



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

# Las tesis de Belgrano

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Licenciatura en Ciencias Biológicas**

**Inducción de la senescencia en plantas de  
trigo y arroz**

**Nº 175**

**María Jesús Cafaro**

**Tutor: Atilio J. Barneix**

Departamento de Investigación  
Abril 2005



## Agradecimientos

Al Dr. Barneix por permitirme entrar al laboratorio y darme la oportunidad de realizar la tesina.

A Irma por co-dirigirme en este trabajo, por enseñarme y ayudarme en todo lo aprendido con mucha paciencia y cariño.

A Vicky por compartir sus conocimientos, ayudarme y hacer más divertidas las horas de trabajo.

A todo el grupo del laboratorio, en especial a Carla, Mariana y Mariela.

A las chicas de abajo: Andrea, Guada y Romi por estar siempre dispuestas a una charla.

A todos los que trabajan en la Cátedra por su cálida atención.

A mis amigas de la vida: Andrea, Jesi y Romi. Para que estemos juntas hasta que seamos unas «biólogas viejitas».

A Viqui, mi amiga del alma que a pesar de la distancia siempre estás presente.

A Nico por alentarme a cumplir este objetivo y poder así concretar nuestros proyectos. Te amo.

A Anita por ser la «computadora» de este trabajo y la mejor compañera de ruta.

A mamá por estar siempre en cada detalle, protegerme y dedicar tu vida a nosotras.



## Resumen

La calidad panadera del grano de trigo (*Triticum aestivum* L.) depende en gran medida de la eficiencia del proceso de removilización de nitrógeno (N) desde las hojas al grano durante la senescencia. La senescencia es el último estadio del desarrollo foliar, involucra la activación de numerosos genes y ha sido asociada con el desarrollo de estrés oxidativo. La célula posee un sistema antioxidante que funciona desactivando especies reactivas de oxígeno que cuando es sobrepasado sobreviene la muerte celular. La regulación fisiológica y genética del proceso de senescencia todavía no está clara. Los estudios genéticos en trigo son muy complejos dado que presenta la característica de ser una especie alohexaploide. Por ello se ha propuesto al arroz (*Oryza sativa* L.) como modelo de estudio del genoma de los cereales, ya que es diploide y que su genoma ya ha sido secuenciado.

Con el objetivo de determinar si el arroz puede utilizarse como especie modelo para el estudio de la regulación génica de la senescencia en trigo se comparó la respuesta de plantas de trigo y arroz en ensayos de senescencia inducida por deficiencia de N y por oscuridad. Las plantas se cultivaron en macetas con vermiculita, en cámara de cultivo a  $25 \pm 1$  °C con una irradiancia de  $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y un fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Se regaron diariamente con solución nutritiva conteniendo  $\text{KNO}_3$  10 mM (trigo) y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1 mM (arroz) como fuente de N. Para el ensayo de inducción de la senescencia por deficiencia de N las plantas de trigo y arroz se dividieron en dos grupos. Uno de los grupos se regó con la solución nutritiva correspondiente (N+) mientras que el otro, se regó con solución nutritiva carente de  $\text{KNO}_3$  y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (N-). Se tomaron muestras de la 3<sup>er</sup> hoja a diferentes tiempos. Para el ensayo de inducción de la senescencia por oscuridad la 3<sup>er</sup> hoja de las plantas de trigo y arroz se cortó por su base y se colocó en cajas con agua destilada. Las hojas se incubaron en oscuridad o se mantuvieron bajo su ciclo normal de luz/oscuridad como control. Se realizaron muestreos a diferentes tiempos. En todos los ensayos se midió la concentración de clorofila, proteínas y aminoácidos; y se analizó el cambio en el perfil de las proteínas foliares mediante SDS-PAGE.

En el ensayo de inducción de la senescencia por deficiencia de N se observó que el proceso de senescencia en las dos especies se indujo rápidamente. Se observó una mayor caída en la concentración de clorofila, proteínas y aminoácidos en las plantas N- que en las plantas crecidas con suplemento de N, así como también una reducción en el nivel de proteínas foliares, principalmente, Rubisco (ribulosa bifosfato carboxilasa-oxigenasa).

Cuando la senescencia fue inducida por incubación de las hojas en oscuridad se observó una disminución en la concentración de clorofila y proteínas junto con un aumento en la concentración de aminoácidos para ambas especies. Los niveles de Rubisco también disminuyeron durante la senescencia. En las hojas de trigo el proceso de senescencia se aceleró durante la incubación en oscuridad siendo más rápido que en arroz, mientras que en las hojas de arroz, el proceso de senescencia se precipitó durante la incubación en luz. Cuando se midieron parámetros de estrés oxidativo se observó que las hojas de ambas especies manifestaron síntomas de estrés durante la incubación en oscuridad; pero, si bien el arroz presentó concentraciones más altas de ascorbato y mayor actividad de ascorbato peroxidasa que el trigo en oscuridad, mostró una rápida caída en la actividad de catalasa en luz, lo que podría explicar la rápida senescencia de las hojas de arroz en estas condiciones.

Las diferencias obtenidas en este trabajo, entre las plantas de trigo y arroz, cuestionan el uso del arroz como especie modelo para el estudio de la regulación génica del proceso de senescencia en trigo.

## Abstract

Wheat (*Triticum aestivum* L.) bread quality depends widely on nitrogen (N) remobilization from leaves to the grains during senescence. Senescence is the final state of leaf development and it involves the activation of numerous genes. It has been associated with the development of oxidative stress. Cells possess an antioxidant system that functions disabling the reactive oxygen species but when this system fails, cellular death overcomes. Physiological and genetic regulation of this process is not still clear. The fact that wheat is an allohexaploid species, makes it very difficult to perform genetic studies. For this reason, in the last years rice (*Oryza sativa* L.) has been proposed as a model for the study of cereals genome. Rice exhibits the advantages of being a diploid species and having a completely sequenced genome.

In order to assess the possibility of using rice as a plant model for the study of senescence regulation in wheat, rice and wheat plants behavior was compared in response to senescence induced by N deficiency and darkness. Plants were grown in pots containing vermiculite as substrate in a growth chamber at  $25 \pm 1$  °C with an irradiance of  $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and a photoperiod of 16 h light/8 h darkness. They were watered daily with nutrient solution containing  $\text{KNO}_3$  10 mM (wheat) y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1 mM (rice). In the N deprivation assay plants were divided in two groups. One of them was watered with the whole nutrient solution (N+) and the other one was watered with nutrient solution lacking of  $\text{KNO}_3$  and  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (N-). Samples of the 3<sup>rd</sup> leaf were taken at different times. In the dark-induced senescence assay, the 3<sup>rd</sup> leaf of the wheat and rice plants was cut at their base and placed in plastic boxes with distilled water. Leaves were incubated in darkness or maintained under they irradiance growth conditions as control. Samples were taken at different times. In all assays chlorophyll, protein and aminoacids content were measured and the protein profile of leaves extracts was analyzed by SDS-PAGE.

When senescence was induced by N deprivation, a rapid progress of senescence could be observed in both species. A fall in chlorophyll, protein and aminoacids concentration was observed in both N- plants and N+ plants. A decrease in Rubisco content was also noticed as senescence proceeded.

In the dark-induced senescence assay, a rapid reduction in chlorophyll and protein concentrations was observed for both species together with an increase in aminoacids concentration. Rubisco levels also decreased during senescence. In wheat plants, senescence was accelerated in darkness conditions and proceeded in a faster way than in rice, while in rice plants senescence precipitated in leaves incubated in light. When oxidative stress parameters were measured, it was observed that leaves of both species manifested symptoms of oxidative stress. Although rice plants incubated in darkness presented higher concentrations of ascorbate and ascorbate peroxidase activity than wheat, they also showed a faster decrease in catalase activity in leaves incubated in light. This differences in catalase behavior could explain the rapid progress of senescence in rice leaves incubated under light conditions.

The results presented in this work present an objection to the use of rice as a model species for the study of senescence regulation in wheat given the biochemical and physiological differences found between them in this study.

## Índice

AGRADECIMIENTOS .....	3
RESUMEN .....	5
ABSTRACT .....	6
ÍNDICE .....	7
INTRODUCCIÓN .....	9
Calidad panadera del trigo .....	9
Absorción y asimilación de nitrógeno .....	10
Transporte y removilización de nitrógeno .....	10
Senescencia .....	11
Senescencia foliar como una forma de muerte celular programada .....	12
Estrés oxidativo y senescencia .....	12
¿Un nuevo modelo para el estudio de la senescencia? .....	13
OBJETIVO .....	13
Objetivo inmediato .....	13
Objetivo mediano .....	13
MATERIALES Y MÉTODOS .....	13
Material vegetal .....	13
Análisis del crecimiento .....	14
Tratamientos para la inducción de la senescencia .....	14
Deficiencia de nitrógeno .....	14
Hojas cortadas incubadas en oscuridad .....	14
Preparación de los extractos .....	14
Deficiencia de nitrógeno .....	14
Hojas cortadas incubadas en oscuridad .....	14
Determinaciones bioquímicas .....	14
Clorofila .....	14
Proteínas .....	14
Aminoácidos .....	15
Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida .....	15
Determinación bioquímica de parámetros indicadores de estrés oxidativo .....	15
Peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	15
Ascorbato .....	15
Malondialdehído (MDA) .....	15
Ascorbato peroxidasa (APX) .....	15
Catalasa .....	16
RESULTADOS .....	16
Análisis del crecimiento .....	16
Curva de expansión foliar .....	16
Cambios ocurridos durante la inducción de la senescencia por deficiencia de nitrógeno .....	17
Cambios en la concentración de clorofila, proteínas solubles y aminoácidos .....	17
Cambios en el perfil de proteínas foliares .....	17
Cambios ocurridos durante la senescencia inducida por oscuridad .....	20
Cambios en la concentración de clorofila, proteínas solubles y aminoácidos .....	20
Cambios en el perfil de proteínas foliares .....	21
Cambios en la concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , ascorbato y malondialdehído .....	23
Cambios en la actividad de catalasa y ascorbato peroxidasa .....	23
DISCUSIÓN .....	26
CONCLUSIONES .....	27
REFERENCIAS .....	27



## Introducción

Los cereales juegan un rol central en los agroecosistemas del mundo, ocupando más del 50% del suelo cultivable en zonas templadas. El hombre ha estado usando cereales como alimento desde mucho antes de empezar a cultivarlos intencionalmente. La posibilidad de almacenar el grano de los cereales de una cosecha a la próxima le permitió sobrevivir largos períodos sin ningún otro alimento, de modo que se transformaron en uno de los productos agrícolas más importantes en la tierra (Payne, 1983; Petr *et al*, 1988).

Los cultivares de cereales actualmente en uso han sido producidos por selección e hibridación, lo que en algunos casos ha llevado a la condición de poliploidía. La transición de especies de cereales salvajes a cultivadas ha producido cambios en muchas otras características y propiedades. Estos cambios han resultado en un aumento de los requerimientos de estos cereales altamente desarrollados para condiciones ambientales específicas conduciendo a un alto rendimiento (Petr *et al*, 1988).

En los países en desarrollo, los cereales, especialmente el arroz, suministran el 70% de los requerimientos energéticos diarios de sus habitantes y también proveen el 70% de los requerimientos proteicos (Payne, 1983). En países con un alto nivel de vida el consumo directo de productos cerealeros provee entre el 20-40% de la energía total y entre el 17-39% de las proteínas totales en los alimentos consumidos. Asimismo, en los países desarrollados, hay una gran demanda de granos para la alimentación animal, que provee la alta proporción de proteínas contenidas en la carne, leche y huevos (Payne, 1983; Petr *et al*, 1988).

Conjuntamente con la explosión poblacional y el aumento en el estándar de vida de muchos países, el consumo total de granos crece considerablemente. Esta situación ha conducido a una discrepancia entre la producción y el consumo de granos, y ha convertido a la producción de cereales en un tema de importancia política y económica en el mundo entero (Petr *et al*, 1988).

Los granos de cereales proveen principalmente hidratos de carbono y son pobres en aceites y proteínas. Generalmente no exceden el 15% de contenido proteico. Los granos de trigo y avena son los más ricos en proteínas y, los de maíz y arroz, los más pobres (Payne 1983).

El almidón es el componente de los granos cuantitativamente más importante. La cantidad y calidad del almidón son muy importantes en la determinación del rendimiento industrial, como también en la calidad final en trigo y en maíz. Por otra parte, la cantidad y calidad de las proteínas son fundamentales para la obtención de una masa capaz de leudar en el caso del trigo (Uhart, 1998).

Las proteínas de los cereales se clasifican, de acuerdo a sus características de solubilidad, en cuatro fracciones: albúminas, globulinas, gliadinas y gluteninas (Payne, 1983). Las albúminas y globulinas, o proteínas citoplasmáticas, son proteínas solubles en agua y tienen funciones metabólicas y estructurales. Se localizan principalmente en el embrión y en la periferia del grano. Las gliadinas y gluteninas son proteínas insolubles en agua, llamadas de reserva, forman el gluten y permiten la elaboración de la masa panadera. Se localizan en el endosperma en forma de inclusiones denominadas corpúsculos o cuerpos proteicos y constituyen la fracción proteica más importante cuantitativa y cualitativamente. Los cuatro grupos de proteínas varían considerablemente en su composición aminoacídica (Uhart, 1998). Todas ellas son ricas en glutamina o asparragina y actúan como fuente de reserva de nitrógeno (N) para el rápido crecimiento del embrión durante la germinación temprana (Payne, 1983). A su vez, las gliadinas son pobres en lisina, mientras que las albúminas y las globulinas son más ricas en este aminoácido. La deficiencia en la calidad nutricional del trigo, así como el sorgo, el maíz y la cebada, es atribuible a su alto contenido de gliadinas (Payne, 1983; Uhart, 1998; Passarella y Savin, 2003).

La calidad de los granos es la razón por la cual sólo se cultiva un pequeño porcentaje de especies en relación con las existentes. Por lo tanto, la definición de calidad depende del uso final del producto y se encuentra determinada por los requerimientos específicos de aquellos que desean moler, procesar o consumir un grano determinado, más que por las propiedades inherentes a dicho grano (Payne, 1983; Passarella y Savin, 2003). El concepto de calidad es variable, ya que depende del criterio especificado con relación al mercado y la industria que utilice dichos granos y, es además dinámico, ya que se modifica en el tiempo con los distintos usos y necesidades de cada región o país, que puede cambiar de acuerdo a nuevos conocimientos o criterios de evaluación (Uhart, 1998; Savin y Sorlino, 2003). Por último, la calidad de los granos está afectada por factores genéticos, como la elección del genotipo a sembrar, y por factores ambientales. Dos de los factores ambientales que pueden alterar la cantidad y composición de las proteínas de modo más notorio son la disponibilidad de N y las altas temperaturas durante el período de llenado de los granos (Savin y Sorlino, 2003).

### Calidad panadera del trigo

El trigo pan (*Triticum aestivum* L.) es una de las especies de trigo más cultivadas en el mundo y de especial importancia en el desarrollo económico y cultural del hombre.

Las proteínas del grano de trigo merecen ser especialmente consideradas debido a su papel fundamental, tanto desde el punto de vista nutritivo como por sus efectos sobre la calidad industrial de este cereal. Las proteínas están presentes en todos los tejidos del grano, encontrándose en mayor proporción en el germen y en la capa de aleurona que en el endosperma y en el pericarpio (Uhart, 1998).

Las gliadinas y las gluteninas son los principales constituyentes del gluten de trigo. La calidad panadera del trigo está determinada por un grupo de proteínas denominadas «gluteninas de alto peso molecular» (Payne, 1987). El balance entre gliadinas y gluteninas junto con el porcentaje total de proteínas determina, entre otras cosas, que la masa tenga las propiedades ideales para la panificación (Passarella y Savin, 2003). Por lo tanto, el gluten de trigo es determinante de la estructura del pan al conferir a la harina propiedades elásticas, por lo que es un cereal con aptitud panadera (Uhart, 1998).

El contenido total de proteínas en el grano de trigo es uno de los factores determinantes de su precio internacional. Un grano de trigo con un porcentaje proteico menor al 11% no sirve para la panificación. En Argentina, el porcentaje de proteínas en el grano ha ido decreciendo en los últimos años. Considerando esto, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA) lanzó un Programa de Mejoramiento de la Calidad de Trigo Argentino modificando el estándar de comercialización por el cual se sumará 2% de bonificación en los precios por cada punto adicional de proteínas logrado por los productores (Savin y Sorlino, 2003).

Esta caída en la calidad panadera del trigo puede atribuirse a la caída en la fertilidad de los suelos, a la escasa fertilización nitrogenada debido a los elevados costos, al aumento en el rendimiento por variedades que requieren una demanda mayor de N y a las políticas de mejoramiento que priorizaron por años el rendimiento a expensas de la calidad. Las dinámicas de acumulación y removilización de N y carbono (C) en la planta están asociadas con la calidad y concentración de proteínas en el grano. En las plantas de trigo la acumulación del 75-85% de N que tendrán en la cosecha se produce antes de la antesis. Este N será posteriormente removilizado a la espiga durante el llenado de los granos, hecho que ocurre durante la senescencia, por esta razón es importante comprender la regulación de este proceso (Uhart, 1998).

El N es un componente esencial de la mayoría de las macromoléculas biológicas y es el macronutriente que las plantas requieren en mayor cantidad constituyendo un factor limitante para las mismas (Feller y Keist, 1986). En plantas como el trigo, el N absorbido del suelo es asimilado principalmente en las células del mesófilo de las hojas maduras, denominadas fuente. Los primeros productos estables de esta asimilación son los aminoácidos, los que pueden ser almacenados, utilizados para la síntesis proteica o removilizados vía floema hacia los tejidos llamados destino, como lo son las hojas jóvenes, raíces y órganos reproductivos (Dalling, 1985).

### Absorción y asimilación de nitrógeno

El N se encuentra en el suelo en bajas concentraciones y su disponibilidad cambia en períodos cortos, por ello las plantas han desarrollado sistemas de incorporación de compuestos nitrogenados de alta eficiencia en las células de la raíz (Crawford, 1995), de forma que la entrada neta de un nutriente depende de las necesidades de la planta y no sólo de la disponibilidad del mismo en el medio circundante de la raíz (Lawlor, 2002).

Las raíces poseen sistemas de transporte activo de baja y alta afinidad para la absorción de compuestos nitrogenados (Oaks, 1994; Crawford, 1995). La reducción del nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) se puede llevar a cabo tanto en las raíces como en los vástagos (Dalling, 1985). Este proceso involucra dos reacciones catalizadas por las enzimas nitrato reductasa (NR) que cataliza la reducción del  $\text{NO}_3^-$  a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) en el citosol; y nitrito reductasa (NiR) que reduce el  $\text{NO}_2^-$  tóxico para la planta a amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) (Lawlor, 2002).

El  $\text{NH}_4^+$  puede ser absorbido directamente del suelo y además es continuamente generado por procesos anabólicos y catabólicos en las hojas. Pudiendo causar toxicidad si se acumula en los tejidos y no es incorporado a los compuestos orgánicos (Lawlor, 2002).

### Transporte y removilización de nitrógeno

A través de la planta se dan flujos de solutos que permiten la interacción entre sí de los distintos órganos. El transporte por el xilema va desde las raíces hacia las láminas de las hojas, mientras que en el floema el flujo es bidireccional. Las hojas completamente expandidas son las fuentes principales del floema mientras que las hojas en desarrollo, los órganos reproductivos y las raíces son los principales destinos (Simpson, 1986).

El N requerido para el crecimiento del vástago es transportado desde las raíces vía xilema como una mezcla de N inorgánico y orgánico, siendo el  $\text{NO}_3^-$  y los aminoácidos las formas predominantes (Simpson, 1986). Cuando la planta está creciendo con  $\text{NO}_3^-$  como fuente principal de N y la reducción ocurre principalmente en las hojas, se generan grandes cantidades de ácidos orgánicos fuertes que, para mantener el pH

interno de la célula, son transportados hasta las raíces por el floema. Como los niveles de N se estabilizan en las hojas completamente expandidas, gran parte del N entrante es re-exportado hacia los destinos principales por el floema. A lo largo de este recorrido el N orgánico sufre un ciclado entre las hojas y las raíces por floema y xilema pudiendo ser transferido de un punto a otro (Dalling, 1985).

Durante el crecimiento vegetativo, la tasa de reducción de  $\text{NO}_3^-$ , la síntesis de carboxilatos y de aminoácidos es alta. La mayoría de los aminoácidos serán utilizados para la síntesis de proteínas, mientras que los carboxilatos se transportarán a la raíz. (Lawlor, 2002) Durante la formación de los órganos reproductivos, la reducción de  $\text{NO}_3^-$  en las hojas disminuye, a la vez que la exportación desde las hojas es incrementada por la removilización de N desde los órganos fuente. La mayoría del N trasladado está destinado para el llenado de los granos (Feller y Keist, 1986).

Con el fin de utilizar el N disponible en los órganos vegetativos, la planta debe senescer (Dalling, 1985). Este proceso está caracterizado por la transición desde la asimilación de N a la removilización del mismo (Feller y Fischer, 1994; Buchanan-Wollaston, 1997). La removilización desde las hojas senescentes es importante en los cultivos de semillas (Feller y Keist, 1986), en procesos como el desarrollo de las hojas jóvenes, o en la determinación del contenido de proteínas del grano en cereales y legumbres (Caputo y Barneix, 1997). Una relación estrecha entre la removilización de N en hojas senescentes y el llenado de los granos pudo ser observada en trigo y arroz (*Oryza sativa* L.) (Feller y Keist, 1986). En hojas maduras de trigo, el N es removilizado desde las hojas senescentes a los granos. Durante la maduración las capas de las células periféricas de los granos senescen y el N removilizado queda disponible para el embrión y para la formación de proteínas de almacenamiento en el endosperma (Feller y Keist, 1986).

### Senescencia

Las plantas son implacables recicladores de recursos y lo hacen empleando la senescencia y la muerte para la reasignación de recursos (Thomas *et al*, 2003). Sus órganos fotosintéticos especializados, las hojas, hacen que la planta invierta mucha energía y nutrientes en la producción de las mismas. Después de un período fotosintético productivo, la contribución de fotosintatos de la hoja disminuye y entran en el último estadio del desarrollo: la senescencia (Quirino *et al*, 2000; Yoshida, 2003).

A pesar de que la senescencia progresa con la edad, no es un simple proceso de envejecimiento. El proceso de envejecimiento es una acumulación pasiva de lesiones con la edad, sin referirse a la muerte como una consecuencia, mientras que la senescencia siempre termina con la muerte (Smart, 1994; Noodén *et al*, 1997). Sin embargo, está demostrado que la senescencia puede ocurrir en forma independiente de la edad ya que puede ser inducida en tejidos jóvenes y también puede acontecer en forma independiente de la muerte puesto que puede ser revertida (Buchanan-Wollaston, 1997; Bochman, 2002; Thomas *et al*, 2003).

La senescencia foliar es un proceso desencadenado tanto por factores ambientales como genéticos, particularmente a través de la producción de fitohormonas como las citocininas, etileno y ácido abscísico (ABA), que la aceleran o retrasan (Feller y Fischer, 1994). Las citocininas, producidas principalmente en la raíz, bajan los niveles de clorofilasa, nucleasas y proteasas en las hojas de algunas especies durante la senescencia, retardando la pérdida de proteínas, ARN y clorofila. Cuando empieza la senescencia se produce un marcado descenso de los niveles de citocininas en el xilema, lo que sugiere que una disminución de estos compuestos podría estar relacionada con la inducción de la senescencia (Smart, 1994). Además, una aplicación externa de citocininas generalmente retarda la senescencia (Gan y Amasino, 1997). A diferencia de las citocininas, el etileno y el ABA aceleran la senescencia junto con el jasmonato (Feller y Fischer, 1994; Chen y Kao, 1998; Lin *et al*, 2002).

A nivel celular, la senescencia se desenvuelve de una manera ordenada. Los cloroplastos, que contienen la mayoría de las proteínas celulares de una hoja, son una de las primeras organelas en ser blanco del catabolismo (Quirino *et al*, 2000). La enzima Rubisco (ribulosa bifosfato carboxilasa-oxigenasa) es la enzima clave en la fotosíntesis y la proteína foliar predominante. Esta enzima cataliza dos reacciones competitivas; la carboxilación y oxigenación de la ribulosa bifosfato (RuBP) y está localizada en el estroma de los cloroplastos, representando más del 50% de las proteínas solubles en las hojas verdes (Makino *et al*, 1984). Durante la senescencia ésta proteína es rápidamente degradada (Feller y Keist, 1986) y sirve como la fuente simple más importante de N para el grano en desarrollo (Dalling, 1985). Otras organelas como los peroxisomas, también pasan por cambios bioquímicos mientras ocurre la senescencia. El núcleo, necesario para la transcripción génica, y las mitocondrias, necesarias para proveer energía, se mantienen intactos hasta las etapas más tardías de la senescencia (Quirino *et al*, 2000). La vacuola es la organela más grande de las células vegetales y en ella se encuentra una variedad de actividades hidrolíticas (Feller y Keist, 1986) incluyendo un gran número de proteasas (Vierstra, 1996; Roberts *et al*, 2003). Por este motivo también puede contribuir al metabolismo en hojas senescentes (Feller y Fischer, 1994), incluso en los últimos pasos de la degradación de la clorofila (Smart, 1994). El rol de esta organela no está totalmente claro; se considera

que contribuye poco a la degradación total de proteínas en una célula vegetal típica y que actúa durante las etapas finales de la senescencia degradando cualquier remanente citoplasmático después de la ruptura del tonoplasto (Vierstra, 1996). La proteólisis proporciona un mecanismo para la síntesis de proteínas y la reutilización de N para mantener la homeostasis celular y el crecimiento (Ho *et al*, 2000).

Los síntomas visibles de la senescencia se relacionan con la degradación de muchas macromoléculas complejas responsables de la apariencia de la planta. Un ejemplo de ello es la pérdida de clorofila, que empieza típicamente en los márgenes de la hoja y progresa hacia el interior (Quirino *et al*, 2000). El mesófilo de la hoja empieza a perder su color verde y se vuelve amarillo o rojo (Smart, 1994). Esta manifestación visible es resultado de la pérdida de clorofila durante el desmantelamiento de los cloroplastos y la síntesis de nuevos compuestos como fenoles y antocianinas. Al mismo tiempo ocurren muchos otros eventos catabólicos, tales como la degradación de lípidos y ácidos nucleicos. De acuerdo con el rol removilizante del programa de senescencia, la degradación de proteínas esta acompañada por un aumento en la cantidad de aminoácidos (Quirino *et al*, 2000).

Genéticamente, la senescencia está regulada por una expresión diferencial que involucra la activación de genes específicos denominados genes asociados a la senescencia (SAG por **Senescence Associated Genes**) y a la represión de otros (Dangl *et al*, 2000; Yoshida, 2003). El análisis de estos SAG ha resultado en la identificación de un número de genes involucrados en el salvataje o protección de funciones. Esto incluye genes que codifican para proteasas, nucleasas, enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos, carbohidratos y N y otras enzimas involucradas en la removilización de nutrientes. Otra clase de secuencias codifica para funciones de respuesta a estrés y finalmente muchas secuencias clonadas no tienen un rol definido (Bleecker, 1998).

El aislamiento de genes regulatorios, especialmente genes que controlan el desarrollo de la senescencia dependiente de la edad, es fundamental para comprender el mecanismo de la senescencia foliar (Nam, 1997).

Para simplificar el estudio de la senescencia foliar, se han utilizado diferentes sistemas modelos, tales como la incubación en oscuridad de hojas cortadas o segmentos de hojas (Feller y Fischer, 1994; Vierstra, 1996) que permiten la inducción de la senescencia de una manera uniforme y rápida. Aunque estos sistemas otorgan ventajas al estudio, no se puede asumir que representan verdaderamente al sistema natural de senescencia en la planta (Smart, 1994).

### **Senescencia foliar como una forma de muerte celular programada**

La muerte celular programada (MCP) es un término amplio que refiere al proceso por el cual las células promueven su propia muerte a través de la activación de sistemas de autodestrucción. Actualmente está aceptado que muchos procesos de desarrollo de las plantas y respuestas a estrés ocurren a través de MCP (Gan y Amasino, 1997).

La apoptosis es la forma principal de muerte celular, definida por características morfológicas y bioquímicas distintivas que incluyen condensación y fragmentación de cromatina, condensación citoplasmática, vacuolización y formación de cuerpos apoptóticos (Lee y Chen, 2002). El principal evento molecular descrito es el patrón específico de clivaje del ADN, detectado usando electroforesis en geles de agarosa. Típicamente las bandas de ADN que aparecen en el gel corresponden a múltiplos de 180 pb debido a la escisión internucleosomal de los fragmentos de cromatina (Danon *et al*, 2000). Sin embargo, en estudios realizados en arroz la fragmentación del ADN no estuvo acompañada por la generación de fragmentos oligonucleosomales, por lo que está en discusión que la MCP durante la senescencia foliar en arroz sea apoptótica (Lee y Chen, 2002).

En plantas, la muerte celular selectiva es necesaria durante el desarrollo y también ocurre en respuesta al ataque de patógenos y respuestas al estrés (Yoshida, 2003). Este tipo de MCP fue descrita durante el desarrollo del endosperma, la partenogénesis diploide, el desarrollo de las anteras, la muerte de las células de la capa de aleurona y la diferenciación del xilema (Danon *et al*, 2000; Lee y Chen, 2002).

### **Estrés oxidativo y senescencia**

Las plantas frecuentemente experimentan estrés, cuando las condiciones externas afectan negativamente el crecimiento, desarrollo, o productividad. Estos estréses pueden ser bióticos o abióticos, estos últimos producidos por un exceso o déficit en el hábitat físico o químico (Bray *et al*, 2000). Las condiciones de estrés inducen la senescencia foliar y en consecuencia, la removilización de N y otros nutrientes. Uno de los factores de estrés que más frecuentemente sufren las plantas de trigo es la deficiencia de N. Los síntomas de la deficiencia incluyen la clorosis, el estrechamiento de las hojas y la llamada «punta quemada» (Makino *et al*, 1984; Mei y Thimann, 1984).

El estrés oxidativo resulta de condiciones que promueven la formación de especies reactivas de oxígeno

(ROS por *Reactive Oxygen Species*) que dañan o matan las células. Las ROS son formadas durante reacciones de óxido-reducción y durante la reducción incompleta del oxígeno o la oxidación del agua. Ejemplos de estas ROS son el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), los radicales hidroxilo ( $OH^\bullet$ ) y perhidroxilo ( $O_2H^\bullet$ ) (Jiménez *et al*, 1998). Estas moléculas reactivas son altamente destructivas para lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. No obstante, estas ROS son requeridas para la lignificación y funcionan como señales en la respuesta de defensa ante patógenos. Las plantas se deshacen de éstas moléculas reactivas mediante el uso de sistemas de defensa con antioxidantes presentes en diferentes compartimentos subcelulares. Cuando los sistemas de defensa fallan, sobreviene la muerte celular (Prochazkova *et al*, 2001). El sistema antioxidante de defensa incluye antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Bray *et al*, 2000). Entre las enzimas antioxidantes se encuentran la superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa y ascorbato peroxidasa (APX). Los antioxidantes no enzimáticos incluyen ascorbato (vitamina C), glutatión,  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno y flavonoides (del Río *et al*, 1998).

La susceptibilidad a estrés oxidativo depende en general del balance entre la producción de oxidantes y la capacidad antioxidante de la célula (Pastori y del Río, 1997; del Río *et al*, 1998). En células vegetales, los cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas son generadores intracelulares de ROS (Jiménez *et al*, 1998).

### ¿Un nuevo modelo para el estudio de la senescencia?

La mayoría de los estudios genéticos realizados en plantas, incluyendo el estudio de la senescencia, hasta el momento son sobre *Arabidopsis thaliana*, una dicotiledónea tomada como modelo debido a su pequeño genoma. Sin embargo, la mayoría de los cultivos de importancia alimenticia como el trigo, maíz, cebada, sorgo, caña de azúcar y arroz, son monocotiledóneas gramíneas, y por lo tanto su fisiología, bioquímica y genética difieren mucho de las dicotiledóneas (Bennetzen, 1999; Qiaoping *et al*, 2001).

El trigo es una especie alohexaploide cuyos 42 cromosomas están divididos en tres genomas A, B y D. La similitud entre los cromosomas de los distintos genomas hace que se los llame homólogos (Gallego *et al*, 1998). Estos genes homólogos contribuyen al enmascaramiento fenotípico de las mutantes recesivas y a un menor desarrollo de mapas genéticos (Gale *et al*, 2003). Todo esto representa un serio inconveniente para la identificación de los genes involucrados en la removilización de N y en la acumulación de proteínas en el grano de trigo.

En los últimos años se ha propuesto al arroz como segundo modelo de estudio, ya que además de ser el cultivo número uno en la producción mundial, posee el genoma más pequeño de las monocotiledóneas anteriormente nombradas (440 Mb), una competencia de transformación razonable y un mapa genético detallado. Estudios comparativos con marcadores de ADN han indicado un contenido genético similar y una colinealidad a lo largo del mismo entre el arroz y otras gramíneas, sugiriendo que el arroz puede proveer amplia información para la caracterización de genomas de gramíneas más extensos, como el trigo (16000 Mb) y permitiría una comparación entre el modelo de dicotiledóneas (*Arabidopsis*) y la mayoría de las monocotiledóneas de importancia económica (Qiaoping *et al*, 2001; Travis, 2002).

## Objetivo

### Objetivo mediano

- Comprender la regulación del mecanismo de transporte de nitrógeno desde las hojas al grano de trigo durante la senescencia.

### Objetivo inmediato

- Estudiar y comparar la respuesta de plantas de trigo y arroz en ensayos de senescencia inducida por deficiencia de nitrógeno y por oscuridad con el objeto de determinar si el arroz puede utilizarse como planta modelo para el estudio de la senescencia en trigo.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Las plantas de trigo (*Triticum aestivum* L. var. Pro INTA Isla Verde) y de arroz (*Oryza sativa* L. var. El Paso) se cultivaron en cámara de cultivo con una irradiancia de  $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y un fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad, a temperatura controlada ( $25 \pm 1$  °C).

Las semillas de trigo se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio 5% (v/v) durante 5 minutos en agitación constante y posteriormente se lavaron con abundante agua destilada. Las semillas de

arroz se remojaron en agua destilada a temperatura ambiente durante dos días. Finalmente, las semillas de ambas especies se pusieron a germinar en bandejas de plástico con papel absorbente humedecido. Las plántulas se trasplantaron a macetas de plástico de 12 cm de diámetro, utilizando vermiculita húmeda como sustrato.

Las plantas de trigo se regaron diariamente con solución nutritiva conteniendo  $\text{KNO}_3$  10 mM según Hoagland y Arnon (1950) y las plantas de arroz también se regaron diariamente con solución nutritiva conteniendo  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1 mM según el protocolo de Makino *et al* (1984).

### **Análisis del crecimiento**

A partir del día de trasplante de las plántulas de trigo y de arroz, se midió diariamente la expansión foliar y se le asignaron valores arbitrarios previamente establecidos: por cada hoja completamente expandida se sumó un (1) punto, y a las parcialmente expandidas, una fracción de uno (1).

### **Tratamientos para la inducción de la senescencia**

#### **Deficiencia de nitrógeno**

Transcurridos 15 días de crecimiento (contados a partir del día de trasplante), las plantas de trigo y arroz se dividieron en dos grupos. Uno de los grupos se regó diariamente con la solución nutritiva correspondiente (N+). Las macetas del otro grupo (N-) se lavaron con exceso de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada para eliminar los posibles nutrientes retenidos en la vermiculita. Para mantener la condición de deficiencia de N (grupo de macetas N-), las plantas de trigo se regaron con solución nutritiva carente de  $\text{KNO}_3$  y las plantas de arroz se regaron con solución nutritiva carente de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

Se tomaron muestras a diferentes tiempos de la tercer hoja (la última hoja totalmente expandida) de cada planta. Las hojas se pesaron, se congelaron en N líquido y se conservaron en freezer a  $-50^\circ\text{C}$ .

#### **Hojas cortadas incubadas en oscuridad**

A los 18 días después del trasplante, la tercer hoja de las plantas de trigo se cortó por su base. Las hojas se pesaron y se colocaron en cajas de plástico con tapa no hermética con agua destilada, creando de ésta manera un ambiente de cámara húmeda para evitar la desecación. Un grupo de cajas se incubó en oscuridad continua para inducir senescencia y otro grupo se mantuvo bajo el ciclo normal de luz/oscuridad como control. Se tomaron muestras a diferentes tiempos congelando las hojas en N líquido y conservándolas en freezer a  $-50^\circ\text{C}$ .

Al día 27 posterior al trasplante, se realizó el mismo procedimiento con hojas de las plantas de arroz.

### **Preparación de los extractos**

#### **Deficiencia de nitrógeno**

Para la preparación de los extractos tanto las hojas de trigo como las de arroz fueron molidas con N líquido en mortero frío. El polvo obtenido fue extraído con buffer de extracción (buffer fosfato de sodio 50 mM pH 8,  $\beta$ -mercaptoetanol 1 mM, glicerol 20% (v/v) y polivinilpolipirrolidina (PVPP) 1% (p/v) usando 3 ml de buffer por cada gramo de peso fresco de hoja.

Los homogenatos fueron filtrados con gasa y se centrifugaron a 100.000 xg por 1 hora en ultracentrífuga. El sobrenadante (denominado  $S_{100}$ ) fue utilizado como fuente para las determinaciones bioquímicas.

#### **Hojas cortadas incubadas en oscuridad**

La preparación de los extractos varió de acuerdo a la determinación bioquímica realizada.

### **Determinaciones bioquímicas**

#### **Clorofila**

La concentración de clorofila se determinó según el método de Arnon (1949). Se tomaron 100  $\mu\text{l}$  del homogenato sin centrifugar y se agregaron 900  $\mu\text{l}$  de acetona 80% (v/v). Las muestras se centrifugaron a 16.000 xg durante 10 minutos y se midió la absorbancia a 652 nm en el sobrenadante.

#### **Proteínas**

La concentración de proteínas se midió de acuerdo al método de Bradford (1976) utilizando seroalbúmina bovina como estándar.

### Aminoácidos

La concentración de aminoácidos se midió según el método descrito por Yemm y Cocking (1955). Se tomaron 100  $\mu$ l del  $S_{100}$  y se agregaron 400  $\mu$ l de ácido tricloroacético (TCA) 5% (p/v) para precipitar las proteínas presentes. Las muestras se dejaron reposar durante 15 minutos en hielo y se centrifugaron a 16.000 xg por 15 minutos. Un volumen variable del sobrenadante (hasta 500  $\mu$ l) se mezcló con 250  $\mu$ l de buffer citrato de sodio 0,2 M pH 5, 100  $\mu$ l de una solución de ninhidrina 5% (p/v) en metilcelosolve (éter monometílico del etilenglicol), y 500  $\mu$ l de KCN 0,2 mM en metilcelosolve. Una vez homogeneizadas las muestras se calentaron durante 15 minutos a 100 °C, se dejaron enfriar y se midió la absorbancia a 570 nm. La curva de calibración se realizó con una solución estándar de glicina 15  $\mu$ g/ml.

### Electroforesis en geles desnaturalizantes de poli(acrilamida)

El perfil de proteínas de las muestras se analizó por SDS-PAGE 15% según Laemmli (1970). Las muestras se prepararon en buffer de siembra (SDS 2.3% (p/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 5% (v/v), glicerol 10% (v/v), Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, azul de bromofenol 0,025% (p/v)), se calentaron a 100 °C durante 5 minutos. La electroforesis se realizó a 200 V durante 50 minutos. Las proteínas se visualizaron por tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250. Los geles se cuantificaron por densitometría con el programa UVP Gel Prot.

### Determinación bioquímica de parámetros indicadores de estrés oxidativo

#### Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )

El nivel de  $H_2O_2$  se midió según el método de Jana y Choudhri (1981). El material vegetal fue homogeneizado usando 10 ml de buffer fosfato de potasio 50 mM pH 6,8 con el agregado de PVPP 1% (p/v) por cada gramo de peso fresco de hoja y centrifugado a 8.000 xg durante 20 minutos. Los niveles de peróxido de hidrógeno en 1 ml de sobrenadante se detectaron por agregado de 0,3 ml óxido de sulfato de titanio 0.1% (v/v) en ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 20% (v/v) y centrifugación a 9.500 xg durante 30 minutos. Se midió la absorbancia a 410 nm en el sobrenadante. Para realizar la curva de calibración se utilizó como estándar  $H_2O_2$  0,01 M procesado de la misma forma.

#### Ascorbato

El contenido de ascorbato se midió según el método de Law *et al* (1983). Este ensayo se basa en la reducción de  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  por el ascorbato en solución ácida. El material vegetal se homogeneizó con 3 ml de TCA 10% (p/v) por cada 0,3 gramos de peso fresco de hoja y se centrifugó a 18.000 xg durante 20 minutos. El pH del sobrenadante se ajustó a 5,5- 6,5 con 2 ml de buffer fosfato de sodio 150 mM pH 6,4 y 240  $\mu$ l de hidróxido de sodio (NaOH) 4 M. Se mezclaron secuencialmente 200  $\mu$ l de las muestras con 100  $\mu$ l de  $H_2O_2$ , 200  $\mu$ l de TCA 10% (p/v) y 200  $\mu$ l de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) 44% (v/v). La reducción del  $Fe^{3+}$  por el ascorbato se detectó por el agregado de 200  $\mu$ l de bipyridilo 4% (p/v) y 100  $\mu$ l de cloruro férrico ( $FeCl_3$ ) 3% (v/v). La reacción se llevo a cabo protegiendo los tubos de la luz a partir del agregado de bipyridilo debido a la fotosensibilidad del mismo. Se midió la absorbancia de las muestras a 525 nm. Para realizar la curva de calibración se utilizó una solución de ascorbato 1 mM diluido en buffer fosfato de sodio 150 mM pH 6,4.

#### Malondialdehído (MDA)

La concentración de MDA se determinó como indicador de peroxidación de lípidos según Heath y Parkers (1968). Las muestras se homogeneizaron con 10 ml de TCA 20% (p/v) por cada gramo de peso fresco de hoja y posteriormente se centrifugaron a 18.000 xg durante 20 minutos. Se tomó 1 ml del sobrenadante y se agregó igual volumen de reactivo de determinación (ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (v/v) en TCA 20% (p/v)) más 100  $\mu$ l de butilhidroxitolueno (BHT) 4% (v/v) en etanol. Luego se enfriaron las muestras en baño de hielo y se centrifugaron a 900 xg durante 3 minutos. Se midió la absorbancia a 532 nm en el sobrenadante contra un blanco de 2 ml de TBA, sustrayendo la absorbancia de turbidez a 600 nm. La cantidad de malondialdehído se calculó en base al coeficiente de extinción molar del MDA a 532 nm de 155  $mM^{-1} cm^{-1}$ .

#### Ascorbato peroxidasa (APX)

La actividad de la enzima ascorbato peroxidasa fue determinada según Nakano y Asada (1987). El material vegetal se homogeneizó con 10 ml de buffer de extracción (fosfato de potasio 50 mM pH 7,8, ácido ascórbico 5 mM, EDTA 1 mM y PVPP 1% (p/v)) por cada gramo de hoja de trigo y con 20 ml de buffer de extracción por cada gramo de hoja de arroz. Las muestras se centrifugaron a 18.000 xg durante 20 minutos y se determinó la absorbancia a 290 nm en 50  $\mu$ l del sobrenadante con 395  $\mu$ l de buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7, 50  $\mu$ l de ascorbato 5 mM y 5  $\mu$ l de  $H_2O_2$  0,1 M. La cantidad de ascorbato oxidado se calculó según el coeficiente de extinción molar del ascorbato a 290 nm de 2,8  $mM^{-1} cm^{-1}$ . Se realizaron dos controles de

reacción: sin extracto (para considerar la posibilidad de oxidación no enzimática del ascorbato) y sin  $H_2O_2$  (para considerar la oxidación del ascorbato dependiente de peróxido).

### Catalasa

La actividad de la enzima catalasa en la descomposición del  $H_2O_2$  fue determinada según el método de Aebi (1984). El material vegetal se homogeneizó en frío con 10 ml de buffer de extracción (buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,8, Tritón X-100 0,5% (v/v), EDTA 0,5 mM y PVPP 1% (p/v)) por cada gramo de peso fresco de hoja y se centrifugó a 18.000 xg durante 20 minutos. Se determinó la absorbancia a 240 nm en 25  $\mu$ l de sobrenadante con el agregado de 470  $\mu$ l de buffer de determinación (buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7) y 5  $\mu$ l de  $H_2O_2$  50 mM. Se realizó un control sin  $H_2O_2$  para determinar la pérdida inespecífica de peróxido y finalmente la reducción de  $H_2O_2$  se calculó en base al coeficiente de extinción molar del  $H_2O_2$  a 240 nm de  $28 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

## Resultados

### Análisis del crecimiento

#### Curva de expansión foliar

El desarrollo de las plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) y arroz (*Oryza sativa* L.) fue seguido desde la germinación hasta el período de macollaje en un tiempo de aproximadamente 20 días para ambas especies (Fig. 1).

En cuanto a las características macroscópicas, se observó que las plantas de trigo tenían hojas de color verde oscuro y eran más anchas desde su base que las plantas de arroz, que tenían hojas de color verde claro y eran más angostas (Fig. 1).

Durante la etapa de germinación se advirtió que las plantas de trigo germinaban en tres días mientras que las de arroz, en 4-5 días (se tomó como índice de la germinación la aparición de la radícula). Luego del trasplante de las plántulas se continuó midiendo la expansión foliar y los datos se utilizaron para graficar una curva de desarrollo en función del tiempo (Fig. 2). A los 14 días las plantas de trigo presentaron seis hojas totalmente expandidas. Mientras que, las plantas de arroz presentaron solamente dos hojas totalmente expandidas (Fig. 2).



**Figura 1.** Plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) y arroz (*Oryza sativa* L.) de 25 días.

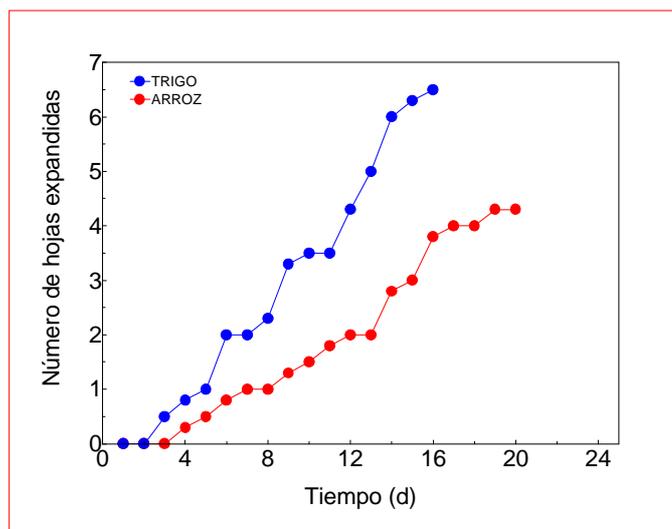


Figura 2. Curva de desarrollo foliar de plantas de trigo (●) y arroz (●).

## Cambios ocurridos durante la inducción de la senescencia por deficiencia de nitrógeno

### Cambios en la concentración de clorofila, proteínas solubles y aminoácidos

Todos los parámetros observados disminuyeron con el tiempo en ambas especies, pero la disminución fue mucho más rápida cuando las plantas fueron sometidas a la deficiencia de N.

La concentración de clorofila fue inicialmente mayor en las plantas de trigo que en las de arroz (Fig. 3 A y B). La caída de la concentración de clorofila fue inicialmente más lenta en trigo que en arroz, pero se aceleró luego de 10 días de deficiencia. Al cabo de 13 días en las plantas de trigo casi el 80% del contenido inicial de clorofila había sido degradado (Fig. 3 A). En las plantas de arroz (Fig. 3 B), también pudo observarse que transcurridos 15 días de tratamiento la concentración de clorofila se redujo en un 80%. El contenido de clorofila en las plantas de trigo N+ (Fig. 3 A) disminuyó sólo un 25% al final del tratamiento mientras que en las plantas de arroz (Fig. 3 B), un 60% de la concentración de clorofila había sido degradado. Al cabo de 14 días la 3<sup>er</sup> hoja de trigo estaba tan deteriorada que no se siguió muestreando. En cambio el muestreo en arroz duró hasta el día 19.

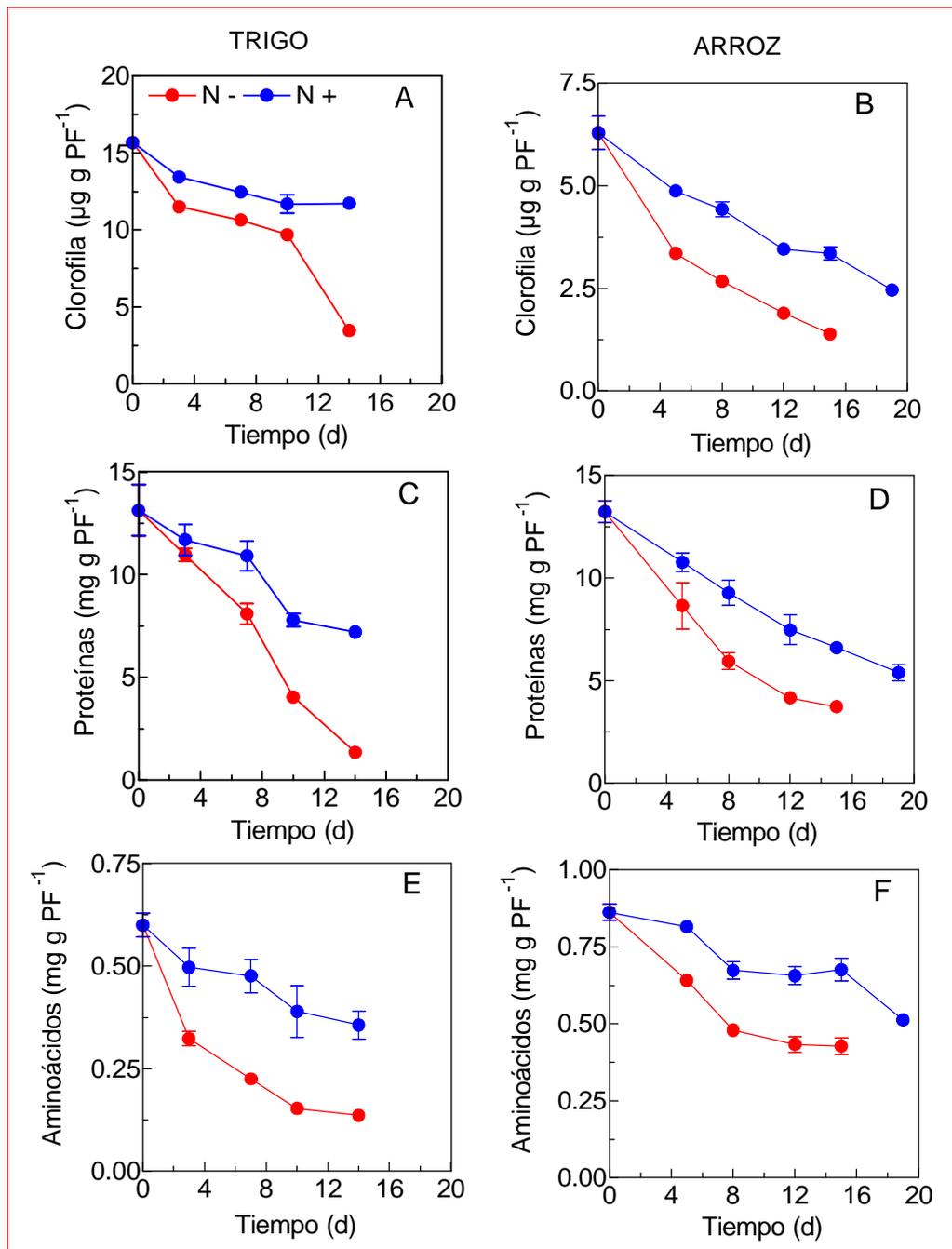
La concentración de proteínas solubles fue similar en ambas especies al inicio del experimento (Fig. 3 C y D), y disminuyó más rápidamente en trigo que en arroz. Al final del tratamiento de deficiencia de N (15 días para trigo y 19 días para arroz) la degradación de proteínas alcanzó el 90% en las plantas de trigo (Fig. 3 C) y el 70% en las plantas de arroz (Fig. 3 D). El contenido de proteínas en las plantas de trigo cultivadas con suplemento de N (Fig. 3 C) disminuyó un 45% al final del tratamiento. Mientras que en las plantas de arroz (Fig. 3 D) la degradación de proteínas fue del 50%.

La concentración de aminoácidos solubles fue inicialmente más alta en arroz (Fig. 3 E y F) aunque la disminución durante el período de deficiencia fue más rápida en trigo. Al final del ensayo, las plantas de trigo mantenidas con deficiencia de N redujeron su concentración de aminoácidos en un 80% (Fig. 3 E) y las plantas de arroz en un 50% (Fig. 3 F). El contenido de aminoácidos en las hojas de plantas de trigo cultivadas con suplemento de N al final del tratamiento disminuyó al 40% (Fig. 3 E) mientras que en las plantas de arroz cayó al 30% (Fig. 3 F).

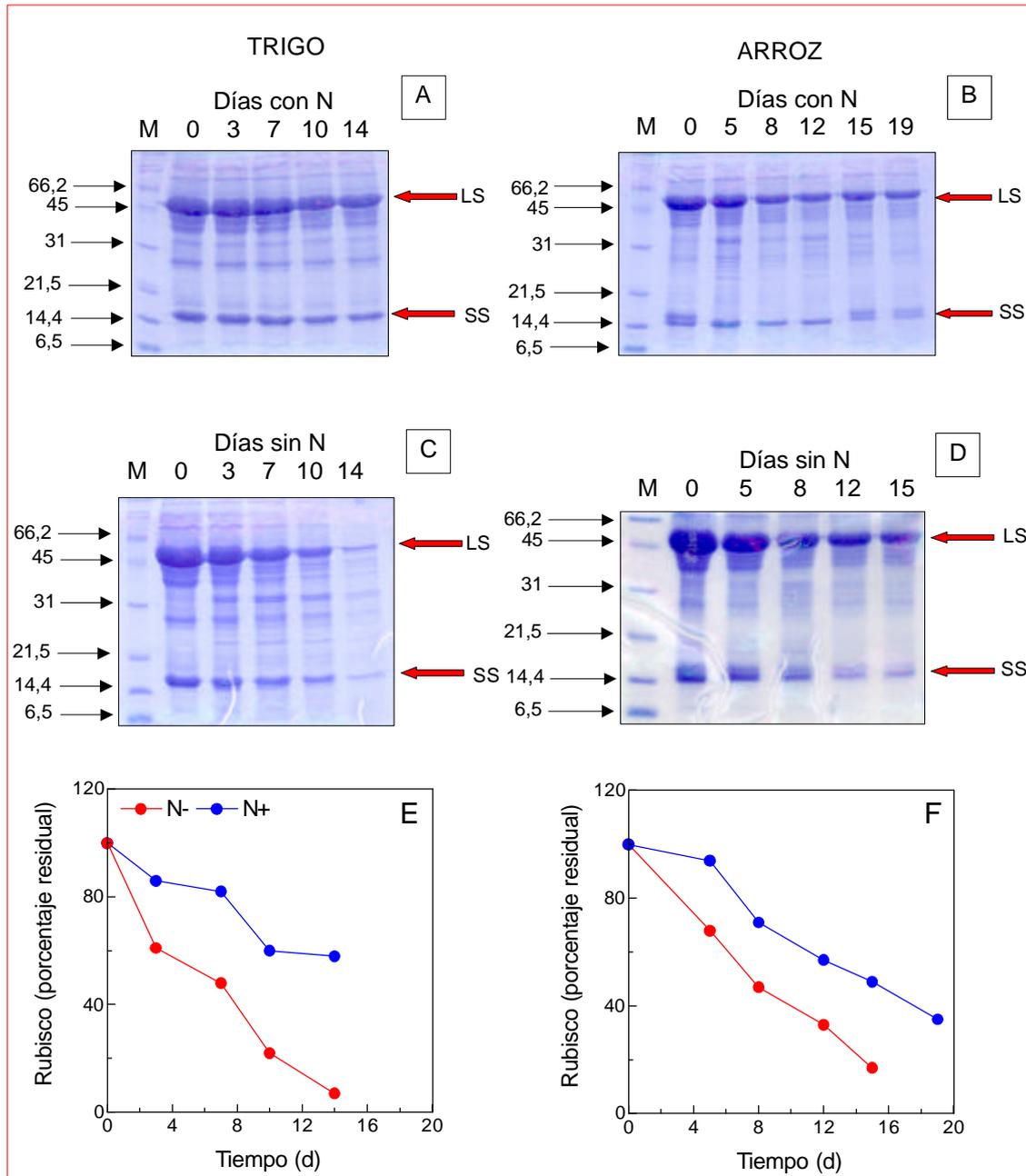
### Cambios en el perfil de proteínas foliares

La variación en el perfil de proteínas foliares durante la inducción de la senescencia por deficiencia de N se analizó mediante electroforesis en SDS-PAGE (Fig. 4 A, B, C y D). La reducción en la intensidad de las bandas a lo largo de todo el perfil fue mayor en las plantas de trigo cultivadas sin N (Fig. 4 C) que en las plantas que crecieron con suplemento de N (Fig. 4 A), siendo éste efecto más notorio para las bandas correspondientes a la subunidad mayor (LS por *Large Subunit*) y menor (SS por *Small Subunit*) de la Rubisco. En las plantas de arroz la disminución en la intensidad de las bandas también fue mayor en las sometidas a la deficiencia de N (Fig. 4 D) que en las plantas N+ (Fig. 4 B), siendo de igual manera más

representativas las bandas correspondientes a las subunidades de la Rubisco. En las plantas de trigo deficientes en N el contenido residual de la subunidad mayor de la Rubisco (Fig. 4 E) fue apenas del 10% al final del tratamiento y del 20% para las plantas de arroz (Fig. 4 F). Las plantas de trigo que permanecieron con suministro de N redujeron su contenido de LS en un 40% (Fig. 4 E) en forma similar a lo ocurrido en las plantas de arroz para las que la pérdida de LS fue de un 45% (Fig. 4 F).



**Figura 3.** Cambios en la concentración de clorofila (A y B), proteínas solubles (C y D) y aminoácidos (E y F) en plantas de trigo y arroz cultivadas en presencia (●) o ausencia (●) de N. Los puntos representan la media de 3 repeticiones  $\pm$  el error estándar.



**Figura 4.** Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 15% de extractos de plantas de trigo (A y C) y arroz (B y D) cultivadas con suplemento de N (A y B) y sometidas a deficiencia de N (C y D). Se sembraron cantidades equivalentes de cada muestra: 6,5 mg PF (TRIGO N+ y N-; ARROZ N-) y 5mg (ARROZ N+). Las flechas rojas señalan las bandas correspondientes a la subunidad mayor (LS) y menor (SS) de la Rubisco. Las flechas negras muestran la posición de los marcadores de peso molecular (M) y su masa (Mr) expresada en kDa. Los gráficos representan el porcentaje remanente de la subunidad mayor de la Rubisco de plantas de trigo (E) y arroz (F) cultivadas con suplemento de N (●) y sometidas a la deficiencia de N (●) cuantificadas por densitometría a partir de las bandas identificadas en A, B, C y D.

## Cambios ocurridos durante la senescencia inducida por oscuridad

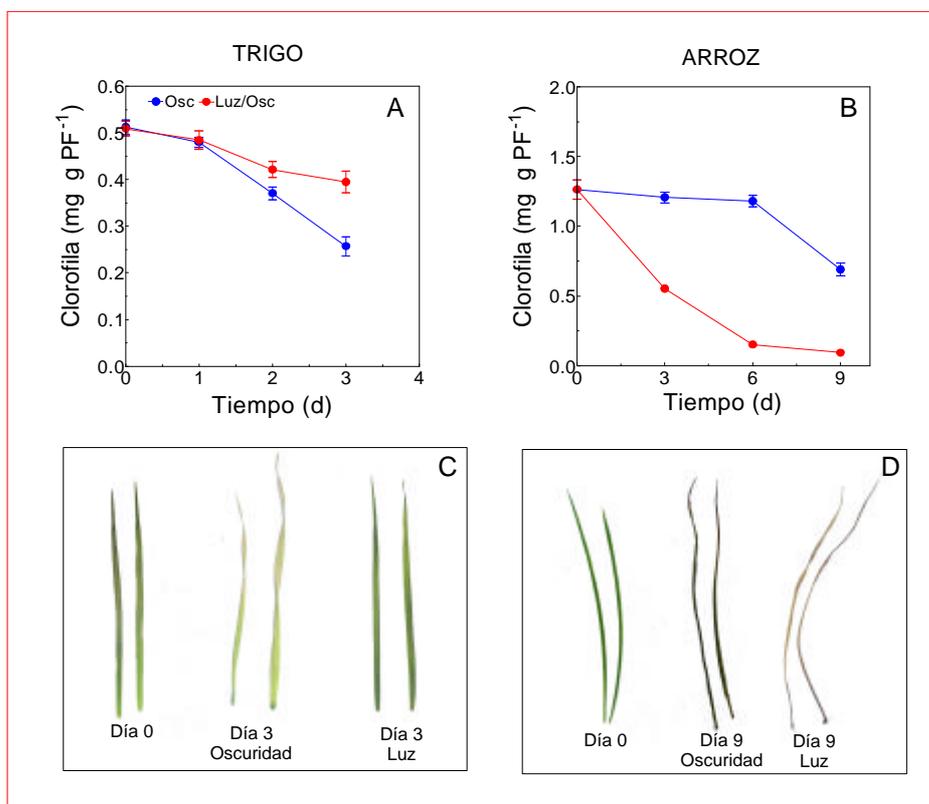
### Cambios en la concentración de clorofila, proteínas solubles y aminoácidos

Las hojas cortadas incubadas en oscuridad presentaron un deterioro mucho más rápido que el inducido por la deficiencia de N.

Cuando las hojas de trigo se incubaron en oscuridad continua, la concentración de clorofila se redujo en un 50% después de 3 días de incubación (Fig. 5 A), lo que explica el cambio de color del verde oscuro al verde claro observado en las hojas incubadas en oscuridad (Fig. 5 C). En las hojas de trigo mantenidas bajo su ciclo normal de luz/oscuridad la concentración de clorofila disminuyó un 20% al día 3. En las plantas de arroz, ocurrió lo contrario, a los 3 días la concentración de clorofila disminuyó un 50% en las hojas incubadas en luz (Fig. 5 B) y apenas un 4% en las hojas incubadas en oscuridad. Esto se manifiesta en el color verde claro, casi amarillento, y el deterioro que muestran las hojas de arroz incubadas en luz (Fig. 5 D). Al cabo de 3 días de incubación en oscuridad las hojas de trigo estaban muy deterioradas por lo que no se continuó con el muestreo. En arroz, el muestreo continuó hasta el día 9.

La concentración inicial de proteínas solubles (Fig. 6) en arroz fue mayor que en trigo, y se redujo en ambas especies a lo largo del tratamiento. En las hojas de trigo incubadas en oscuridad (Fig. 6 A) la concentración de proteínas solubles se redujo en un 50% al día 3 de incubación, mientras que en las hojas mantenidas en luz sólo decreció un 20%. En las hojas de arroz (Fig. 6 B) la concentración de proteínas solubles disminuyó un 50% durante la incubación en luz al día 3 y un 30% en las hojas incubadas en oscuridad. La disminución en el contenido de proteínas en las hojas de arroz continuó hasta que finalizó el tratamiento.

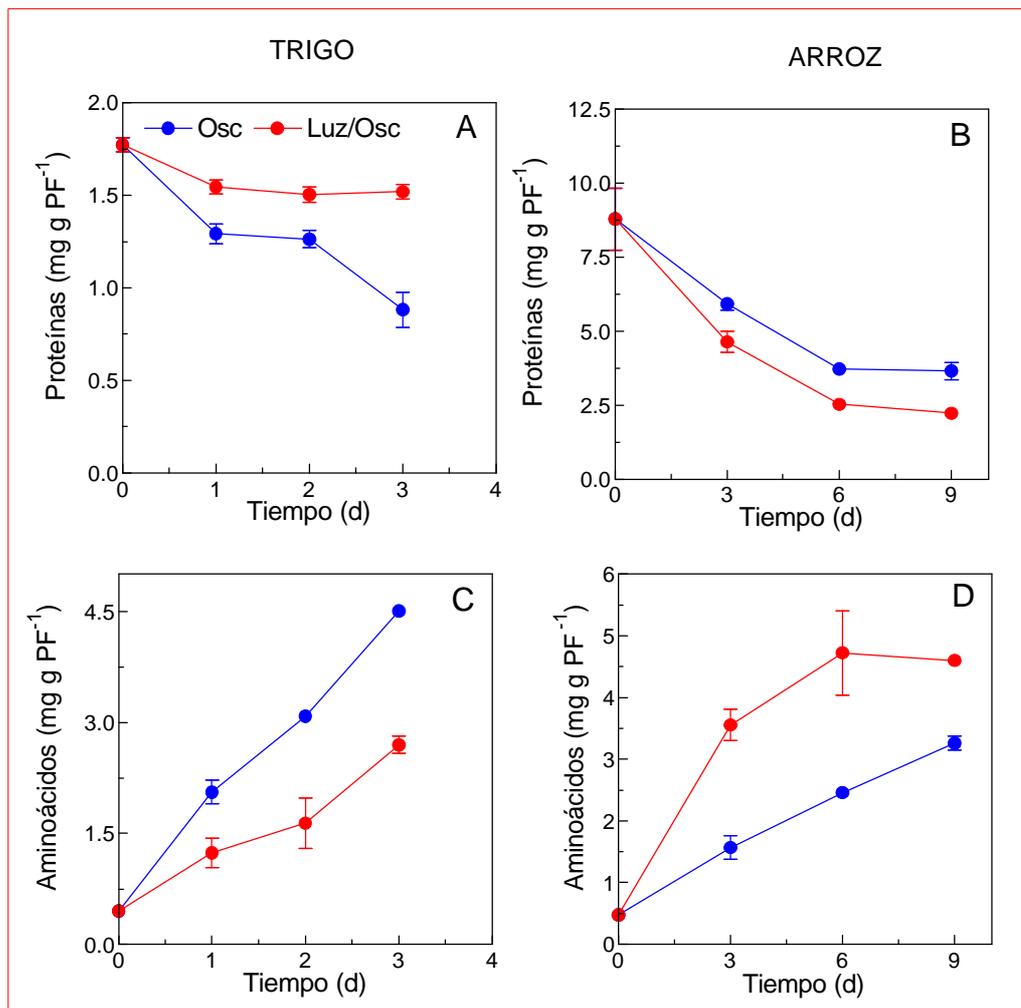
En ambas especies la concentración de aminoácidos aumentó en función del tiempo de incubación (Fig. 6). Este aumento se observó a partir del primer día de incubación. Fue mayor en las hojas de trigo mantenidas en oscuridad (Fig. 6 C) que en las hojas incubadas en luz, mientras que en las hojas de arroz (Fig. 6 D) el aumento en la concentración de aminoácidos fue mayor en las hojas mantenidas en luz que en las hojas incubadas en oscuridad.



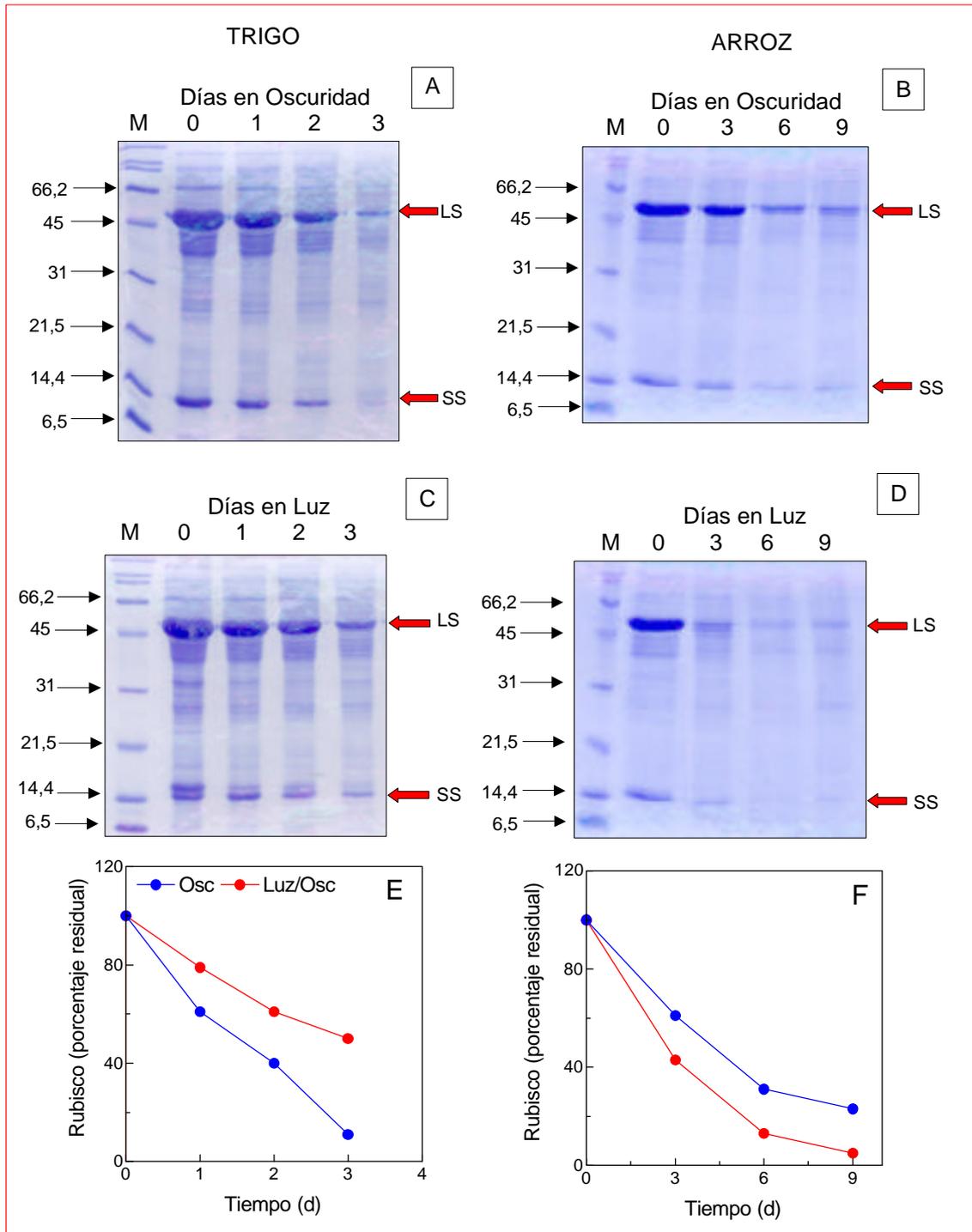
**Figura 5.** Cambios en la concentración de clorofila en plantas de trigo (A) y arroz (B) durante la incubación en oscuridad (●) y en luz/osc (●). Los puntos representan la media de 5 repeticiones  $\pm$  el error estándar. Fotografía de la 3<sup>er</sup> hoja de plantas de trigo (C) y arroz (D), incubadas en oscuridad y luz, tomadas al inicio del tratamiento (día 0) y al último día de incubación (día 3 para trigo, día 9 para arroz).

### Cambios en el perfil de proteínas foliares

La variación en el perfil de proteínas foliares durante la inducción de la senescencia por oscuridad se determinó mediante electroforesis en SDS-PAGE (Fig. 7 A, B, C y D). La reducción en la intensidad de todas las bandas fue mayor en las plantas de trigo incubadas en oscuridad (Fig. 7 A) que en las plantas mantenidas bajo su ciclo normal de luz/oscuridad (Fig. 7 B), siendo las bandas más significativas las correspondientes a las subunidades LS y SS de la Rubisco. En las plantas de arroz la disminución en la intensidad de las bandas de todo el perfil fue mayor en las incubadas en luz (Fig. 7 D) que en las plantas mantenidas en oscuridad continua (Fig. 7 B), siendo de igual manera más representativas aquellas bandas correspondientes a la LS y SS de la Rubisco. La reducción en el contenido de la subunidad mayor de la Rubisco en las hojas de trigo incubadas en oscuridad fue del 90% a los 3 días de incubación y del 50% en las hojas incubadas en luz (Fig. 7 E). En las hojas de arroz incubadas en luz el porcentaje residual de la subunidad mayor de la Rubisco fue del 40% al día 3, mientras que en las hojas mantenidas en oscuridad continua se conservó casi el 60% de la LS luego de 3 días de tratamiento (Fig. 7 F).



**Figura 6.** Cambios en la concentración de proteínas (A y B) y aminoácidos (C y D) en hojas de trigo y arroz incubadas en oscuridad (●) y en luz (●). Los puntos representan la media de 3 repeticiones  $\pm$  el error estándar.



**Figura 7.** Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 15% de extractos de hojas de trigo (A y C) y arroz (B y D) incubadas en oscuridad y en luz. Las flechas rojas señalan las bandas correspondientes a la subunidad mayor (LS) y menor (SS) de la Rubisco. Se sembraron cantidades equivalentes de cada muestra: 6,5 mg PF (TRIGO) y 10 mg PF (ARROZ). Las flechas negras muestran la posición de los marcadores de peso molecular (M) y su masa ( $M_r$ ) expresada en kDa. Los gráficos representan el porcentaje remanente de la subunidad mayor de la Rubisco de los extractos de hojas de trigo (E) y arroz (F) incubadas en oscuridad (●) y en luz (●), cuantificadas por densitometría a partir de las bandas identificadas en A, B, C y D.

Dadas las diferencias observadas entre ambas especies en el ensayo de senescencia inducida por oscuridad y con el objeto de explicarlas, se encaró un estudio de la inducción del estrés oxidativo durante la incubación en oscuridad.

### **Cambios en la concentración de $H_2O_2$ , ascorbato y malondialdehído**

La concentración inicial de  $H_2O_2$  fue mucho mayor en arroz que en trigo, y aumentó en ambas especies (Fig. 8 A y B). En las hojas de trigo incubadas en oscuridad la concentración de  $H_2O_2$  aumentó un 90% a los 3 días de tratamiento y un 60% en las hojas mantenidas en luz (Fig. 8 A). En arroz el incremento en la concentración de  $H_2O_2$  (Fig. 8 B) se manifestó de manera contraria a las hojas de trigo, mostrando a partir del primer día de incubación un aumento mayor en las hojas incubadas en luz que en las hojas mantenidas en oscuridad.

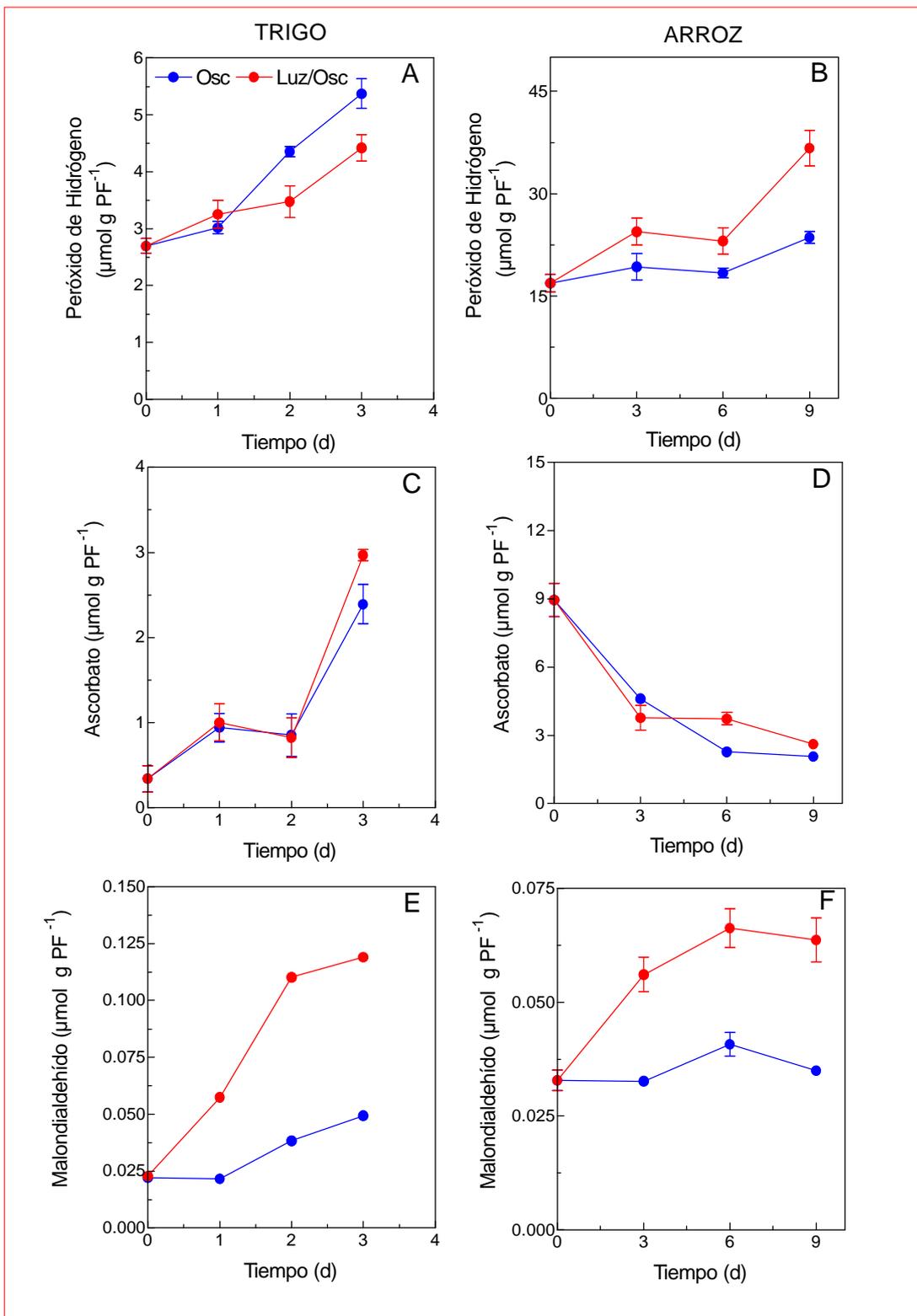
El cambio en la concentración de ascorbato mostró un patrón muy diferente en ambas especies (Fig. 8 C y D). En las hojas de trigo la concentración de ascorbato aumentó más en luz que en oscuridad (Fig. 8 C). Por el contrario, en las hojas de arroz (Fig. 8 D) la concentración de ascorbato disminuyó a partir del primer día de incubación, siendo al final del tratamiento de un 75% en las hojas incubadas en oscuridad y un 70% en las hojas mantenidas en luz.

El contenido de MDA aumentó en ambas especies durante la incubación en luz más que por la incubación en oscuridad (Fig. 8 E y F). En las hojas de trigo incubadas en oscuridad la concentración de MDA aumentó un 5% a los 3 días de incubación, mientras que en las hojas mantenidas bajo su ciclo normal de luz/oscuridad aumentó un 400% (Fig. 8 E). La concentración de MDA en las hojas de arroz incubadas en luz al final del tratamiento aumentó de forma más significativa que durante la incubación en oscuridad (Fig. 8 F).

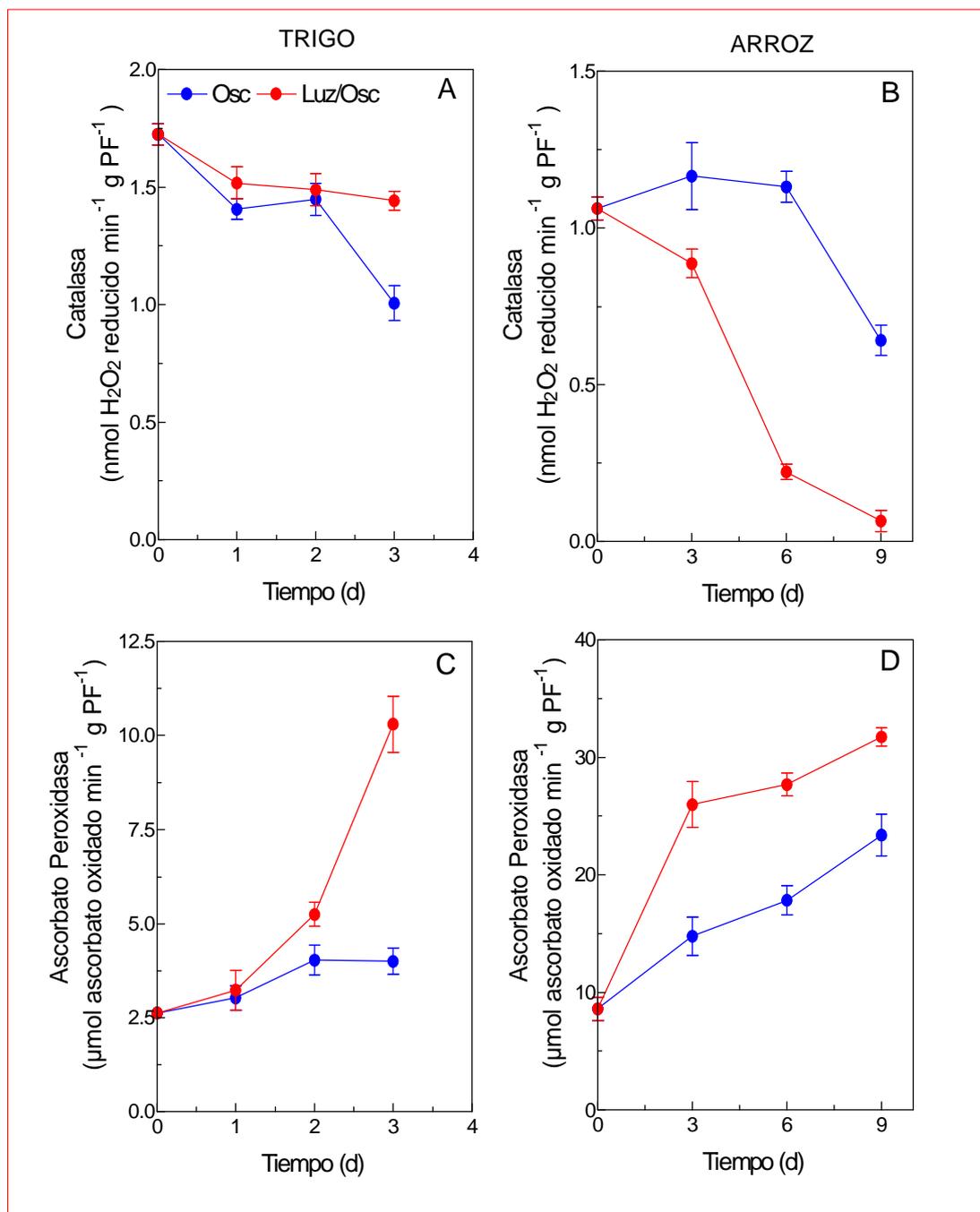
### **Cambios en la actividad de catalasa y ascorbato peroxidasa**

En las hojas de trigo (Fig. 9 A) incubadas en oscuridad durante tres días la actividad de catalasa se redujo en un 40%, mientras que en las hojas incubadas en luz la reducción fue del 15% al final del ensayo. Por otro lado al término del tratamiento, en las hojas de arroz (Fig. 9 B), la reducción en la actividad de catalasa fue de un 90% en las hojas incubadas en luz y de un 40% en las hojas mantenidas en oscuridad.

La actividad de ascorbato peroxidasa (APX) aumentó en ambas especies durante la incubación en luz más que durante la incubación en oscuridad (Fig. 9 C y D). En las hojas de trigo incubadas en oscuridad después de 3 días de tratamiento la actividad de APX aumentó un 50%, mientras que aumentó un 200% en las hojas mantenidas bajo su ciclo normal de luz/oscuridad (Fig. 9 C). La actividad de APX en las hojas de arroz aumentó un 200% en las hojas incubadas en luz y de un 70% en las hojas mantenidas en oscuridad a los 3 días de incubación (Fig. 9 D). El aumento continuó hasta que finalizó el tratamiento.



**Figura 8.** Cambios en la concentración de peróxido de hidrógeno (A y B), ascorbato (C y D) y malondialdehído (E y F) de extractos de hojas de trigo y arroz incubadas en oscuridad (●) y en luz (●). Los puntos representan la media de 4 repeticiones  $\pm$  el error estándar.



**Figura 9.** Cambios en la actividad enzimática de catalasa (A y B) y ascorbato peroxidasa (C y D) de extractos de hojas de trigo y arroz incubadas en oscuridad (●) y en luz (●). Los puntos representan la media de 3 repeticiones  $\pm$  el error estándar.

## Discusión

El trigo es un cultivo adaptado a suelos de alta fertilidad cuya principal fuente de nitrógeno (N) es el nitrato, en tanto que el arroz se desarrolla en suelos anegados de características reductoras, donde la principal fuente de N es el amonio. Como tienen diferentes requerimientos nutricionales, en el presente trabajo se utilizaron soluciones nutritivas diferentes para cultivar ambas especies.

Durante el ensayo de crecimiento se observó que las plantas de trigo presentan una tasa de desarrollo y expansión foliar más rápida que las plantas de arroz. Estas diferencias en el crecimiento establecen diferentes demandas de N, y pueden explicar las diferencias observadas en la inducción de la senescencia por deficiencia de N.

Un correcto abastecimiento de N en las plantas induce una alta tasa de fotosíntesis y por lo tanto, una rápida tasa de crecimiento (Dalling, 1985). Los síntomas de la deficiencia de N en el crecimiento de las plantas y en el desarrollo de la senescencia foliar han sido ampliamente estudiados (Mei y Thimann, 1984; Dalling, 1985; Feller y Keist, 1986; Feller y Fischer, 1994; Lawlor, 2002). Las características principales de la deficiencia de N son la clorosis, la reducción en el tamaño de las hojas, la «punta quemada» en el extremo de las hojas (Mei y Thimann, 1984), la hidrólisis acelerada de proteínas y el correspondiente transporte de los aminoácidos resultantes fuera de la hoja hacia otras partes de la planta en desarrollo (Feller y Fischer, 1994). Estos aminoácidos, producto de la degradación de proteínas, son exportados y no se acumulan en las hojas senescentes de la planta intacta (Feller y Keist, 1986). Los resultados del presente trabajo evidencian estos síntomas. Reflejan que bajo condiciones limitantes de N el proceso de senescencia en las plantas de trigo y arroz es inducido rápidamente. Las plantas de trigo y arroz mostraron una pérdida en la concentración de clorofila, proteínas solubles y aminoácidos libres mayor en las plantas con insuficiencia de N que en las plantas mantenidas con suplemento de N (Fig. 3). La enzima Rubisco es degradada aceleradamente durante la etapa temprana de la senescencia (Dalling, 1985; Feller y Fischer, 1994). Se observó también una reducción en los niveles de las proteínas foliares, principalmente de las subunidades mayor y menor de la Rubisco, siendo ésta reducción más importante en las plantas con deficiencia de N que en las plantas N+ (Fig. 4).

En resumen, la senescencia inducida por deficiencia de N mostró un patrón similar en ambas especies, pero con una velocidad mayor en las plantas de trigo, que puede ser explicada por las diferencias observadas en el crecimiento.

El proceso de senescencia en hojas cortadas incubadas en oscuridad es sólo parcialmente representativo del proceso que ocurre en las hojas unidas a la planta y esto ha sido descrito por diversos autores (Smart, 1994; Feller y Fischer, 1994). En trigo se demostró que la senescencia foliar en hoja cortada se inicia y procede de manera más rápida durante la incubación en oscuridad que durante la incubación en luz (Feller y Fischer, 1994). Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente trabajo. En trabajos realizados con hojas de arroz cortadas, incubadas en oscuridad se observó una reducción en el contenido de clorofila y proteínas solubles, además la fragmentación de ADN sin la generación de fragmentos oligonucleosomales (Okada *et al*, 1992; Lee *et al*, 2002;). En el presente trabajo durante la incubación de hojas cortadas el proceso de senescencia se aceleró en hojas de trigo incubadas en oscuridad continua y no así en hojas de arroz tratadas de la misma forma, en las cuales el proceso de senescencia se precipitó durante la incubación en luz y ocurrió en forma más lenta que para las hojas de trigo mantenidas en oscuridad continua (Fig. 5, 6 y 7). Las hojas de trigo mantenidas en oscuridad mostraron una mayor caída en la concentración de clorofila y proteínas que aquellas mantenidas en luz (Fig. 5 y 6). Por otro lado, las hojas de arroz incubadas en luz presentaron un deterioro más rápido que aquellas mantenidas en oscuridad. El aumento en la concentración de aminoácidos (Fig. 6 C y D) se produce por una acumulación de los mismos en las hojas que ya no están unidas a la planta, por lo cual no es posible una exportación hacia otras partes en desarrollo.

En los presentes experimentos observamos también una asociación entre el proceso de senescencia y el estrés oxidativo en las plantas de ambas especies. Durante el proceso de senescencia se desarrolla un estrés oxidativo que promueve la formación de especies reactivas de oxígeno y cambios en los sistemas antioxidantes como lo observado en las Fig. 8 y 9. Sin embargo, previo a cualquier conclusión es importante tener en cuenta que el proceso de senescencia artificialmente inducido por escisión de hojas e incubación en oscuridad tiene la desventaja de producir simultáneamente otros tipos de estrés como el daño celular, el estrés hídrico o el estrés por deficiencia de nutrientes (Pastori y del Río, 1997). Durante la senescencia se ha reportado una fuerte represión en la actividad de catalasa y una superproducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Pastori y del Río, 1997; Jiménez *et al*, 1998). Estas respuestas han sido observadas en este trabajo durante la incubación en oscuridad de las hojas de trigo y arroz (Fig. 8 y 9). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un producto de las reacciones

oxidativas que ocurren en los peroxisomas y en los cloroplastos. Los radicales hidroxilo formados a partir del  $H_2O_2$  inician una serie de reacciones que conducen a la peroxidación de lípidos de membrana, formando malondialdehído (MDA), y a la destrucción de proteínas. (del Río *et al*, 1998; Lin y Kao, 1998). El MDA es un indicador de la peroxidación de lípidos de membrana (Jiménez *et al*, 1998). El aumento en la concentración de MDA observado en este trabajo (Fig. 8 E y F) durante la incubación en luz de las hojas de trigo y arroz sugiere la existencia de daño oxidativo probablemente, por efecto de la luz. En el caso del trigo, los niveles de catalasa presentes en el peroxisoma son suficientes para proteger a la célula y no senesce tan rápidamente como ocurre en arroz.

En las células del mesófilo, el  $H_2O_2$  producido en cloroplastos y otras organelas celulares, es removido por reacciones donde intervienen la ascorbato peroxidasa y el ascorbato como dador de electrones (Pastori y del Río, 1997; Arora *et al*, 2002). En los presentes experimentos las hojas de arroz presentaron mayor concentración de ascorbato y mayor actividad de ascorbato peroxidasa (APX) que las hojas de trigo (Fig. 8 y 9). Esto podría explicarse como una adaptación de esta especie al ambiente estresante en el que normalmente crece. En ambas especies se observó un incremento de la actividad de APX durante el desarrollo del estrés oxidativo. Sin embargo el aumento en la actividad de esta enzima (Fig. 9 C y D) durante la incubación en luz en las plantas de trigo y arroz no sería suficiente para contrarrestar el estrés oxidativo y el proceso de senescencia.

La enzima catalasa, por otro lado, está localizada en los peroxisomas y funciona removiendo el  $H_2O_2$  tóxico que se genera en las reacciones oxidativas, y ha sido considerada como la principal enzima antioxidante (Willekens *et al*, 1997; Lin y Kao, 1998). Estos resultados muestran que si bien en trigo hay una pequeña caída en la actividad de catalasa, algo mayor en oscuridad que en luz, en arroz se produce una acelerada caída de la actividad de esta enzima en las hojas incubadas en luz (incluso mayor que en las hojas de trigo incubadas en oscuridad) (Fig. 9 A y B). Esta caída es probablemente la causa del aumento en la concentración de radicales libres que desencadenan la muerte celular en estas condiciones. Esta enzima tiene una regulación compleja, aunque no están claros los efectos de la luz sobre su actividad. En maíz el gen *Cat2* no muestra efectos de la luz sobre su expresión, aunque el gen *Cat3* presenta un ritmo diario (Boldt y Scandalios, 1997). Por eso resulta difícil interpretar los resultados aquí observados.

## Conclusiones

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que el tratamiento de deficiencia de nitrógeno induce una aceleración de la senescencia foliar tanto en trigo como en arroz. Sin embargo, se pudo observar que este proceso ocurre en forma más rápida en trigo.

Por otro lado, los resultados obtenidos con el tratamiento de incubación en oscuridad de hojas cortadas, demuestran que existe una asociación entre el estrés oxidativo y el proceso de senescencia para ambas especies. No obstante, se puede apreciar que estas plantas difieren en la forma en que se desarrolla la senescencia inducida. En trigo la senescencia y el estrés oxidativo ocurren más rápido en las hojas incubadas en oscuridad mientras que en arroz, la senescencia procede en forma más veloz cuando las hojas se incuban en luz.

Estas diferencias cuestionan la posibilidad de utilizar al arroz como especie modelo para el estudio de la regulación génica de la senescencia foliar en trigo.

## Referencias

- ✂ **Aebi, H.** Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. Vol. 105: 121-126. (1984).
- ✂ **Arnon, D. I.** Copper enzymes in chloroplasts. Polyphenoloxydases in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiol.* 24: 1-15. (1949).
- ✂ **Arora, Ajay, R. K. Sairam and G. C. Srivastava.** Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*. Vol. 82. No. 10. (2002).
- ✂ **Bennetzen, Jeffrey L.** Plant genomics takes root, branches out. *TIG*. Vol. 15. No. 3. (1999).
- ✂ **Bleecker, Anthony B.** The evolutionary basis of leaf senescence: method to the madness?. *Current Opinion in Plant Biology*. 1: 73-78. (1998).
- ✂ **Bochman, Matt.** Molecular analysis of leaf senescence. *Biocenose*. Vol. 7. Issue 1. (2002).
- ✂ **Boldt, Ralf and John G. Scandalios.** Influence of UV-Light on the Expression of the *Cat2* and *Cat3* Catalase Genes in Maize. *Free Radical Biology and Medicine*. Volume: 3. Issue: 3. pp. 505-514.

- (1997).
- ✂ **Bradford, M. M.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254. (1976).
  - ✂ **Bray, Elizabeth A., Julia Bailey-Serres and Elizabeth Weretilnyk.** Responses to abiotic stresses. En: B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones. (eds). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Phytologists. pp. 1158-1203. (2000).
  - ✂ **Buchanan-Wollaston, Vicky.** The molecular biology of leaf senescence. *Journal of experimental botany*. Vol. 48. No. 307. pp. 181-199. (1997).
  - ✂ **Caputo, C. and Atilio J. Barneix.** Export of aminoacids to the phloem in relation to N supply in wheat. *Physiologia Plantarum*. 101: 853-860. (1997).
  - ✂ **Chen, Shu Jiuan and Ching Huei Kao.** Methyl jasmonate, ammonium, and leaf senescence in rice. *Journal of Plant Physiology*. Vol. 152. pp. 353-357. (1998).
  - ✂ **Crawford, Nigel M.** Nitrate: Nutrient and signal for plant growth. *The Plant Cell*. Vol. 7. 859-868. (1995)
  - ✂ **Dalling, Michael J.** The physiological basis of nitrogen redistribution during grain filling in cereals. En: James E. Harper, Lawrence E. Schrader and Robert W. Howell. *Exploitation of physiological and genetic variability to enhance crop productivity*. pp. 55-71. (1985).
  - ✂ **Dangl, Jeffery L., Robert A. Dietrich and Howard Thomas.** Senescence and programmed cell death. En: B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones. (eds). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Phytologists. pp. 1158-1203. (2000).
  - ✂ **Danon, Antonie, Valérie Delorme, Nathalie Mailhae and Patrick Gallois.** Plant programmed cell death: A common way to die. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 647-655. (2000).
  - ✂ **Del Río, Luis A., Gabriela Pastori, José M. Palma, Luisa M. Sandalio, Francisca Sevilla, Francisco J. Corpas, Ana Jiménez, Eduardo López-Huertas, and José A. Hernández.** The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiol.* 116: 1195-1200. (1998).
  - ✂ **Feller, U. and M. Keist.** Senescence and nitrogen metabolism in annual plants. En: H. Lambers, J. J. Neeteson and I. Stulen (eds). *Fundamental, ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants*. pp. 219-235. (1986).
  - ✂ **Feller, Urs and Andreas Fischer.** Nitrogen metabolism in senescing leaves. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 13 (3): 241-173. (1994).
  - ✂ **Gale, M. D., K. M. Devos, and G. Moore.** Rice as the pivotal genome in the new era of grass comparative genetics. *International Rice Research Institute. Science. Abstracts.* (2003).
  - ✂ **Gallego, Francesca, Catherine Feuillet, Mpnika Messmer, Anja Penger, Andreas Graner, Masahiro Yano, Takuji Sasaki, and Beat Keller.** *Genome*. 41(3): 328-336 (1998).
  - ✂ **Gan, Susheng and Richard M. Amasino.** Making sense of senescence. *Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. Plant Physiol.* 113: 313-319. (1997).
  - ✂ **Heath, R.L. and L. Packer.** Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*. 25: 189-198. (1968).
  - ✂ **Ho, Shin-Lon, Wu-Fu Tong, and Su-May Yu.** Multiple mode regulation of a cysteine proteinase gene expression in rice. *Plant Physiology*. Vol. 122. pp. 57-66. (2000).
  - ✂ **Hoagland, D. R. and D. I. Arnon.** The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Stn. Circ.* 347: 1-39. (1950).
  - ✂ **Jana, S. and M.A. Choudhuri.** Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging. *Aquat. Bot.* 12: 345-354. (1981).
  - ✂ **Jiménez, Ana, José A. Hernández, Gabriela Pastori, Luis A. del Río and Francisca Sevilla.** Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiol.* 118: 1327-1335. (1998).
  - ✂ **Laemmli, U. K.** Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685. (1970).
  - ✂ **Law, M.Y, S.A. Charles and B. Halliwell.** Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of Paraquat. *Biochem. J.* 210: 899-903. (1983).
  - ✂ **Lawlor, David W.** Carbon and nitrogen journal assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. *Journal of Experimental Botany*. Vol.53. No. 370. pp. 773-787. (2002).
  - ✂ **Lee, Ruey-Hua and Shu-Chen Grace Chen.** Programmed cell death during rice leaf senescence is nonapoptotic. *New Phytologist*. 155: 25-32. (2002).
  - ✂ **Lin, Chuan Chi, Yi Ting Hsu and Ching Huei Kao.** Ammonium ion, ethylene and NaCl-induced senescence of detached rice leaves. *Plant Growth Regulation*. 37: 85-92. (2002).
  - ✂ **Lin, Jaw-Neng and Ching Huei Kao.** Effect of oxidative stress caused by hydrogen peroxide on senescence of rice leaves. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 39: 161-165. (1998).

- ✂ **Makino, Amane, Tadahiko Mae and Koji Ohira.** Relation between nitrogen and ribulose-1,5-biphosphate carboxylase in rice leaves from emergence through senescence. *Plant & Cell Physiol.* 25 (3): 429-437. (1984).
- ✂ **Mei, Hui-Sheng and Kenneth V. Thimann.** The relation between nitrogen deficiency and leaf senescence. *Physiol. Plant.* 62: 157-161 (1984).
- ✂ **Nakano, Y. and K. Asada.** Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in Ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant cell physiol.* 28(1), 131-140 (1987).
- ✂ **Nam, Hong Gil.** The molecular genetic analysis of leaf senescence. *Current Opinion in Biotechnology.* 8: 200-207. (1997).
- ✂ **Noodén, Larry D., Juan J. Guiamét and Isaac John.** Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum.* 101: 746-753. (1997).
- ✂ **Oaks, Ann.** Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. *Can. J. Bot.* 72: 739-750. (1994).
- ✂ **Okada, Katsuhiko, Yasunori Inoue, Kazuhiko Satoh and Sakae Katoh.** Effects of light degradation of chlorophyll and proteins during senescence of detached rice leaves. *Plant Cell Physiol.* 33 (8): 1183-1191. (1992).
- ✂ **Passarella, V. S. y R. Savin.** Características físico-químicas de los granos y sus usos principales. En: Emilio H. Satorre, Roberto L. Vence Arnold, Gustavo A. Slafer, Elba B de la Fuente, Daniel J. Miralles, María Otegui y Roxana Savin. Producción de granos. Bases funcionales para su manejo. Ed. Facultad de Agronomía. Bs. As. Argentina. pp. 11-23. (2003).
- ✂ **Pastori, Gabriela M. and Luis A. del Río.** Natural senescence of pea leaves. *Plant Physiol.* 113: 411-418. (1997).
- ✂ **Payne, P. I.** Breeding for protein quantity and protein quality in seed crops. En: J. Daussant, J. Mossé and J. Vaughan (eds). *Seed proteins.* Academic Press. N. Y. pp. 223-253 (1983).
- ✂ **Payne, P. I.** Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 141-153. (1987).
- ✂ **Petr, J., J. Cerny, L. Hruska et al.** Yield formation in the main field crops. *Developments in crop science.* Elsevier. (13). pp. 72-151. (1988).
- ✂ **Prochazkova, D., R. K. Sairam, G. C. Srivastava and D. V. Singh.** Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Sciene* 161: 765-771 (2001).
- ✂ **Qiaoping, Yuan, John Quackenbush, Razvan Sultana, Mihaela Perlea, Steven L. Salzberg and C. Robin Buell.** Rice bioinformatics. Analysis of rice sequence data and leveraging the data to other plant species. *Plant Physiology.* Vol. 125. pp. 1166-1174 (2001).
- ✂ **Quirino, Betania F., Yoo-Sun Noh, Edward Himelblau and Richard M. Amasino.** Molecular aspects of leaf senescence. *Reviews.* Elsevier Science. Vol. 5. No. 7 (2000).
- ✂ **Roberts, Irma N., Pedro Fernández Murray, Carla P. Caputo, Susana Passeron and Atilio J. Barneix.** Purification and characterization of a subtilisin-like serine protease induced during the senescence of wheat leaves. *Physiologia Plantarum.* 118: 483-490 (2003).
- ✂ **Savin, R. y D. M Sorlino.** Calidad de los granos y estimadores más comunes. En: Emilio H. Satorre, Roberto L. Vence Arnold, Gustavo A. Slafer, Elba B de la Fuente, Daniel J. Miralles, María Otegui y Roxana Savin. Producción de granos. Bases funcionales para su manejo. Ed. Facultad de Agronomía. Bs. As. Argentina. pp. 11-23 (2003).
- ✂ **Simpson, Richard J.** Translocation and metabolism of nitrogen: whole plant aspects. En: H. Lambers, J. J. Neeteson and I. Stulen (eds). *Fundamental, ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants.* pp. 71-96. (1986).
- ✂ **Smart, Catherine M.** Gene expression during leaf senescence. *New Phytol.* 126. pp. 419-448. (1994).
- ✂ **Thomas, Howard, Helen J. Ougham, Carol Wagstaff and Anthony D. Stead.** Defining senescence and death. *Journal of Experimental Botany.* Vol.54. No. 385. pp. 1127-1132. (2003).
- ✂ **Travis, John.** Hot cereal: Rice reveals bumper crop of genes. *Science News online.* Vol. 161. No. 14. p. 211. (2002).
- ✂ **Uhart, S. A.** Trigo pan. En: Luis A. N. Aguerrizábal y Fernando H. Andrade (eds). *Calidad de productos agrícolas. Bases ecofisiológicas, genéticas y de manejo agronómico.* Unidad integrada Balcarce (INTA). pp. 28-68. (1998).
- ✂ **Vierstra, Richard D.** Proteolysis in plants: mechanisms and functions. *Plant Molecular Biology.* 32: 275-302. (1996).
- ✂ **Willekens, Hilde, Sangpen Chamnongpol, Mark Davey, Martina Schraudner, Christian Langerbartels, Marc Van Montagu, Dirk Inzé and Wim Van Camp.** Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is

indispensable for stress defense in C<sub>3</sub> plants. The EMBO Journal. 16: 4806-4816. (1997).

- ✍ **Yem, E. W. and E. C. Cocking.** The determination of amino acids with ninhydrin. Analyst. 80: 209-213. (1955).
- ✍ **Yoshida, Satoko.** Molecular regulation of leaf senescence. Current Opinion in Plant Biology. 6: 79-84. (2003).



