



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesinas de Belgrano

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera Licenciatura en Ciencias Biológicas

Expresión diferencial de Proteasas tipo
Subtilisina Asociadas a Senescencia en plantas
de trigo (*Triticum aestivum.L*)

N° 670

María Jimena Ruiz Diaz

Directora de la Tesina: Dra. Irma Roberts

Departamento de Investigaciones
Marzo de 2015



INBA-CONICET-FAUBA
Instituto de Investigaciones en Biociencias
Agrícolas y Ambientales



Universidad de Belgrano
Zabala 1837 (C1426DQ6)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina
Tel.: 011-4788-5400 int. 2533
e-mail: invest@ub.edu.ar
url: <http://www.ub.edu.ar/investigaciones>

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, Dra. Irma Roberts por haberme brindado la posibilidad de realizar mi tesis bajo su dirección en el INBA, por haber compartido sus conocimientos y su tiempo conmigo. Por su infinita paciencia, su generosidad y comprensión.

Al personal de la UB, Dani y Gaby por su buena predisposición en cuestiones administrativas, al Dr. Hernán y la Dra. Claudia por el gran incentivo y la confianza que me brindaron a lo largo de la carrera.

A todos los chicos que forman parte de “los becarios del INBA” por el compañerismo y hacer del lugar de trabajo un ambiente siempre agradable con las charlas y momentos compartidos.

A mis amigos de la vida, Daia, Gaby, Santi, María, Tomi, por estar siempre.

A Mariano por haberme acompañado todos estos años, siempre, aguantándome desde el primer día, GRACIAS.

A la Dra. Mariela Echeverría que siempre tuvo una respuesta a los problemillas del día a día que solían surgir en el trabajo, siempre con la solución a flor de piel, y por su gran compañerismo.

A la Lic. Cintia Veliz por compartir conmigo sus conocimientos, por sus correcciones y opiniones en este trabajo, por las horas de trabajo compartidas, pero por sobre todo, por su amistad.

A mi familia, Diego, Ana y Carmiña, por haberme brindado todo y más, por su gran amor, fueron y son el sostén en mi vida, por acompañarme siempre y darme el empuje necesario.

RESUMEN

El contenido proteico del grano de trigo debe ser superior al 11%, de lo contrario se ve afectada su calidad nutricional e industrial. En este cultivo, el nitrógeno (N) absorbido es asimilado en las hojas maduras proveyendo de compuestos nitrogenados a los tejidos destinos (raíces y hojas jóvenes). Durante la senescencia, los granos se transforman en los principales destinos y tiene lugar la removilización del N desde las hojas senescentes. La misma involucra la actividad de proteasas cuya expresión se ve fuertemente aumentada en los tejidos senescentes. En trabajos previos se ha demostrado que existe una clara correlación entre la actividad de dos proteasas tipo subtilisina, denominadas P1 y P2, y el desarrollo de la senescencia en plantas de trigo. En este trabajo nos propusimos: i) estudiar la expresión de dichas subtilisinas en distintos tejidos y estadios de desarrollo de plantas de trigo mediante el uso de anticuerpos, e ii) identificar secuencias codificantes para putativas subtilisinas en bases de datos de trigo y analizar su expresión por RT-PCR durante la senescencia foliar. Se trabajó con plantas en estado vegetativo (30 d) y en espigazón (125 d). Se tomaron muestras de hojas verdes, hojas senescentes, hoja bandera, espigas, raíces, base foliar envainante y caña. Con relación al primer objetivo, los resultados mostraron un nivel basal de P2 en todos los tejidos verdes y raíz, aumentando casi 8 veces en hojas senescentes. Solo se detectó expresión de P1 en base foliar envainante y en raíz. El antisuero reveló además la presencia de al menos otras 3 potenciales subtilisinas que denominamos P3, P4 y P5, presentes en espigas, caña, hojas senescentes y raíces que no habían sido previamente descritas. La expresión de P1 y P2 en distintos tejidos, sugiere que estas proteasas estarían involucradas en otras funciones además de la proteólisis asociada a senescencia. En el caso de P2 probablemente estaría cumpliendo alguna función relacionada con la homeostasis celular, dada su ubicuidad, mientras que la expresión de P1 en raíz sugiere un rol en el ciclado de N en dicho tejido. En ensayos de senescencia inducida por fitohormonas, se observó que tanto P1 como P2 aumentan su expresión en respuesta a metil jasmonato. Con relación al segundo objetivo, en base a la secuencia de un fragmento de 17 aminoácidos de P1 se realizó una búsqueda en bases de datos de trigo usando el software BLAST. Se obtuvieron tres secuencias que contienen dicho fragmento: TA83755_4565, TA83756_4565 y TA83757_4565. El análisis de comparación de secuencias utilizando el programa ClustalW2 mostró que a pesar de presentar alta homología (entre 78 y 90%) estas secuencias corresponden a tres genes diferentes. El análisis de dichas secuencias por RT-PCR semicuantitativa y qRT-PCR mostró que TA83757_4565 y TA83755_4565 presentan muy bajos niveles de expresión en hojas verdes y muestran una fuerte inducción en hojas senescentes, tanto en las plantas jóvenes como adultas. Estos resultados contribuyen a reforzar la hipótesis de una fuerte relación propuesta entre las proteasas del grupo de las subtilisinas y el normal desarrollo de la senescencia vegetal. Por su parte, no se detectó expresión de TA83756_4565 en ninguna de las muestras analizadas.

INDICE

<i>AGRADECIMIENTOS</i>	<i>III</i>
<i>RESUMEN</i>	<i>IV</i>
<i>INDICE</i>	<i>V</i>
<i>ABREVIATURAS</i>	<i>VII</i>
<i>INTRODUCCIÓN</i>	<i>8</i>
EL GRANO DE LOS CEREALES Y SU CALIDAD	8
CALIDAD PANADERA DEL TRIGO	9
PRINCIPALES FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD DEL TRIGO PAN	9
ABSORCION, ASIMILACION Y REMOVILIZACION DEL NITROGENO	10
SENESCENCIA	12
PROTEASAS ASOCIADAS A LA SENESCENCIA EN PLANTAS	13
SERIN PROTEASAS: SUBTILISINAS	14
<i>OBJETIVOS E HIPÓTESIS</i>	<i>16</i>
OBJETIVOS	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
HIPÓTESIS	16
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	<i>17</i>
ENSAYOS EN CÁMARA DE CULTIVO	17
ENSAYOS EN INVERNÁCULO	17
PREPARACIÓN DE EXTRACTOS	18
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS	18
SDS-PAGE PARA PROTEÍNAS TOTALES Y CUANTIFICACIÓN DE RUBISCO	18
ANÁLISIS POR WESTERN BLOT	18

IDENTIFICACIÓN DE GENES CODIFICANTES PARA SUBTILISINAS EN BASE DE DATOS DE TRIGO Y DISEÑO DE PRIMERS	19
EXTRACCIÓN DE RNA.....	20
RT-PCR SEMI-CUANTITATIVA	21
REAL TIME PCR (qRT-PCR).....	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
OBJETIVO 1: ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEASAS TIPO SUBTILISINA EN PLANTAS DE TRIGO MEDIANTE EL USO DE ANTICUERPOS.....	22
ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE DISTINTOS TEJIDOS DE PLANTAS EN ESTADO REPRODUCTIVO	23
PLANTAS EN ESTADO VEGETATIVO VS. ESTADO REPRODUCTIVO	26
SENESCENCIA INDUCIDA POR FITOHORMONAS.....	28
OBJETIVO 2: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE TRES SECUENCIAS CODIFICANTES PARA PROTEASAS TIPO SUBTILISINA EN HOJAS SENESCENTES DE TRIGO	33
CONCLUSIONES.....	36
BIBLIOGRAFIA.....	37

ABREVIATURAS

AA: Aminoácidos

CKs: citocininas

Gln: Glutamina

$\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$: Ión fosfato diácido

HPO_4^{-2} : Ión fosfato monoácido

K_2HPO_4 : Potasio fosfato dibásico

KH_2PO_4 : Potasio fosfato monobásico

KNO_3 : Nitrato de potasio

N: Nitrógeno

NH_4^+ : Amonio

NO_2^- : Nitrito

NO_3^- : Nitrato

Rubisco: Ribulosa 1.5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa

SPs: Serín proteasas

MJ: Metil jasmonato

BAP: 6_benzilaminopurina

HV: Hojas verdes

HS: Hojas senescentes

R: Raíz

C: Caña

BFE: Base foliar envainante

E: Espigas

INTRODUCCIÓN

Los cereales juegan un papel importante en los agro-ecosistemas del mundo, ocupando más del 50% del suelo cultivable en zonas templadas. El hombre los ha utilizado como alimento mucho antes de comenzar a cultivarlos intencionalmente y la posibilidad de almacenar sus granos, de una cosecha a la otra, le ha permitido sobrevivir largos períodos sin ningún otro alimento, de este modo se han convertido en los cultivos más importantes del mundo.

Muchos cultivares de cereales actualmente en uso han sido producidos por selección o hibridación, lo que en algunos casos ha llevado a la condición de poliploidía y a cambios en muchas otras características y propiedades (Petr et al., 1988)

Entre todos los cultivos, los cereales son capaces de hacer un mejor uso de aquellos factores que conducen a un alto rendimiento. Además, su distribución y adaptación a las condiciones medioambientales son excepcionales. Esta característica ha hecho que en todo el mundo los cereales proporcionen la mayor parte del requerimiento energético en la alimentación humana (Petr et al., 1988; Pyne, 1983).

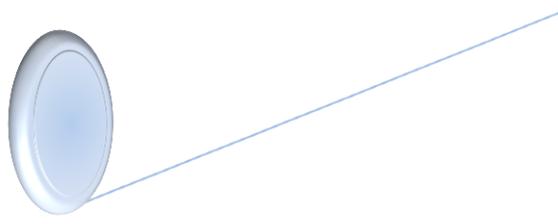
EL GRANO DE LOS CEREALES Y SU CALIDAD

El grano de los cereales es un cariopse que contiene un único embrión y un tejido de reserva, el endosperma. Este último ocupa el 80%-90% del peso seco del grano maduro y representa el principal tejido de almacenamiento de proteínas y almidón (Pasarella y Savin, 2003).

El componente cuantitativamente más importante de los granos es el almidón. En el caso del trigo y del maíz, su cantidad y calidad determina el rendimiento industrial y la calidad final de los productos (Pasarella y Savin, 2003). Sin embargo, también la cantidad y calidad de proteínas resultan fundamentales en la determinación del valor económico y la calidad de los productos obtenidos (Uhart, 1998).

Los aspectos vinculados con la calidad del grano están asociados con la utilización que se les da a los mismos (Uhart, 1998). Esto ha llevado a que solo se cultive un mínimo porcentaje de especies en relación a los existentes (Savin y Sorlino, 2003).

El concepto de calidad de los granos en cereales es variable y dinámico a la vez, porque depende del criterio especificado por el mercado y la industria que los utilice y porque puede ser modificado en el tiempo según los usos y necesidades de cada región o país (Payne, 1983; Savin y Sorlino, 2003).



Usualmente los cereales no exceden el 15% de contenido proteico en sus granos. Los granos de trigo y avena son los más ricos en proteínas y los de maíz y arroz, los más pobres; pero en todos el tipo de proteínas predominante es la de reserva (Payne, 1983).

Según su solubilidad las proteínas del grano se clasifican en cuatro fracciones: albúminas, globulinas, gliadinas y gluteninas. Las albúminas y globulinas (proteínas citoplasmáticas) son hidrosolubles, se localizan en el embrión y en la periferia del grano y tienen funciones metabólicas y estructurales. Las gliadinas y gluteninas, denominadas en conjunto prolaminas, son insolubles en agua, se localizan en el endosperma constituyendo las funciones cualitativas y cuantitativas más importantes, forman el gluten y son responsables de las características físicas de la masa. Las cuatro fracciones son ricas en determinados aminoácidos (principalmente: glutamina y asparagina) pero, a diferencia de la albúminas y las globulinas, las gliadinas son pobres en lisina. Un contenido elevado de la fracción de gliadinas es la causa de por qué cereales tales como el trigo y el maíz tienen una deficiente calidad nutricional (Paserella y Savin, 2003; Uhart, 1998; Payne, 1983).

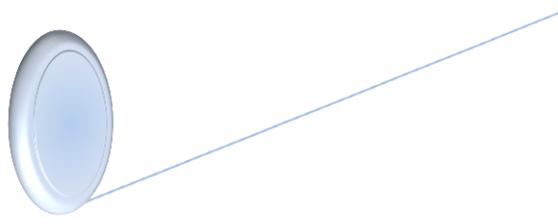
CALIDAD PANADERA DEL TRIGO

El trigo ha formado parte del desarrollo económico y cultural del hombre. Es una de las plantas monocotiledóneas más cultivadas. Dentro de las especies cultivadas de esta planta están *Triticum aestivum* L. y *Triticum durum* L., las cuales son de carácter anual y pertenecen a la familia de las Gramíneas (*Poaceae*). La especie más importante, *T. aestivum* L., corresponde al trigo harinero que se usa básicamente para la producción del pan, galletas y repostería.

La propiedad más importante del trigo pan es la capacidad de cocción de la harina (Pasarella y Savin, 2003) debida a la elasticidad y fuerza del gluten que contiene; y su calidad depende, entre otras cosas, del contenido proteico de los granos. Como ya se mencionó, las gliadinas y gluteninas son las principales proteínas que constituyen el gluten. Las primeras confieren extensibilidad, permitiendo que la masa leve durante la fermentación, las segundas elasticidad, impidiendo que la masa se sobre-extienda y colapse durante la fermentación y horneado (Pasarella y Savin, 2003). A mayor contenido de proteínas insolubles en el grano, mayor será la cantidad de gluten y mejor la calidad de la harina (Uhart, 1998). Es decir, el balance óptimo entre fuerza y elasticidad, junto con el porcentaje total de proteínas hace que la harina de trigo tenga magníficas propiedades para la panificación (Pasarella y Savin, 2003; Uhart, 1998).

PRINCIPALES FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD DEL TRIGO PAN

La calidad de los granos de trigo pan se ve afectada tanto por factores genéticos como ambientales. La textura y tipo del endosperma y la composición proteica se encuentran fundamentalmente determinadas por el genotipo, de hecho, la composición proteica es utilizada



para identificar cultivares (Savin y Sorlino, 2003). El ambiente tiene influencia sobre la calidad del trigo pan a través de su efecto sobre la cantidad, calidad y concentración de proteínas de grano (Uhart, 1998). Uno de los factores más importantes que puede alterar la calidad es la disponibilidad de nitrógeno (N) en el suelo durante el periodo de llenado de los granos (Savin y Sorlino, 2003; Lawlor, 2002).

La disminución en la calidad panadera que se ha producido en los últimos años en los trigos argentinos se debe a las políticas de mejoramiento que por años privilegiaron el rendimiento a expensas de la calidad, el aumento en el rendimiento de variedades actuales que requieren de una demanda mayor de N, la caída en la fertilidad de los suelos por su continua explotación y a la escasa fertilización nitrogenada.

Debido a los costos del fertilizante nitrogenado para la producción agrícola y a sus efectos nocivos de polución sobre el ambiente, sería deseable desarrollar estrategias simultáneas para reducir el consumo de N manteniendo la productividad (Wang et al., 2001). Dado que las dinámicas de acumulación y removilización de N en las plantas están relacionadas con la calidad y el contenido de proteínas en el grano (Uhart, 1998) sería bueno tener un entendimiento más acabado de las bases moleculares y fisiológicas del proceso de removilización de N. Por ejemplo, en plantas de trigo se ha demostrado que entre el 75 y el 85% del N obtenido a cosecha, es acumulado antes de la antesis, poniendo de manifiesto que la removilización de este nutriente durante el periodo de llenado de los granos es de suma importancia en la determinación de la calidad de los mismos (Uhart, 1998).

ABSORCION, ASIMILACION Y REMOVILIZACION DEL NITROGENO

El N además de ser el elemento más abundante de la atmósfera (Wang et al., 2001) es un componente esencial de la materia viva ya que forma parte, y determina la síntesis, de la mayoría de las macromoléculas biológicas. Es componente de los ácidos nucleicos, clorofilas, aminoácidos y proteínas, de las cuales representa casi el 18% de su peso molecular (Lawlor, 2002; Takei et al., 2002). Por este motivo, es el elemento que las plantas requieren en mayor cantidad, llegando a convertirse en el factor limitante más importante para su crecimiento (Feller U. y Keist M., 1986; Wang et al., 2001).

El N en el suelo se encuentra principalmente como nitrato (NO_3^-) (Wang et al., 2001). Su concentración en la mayoría de las tierras agrícolas es bastante baja, pero la entrada de este macronutriente en las plantas depende más de las necesidades de ésta que de su disponibilidad en la biosfera (Lawlor, 2001). La mayoría de las plantas absorben el N como NO_3^- y lo asimilan en forma de aminoácidos (Takei et al., 2002) (**Figura 1**), los que pueden ser almacenados y/o utilizados para la síntesis proteica (Lawlor, 2002). A medida que aumenta la disponibilidad de N, las proteínas sintetizadas se traducen en crecimiento de las hojas,

aumentando así la superficie fotosintetizadora. En la mayoría de los cultivos un adecuado suministro de N se traduce en incrementos en la superficie foliar (Escalante Estrada, 1999; Lawlor, 2002).

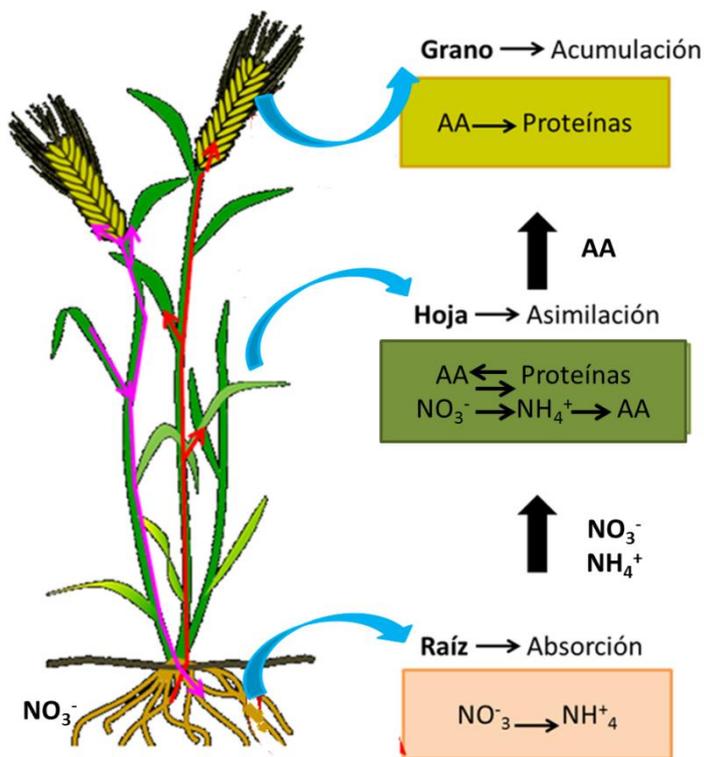
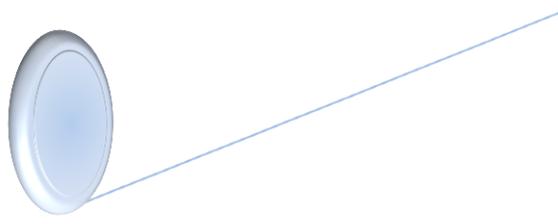


Figura 1: Esquema de absorción de NO_3^- desde el suelo y, removilización de aminoácidos desde los órganos fuente hacia los órganos destino vía floema, en plantas de trigo. Las flechas rosa muestran transporte por floema y las rojas por xilema.

Durante el periodo de crecimiento vegetativo, las hojas son fotosintéticamente muy activas, y capaces de capturar la luz y utilizar su energía para la asimilación reductiva de CO_2 y NO_3^- formando principalmente carbohidratos y aminoácidos utilizados mayormente para la síntesis proteica (Lawlor, 2002; Takey et al., 2002). Durante el periodo reproductivo, la asimilación de NO_3^- en las hojas se reduce considerablemente y la removilización de N desde las hojas maduras (órgano fuente) hacia órganos más jóvenes o reproductivos (destino) se ve incrementada (Smart, 1994; Yoshida, 2003).

La removilización de N es crucial para su economía en los cultivos de grano y su acumulación en las semillas ya que durante el periodo de llenado de los granos un porcentaje más que considerable de N deriva de los tejidos vegetativos de la planta (Feller U. y Keist M., 1986; Feller y Fischer, 1994). Cuando comienza la senescencia, el flujo de N en el xilema disminuye como respuesta a la baja tasa de transpiración (Feller y Fischer, 1994) y consistente con el rol de removilización del programa de senescencia se puede notar un aumento en los niveles de aminoácidos, derivados de la degradación proteica, que pueden ser transportados por el floema entre fuente y destino (Feller y Fischer, 1994).



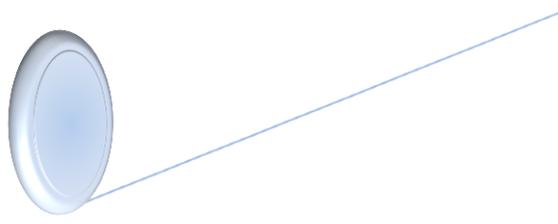
SENESCENCIA

Las hojas son órganos fotosintéticos especializados y la planta invierte mucha energía y nutrientes en la producción de la biomasa foliar (Buchanan- Wollaston, 1997; Quirino et al., 2000). Las hojas sufren tres fases de desarrollo durante su tiempo de vida. La primera es el crecimiento, donde ocurre una rápida síntesis de proteínas y otros componentes celulares. Siguiendo a esta fase sobreviene la madurez que transcurre con un nivel de recambio de proteínas considerablemente bajo. Por último, después de un periodo fotosintéticamente productivo, la contribución de fotosintatos desde las hojas hacia la planta disminuye y las hojas entran en su etapa final de desarrollo: la senescencia. Esta etapa se caracteriza por la activa degradación de macromoléculas, principalmente de proteínas (Bouchanan-Wollaston, 1997; Simova-Stoilova et al., 2000; Quirino et al., 2000; Munnè-Bosch y Alegre, 2004).

El primer y más obvio síntoma de la senescencia es el amarillamiento de las hojas como consecuencia de la degradación de la clorofila (Yoshida, 2003; Munnè-Bosch y Alegre, 2004). En las plantas como el trigo comienza desde las hojas inferiores (más viejas) y progresa hacia arriba (Feller y Keist, 1986; Lee et al., 2001). Por lo general, el amarillamiento y la removilización de N proteico están bien correlacionados (Thomas et al., 2002; Munnè-Bosch y Alegre, 2004).

La senescencia puede desencadenarse en forma dependiente de la edad (comúnmente llamada *senescencia natural*) en toda la planta o en órganos aislados que van muriendo para dar paso a los nuevos tejidos. Entre los factores internos que inducen la senescencia natural se encuentran los niveles de azúcares (Masclaux et al., 2000; Yoshida, 2003; Jongebloed et al., 2004; Pourtau et al., 2004), las especies reactivas de oxígeno (EROs) y las fitohormonas (Gan y Amasino, 1997; Buchanan-Wollaston et al., 2003; Yoshida, 2003; Munné-Boch y Alegre, 2004). En particular, se destaca un grupo de hormonas llamadas citocininas (CKs). Se han realizado numerosos estudios fisiológicos que demuestran que la concentración de CKs disminuye en las hojas senescentes y que el tratamiento de las hojas con CKs retarda la senescencia de las mismas manteniendo la concentración de clorofila y proteínas altas por más tiempo (Gan y Amasino, 1997; Criado et al., 2007). En consecuencia, se inhibe la exportación de compuestos de carbono (C) y N acumulándose en las hojas expandidas y disminuye su contenido en las hojas en expansión (Criado et al., 2009).

Por otro lado, la senescencia puede ser inducida y/o acelerada (*senescencia inducida*) por factores externos o condiciones ambientales adversas para el crecimiento de la planta (Yoshida, 2003) entre los que se incluye el estrés hídrico, las temperaturas extremas, los compuestos fitotóxicos como el ozono, la excesiva salinidad del suelo, la deficiencia de nutrientes o la relación rojo/rojo lejano de la radiación incidente.



Uno de los aspectos más característicos de la senescencia es un notable aumento en la actividad de diferentes enzimas hidrolíticas, involucradas en la degradación de las macromoléculas a sus componentes monoméricos básicos, paso fundamental para su posterior transporte vía floema y redistribución hacia los órganos destino.

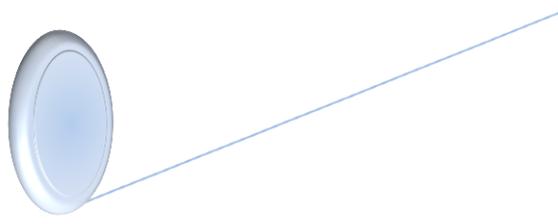
PROTEASAS ASOCIADAS A LA SENESCENCIA EN PLANTAS

Las enzimas proteolíticas o proteasas, son enzimas que catalizan la ruptura hidrolítica de enlaces peptídicos en sus proteínas blanco. Estas enzimas están ampliamente distribuidas en plantas, animales y microorganismos (Chrsiteller 2005; Haq et al., 2004). En organismos superiores, cerca del 2% de los genes codifican para estas enzimas (Barett et al., 2001). Las proteasas desempeñan un papel clave en muchos procesos biológicos, siendo indispensables para el mantenimiento y la supervivencia de los organismos.

Los cambios producidos en la compartimentalización subcelular distinguen la diferenciación del simple deterioro y enfatizan que la senescencia es un proceso programado y no simplemente una forma de necrosis (Dangl et al., 2000). Además el mantenimiento de la compartimentalización durante esta fase tardía de desarrollo podría ser la base por la cual los eventos catabólicos permiten la removilización de N y otros nutrientes (Feller y Fischer, 1994). Se ha observado que las mitocondrias, peroxisomas y vacuolas, con sus membranas circundantes, permanecen funcionales durante el proceso de senescencia (Smart, 1994; Feller y Fischer, 1994; Dangl et al., 2000).

La vacuola es la organela más grande de las células vegetales y en ellas se localizan una gran variedad de enzimas hidrolíticas (Feller y Keist, 1986) incluyendo la mayoría de la proteasas (Vierstra, 1996). Esta característica hace que pueda contribuir al metabolismo de hojas senescentes (Feller y Fischer, 1994) incluso en las últimas etapas del catabolismo de la clorofila (Smart, 1994). Sin embargo, el rol de esta organela no está todavía totalmente claro y se considera que estaría contribuyendo mayormente con la degradación de las proteínas durante las etapas finales de la senescencia, después de la ruptura del tonoplasto, degradando cualquier remanente citoplasmático y facilitando así la verdadera muerte celular (Vierstra, 1996; Thomas et al., 2003).

Los cloroplastos son compartimentos vegetales ricos en proteínas (Vierstra, 1996, Quirino et al., 2000) y pueden ser considerados importantes organelas de almacenamiento de N. Entre el 70-80% del N en las células fotosintéticamente activas del mesófilo de las hojas maduras se localiza en los cloroplastos (Horstensteiner y Feller, 2002), principalmente como Ribulosa-1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) en el estroma (Feller y Keist, 1986; Smart, 1994; Nooden et al., 1997) y proteínas del complejo antena del fotosistema II (FSII) en la membrana tilacoidea. La mayoría de las proteínas movilizables en una hoja son solubles (Thomas et al., 2002) y se ha demostrado que la Rubisco es la principal fuente del N removilizado durante la



senescencia (Makiano et al., 1984; Kamachi et al., 1991; Simova- Stoilova, 2000). Es más, la movilización de proteínas cloroplásticas es una actividad metabólica central en la senescencia foliar (Feller y Fischer, 1994; Thomas et al., 2002) y se ha sugerido que al menos los primeros pasos en el catabolismo de estas ocurrían dentro en los cloroplastos (Hortensteiner y Feller, 2002).

La proteólisis es esencial para el desarrollo y la fisiología de las plantas. Es responsable de la respuesta a estrés y de la limpieza celular mediante la eliminación de proteínas anormales y, por otra parte, suministra los aminoácidos necesarios para sintetizar nuevas proteínas. Las proteasas son reguladores claves de la homeostasis, crecimiento y desarrollo de las plantas. Además, la proteólisis es fundamental para generar y catabolizar péptidos bioactivos como hormonas o zimógenos.

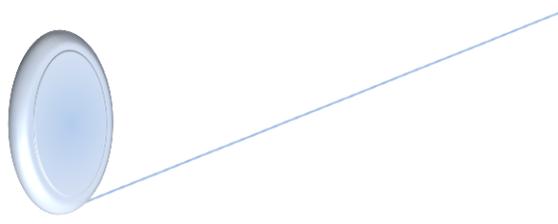
SERIN PROTEASAS: SUBTILISINAS

Las serín proteasas (SPs), constituyen el grupo más numeroso de proteasas en plantas (van der Hoorn, 2008). Tripathi y Sowdhamini (2006) identificaron un total de 206 y 222 SPs en *Arabidopsis* y arroz, respectivamente. Sin embargo, a la mayoría no se le conoce su función biológica.

Varias evidencias sugieren que las SPs juegan un rol importante en la removilización de N. En plantas de trigo, se encontró que las SPs eran las proteasas predominantes responsables de la degradación de proteínas durante la senescencia monocárpica natural y la inducida por estrés térmico (Chauhan et al., 2009).

Las SPs constituyen una de las clases más numerosas de proteasas en plantas. En consonancia con su papel regulador, se ha demostrado que las SPs estarían involucradas en diversos procesos que regulan el desarrollo de la planta y las respuestas de defensa. Además, algunas de las SPs carboxilpeptidasas (familia S10) actúan como aciltransferasas en lugar de hidrolasas, lo que sugiere una diversificación en la función de regulación del metabolismo secundario en plantas. Sin embargo, las funciones y mecanismos de regulación de estas proteasas son poco conocidas sobre todo por la falta de identificación de sus sustratos biológicos. Actualmente, existe bibliografía disponible sobre estas proteasas estudiadas en dos especies de plantas: *Arabidopsis thaliana* (dicotiledónea) y *Oryza sativa* (monocotiledónea), debido a la disponibilidad de sus secuencias genómicas completas, lo que permite realizar diversos estudios para obtener así una idea más amplia acerca de su función y vías metabólicas.

Dentro de las SPs, la familia S8 (subtilisinas) es una de las más numerosas y menos estudiadas. Previamente nuestro grupo de trabajo pudo demostrar que existe una clara correlación entre la actividad de dos proteasas tipo subtilisina (denominadas P1 y P2) y el



desarrollo de la senescencia en plantas de trigo (Roberts, 2003, 2006 y 2011). Ambas proteasas son inducibles por oscuridad así como por la deficiencia de N (Roberts et al., 2006) y también se ha demostrado su expresión durante la senescencia natural en hojas bandera de plantas de trigo (Roberts et al. 2011), apoyando la hipótesis de su participación en la degradación de Rubisco y removilización de N hacia los granos en desarrollo.

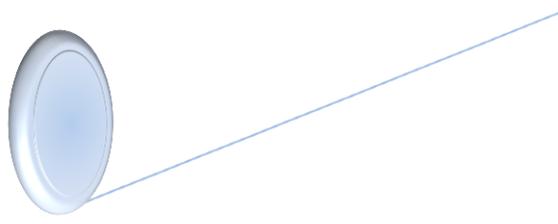
Si bien las proteasas P1 y P2 ya han sido caracterizadas, aún no se ha estudiado su expresión en distintos tejidos y/o estadios de desarrollo de plantas de trigo. Estudios de este tipo nos permitirían ampliar el conocimiento del rol de dichas subtilisinas en otras funciones o mecanismos biológicos distintos de la senescencia.

Las estructuras cristalinas revelan que las subtilisinas poseen una triada catalítica fuertemente conservada similar a los miembros de la quimiotripsina y carboxilpeptidasa pero poseen un orden diferente de los residuos Asp, His y Ser (Tripathi y Sowdhamini 2006).

Una característica interesante en la familia de las subtilisinas es que algunos miembros parecen ser mosaicos con poca o ninguna similitud de secuencia con cualquier otra proteína conocida y con grandes inserciones en los extremos N y C terminal.

Como ya se mencionó en otras especies vegetales, tales como arroz y *A. thaliana*, ya se conoce la composición de la familia de proteasas tipo subtilisina. Sin embargo, en trigo todavía esta información se desconoce. La falta de un genoma completamente secuenciado en esta especie hace muy difícil el estudio de la familia de subtilisinas. Una forma de lograr identificar nuevos miembros de este grupo de proteasas consiste en utilizar secuencias conservadas de subtilisinas de otras especies vegetales para buscar secuencias homólogas en bases de datos de trigo. Si se pudiera de esta forma identificar nuevas secuencias a continuación se podría estudiar su expresión en hojas en distintos estadios de desarrollo y ver si están asociadas o no a la senescencia.

Por otra parte, el uso de anticuerpos también podría ser una alternativa útil para tratar de identificar nuevas proteasas tipo subtilisina emparentadas con aquellas contra las cuales fueron desarrollados los antisueros.



OBJETIVOS E HIPÓTESIS

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

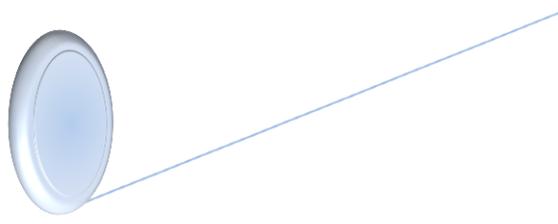
- Comprender el mecanismo de removilización de N desde las hojas senescentes hacia los granos en desarrollo en plantas de trigo y estudiar el rol de las proteasas asociadas a la senescencia en dicho mecanismo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar la expresión de las dos proteasas de mayor actividad en hojas senescentes de trigo, denominadas P1 y P2, mediante el uso de anticuerpos.
- Identificar en base de datos de trigo secuencias codificantes para proteasas tipo subtilisina emparentadas con P1 y P2, diseñar primers específicos para las mismas y analizar su expresión por RT-PCR semicuantitativa y qRT-PCR en tiempo real durante la senescencia en distintos tejidos de plantas de trigo.

HIPÓTESIS

- Las dos proteasas previamente purificadas a partir de hojas senescentes de trigo, denominadas P1 y P2, son las primeras subtilisinas que han sido asociadas al proceso de senescencia natural o inducida en dicha especie vegetal (Roberts et al., 2003 y 2006). Sin embargo, aún no ha sido estudiada la posibilidad de una expresión diferencial de tales proteasas en distintos tejidos y/o estadios de crecimiento. En consecuencia, la primera hipótesis de esta tesis es que P1 y P2 se expresan en forma diferencial en distintos tejidos y estadios fisiológicos de plantas de trigo la cual puede evidenciarse a través de ensayos de western blot usando anticuerpos específicos.
- En las especies vegetales en que la familia de subtilisinas ha sido identificada se ha comprobado que se trata de un grupo numeroso que cuenta entre 59 y 65 miembros en Arabidopsis y arroz, respectivamente (Tripathi y Sowdhamini, 2006). La segunda hipótesis de esta tesis establece que es posible identificar en bases de datos secuencias que codifiquen para proteasas tipo subtilisina, aun no descritas, emparentadas con las ya identificadas y analizar su expresión por RT-PCR semicuantitativa y qRT-PCR en tiempo real en tejidos senescentes de plantas de trigo mediante primers específicos.



MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se utilizaron plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) de la variedad Pro-INTA Isla verde.

ENSAYOS EN CÁMARA DE CULTIVO

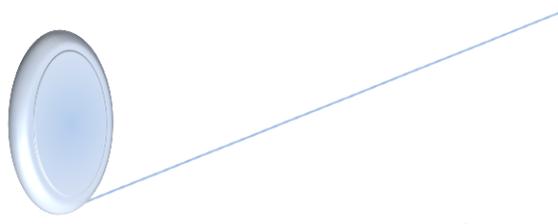
Las plantas fueron cultivadas en cámara de crecimiento en condiciones controladas de luz (350 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16 h luz/8 h oscuridad) y temperatura (23-25°C). Las semillas se pusieron a germinar sobre papel húmedo en bandejas durante 48 h en oscuridad. Posteriormente las plántulas fueron trasplantadas a macetas plásticas de 12 cm de diámetro a razón de 5 plantas por maceta, utilizando vermiculita como sustrato. Las mismas fueron regadas a diario, alternando agua destilada con una solución nutritiva (Hoagland y Arnon, 1950) concentración final de KNO_3 de 10 mM, lo que representa condiciones de buena disponibilidad de N. Las plantas se cultivaron en estas condiciones durante 15 días.

ENSAYOS EN INVERNÁCULO

Las plantas fueron sembradas en macetas de 10 litros utilizando vermiculita como sustrato, a razón de 5 plantas por maceta. Éstas fueron mantenidas en un invernáculo ubicado en el campus de la Facultad de Agronomía de la UBA con luz natural, por un período de 75 días a partir del 18/07/2012.

Solución nutritiva Hoagland y Arnon (1950)

✓ K_2SO_4	1mM
✓ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 mM
✓ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mM
✓ KH_2PO_4	0,2 mM
✓ KNO_3	10 mM
✓ Fe-EDTA	0,03%
✓ H_3BO_3	3 μM
✓ $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,03 μM
✓ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,75 μM
✓ $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,1 μM
✓ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,2 μM
✓ $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 μM



PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

El material vegetal se molió con N líquido en un mortero de porcelana previamente enfriado. El material obtenido se traspasó a microtubos mantenidos también en nitrógeno líquido, se agregó al mismo una punta de espátula de polivinilpolipirrolidona (PVPP) y 5 ml de buffer de extracción (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 + Glicerol 20% v/v).

Las muestras se homogenizaron con ayuda de un vortex en 3 ciclos de 10-15 s de agitación y 2-3 min de descanso en hielo. Los homogenatos se centrifugaron 1 h a 10.000 xg y 4 °C. El sobrenadante fue utilizado para medir el contenido de proteínas y para electroforesis en geles de poliacrilamida previa desnaturalización en buffer de siembra (Laemmli, 1970).

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976). Para ello se mezcló un volumen variable (10-100µl, dependiendo de la muestra de extracto con 1 ml del reactivo de Bradford (100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml etanol absoluto, 100 ml ácido fosfórico 85% p/v, llevado a volumen final de 1L con H₂O) y luego de incubar dicha mezcla durante 20 min a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteínas en las muestras fue calculada a partir de una curva de calibración con seroalbúmina bovina (BSA) como estándar.

SDS-PAGE PARA PROTEÍNAS TOTALES Y CUANTIFICACIÓN DE RUBISCO

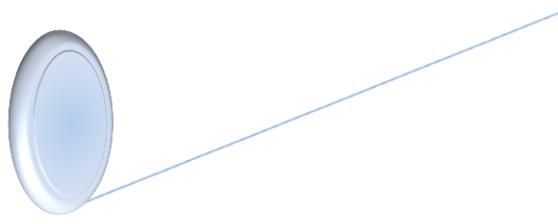
Las proteínas presentes en los extractos de hojas de trigo fueron separadas por su peso molecular en geles desnaturalizantes de poliacrilamida según el protocolo de Laemmli (1970).

Para visualizar los niveles de la enzima Rubisco, las proteínas se separaron en SDS-PAGE 15%. Las muestras se equilibraron por g de peso fresco (PF) o por contenido total de proteínas. Las proteínas se revelaron por tinción con una solución de Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% (p/v) en 45% metanol y 10% ácido acético en constante agitación.

Los geles teñidos, se escanearon y con la utilización del software "Image J" se cuantificaron las bandas correspondientes a las subunidades mayor y menor de Rubisco.

ANÁLISIS POR WESTERN BLOT

Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore) empleando un equipo de transferencia semi-seco (Blotting-Transfer, BioRad) usando como buffer de transferencia Tris-HCl 25 mM pH 8, glicina 150 mM y metanol 20% (v/v) a temperatura ambiente durante 20 min, aplicando una intensidad de voltaje constante de 15 V.

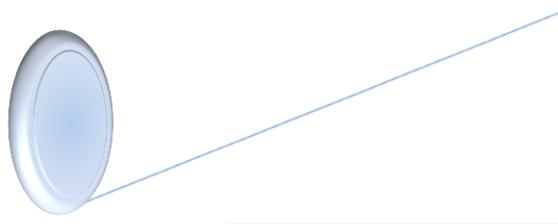


Para el revelado de las membranas, las mismas fueron incubadas durante 2 h en Buffer Tris-NaCl-Tween 20 (TBST) y leche en polvo 5% (p/v) a temperatura ambiente (paso de bloqueo).

Seguidamente, las membranas se incubaron por 2 h con el antisuero primario (anti P1) en una dilución 1:2500. Luego se efectuaron 4 lavados con TBST de 10 min cada uno y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con la enzima fosfatasa alcalina en una dilución 1:10.000 en TBST durante 1,5 h. A continuación, se realizaron 3 lavados con TBST y 1 lavado con TBS por 10 min cada uno y el revelado se realizó en oscuridad colocando unas gotas de solución reveladora de NTB/BCIP® (Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL, USA) hasta observar la aparición de bandas. Seguidamente se añadió agua para evitar la saturación y las membranas se dejaron secar a temperatura ambiente.

IDENTIFICACIÓN DE GENES CODIFICANTES PARA SUBTILISINAS EN BASE DE DATOS DE TRIGO Y DISEÑO DE PRIMERS

Con el fin de identificar secuencias codificantes para proteasas tipo subtilisina en el genoma de trigo y analizar su expresión durante la senescencia foliar se utilizó la secuencia previamente obtenida de un fragmento de 17 aminoácidos de la proteasa P1 (APEIFKPDVTAPGVDIL) para realizar una búsqueda de secuencias homólogas en bases de datos de trigo usando el software BLAST. Se obtuvieron tres secuencias que contienen dicho fragmento: TA83755_4565, TA83756_4565 y TA83757_4565. A partir de dichas secuencias se diseñaron “*primers*” específicos con el software OligoPerfect™ Designer con el fin de estudiar su expresión por RT-PCR en plantas de trigo.



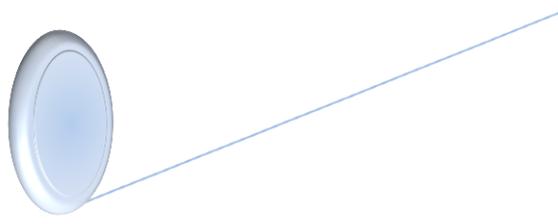
SECUENCIAS	FRAGMENTOS	Tm	AMPLICON
TA83755 F	CGAAGAGGGGAAGTTGAACG	62,4	186 pb
TA83755 R	CGCGCGTATGTACTTGAAGA	60,4	
TA83756 F	GAGGAGGGAAAGCTGAACG	62,3	233 pb
TA83756 R	TGCACGCGTATGTACTTGAA	58,4	
TA83757 F	ACGGGCACTACACTTTACGC	62,4	232 pb
TA83757 R	GAGCTTGACGGCATATGGTT	60,4	
TEF 1 α F	TCCGTCTTCCCCTCCAGGAC	60,4	435 pb
TEF 1 α R	GCAGGGCCTCCAGCTCCTTA	64,57	
RNAr 18s F	CGGCGCTCCTAGGCCTTAATTG	66,4	180 pb
RNAr 18s R	TGAGCACTCTAATTTCTCAAAGTACG	61,6	

Tabla 1: se muestran las secuencias de los primers utilizados TA83755, TA83757, TA83756 y los primers control TEF y RNAr 18s, su respectivo Tm y el tamaño de sus amplicones.

EXTRACCIÓN DE RNA

La extracción del RNA total se hizo empleando el reactivo PureLink® Plant RNA Reagent (Invitrogen). A partir de 100 mg de muestra del material vegetal molido se agregaron 500 μ l del reactivo de extracción. La mezcla se incubó 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 13.000 xg durante 2 min para clarificar el extracto. Al sobrenadante obtenido se le agregó 0,1 ml de NaCl 5 M, 0,3 ml de cloroformo y se lo centrifugó a 10.000 xg por 10 min a 4°C para separar las fases. Seguidamente se transfirió la fase superior (acuosa) a otro tubo y se añadió un volumen igual de isopropanol para la precipitación del RNA, se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 10.000 xg durante 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se le adicionó 1 ml de etanol 70% para lavar el pellet. Nuevamente se centrifugó a 10.000 xg por 1 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar al aire por unos minutos). Por último se resuspendió el pellet en 30 μ l de agua libre de RNasa, mezclando con pipeta. Se realizó la cuantificación del RNA con el kit Qubit® según el protocolo provisto por el fabricante y las muestras se conservaron en freezer a -20°C.

El tratamiento con DNasa I se realizó según el protocolo provisto con la enzima por el fabricante a partir de 5 μ l del RNA. Se agregó 1 μ l de 10X buffer, 3 μ l de agua libre de RNasa y 1 μ l de DNasa, se incubó a 37°C por 30 min. Posteriormente se agregó 1 μ l de EDTA 25mM y se incubó otros 10 min a 65°C (para frenar la reacción de la DNasa).



A continuación se procedió a la síntesis del cDNA, a partir de 5 μ l del RNA tratado previamente con DNasa (1 ng a 5 μ g de RNA) se le adicionó 1 μ l de oligodT, 1 μ l dNTPs 10 mM, 9,5 μ l de agua libre de RNasa y se incubó a 65°C por 5 min. Luego se pasó los tubos a hielo, se añadieron 4 μ l de buffer FS 5X, 2 μ l de DTT 0,1 M y 1 μ l RNasa OUT, todo se incubó a 42°C por 2 min. Al finalizar esta incubación se agregó 1 μ l de SuperSript II RT, volviendo a incubar a 42°C por 50 min y a 70°C por 15 min. El cDNA obtenido se conservó a -20°C.

RT-PCR SEMI-CUANTITATIVA

Se analizó la expresión de las secuencias identificadas por RT-PCR semi-cuantitativa en diferentes tejidos.

Las condiciones de reacción fueron: primers forward y reverse 1 μ l de cada uno (300 μ M), dNTPs (10 mM) 1 μ l, buffer 5X 10 μ l, Taq polimerasa 1 μ l, agua milliQ estéril 35,75 μ l. Se utilizó 1 μ l de cada cDNA con un volumen final de 50 μ l por reacción.

Las condiciones de ciclado fueron: un ciclo de desnaturalización por 2 min a 94°C, 32 ciclos de 92°C por 15 s (desnaturalización), 57°C por 15 s (annealing), y 72°C por 30 s (extensión). Finalmente se realizó un ciclo de extensión final a 72°C por 3 min. Se almacenaron los productos de PCR en freezer a -20°C. Los productos de PCR se utilizaron para analizar las bandas en geles de agarosa.

REAL TIME PCR (qRT-PCR)

Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l, utilizando 10 μ l de FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)[®] 2X y una concentración final de 300 nM de cada primer y 2 μ l de una dilución de 1:5 de cDNA.

Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 1 ciclo a 95°C por 10 min, 40 ciclos a 95°C por 30 s, otros 30 s a 57°C (para TA83755) y 60°C (para TA83757) y 30 s a 60°C. Luego 1 ciclo a 95°C por 1 min, 1 ciclo a 55°C por 30 seg y finalmente 1 ciclo a 95°C por 30 s.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBJETIVO 1: ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEASAS TIPO SUBTILISINA EN PLANTAS DE TRIGO MEDIANTE EL USO DE ANTICUERPOS

En esta parte del trabajo nos propusimos estudiar la expresión de las dos proteasas de mayor actividad en hojas senescentes de trigo, denominadas P1 y P2, en distintos tejidos y estadios de desarrollo mediante la técnica de western blot. Para ello contamos con un antisuero anti-P1 capaz de revelar también P2 por reacción cruzada.

Se trabajó con plantas de trigo en estado vegetativo (plantas de 30 d) (Figura 2 c) y plantas en estado reproductivo (plantas en espigazón de 125 d) (Figura 2 a y b) cultivadas en cámara de crecimiento e invernáculo, respectivamente. Se tomaron muestras de hojas verdes, hojas senescentes, hoja bandera, espigas en dos estadios de desarrollo, raíces, vaina foliar y caña (Figura 3). En estas muestras se midió la concentración de proteínas y las mismas se analizaron por western blot. En las muestras de las plantas cultivadas en invernáculo, se determinó además la concentración de la subunidad mayor (SM) y menor (Sm) de Rubisco, uno de los principales componentes de la maquinaria fotosintética.

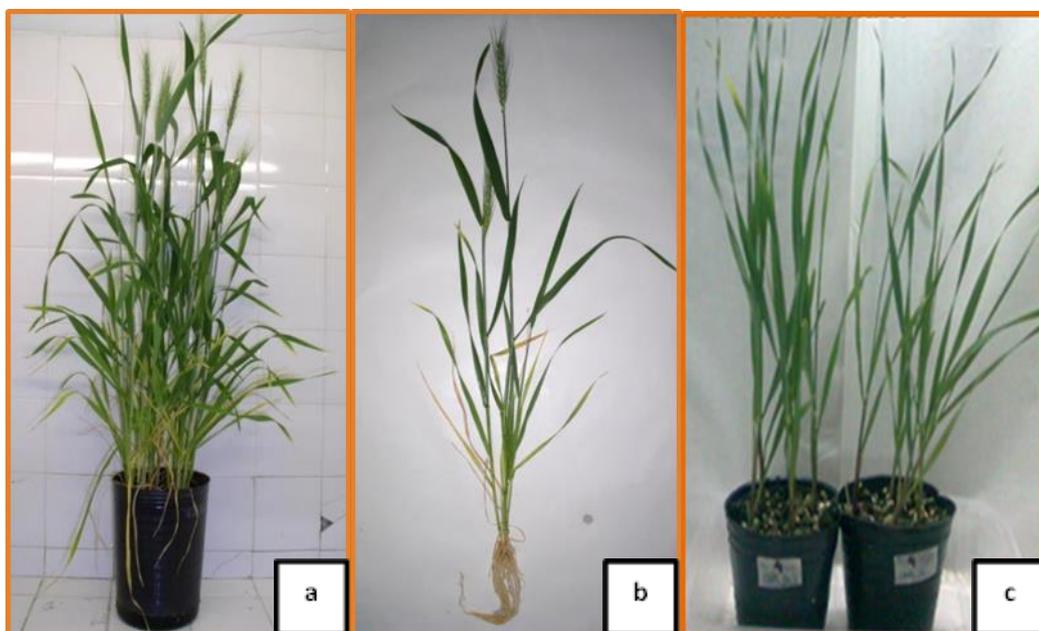


Figura 2: a) Plantas de trigo cultivadas en invernáculo a los 125 días, b) Detalle de una planta de la imagen mostrada en a y c) Plantas de trigo cultivadas en cámara a los 30 días.

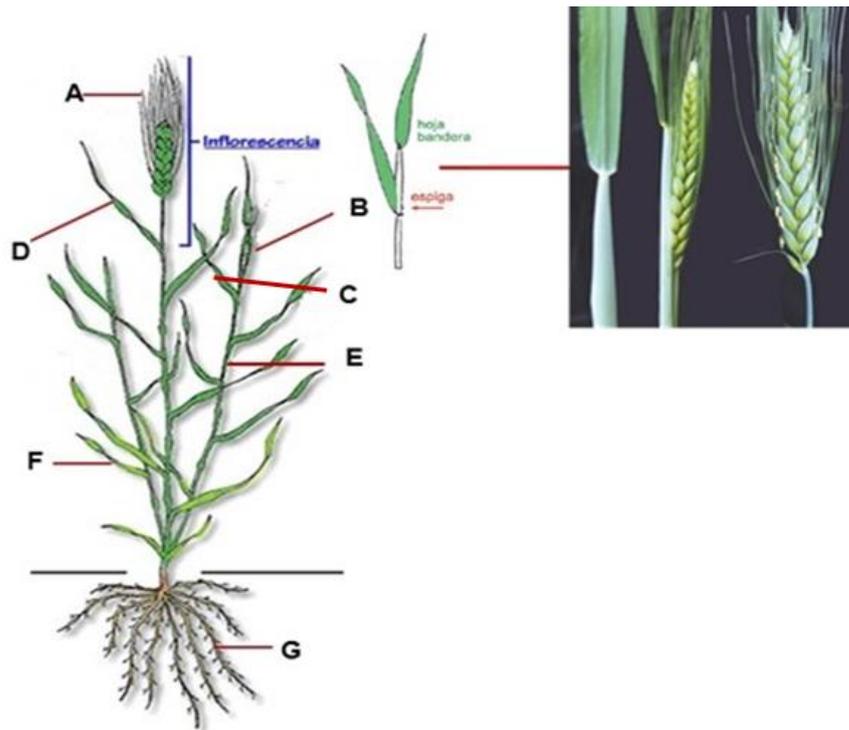


Figura 3: Esquema de los tejidos muestreados. A: espiga emergente (E), B: espiga no emergente (E. NE), D: hoja bandera (HB), C: hoja verde (HV), E: caña (C), F: hoja senescente (HS), G: raíz (R), la foto a la derecha muestra en detalle las espigas y hoja bandera muestreadas.

ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE DISTINTOS TEJIDOS DE PLANTAS EN ESTADO REPRODUCTIVO

A partir de las muestras de tejido vegetal se prepararon extractos y las proteínas se separaron por SDS-PAGE 15 %, sembrando en cada caso una alícuota equivalente a 1,2 g de PF de extracto. Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF para la inmunodetección de las subtilisinas.

Con la utilización del software “ImageJ”, se cuantificaron las bandas obtenidas en el western blot y los resultados se muestran en la Figura 4 b.

En las muestras del ensayo de invernáculo, los resultados obtenidos mostraron que hubo una expresión basal de P2 en hojas verdes (HV) y en raíz (Figura 4 a, calles 3 y 7 respectivamente y que su expresión tuvo un aumento de casi ocho veces en hojas senescentes (HS) en estas plantas adultas (Figura 4 b) (Roberts et al., 2006).

Se observa también una expresión de P2 en tejidos de espiga no emergente (E.NE- Figura 4 a, calle 2), base foliar envainante (BFE- Figura 4 a, calle 5) así como en caña (C- Figura 4 a, calle 6)

Solo se detectó expresión de P1 en la muestra de raíz y base foliar envainante (Figura 4 a, calle 7 y 5).

El antisuero reveló además la presencia de otras tres bandas. Una de mayor peso molecular, la cual nombramos como P3, presente tanto en espigas (E-calle 1 y 2) como en hojas senescentes (HS-calle 4). Una segunda banda de menor peso molecular nombrada como P4, presente en espigas tanto emergida (calle 1) como no emergente (calle 2) (Figura 4 a). Además se detectó una banda de muy baja expresión en HS y peso molecular intermedio denominada P5.

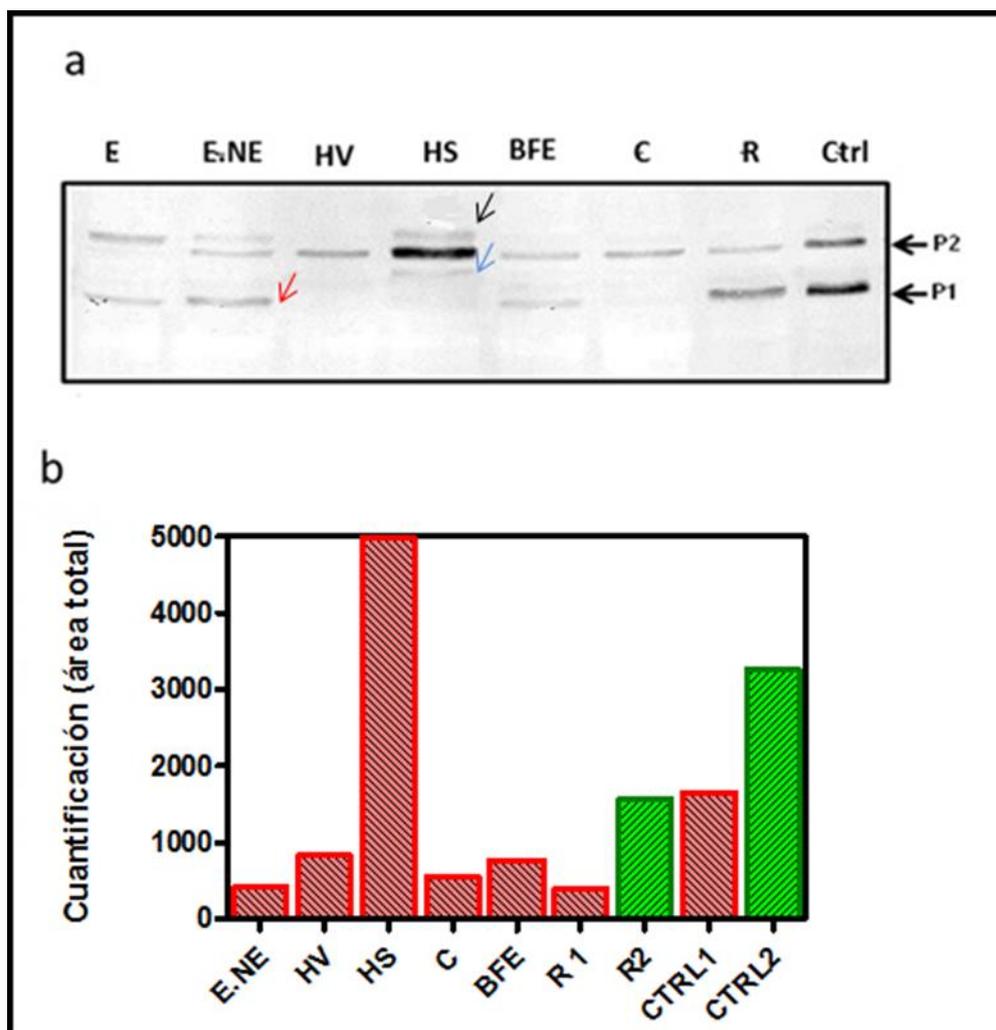


Figura 4: a) Inmunodetección de proteasas tipo subtilisina en plantas de trigo cultivadas en invernáculo. Las flechas del lateral derecho indican las bandas previamente descritas correspondientes a P2 y P1. Las flechas internas indican las tres bandas nuevas detectadas a partir de estos ensayos denominadas P3 (flecha negra), P4 (flecha roja) y P5 (flecha azul). Las calles están nombradas con las siglas de los tejidos muestreados, E (espiga), E.NE (espiga no emergente), HV (hoja verde), HS (hoja senescente), C (caña), BFE (base foliar envainante), R (raíz), Ctrl (control) correspondiente a una muestra de una purificación parcial enriquecida en P1 y P2. **b)** cuantificación de las bandas de P1 y P2 mostradas en la foto de arriba, donde la barra verde corresponde a las bandas detectadas de P1 y las barras rojas corresponden a las bandas de P2.



También se evaluaron posibles variaciones en los niveles de Sm y SM de la enzima Rubisco (Figura 5), pudiéndose observar que en HS el contenido de SM disminuye notoriamente en comparación con los tejidos verdes tales como hojas bandera, hojas verdes, caña o base foliar. Tal como fue previamente reportado se sabe que la enzima Rubisco es aceleradamente degradada durante la etapa temprana de la senescencia (Dalling, 1895; Feller y Fischer, 1994). Por su parte, la Sm también disminuye en tejidos senescentes así como en caña (C), tiene una concentración similar en tejidos de espigas (E.NE y E) y en base foliar envainante (BFE), teniendo una concentración mayor en tejidos verdes (HB y HV).

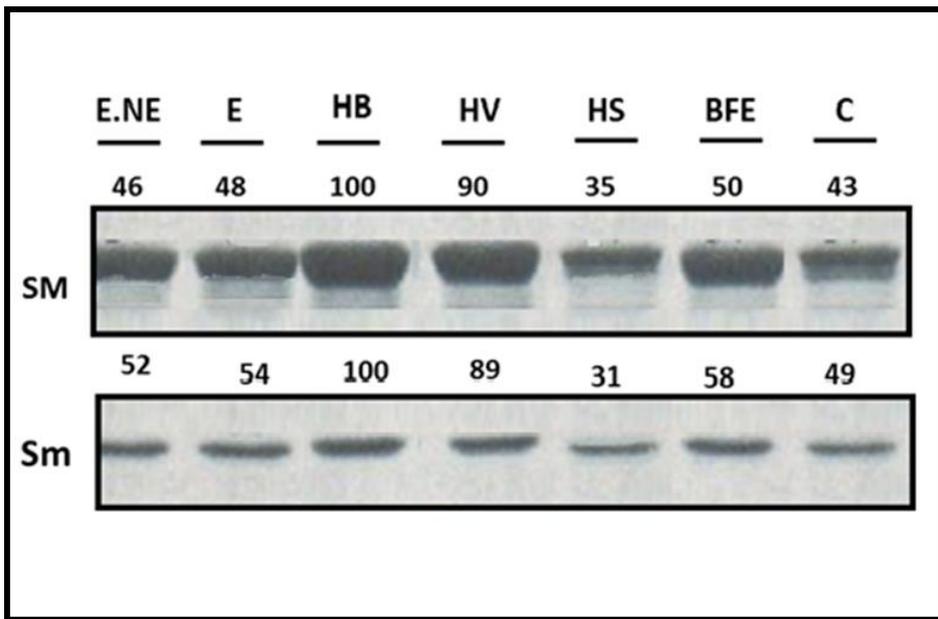


Figura 5: Cambios en los niveles de la subunidad mayor (SM) y subunidad menor (Sm) de Rubisco en un SDS-PAGE 15 % de extractos de diferentes tejidos de plantas de trigo cultivadas en invernáculo. Las proteínas se tiñeron con CBB R250 y la intensidad de las bandas se cuantificó con el software Image J, considerando como un 100% las muestras con mayor concentración de SM y Sm a fines comparativos. Se muestran los valores obtenidos (en porcentaje) arriba de cada calle. E.NE: espiga no emergente, E (espiga), HB (hoja bandera), HV (hoja verde), HS (hoja senescente), BFE (base foliar envainante), C (caña).

El contenido total de proteínas solubles en los distintos tejidos se determinó por el método de Bradford (1976) (Figura 6), observando una mayor concentración de proteínas en tejidos vegetativos como hojas bandera (HB) y hojas verdes (HV). Los tejidos con menor concentración proteica fueron HS (hojas senescentes) y C (caña).

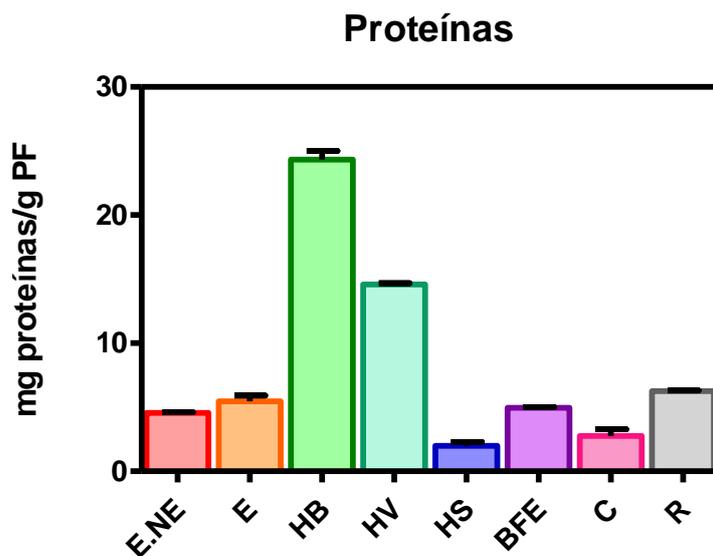
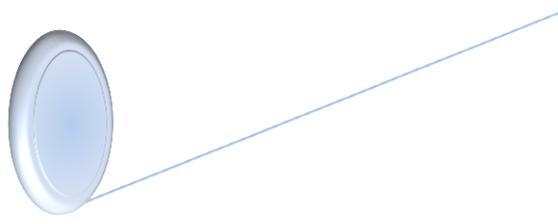


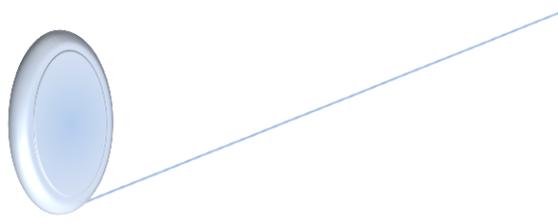
Figura 6: Concentración de proteínas en los tejidos muestreados, expresados en mg de proteína/g de peso fresco. Los nombres de los tejidos corresponden a las abreviaturas detalladas en la **Figura 3**.

PLANTAS EN ESTADO VEGETATIVO VS. ESTADO REPRODUCTIVO

Si bien es ampliamente reconocido que el proceso de senescencia foliar que tiene lugar en las plantas en estado vegetativo a medida que las hojas se van renovando en forma secuencial es equiparable a la senescencia monocárpica (muerte de la planta final del ciclo de vida), aún no se conoce con claridad hasta qué punto se puede homologar ambos estadios de desarrollo. Menos aún se conoce si el perfil de proteasas expresadas en una u otra condición es similar o no. Con el fin de dilucidar esta cuestión se estudió el comportamiento de las potenciales proteasas tipo subtilisina detectadas mediante el uso de anticuerpos en plantas en diferentes estado de desarrollo, vegetativo (ensayo cámara) o reproductivo (ensayo en invernáculo).

Los resultados se muestran en la Figura 7, en la que se comparan los distintos tejidos muestreados a partir de las plantas en espigazón (muestras "I" de invernáculo) y en estado vegetativo (muestras "C" de cámara de cultivo).

Como se puede observar en la figura, en general el patrón de bandas reveladas por el antisuero no muestra diferencias importantes cuando comparan plantas en ambos estadios de desarrollo, aunque sí se observan algunas diferencias a nivel de intensidad de bandas. P2 se expresa en todos los tejidos, mostrando una mayor intensidad en la muestra correspondiente a caña de plantas adultas (C.I - calle 6), mientras que se expresa en menor proporción en las espigas, tanto plantas jóvenes (E.C) como adultas (E.I) (calles 1 y 2 respectivamente).



También se observan diferencias en los niveles de expresión de P2 en HS, cuando se comparan los dos estadios de desarrollo, siendo la señal más fuerte en las plantas de cámara que en las de invernáculo. La diferencia más importante entre ambas proteasas radica en su perfil de expresión durante la senescencia, como ya se había estudiado, P2 está presente en HV en bajos niveles y se induce rápidamente una vez que la senescencia ha comenzado, mientras que P1 solo es detectable en etapas más avanzadas de la senescencia. La inducción tardía de P1 sugiere un rol en la ejecución de la muerte celular, mientras que la inducción temprana de P2 estaría indicando una participación en la degradación de proteínas previa a la pérdida de la integridad subcelular. Sin embargo, tanto la actividad de P1 como de P2 estarían contribuyendo a la removilización de N hacia los granos en desarrollo (Roberts et al. 2011).

Por su parte, P1 muestra una leve expresión en las muestras que corresponden a caña de ambos ensayos (C.C y C.I _ calles 5 y 6), mientras que no se detecta en espigas.

En general, se acepta que las subtilisinas pueden separarse en dos grandes grupos de acuerdo a su función biológica. Mientras que algunas presentan un amplio rango de sustratos y estarían relacionadas con la degradación masiva de proteínas, otras estarían implicadas en funciones muy específicas relacionadas con la regulación de distintos aspectos del desarrollo en plantas (Rautengarten et al. 2005). Entre ellas se encuentran las subtilisinas SDD1 y ALE1, ambas de *A. thaliana*. Se ha demostrado que SDD1 regula la distribución y desarrollo de estomas en la epidermis (Berger y Altmann 2000) mientras que ALE1 es responsable del desarrollo de la cutícula durante la embriogénesis (Tanaka et al. 2001). Además, las subtilisinas han sido asociadas en plantas a otras funciones tales como defensa frente al ataque de patógenos en tomate (Tornero et al. 1996), el desarrollo de nódulos en soja (Ribeiro et al. 1995), germinación en semillas de cebada (Fontanini y Jones 2002) y muerte celular programada en *Avena sativa* (Coffeen y Wolpert 2004).

Nuestros resultados muestran que tanto P1 como P2 estarían involucradas en otras funciones biológicas además de la proteólisis asociada a senescencia foliar (Roberts et al., 2003).

Nuevamente se detectaron las bandas de mayor y menor peso molecular, correspondientes a P3 y P4 como así también la banda de peso intermedio P5. Estas bandas pueden observarse en las muestras correspondientes a espiga, caña y raíz, tanto en las muestras de cámara como invernáculo.

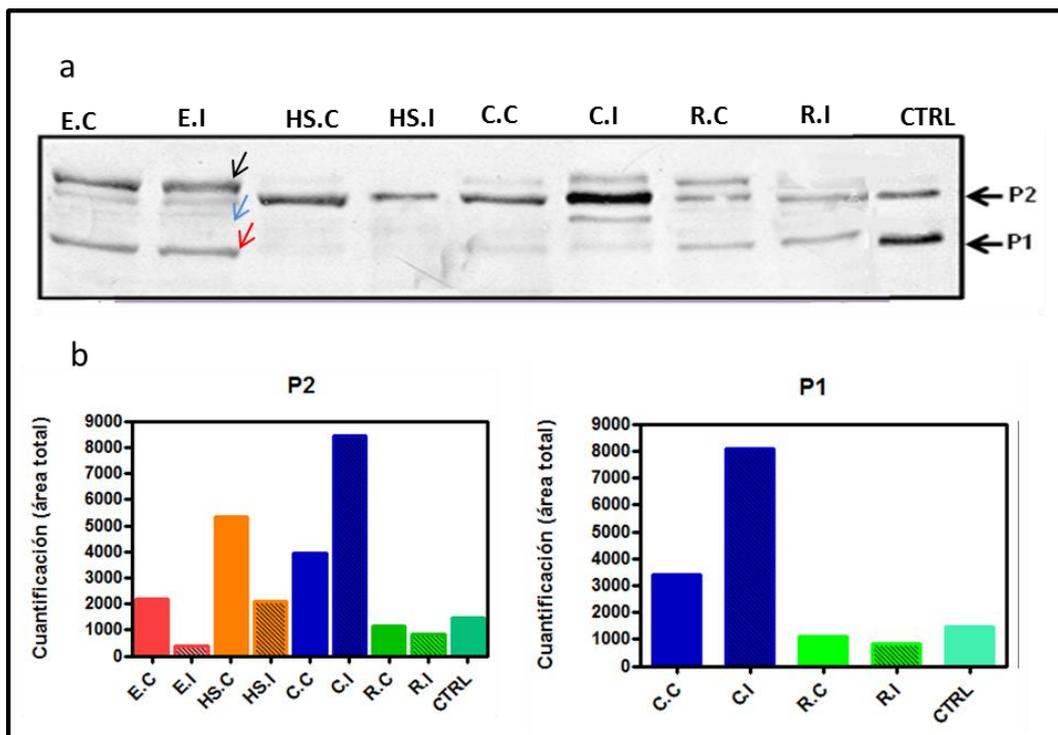
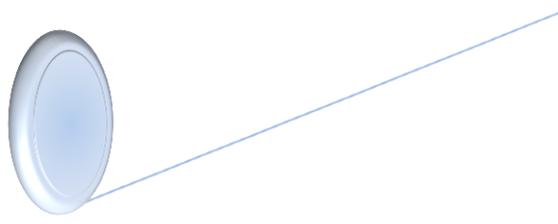


Figura 7 a) Inmunodetección de proteasas tipo subtilisiina en distintos tejidos de plantas jóvenes (ensayo en cámara de cultivo) y plantas adultas (ensayo en invernáculo). 1: E.C (espiga cámara), 2: E.I (espiga invernáculo), HS.C (hoja senescente cámara), HS.I (hoja senescente invernáculo), C.C (caña cámara), T.I (tallo invernáculo), R.C (raíz cámara), R.I (raíz invernáculo), C (ctrl), el control corresponde a una muestra parcialmente purificada parcialmente enriquecida en P2 y P1. **b)** Las nuevas bandas detectadas en esta tesis, correspondiente a P3, P4 y P5 se indican con flechas negra, roja y azul respectivamente.

La cuantificación de bandas (figura 7 b) permitió comparar la expresión de P1 y P2 en todos los tejidos analizados. Puede observarse que en general la expresión de P2 fue mayor en las plantas cultivadas en cámara que las de invernáculo, con la excepción de las muestras de caña en las cuales los niveles de P2 fueron superiores en las plantas de invernáculo. La proteasa P1, pudo cuantificarse en las muestras de caña, con mayor expresión en las muestras de invernáculo, mientras que en raíces no parece haber notables diferencias entre estadios de desarrollo. Sin embargo, es necesario recordar que al no contar con número suficiente de repeticiones no podemos asegurar la significancia estadística de estos resultados que deben tomarse como una información preliminar o exploratoria.

SENESCENCIA INDUCIDA POR FITOHORMONAS

Con el fin de estudiar el patrón de bandas de proteasas tipo subtilisiina en respuesta a la senescencia inducida por hormonas se realizó un ensayo de hojas cortadas incubadas en presencia de metil jasmonato (MJ, 50 μ M), una de las principales fitohormonas relacionadas con la senescencia vegetal. Por otro lado, se realizó un tratamiento control de hojas incubadas en agua destilada, y otro tratamiento con la adición de 6-benzilaminopurina (BAP, 10 μ M), una citocinina artificial con efecto retardador de la senescencia. Nuevamente, se evaluó el nivel de



expresión de P1 y P2 mediante el uso de anticuerpos y la posible aparición de las nuevas proteasas detectadas, P3, P4 y P5.

En la Figura 8, se muestra el aspecto de las hojas de los distintos tratamientos, a los 0, 2 y 4 días de incubación. En el día 0 se muestra el material vegetal en el instante antes de comenzar cada tratamiento. En el día 2 ya se puede apreciar la diferencia en el aspecto de las hojas entre tratamientos, siendo notable la aceleración de la senescencia (evidenciada como pérdida de clorofila) en las hojas incubadas con MJ (Roberts et al., 2006), mientras que las hojas incubadas en presencia de BAP, mostraron un retraso del progreso de la senescencia en comparación con las hojas incubadas en agua. En el día 4, las hojas del tratamiento control comenzaron a evidenciar pérdida de clorofila, mientras que el tratamiento con MJ resultó en hojas completamente senescentes y el tratamiento con BAP no produjo cambios notorios en el aspecto de las hojas con respecto al día 2, o incluso respecto de la muestra tomada en el día 0.

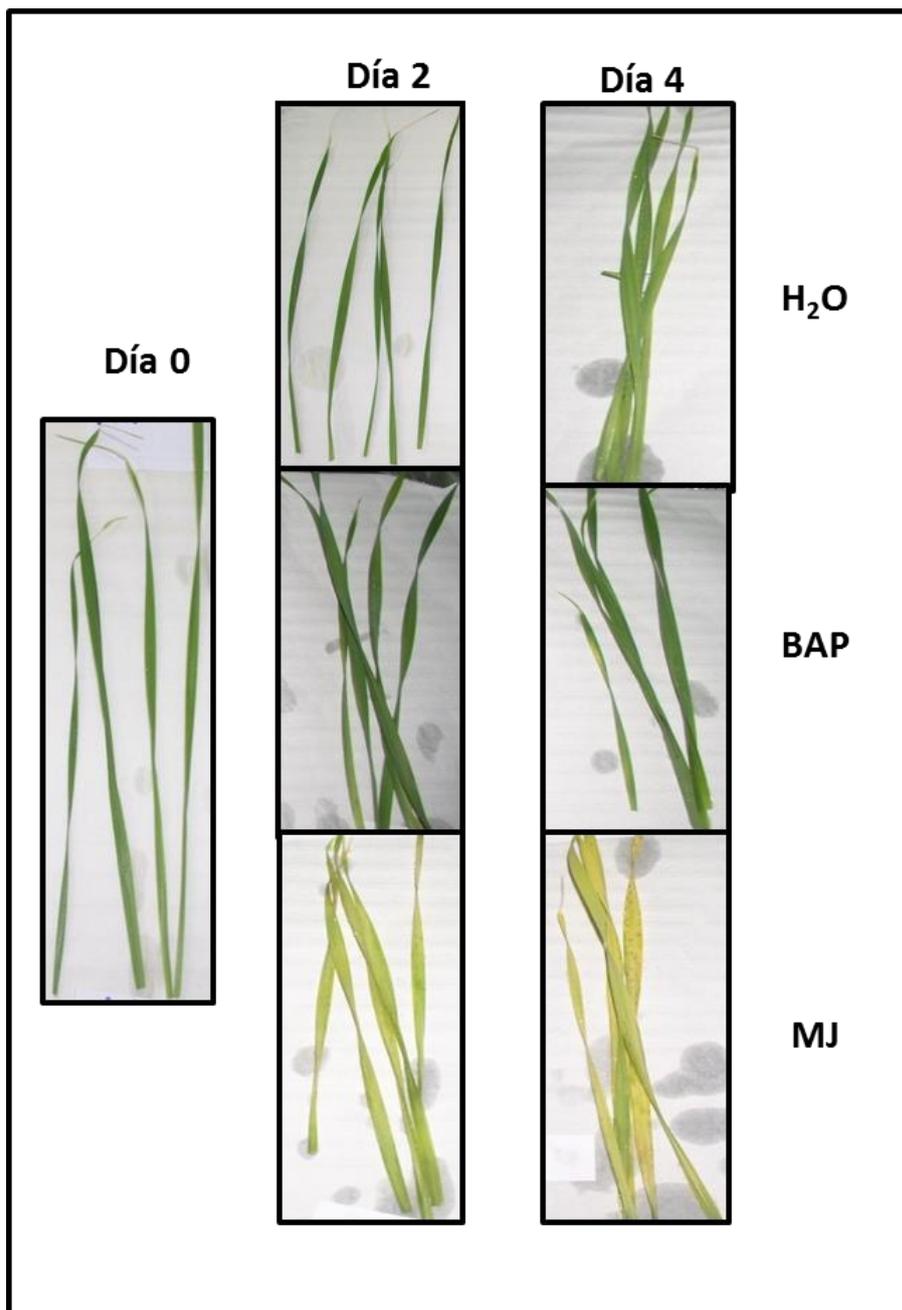


Figura 8: Aspecto de las hojas cortadas de plantas jóvenes de trigo (30 días) incubadas en oscuridad y tratadas con 6_benzilaminopurina (BAP) 10 μ M, MetilJasmonato (MJ) 50 μ M o agua destilada. Las muestras se tomaron a los 0, 2 y 4 días de tratamiento.

El análisis de la concentración de proteínas en los extractos de hojas de los diferentes tratamientos se muestra en la Figura 9. Se pudo observar una menor concentración de proteínas en los extractos de hojas que fueron sometidas al tratamiento con MJ sobre todo al día 4. Esta información indica que tal como se observa en la figura 8, la aplicación de MJ produjo una aceleración de la senescencia en estas hojas comparadas con las hojas incubadas en agua o BAP.

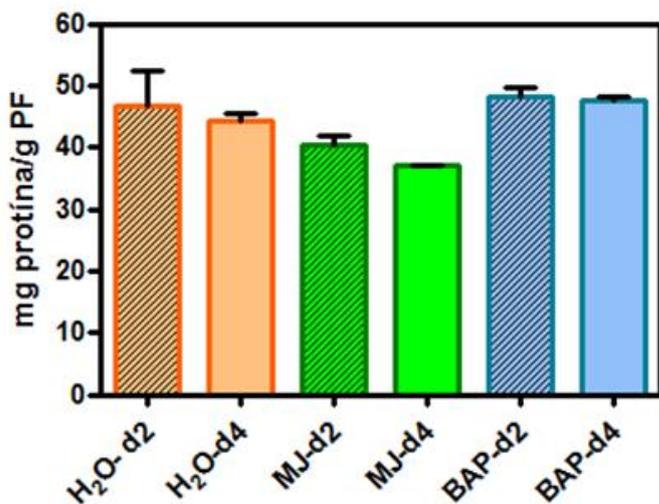


Figura 9: Concentración de proteínas en los extractos de hojas de trigo incubadas en oscuridad continua en agua destilada (H₂O), metiljasmonato (MJ) 50μM o 6_benzilaminopurina (BAP) 10μM muestreados a los 2 y 4 días de tratamiento

En forma similar a lo realizado en los ensayos anteriores, se evaluó la expresión de proteasas tipo subtilisina mediante western blot (Figura 10 a) y los niveles de ambas subunidades de Rubisco (Figura 10 b y c). En este experimento, se pudo observar la expresión de P2 en las muestras provenientes de todos los tratamientos y tiempos de incubación, observándose la mayor expresión de P2 en las hojas incubadas en presencia de MJ en el último muestreo, demostrando que esta proteasa aumenta su expresión a medida que progresa la senescencia de las hojas cortadas. En el caso de P1, solo pudo ser detectada en muy bajos niveles, en el tratamiento con MJ y luego de 4 días de incubación. Nuevamente, cabe señalar que se trata de un ensayo exploratorio y la falta de réplicas independientes no permite analizar la significancia de las diferencias observadas entre los tratamientos. Sin embargo, a pesar de esta limitación, los resultados obtenidos son coherentes con lo previamente observado en plantas jóvenes (Roberts et al. 2006) y en estado reproductivo (Roberts et al. 2011). Llamativamente, en este ensayo no se vio expresión de las bandas denominadas P3, P4 y P5.

En cuanto a las subunidades de Rubisco, la tendencia de estos resultados preliminares indican que el contenido de ambas subunidades disminuiría en función del tiempo de incubación, con una clara caída en el tratamiento de MJ tanto para la SM (Figura 10 b) como la Sm (Figura 10 c). También puede observarse una tendencia de retraso de la degradación de proteínas en el tratamiento de BAP, evidenciado por el mantenimiento de altos niveles de ambas subunidades de Rubisco.

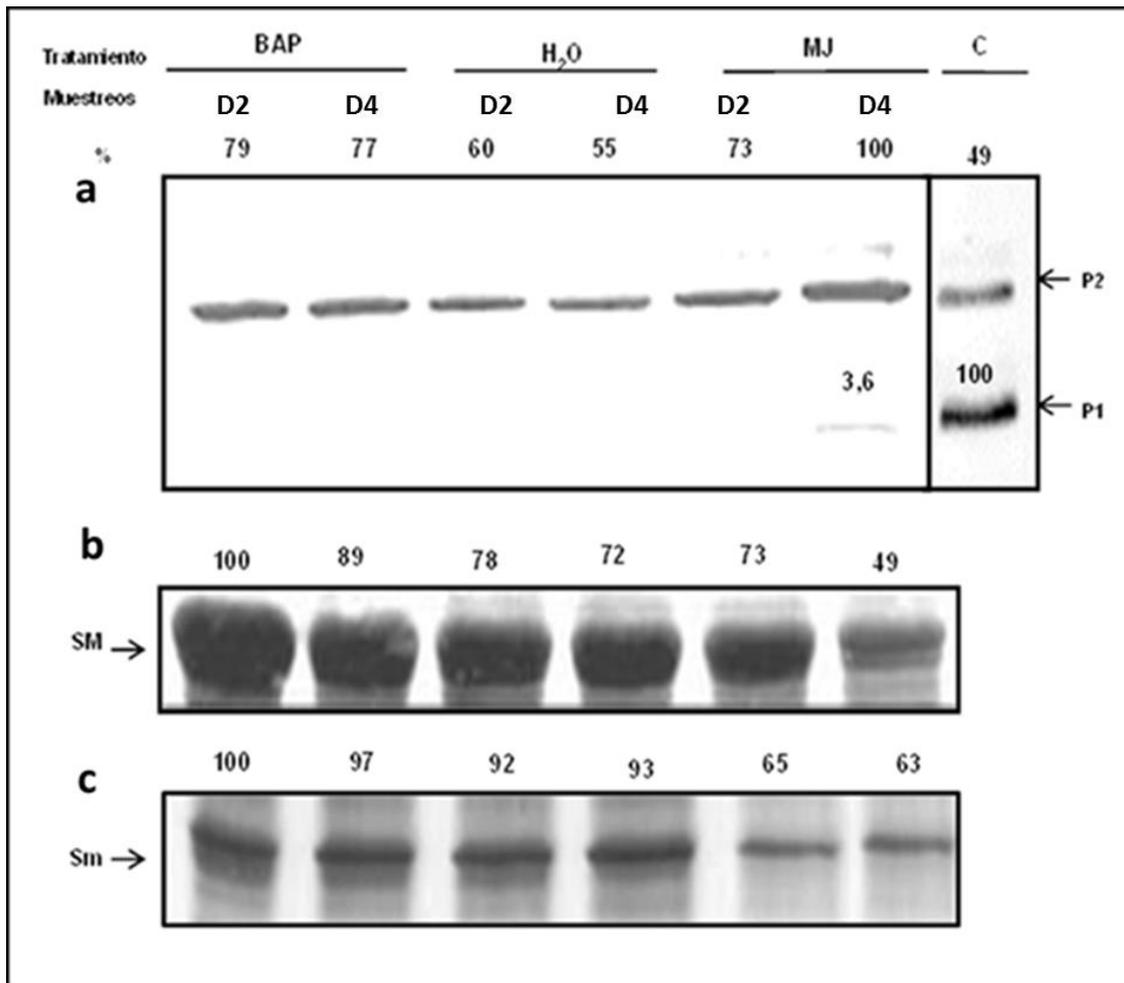


Figura 10 **a)** Inmunodetección de P2 y P1 en extractos de hojas de trigo cortadas, incubadas en oscuridad continua, sometidas a tratamientos, con metil jasmonato (MJ) 50 μ M y 6_benzilaminopurina (BAP) 10 μ M o H₂O muestreadas a los 2 y 4 días de incubación. El control "C", corresponde a la muestra de una purificación parcial enriquecida en P1 y P2. **b)** Niveles de SM de Rubisco en los extractos analizados por SDS-PAGE 15% y tinción con CBB R250. **c)** Niveles de Sm de Rubisco en los extractos analizados por SDS-PAGE 15% y tinción con CBB R250. Las bandas de las subtilisinas y de subunidades de Rubisco se cuantificaron con el software Image J y los valores obtenidos se muestran, expresados como porcentajes, en cada foto relativizados a la muestra de mayor concentración (100%) para cada banda, solo a los fines comparativos.

Figura 11: Alineación de las secuencias codificantes para putativas subtilisinas de trigo identificadas en base a la secuencia parcial de P1. Los diferentes colores indican la zona de hibridación de los primers *forward* y *reverse* de cada secuencia. En verde, TA83755, en rojo TA83756, y en azul TA83757.

A continuación se analizó la expresión de dichos genes por RT-PCR semicuantitativa en hojas verdes y senescentes de plantas jóvenes de trigo cultivadas bajo condiciones controladas en cámara (Figura 12 a) y en plantas adultas cultivadas en invernáculo (Figura 12 b), utilizando como control los genes del RNAr 18S y del factor de elongación 1 alfa (TEF), respectivamente.

En plantas jóvenes de trigo se pudo observar que solamente dos de las secuencias estudiadas (TA83757 y TA83755) se expresan tanto en las hojas verdes como senescentes, aumentando considerablemente, su expresión en estas últimas. La cuantificación de la intensidad de las bandas mostró que TA83757 aumentó 10 veces en los tejidos de HS, y TA83755 se expresó 1,53 veces más que en HV.

Por su parte, no se observó expresión de la secuencia TA83756 tanto en HV como HS (Figura 12 a).

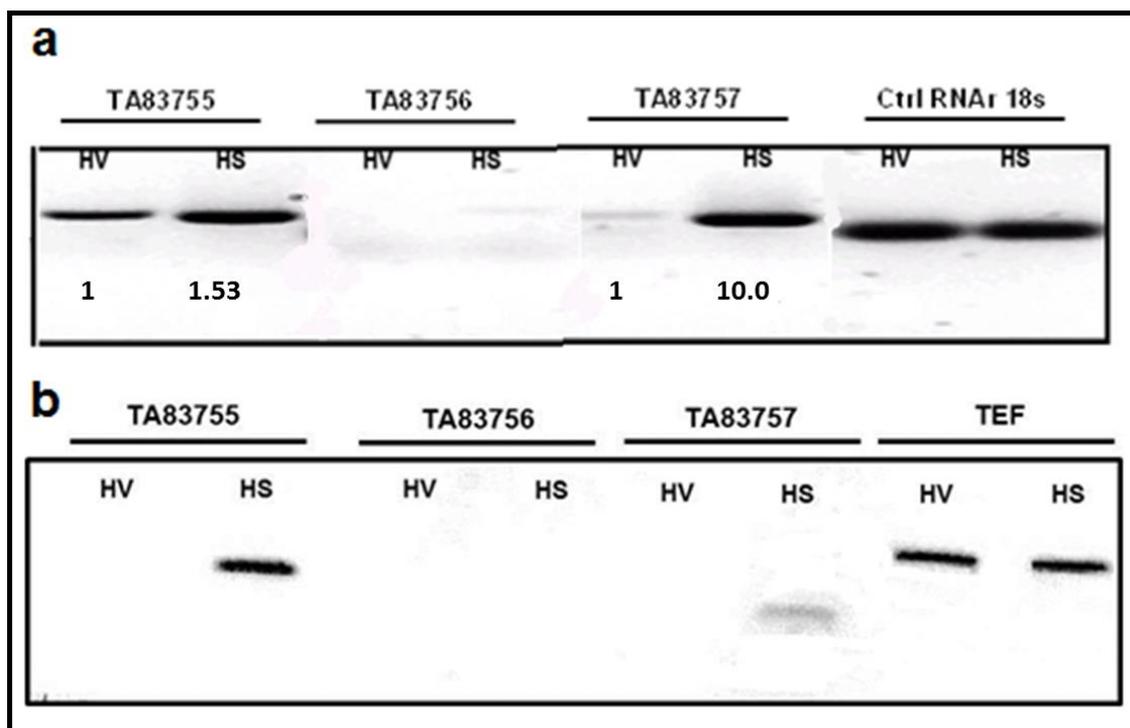
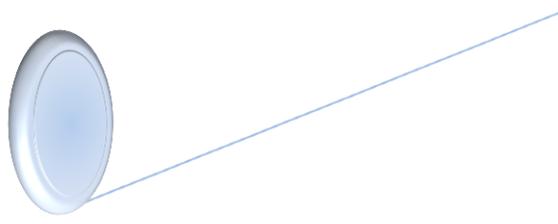


Figura 12 a) Análisis de la expresión de las secuencias TA83757, TA83756, TA83755 identificadas como putativas subtilisinas en base a la secuencia parcial de P1 en extracto de hojas verdes y senescentes de plantas jóvenes determinadas por RT-PCR semicuantitativas. Los valores informados se obtuvieron normalizando los datos de intensidad de bandas en función al control correspondiente, y luego se relativizó entre hojas senescentes y no senescentes para determinar las veces de inducción. **b)** Análisis de la expresión de las mismas secuencias en hojas verdes y senescentes de plantas en espigazón cultivadas en invernáculo determinada por RT-PCR semicuantitativa.



Del mismo modo también se analizó las expresiones de las mismas secuencias en hojas verdes y senescentes en plantas cultivadas en invernáculo por RT-PCR semicuantitativa (Figura 12 b), utilizando como control el gen del factor de elongación 1 α (TEF).

Los resultados muestran que en plantas en estado reproductivo, se pudo observar la inducción de las secuencias TA83757 y TA83755 solo en las HS (Figura 12 b), mientras que no se observó la expresión de TA83756 en hojas verdes ni senescentes. A continuación, en función a los datos obtenidos, se decidió analizar la expresión de los genes que mostraron inducción en hojas senescentes TA83755 (Figura 13 a) y TA83757 (Figura 13 b) por qRT-PCR en tiempo real. En este análisis se utilizó como referencia el gen del factor de elongación 1 α (TEF), contra el cual se contrastaron los niveles de expresión de TA83755 y TA83757 en todos los casos.

Este análisis permitió confirmar la inducción de las secuencias TA83755 y TA83757 en HS provenientes de plantas en estado vegetativo (c) así como de plantas en estado reproductivo (i) Además se puede observar que los niveles de expresión de las dos putativas proteasas son mayores en las muestras de HS de plantas jóvenes comparadas con las cultivadas en invernáculo.

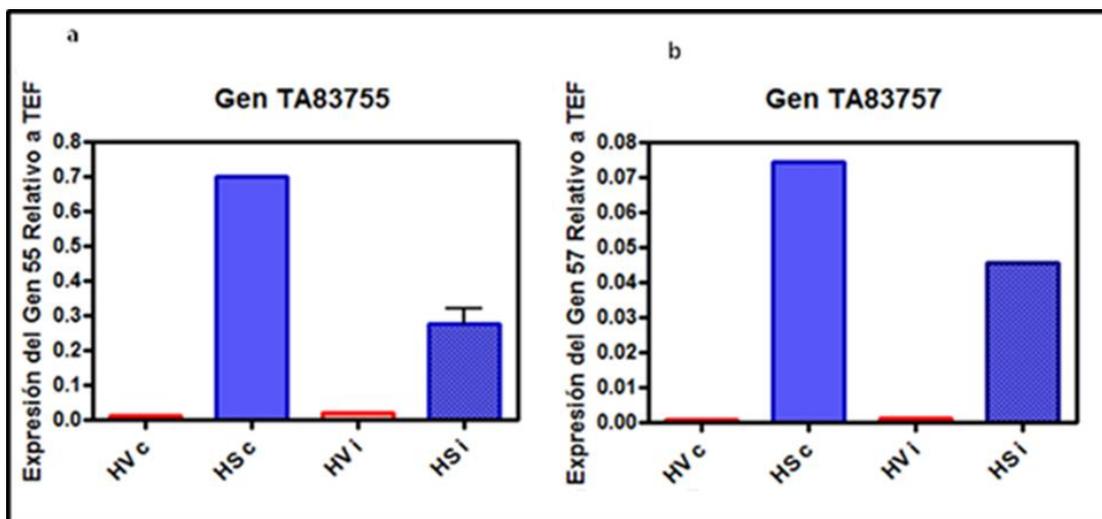
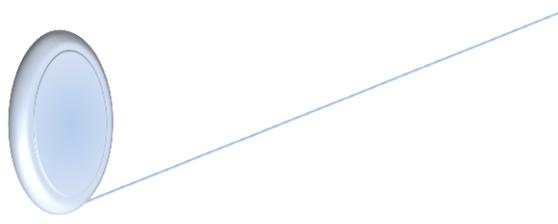


Figura 13: Análisis de la expresión de las secuencias TA83755 (a) y TA83757 (b) normalizados respecto de la expresión del gen TEF1 α , obtenidos por qRT-PCR en tiempo real. Las muestras corresponden a hojas verdes (HV) y hojas senescentes (HS) de plantas cultivadas en cámara (c) e invernáculo (i).



CONCLUSIONES

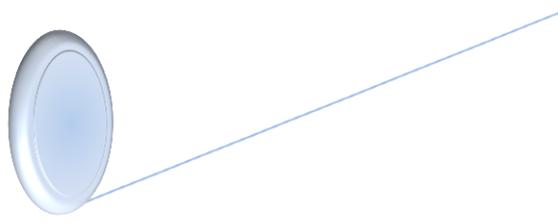
A lo largo del trabajo desarrollado, hemos podido analizar la expresión diferencial de dos proteasas tipo subtilisina asociadas fuertemente al proceso de senescencia, P1 y P2, en diferentes tejidos de trigo muestreados, tanto en plantas jóvenes (35 días) como adultas (125 días) asociadas fuertemente al proceso de senescencia en dichas plantas. Observamos que en las plantas de estado reproductivo, P2 tiene una expresión basal en todos los tejidos muestreados tales como: raíz, caña, base foliar envainante, hojas senescentes, hojas verdes y espigas no emergente, con un notorio aumento de su expresión en hojas senescentes. Por su parte, P1 únicamente se induce en los tejidos de base foliar envainante y raíz (con más intensidad en este último). Se observó un comportamiento similar en las plantas de estado vegetativo, expresión basal de P2 en todos los tejidos, con mayor inducción en hojas senescentes y expresión de P1 en caña y raíz. En líneas generales no hubo una notoria diferencia entre los diferentes estadios de desarrollo de las plantas. Si bien no se pudo realizar un análisis estadístico debido a la falta de repeticiones, estos resultados nos permiten obtener información a modo preliminar para abordar futuros estudios.

En los tratamientos con fitohormonas, donde incubamos hojas cortadas de plantas en estado vegetativo en presencia de MJ (fitohormona inductora de la senescencia), observamos que P2 se expresa en todos los tratamientos mostrando inducción por MJ. Por su parte, P1 solamente se expresó luego de 4 días de tratamiento, cuando las hojas se encontraban completamente amarillas.

Durante estos ensayos hemos observado la presencia de nuevas bandas inmunoreactivas al antisuero anti-P1, las cuales fueron denominadas P3, P4 y P5, y corresponderían a otras proteasas tipo subtilisina aún no descritas.

Así mismo, se encontraron tres secuencias codificantes para putativas subtilisinas en trigo, dos de las cuales (TA83757 y TA83755) pudimos determinar que se asocian positivamente con la senescencia foliar en trigo.

Como conclusión general podemos decir que los resultados presentados en este trabajo contribuyen a sustentar la idea de un rol clave de las subtilisinas en el proceso de senescencia además de demostrar que también serían enzimas de importancia vital en otras etapas del crecimiento vegetal.



BIBLIOGRAFIA

Barneix AJ, Arnozis PA, Guitman MR. The regulation of nitrogen accumulation in the grain of wheat plants (*Triticum aestivum*) (1992). *Physiology of Plants*. **86**:609-615.

Berger D, Altmann T. A. subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. (2000) *Genes Development* **14**: 1119-1131

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. (1976). *Anal Biochem*. **72**:248-254.

Buchanan-Wollaston v. The molecular biology of leaf senescence. (1997) *journal of Experimental Botany*. **48**: 181-199.

Coffeen W, Wolpert T Purification and Characterization of Serine Proteases That Exhibit Caspase-Like Activity and Are Associated with Programmed Cell Death in *Avena sativa*. (2004) *Plant Cell* **16**: 857-873

Dalling, Michael J. The physiological basis of nitrogen redistribution during grain filling in cereals. (1985) In: James E. Harper, Lawrence E. Schrader and Robert W. Howell. Exploitation of physiological and genetic variability to enhance crop productivity. pp. 55-71.

Dangl J.L., Dietrich R.A. & Thomas H. Senescence and programmed cell death. (2002) In: *Biochemistry and Molecular Biologic of Plants*, Buchanan B., Gruissem W. & Jones R. 8Eds), American Society of Plants Physiologists. **20**: 1044-1100.

Feller U. & Fischer A. Nitrogen metabolism in senescing. (1994) *Critical Reviews in Plant Sciences*. **13**: 241-273.

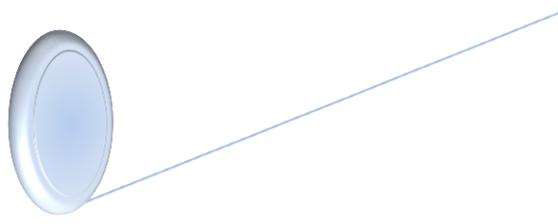
Feller U. & Keist M. Senescence and nitrogen metabolism in annual plants. (1986) In: *Fundamental, Ecological & Agricultural Aspects of Nitrogen Metabolism in Higher Plants*, Lambers H., Neeteson J.J. & Stulen L., Martinus Nijhoff, Dorderecht, 219-234.

Fontanini D, Jones B (2002) SEP-1, a subtilisin-like serine endopeptidase from germinated seeds of *Hordeum vulgare* L. cv. *Morex*. *Planta* **215**:

Gan S. & Amasino R.M. Making sense of senescence. (1997) *Plant Physiology* **133**: 313-319.

Hoagland D.R. & Arnon D.I. The water-culture method for growing plants without soil. (1950) *California Agricultural Experiment station Circular*. **347**.

Hörtensteiner S. & Feller U. nitrogen metabolism and remobilization during senescence. (2002) *Journal of Experimental Botany*. **53**: 927-937.



Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. (1970) *Nature* **227**:680-685.

Lawlor D.W. Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanism are the key to understanding production systems. (2002) *Journal of Experimental botany*. **53**: 773-787.

Munné-Bosch S. & Alegre L. Died and let live: Leaf senescence contributes to plants survival under drought stress. (2004) *Functional Plant Biology*. **31**: 203-216.

Munné-Bosch S. & Alegre L. Interplay between ascorbic acid and lipophilic antioxidant defences in chloroplasts of water-stressed *Arabidopsis* plants. (2002) *FEBS Letters*. **524**: 145-148.

Noodén L.D., Guiamét J.J & Jhon I. Senescence mechanism. (1997) *Physiologica Plantarum*. **101**: 746-753.

Passarella V.S. Y Savin R. Estructura física de los granos. (2003) En: *Producción de granos. Bases funcionales para su manejo*, Ed. Facultad de Agronomía, Bs.As., Argentina. **II**: 11-23.

Payne P. I. Breeding for proteins quality and protein quality in seed crops. (1983) In: *Seed Proteins*, Daussant J. Mossé J. & Vaughan J. (Eds), Academic Press, N. Y. **11**: 223-253.

Petr J., Cerný V., Hruska L., et al. (1988) Yield formation in the main field crops. *Developments in crop science. Elsevier*. **13**: 72-151.

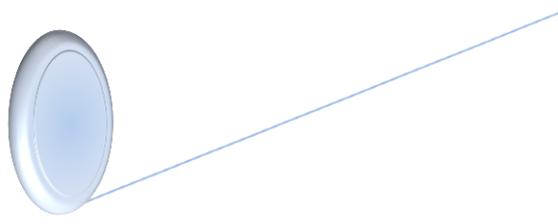
Quirino B.F., Noh Y.S., Himelblau E. & Amasino R.M. Molecular aspects of leaf senescence. (2000) *Trends in Plant science*. **5**:278-282.

Rautengarten C, Steinhauser D, Stintzi A, Schaller A, Kopka J, Altmann T. Inferring hypotheses on functional relationships of genes: analysis of the *Arabidopsis thaliana* subtilase gene family. (2005) *PLoS Computational Biology* **1**: e40

Ribeiro A, Akkermans A, van Kammen A, Bisseling T, Pawlowski K A Nodule-Specific Gene Encoding a Subtilisin-Like Protease Is Expressed in Early Stages of Actinorhizal Nodule Development. (1995) *Plant Cell* **7**: 785-794

Roberts I.N Murra P.F., Caputo C., Passeron S. & Barneix A. J. Purification and characterization of a subtilisin-like serine protease induced during the senescence of wheat leaves. (2003) *Physiologica Plantarum*. **118**: 483-490.

Roberts I, Fernández Murray P, Passeron S, Barneix AJ. The activity of the 20S proteasome is maintained in detached wheat leaves during senescence in darkness (2002). *Plant Physiologica Biochem* **40**:161-166.



Roberts I.N., Caputo C., Mariana Kade, Criado M., Barneix A. J. Subtilisin-like serine proteases involved in N remobilization during filling in wheat (2011). *Acta Physiologicae Plantarum* **33**:1997-2001

Savin R. y Sorlino D.M ¿Que se entiende por calidad de los granos? (2003) En: *Producción de ranos. Bases funcionales para su manejo*, Ed. Facultad de Agronomía, Bs.As., Argentina **III**: 27-46

Smart C.M. Gen expression during leaf senescence. (1994) *New Phytologist*. **126**: 419- 448.

Tanaka H, Onouchi H, Kondo M, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Machida C, Machida Y. A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in Arabidopsis embryos and juvenile plants. (2000) *Development* **128**: 4681-4689

Takei K., Takahashi T., Sugiyama T., Yamaya T. & Sakakibara H. Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin. (2002) *Journal of Experimental Botany*. **53**: 971-977.

Thomas H., Ougham H.J., Canter P. & Donnison I. What stay- green mutants tell us about nitrogen remobilization in leaf senescence. (2002) *Journal of Experimental Botany*. **53**: 801-808.

Thomas H., Ougham H.J., Wagstaff C. & Staed A.D. Defining senescence and death. (2003) *Journal of Experimental Botany*. **54**: 1127-1132.

Tornero P, Conejero V, Vera P Primary structure and expression of a pathogen-induced protease (PR-P69) in tomato plants: Similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. (1996) *PNAS* **93** 6332-6337

Uhart S.A. Trigo pan. (1998) En: *Calidad de Productos Agrícolas. Bases Ecofisiológicas, Genéticas y de Manejo Agronómicos*, INTA – Balcarce, Bs.As., Argentina. Pp: 28-68.

Viestra R.D. Proteolysis in plants: mechanisms and functions. (1996) *Plant Molecular Biology*. **32**: 275-302.

Wang Y.H., Gravin D.F. & Kochian L.V. Nitrate-induced genes in tomato roots. Array analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition. (2001). *Plant Physiology*. **127**: 345-359.

Yoshida S. Molecular regulation of leaf senescence. (2003) *Current Opinion in Plant biology*. **6**: 79-84.

