cooper, P. y Tegeder, M.** (2010) Altered phloem transport of S-methylmethionine affects plant metabolism and seed number in pea plants. *Plant Physiology*, **154**, 1886-1896.

- Tegeder, M.** (2012) Transporters for amino acids in plant cells: some functions and many unknowns. *Current opinion in plant biology*, **15**, 315-321.
- Tegeder, M.** (2014) Transporters involved in source to sink partitioning of amino acids and ureides: opportunities for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*, **65**, 1865-1878.
- Tegeder, M. y Hammes, U.Z.** (2018) The way out and in: phloem loading and unloading of amino acids. *Current opinion in plant biology*, **43**, 16-21.
- Tegeder, M. y Rentsch, D.** (2010) Uptake and partitioning of amino acids and peptides. *Molecular plant*, **3**, 997-1011.
- Tegeder, M., Tan, Q., Grennan, A.K. y Patrick, J.W.** (2007) Amino acid transporter expression and localisation studies in pea (*Pisum sativum*). *Functional Plant Biology*, **34**, 1019-1028.
- Tegeder, M. y Ward, J.M.** (2012) Molecular evolution of plant AAP and LHT amino acid transporters. *Frontiers in plant science*, **3**, 21.
- Terry, M.E. y Bonner, B.A.** (1980) An examination of centrifugation as a method of extracting an extracellular solution from peas, and its use for the study of indoleacetic acid-induced growth. *Plant Physiology*, **66**, 321-325.
- Tetley, R.M. y Thimann, K.V.** (1974) The metabolism of oat leaves during senescence: I. Respiration, carbohydrate metabolism, and the action of cytokinins. *Plant Physiology*, **54**, 294-303.
- Tetlow, I. y Farrar, J.** (1993) Apoplastic sugar concentration and pH in barley leaves infected with brown rust. *Journal of Experimental Botany*, **44**, 929-936.
- The UniProt Consortium** (2017) UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, **45**, D158-D169.
- Thoenen, M., Herrmann, B. y 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.
- Thomas, H. y de Villiers, L.** (1996) Gene expression in leaves of *Arabidopsis thaliana* induced to senesce by nutrient deprivation. *Journal of Experimental Botany*, **47**, 1845-1852.
- Thompson, A.R., Doelling, J.H., Suttangkakul, A. y Vierstra, R.D.** (2005) Autophagic nutrient recycling in *Arabidopsis* directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. *Plant Physiology*, **138**, 2097-2110.
- Thompson, A.R. y Vierstra, R.D.** (2005) Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Current opinion in plant biology*, **8**, 165-173.
- Thompson, J.E., Froese, C.D., Madey, E., Smith, M.D. y Hong, Y.** (1998) Lipid metabolism during plant senescence. *Prog Lipid Res*, **37**, 119-141.
- Thompson, J.E., Paliyath, G., Brown, J.H. y Duxbury, C.L.** (1987) The involvement of activated oxygen in membrane deterioration during senescence. En *Plant senescence: its biochemistry and physiology* (Thomson, W.W., Nothnagel, E.A. y Huffaker, R.C. eds). Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, pp. 146-155.
- Tian, S., Wang, X., Li, P., Wang, H., Ji, H., Xie, J., Qiu, Q., Shen, D. y Dong, H.** (2016) Plant aquaporin AtPIP1; 4 links apoplastic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induction to disease immunity pathways. *Plant Physiology*, **171**, 1635-1650.
- Timm, S., Nunes-Nesi, A., Pärnik, T., Morgenthal, K., Wienkoop, S., Keerberg, O., Weckwerth, W., Kleczkowski, L.A., Fernie, A.R. y Bauwe, H.** (2008) A cytosolic pathway for the conversion of hydroxypyruvate to glycerate during photorespiration in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **20**, 2848-2859.
- Titel, C., Woehlecke, H., Afifi, I. y Ehwald, R.** (1997) Dynamics of limiting cell wall porosity in plant suspension cultures. *Planta*, **203**, 320-326.
- Tognetti, V.B., Mühlenbock, P. y Van Breusegem, F.** (2012) Stress homeostasis—the redox and auxin perspective. *Plant, Cell & Environment*, **35**, 321-333.
- Torres, M.A. y Dangl, J.L.** (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current opinion in plant biology*, **8**, 397-403.
- Torres, M.A., Dangl, J.L. y Jones, J.D.** (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.
- Touchette, B.W., Rhodes, K.L., Smith, G.A. y Poole, M.** (2009) Salt spray induces osmotic adjustment and tissue rigidity in smooth cordgrass, *Spartina alterniflora* (Loisel.). *Estuaries and Coasts*, **32**, 917-925.

- Tournaire-Roux, C., Sutka, M., Javot, H., Gout, E., Gerbeau, P., Luu, D.-T., Bligny, R. y Maurel, C. (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature*, **425**, 393-397.
- Tran, H.T. y Plaxton, W.C. (2008) Proteomic analysis of alterations in the secretome of *Arabidopsis thaliana* suspension cells subjected to nutritional phosphate deficiency. *Proteomics*, **8**, 4317-4326.
- Tran, H.T., Qian, W., Hurley, B.A., She, Y.M., Wang, D. y Plaxton, W.C. (2010) Biochemical and molecular characterization of AtPAP12 and AtPAP26: the predominant purple acid phosphatase isozymes secreted by phosphate-starved *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment*, **33**, 1789-1803.
- Trentin, A.R., Pivato, M., Mehdi, S.M., Barnabas, L.E., Giaretta, S., Fabrega-Prats, M., Prasad, D., Arrigoni, G. y Masi, A. (2015) Proteome readjustments in the apoplastic space of *Arabidopsis thaliana ggt1* mutant leaves exposed to UV-B radiation. *Frontiers in Plant Science*, **6**, 128.
- Turner, N.C. (1981) Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant and soil*, **58**, 339-366.
- Turner, N.C. (1988) Measurement of plant water status by the pressure chamber technique. *Irrigation science*, **9**, 289-308.
- Turner, N.C., Spurway, R.A. y Schulze, E.D. (1984) Comparison of water potentials measured by in situ psychrometry and pressure chamber in morphologically different species. *Plant Physiology*, **74**, 316-319.
- Tyree, M. (1976) Negative turgor pressure in plant cells: fact or fallacy? *Canadian Journal of Botany*, **54**, 2738-2746.
- Tyree, M. y Hammel, H. (1972) The measurement of the turgor pressure and the water relations of plants by the pressure-bomb technique. *Journal of Experimental Botany*, **23**, 267-282.
- Tyree, M. y Jarvis, P. (1982) Water in tissues and cells. En *Physiological plant ecology II: water relations and carbon assimilation* (Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B. y Ziegler, H. eds). Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 35-77.
- Tyree, M.T. y Richter, H. (1982) Alternate methods of analysing water potential isotherms: some cautions and clarifications. II. Curvilinearity in water potential isotherms. *Canadian Journal of Botany*, **60**, 911-916.
- Tyree, M.T. y Zimmermann, M.H. (2002) *Xylem structure and the ascent of sap* 2nd edn. Berlin ; New York: Springer-Verlag
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E. y Ryals, J. (1992) Acquired resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **4**, 645-656.
- Urban, L., Jaffrin, A. y Chraïbi, A. (1993) Analysis of pressure-volume curves of leaves of *Rosa hybrida* cv. Sonia. *Journal of Experimental Botany*, **44**, 605-613.
- van der Graaff, E., Schwacke, R., Schneider, A., Desimone, M., Flüge, U.-I. y Kunze, R. (2006) Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiology*, **141**, 776-792.
- van der Linde, K., Hemetsberger, C., Kastner, C., Kaschani, F., van der Hoorn, R.A., Kumlehn, J. y Doehlemann, G. (2012) A maize cystatin suppresses host immunity by inhibiting apoplastic cysteine proteases. *The Plant Cell*, **24**, 1285-1300.
- Van Loon, L. y Van Strien, E. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **55**, 85-97.
- van Loon, L.C., Rep, M. y Pieterse, C.M. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, **44**, 135-162.
- Vanacker, H., Carver, T.L. y Foyer, C.H. (2000) Early H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiology*, **123**, 1289-1300.
- Velazhahan, R., Datta, S.K. y Muthukrishnan, S. (1999) The PR-5 family: thaumatin-like proteins. En *Pathogenesis-related proteins in plants* (Datta, S.K. y Muthukrishnan, S. eds). Boca Raton: CRC Press, pp. 107-129.
- Veljanovski, V., Vanderbeld, B., Knowles, V.L., Snedden, W.A. y Plaxton, W.C. (2006) Biochemical and molecular characterization of AtPAP26, a vacuolar purple acid phosphatase up-regulated in phosphate-deprived *Arabidopsis* suspension cells and seedlings. *Plant Physiol*, **142**, 1282-1293.

- Veronese, P., Chen, X., Bluhm, B., Salmeron, J., Dietrich, R. y Mengiste, T. (2004) The BOS loci of *Arabidopsis* are required for resistance to *Botrytis cinerea* infection. *The Plant Journal*, **40**, 558-574.
- Vicentini, F. y Matile, P. (1993) Gerontosomes, a multifunctional type of peroxisome in senescent leaves. *Journal of Plant Physiology*, **142**, 50-56.
- von Groll, U., Berger, D. y Altmann, T. (2002) The subtilisin-like serine protease SDD1 mediates cell-to-cell signaling during *Arabidopsis* stomatal development. *The Plant Cell*, **14**, 1527-1539.
- von Schaewen, A., Rips, S., Jeong, I.S. y Koiwa, H. (2015) *Arabidopsis thaliana* KORRIGAN1 protein: N-glycan modification, localization, and function in cellulose biosynthesis and osmotic stress responses. *Plant Signaling & Behavior*, **10**, e1024397.
- Vos, J. y Oyarzun, P. (1988) Water Relations of Potato Leaves. II. Pressure—Volume Analysis and Inferences About the Constancy of the Apoplastic Fraction. *Annals of Botany*, **62**, 449-454.
- Wada, S., Ishida, H., Izumi, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Mae, T. y Makino, A. (2009) Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiology*, **149**, 885-893.
- Wakao, S. y Benning, C. (2005) Genome-wide analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenases in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **41**, 243-256.
- Wang, K., Senthil-Kumar, M., Ryu, C.M., Kang, L. y Mysore, K.S. (2012) Phytosterols play a key role in plant innate immunity against bacterial pathogens by regulating nutrient efflux into the apoplast. *Plant Physiology*, **158**, 1789-1802.
- Wang, S. y Blumwald, E. (2014) Stress-induced chloroplast degradation in *Arabidopsis* is regulated via a process independent of autophagy and senescence-associated vacuoles. *The Plant Cell*, **26**, 4875-4888.
- Wanner, L., Keller, F. y Matile, P. (1991) Metabolism of radiolabelled galactolipids in senescent barley leaves. *Plant Science*, **78**, 199-206.
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Métraux, J.-P. y Ryals, J.A. (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, **3**, 1085-1094.
- Wardlaw, I.F. (2005) Consideration of apoplastic water in plant organs: a reminder. *Functional Plant Biology*, **32**, 561-569.
- Watanabe, M., Balazadeh, S., Tohge, T., Erban, A., Giavalisco, P., Kopka, J., Mueller-Roeber, B., Fernie, A.R. y Hoefgen, R. (2013) Comprehensive dissection of spatiotemporal metabolic shifts in primary, secondary, and lipid metabolism during developmental senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **162**, 1290-1310.
- Weaver, L.M. y Amasino, R.M. (2001) Senescence is induced in individually darkened *Arabidopsis* leaves, but inhibited in whole darkened plants. *Plant Physiology*, **127**, 876-886.
- Weaver, L.M., Gan, S., Quirino, B. y Amasino, R.M. (1998) A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant molecular biology*, **37**, 455-469.
- Wei, H., Brunecky, R., Donohoe, B.S., Ding, S.-Y., Ciesielski, P.N., Yang, S., Tucker, M.P. y Himmel, M.E. (2015) Identifying the ionically bound cell wall and intracellular glycoside hydrolases in late growth stage *Arabidopsis* stems: implications for the genetic engineering of bioenergy crops. *Frontiers in plant science*, **6**, 315.
- Weiss, W., Weiland, F. y Gorg, A. (2009) Protein detection and quantitation technologies for gel-based proteome analysis. *Methods in Molecular Biology*, **564**, 59-82.
- Widhalm, J.R., Gutensohn, M., Yoo, H., Adebisin, F., Qian, Y., Guo, L., Jaini, R., Lynch, J.H., McCoy, R.M., Shreve, J.T., Thimmapuram, J., Rhodes, D., Morgan, J.A. y Dudareva, N. (2015) Identification of a plastidial phenylalanine exporter that influences flux distribution through the phenylalanine biosynthetic network. *Nature communications*, **6**, 8142.
- Wilkinson, S. y Davies, W.J. (1997) Xylem sap pH increase: a drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplast. *Plant Physiology*, **113**, 559-573.
- Wingler, A., Marès, M. y Pourtau, N. (2004) Spatial patterns and metabolic regulation of photosynthetic parameters during leaf senescence. *New Phytologist*, **161**, 781-789.
- Wingler, A. y Roitsch, T. (2008) Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. *Plant Biology*, **10**, 50-62.

- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V. y Provar, N.J. (2007) An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One*, **2**, e718.
- Witte, C.P. (2011) Urea metabolism in plants. *Plant Science*, **180**, 431-438.
- Wittenbach, V.A. (1978) Breakdown of ribulose biphosphate carboxylase and change in proteolytic activity during dark-induced senescence of wheat seedlings. *Plant Physiology*, **62**, 604-608.
- Wojtaszek, P. (1997) The oxidative burst: a plant’s early response against infection. *Biochemical Journal*, **322**, 681-692.
- Wolf, C., Hennig, M., Romanovicz, D. y Steinebrunner, I. (2007) Developmental defects and seedling lethality in apyrase AtAPY1 and AtAPY2 double knockout mutants. *Plant molecular biology*, **64**, 657-672.
- Woolhouse, H. y Batt, T. (2016) The nature and regulation of senescence in plastids. *Perspectives in experimental biology*, **2**, 163-175.
- Wu, F., Sheng, P., Tan, J., Chen, X., Lu, G., Ma, W., Heng, Y., Lin, Q., Zhu, S. y Wang, J. (2014) Plasma membrane receptor-like kinase leaf panicle 2 acts downstream of the DROUGHT AND SALT TOLERANCE transcription factor to regulate drought sensitivity in rice. *Journal of Experimental Botany*, **66**, 271-281.
- Wu, Y., Xun, Q., Guo, Y., Zhang, J., Cheng, K., Shi, T., He, K., Hou, S., Gou, X. y Li, J. (2016a) Genome-wide expression pattern analyses of the Arabidopsis leucine-rich repeat receptor-like kinases. *Molecular plant*, **9**, 289-300.
- Wu, Y., Yang, T., Song, Y., Zhang, X., Xu, S., Xue, G. y Xing, X. (2016b) Metabolic regulation of ammonia emission in different senescence phenotypes of *Nicotiana tabacum*. *Biologia plantarum*, **60**, 190-194.
- Xiao, D., Cui, Y., Xu, F., Xu, X.X., Gao, G.X., Wang, Y.X., Guo, Z.X., Wang, D. y Wang, N.N. (2015) SENESCENCE-SUPPRESSED PROTEIN PHOSPHATASE Directly Interacts with the Cytoplasmic Domain of SENESCENCE-ASSOCIATED RECEPTOR-LIKE KINASE and Negatively Regulates Leaf Senescence in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **169**, 1275-1291.
- Xing, W. y Rajashekar, C.B. (2001) Glycine betaine involvement in freezing tolerance and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany*, **46**, 21-28.
- Xiong, Y., Contento, A.L. y Bassham, D.C. (2005) AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **42**, 535-546.
- Xu, F., Meng, T., Li, P., Yu, Y., Cui, Y., Wang, Y., Gong, Q. y Wang, N.N. (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.
- Xu, G., Fan, X. y Miller, A.J. (2012) Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual review of plant biology*, **63**, 153-182.
- Yamada, K., Saijo, Y., Nakagami, H. y Takano, Y. (2016) Regulation of sugar transporter activity for antibacterial defense in Arabidopsis. *Science*, **354**, 1427-1430.
- Yamamoto, A., Bhuiyan, M.N., Waditee, R., Tanaka, Y., Esaka, M., Oba, K., Jagendorf, A.T. y Takabe, T. (2005) Suppressed expression of the apoplastic ascorbate oxidase gene increases salt tolerance in tobacco and Arabidopsis plants. *Journal of Experimental Botany*, **56**, 1785-1796.
- Yanagisawa, S., Yoo, S.-D. y Sheen, J. (2003) Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature*, **425**, 521-525.
- Yang, H., Krebs, M., Stierhof, Y.-D. y Ludewig, U. (2014) Characterization of the putative amino acid transporter genes AtCAT2, 3 & 4: the tonoplast localized AtCAT2 regulates soluble leaf amino acids. *Journal of Plant Physiology*, **171**, 594-601.
- Yang, H., Stierhof, Y.-D. y Ludewig, U. (2015) The putative Cationic Amino Acid Transporter 9 is targeted to vesicles and may be involved in plant amino acid homeostasis. *Frontiers in plant science*, **6**, 212.
- Ye, Y., Ding, Y., Jiang, Q., Wang, F., Sun, J. y Zhu, C. (2017) The role of receptor-like protein kinases (RLKs) in abiotic stress response in plants. *Plant cell reports*, **36**, 235-242.
- Yi, X., McChargue, M., Laborde, S., Frankel, L.K. y Bricker, T.M. (2005) The manganese-stabilizing protein is required for photosystem II assembly/stability and photoautotrophy in higher plants. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 16170-16174.
- Yoda, H., Hiroi, Y. y Sano, H. (2006) Polyamine oxidase is one of the key elements for oxidative burst to induce programmed cell death in tobacco cultured cells. *Plant Physiology*, **142**, 193-206.

- Yoshimoto, K., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Kusano, M., Consonni, C., Panstruga, R., Ohsumi, Y. y Shirasu, K. (2009) Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **21**, 2914-2927.
- Zabaleta, E., Oropeza, A., Assad, N., Mandel, A., Salerno, G. y Herrera-Estrella, L. (1994) Antisense expression of chaperonin 60 $\beta$  in transgenic tobacco plants leads to abnormal phenotypes and altered distribution of photoassimilates. *The Plant Journal*, **6**, 425-432.
- Zavaliev, R., Levy, A., Gera, A. y Epel, B.L. (2013) Subcellular dynamics and role of Arabidopsis  $\beta$ -1, 3-glucanases in cell-to-cell movement of tobamoviruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **26**, 1016-1030.
- Zechmann, B. (2011) Subcellular distribution of ascorbate in plants. *Plant Signaling & Behavior*, **6**, 360-363.
- Zhang, J., Li, H., Xu, B., Li, J. y Huang, B. (2016) Exogenous melatonin suppresses dark-induced leaf senescence by activating the superoxide dismutase-catalase antioxidant pathway and down-regulating chlorophyll degradation in excised leaves of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Frontiers in Plant Science*, **7**, 1500.
- Zhang, K., Xia, X., Zhang, Y. y Gan, S.S. (2012) An ABA-regulated and Golgi-localized protein phosphatase controls water loss during leaf senescence in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **69**, 667-678.
- Zhang, L., Garneau, M.G., Majumdar, R., Grant, J. y Tegeder, M. (2015) Improvement of pea biomass and seed productivity by simultaneous increase of phloem and embryo loading with amino acids. *The Plant Journal*, **81**, 134-146.
- Zhang, L., Tan, Q., Lee, R., Trethewey, A., Lee, Y.-H. y Tegeder, M. (2010) Altered xylem-phloem transfer of amino acids affects metabolism and leads to increased seed yield and oil content in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **22**, 3603-3620.
- Zhang, L., Tian, L.-H., Zhao, J.-F., Song, Y., Zhang, C.-J. y Guo, Y. (2009) Identification of an apoplastic protein involved in the initial phase of salt stress response in rice root by two-dimensional electrophoresis. *Plant Physiology*, **149**, 916-928.
- Zhang, N. y Portis, A.R. (1999) Mechanism of light regulation of Rubisco: a specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 9438-9443.
- Zhao, P., Zhang, F., Liu, D., Imani, J., Langen, G. y Kogel, K.-H. (2017) Matrix metalloproteinases operate redundantly in Arabidopsis immunity against necrotrophic and biotrophic fungal pathogens. *PLoS One*, **12**, e0183577.
- Zhao, Y., Chan, Z., Gao, J., Xing, L., Cao, M., Yu, C., Hu, Y., You, J., Shi, H. y Zhu, Y. (2016) ABA receptor PYL9 promotes drought resistance and leaf senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113**, 1949-1954.
- Zhou, Q., Yu, Q., Wang, Z., Pan, Y., Lv, W., Zhu, L., Chen, R. y He, G. (2013) Knockdown of GDCH gene reveals reactive oxygen species-induced leaf senescence in rice. *Plant, Cell & Environment*, **36**, 1476-1489.
- Zhou, X., Jiang, Y. y Yu, D. (2011) WRKY22 transcription factor mediates dark-induced leaf senescence in Arabidopsis. *Molecules and cells*, **31**, 303-313.
- Zhou, Y., Sun, X., Yang, Y., Li, X., Cheng, Y. y Yang, Y. (2016) Expression of *Stipa purpurea* SpCIPK26 in Arabidopsis thaliana Enhances Salt and Drought Tolerance and Regulates Abscisic Acid Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, **17**, 966.
- Zhu, Q., Maher, E.A., Masoud, S., Dixon, R.A. y Lamb, C.J. (1994) Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Nature Biotechnology*, **12**, 807-812.
- Ziemann, S., Linde, K., Lahrmann, U., Acar, B., Kaschani, F., Colby, T., Kaiser, M., Ding, Y., Schmelz, E., Huffaker, A., Holton, N., Zipfel, C. y Doehlemann, G. (2018) An apoplastic peptide activates salicylic acid signalling in maize. *Nature plants*, **4**, 172-180.
- Zimmermann, D., Gomez-Barrera, J.A., Pasule, C., Brack-Frick, U.B., Sieferer, E., Nicholson, T.M., Pfannstiel, J., Stintzi, A. y Schaller, A. (2016) Cell death control by matrix metalloproteinases in tomato. *Plant Physiology*, **171**, 1456-1469.
- Zimmermann, G., Kelly, G.J. y Latzko, E. (1976) Efficient purification and molecular properties of spinach chloroplast fructose 1,6-bisphosphatase. *European Journal of Biochemistry*, **70**, 361-367.
- Zimmermann, P. y Zentgraf, U. (2005) The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular and Molecular Biology Letters*, **10**, 515-534.

**Zörb, C., Mühling, K.H., Kutschera, U. y Geilfus, C.-M.** (2015) Salinity stiffens the epidermal cell walls of salt-stressed maize leaves: is the epidermis growth-restricting? *PLoS One*, **10**, e0118406.