



Tesina de Grado para optar al título de Bióloga

Rol de la alantoína en la regulación de los niveles de especies activas del oxígeno en *Arabidopsis thaliana*.



Tesinista: BOGINO, María Florencia

Firma:

Director: GONZÁLEZ, Claudio Alejandro

Firma:

Co-director: LESCANO LÓPEZ, Carlos Ignacio

Firma:

Fecha: 12 de abril de 2018

**Cátedra de Fisiología Vegetal
Escuela de Biología
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Universidad Nacional de Córdoba**

Tesina de Grado para optar al título de Bióloga:

Rol de la alantoína en la regulación de los niveles de especies activas del oxígeno en *Arabidopsis thaliana*.

Tribunal Examinador:

Apellido y Nombre: Dra. Diana Labuckas

Firma:

Apellido y Nombre: Dr. Sebastián Dambolena

Firma:

Apellido y Nombre: Biól. Carolina Martini

Firma:

Calificación:

Fecha:

Índice:

| | |
|---|----|
| Resumen | 4 |
| Abreviaturas | 5 |
| Introducción | 6 |
| Hipótesis y objetivos | 11 |
| Materiales y métodos | 12 |
| Resultados | 17 |
| 1. Respuesta de plantas WT y <i>aln-1</i> a condiciones inductoras de estrés oxidativo | 17 |
| Los mutantes <i>aln-1</i> acumulan alantoína en forma constitutiva | 17 |
| Evolución de parámetros oxidativos de plantas WT y <i>aln-1</i> en condiciones control..... | 18 |
| Evolución de parámetros oxidativos de plantas WT y <i>aln-1</i> en respuesta al MV..... | 20 |
| Evolución de parámetros oxidativos de plantas WT y <i>aln-1</i> en respuesta al H ₂ O ₂ | 23 |
| 2. Estudio de la translocación de alantoína y los niveles de EAO foliares | 26 |
| La alantoína se transporta de raíz a parte aérea | 27 |
| Efecto de la alantoína exógena sobre los niveles de EAO en WT y <i>ups5</i> | 29 |
| Discusión..... | 33 |
| Conclusiones | 39 |
| Referencias bibliográficas | 40 |

Resumen

La alantoína es un metabolito derivado de la degradación de las purinas, que se acumula en *Arabidopsis thaliana* en condiciones de estrés abiótico. Numerosos autores han relacionado este hecho con la tolerancia al estrés. Puesto que se conoce que diferentes tipos de estrés abiótico conducen al aumento de los niveles de especies activas del oxígeno (EAO), situación conocida como estrés oxidativo; se propuso que la acumulación de alantoína podría estar relacionada con la tolerancia a dicho estrés. En este trabajo mutantes alantoinasa *knockout* (*aln-1*) que acumulan alantoína en forma constitutiva, presentaron signos de mayor tolerancia al estrés oxidativo inducido por H₂O₂; sin embargo, no presentaron diferencias respecto al genotipo silvestre al ser tratados con alta intensidad lumínica, metilviológeno o aminotriazol.

También se ha propuesto que el transporte a larga distancia de alantoína, mediante el transportador Ureido Permeasa 5 (*AtUPS5*), podría estar implicado en la tolerancia al estrés. Por ello, se estudió la relación de la translocación de alantoína con la regulación de las EAO endógenas, en líneas WT y *ups5*. Luego de 3 horas de tratamiento con alantoína exógena, las plantas *ups5* mostraron una disminución en sus niveles de O₂⁻ foliares. Sin embargo, luego de 24 horas de tratamiento, ambos genotipos presentaron un aumento en los niveles de O₂⁻ y H₂O₂, lo que sugiere la implicancia de otros transportadores en la translocación de alantoína y modulación de las EAO en parte aérea. Se discuten las posibles relaciones de este hecho, con las respuestas de tolerancia al estrés abiótico de plantas que acumulan alantoína o tratadas con alantoína exógena descriptas.

Palabras clave: alantoína, especies activas del oxígeno, estrés oxidativo, transporte a larga distancia, permeasas de ureidos, *Arabidopsis thaliana* L.

Abreviaturas

ABA ácido abscísico

ALN alantoinasa

AT Aminotriazol

DAB Diaminobencidina

EAO Especie activa del oxígeno

JA ácido jasmónico

MV Metilviológeno

MDA Malondialdehído

MES ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico

NBT cloruro de nitroblue tetrazolium

PF Peso fresco

PS Peso seco

RE Retículo Endoplasmático

UPS Permeasa de Ureidos

WT *wildtype*, genotipo silvestre

Φ PSII Eficiencia cuántica del fotosistema II

Introducción

Las condiciones de crecimiento desfavorables causan alteraciones en la homeostasis vegetal, lo que se conoce como estrés. Esto puede deberse a factores abióticos, como la disponibilidad de agua y nutrientes, insolación, temperatura, salinidad y contaminación del suelo; o bióticos, como la herbivoría y el ataque por agentes patógenos como virus, bacterias y hongos.

Las plantas, al ser sésiles, han desarrollado diversos mecanismos que les permiten resistir, escapar o tolerar al estrés (Rao, 2006). La resistencia es el conjunto de mecanismos que evitan el desvío de las condiciones óptimas de desarrollo, como por ejemplo el engrosamiento de la cutícula o las diferentes anatomías foliares. Las plantas también poseen mecanismos de escape, como la adecuación de sus ciclos biológicos a fin de pasar la etapa desfavorable en forma de semilla. Por último, la tolerancia al estrés se define como aquellos mecanismos moleculares que llevan a la adecuación fisiológica del organismo al nuevo estado ambiental (Taiz y Zeiger, 2006). Estos procesos involucran cambios metabólicos, en la expresión génica y en el balance hormonal que implican ajustes en los procesos de desarrollo (Rao, 2006). Se ha observado que distintos tipos de estrés promueven respuestas fisiológicas comunes, como por ejemplo, regulación de los niveles hormonales, disminución de la eficiencia fotosintética, alteraciones en la síntesis proteica y modificaciones en la biosíntesis de osmoprotectores, factores de transcripción, y secuestradores de especies activas del oxígeno (EAO) (Rao, 2006).

Tradicionalmente las EAO, tales como el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), el ión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot), fueron descritas como un producto tóxico del metabolismo aeróbico (Mittler, 2002). También, se conoce que las plantas que se encuentran en condiciones de alta intensidad lumínica, sufren una alteración en el transporte electrónico que genera EAO, lo que se ha denominado estrés fotooxidativo (Reddy y Raghavendra, 2006). Las condiciones de irradiación y temperatura no óptimas, son consideradas como los factores de estrés abiótico más limitantes en el desarrollo y rendimiento de los cultivares (Foyer, 2002). Además, otras condiciones ambientales tales como sequía, salinidad, temperatura, presencia de metales pesados, radiación UV, déficit nutricional y polución ambiental promueven un desbalance entre la generación y la eliminación de las EAO (Reddy y Raghavendra, 2006).

Las plantas han desarrollado diversos mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo que principalmente pueden clasificarse en dos sistemas: enzimático y no enzimático. Dentro del primero encontramos la Superóxido Dismutasa (SOD), Ascorbato Peroxidasa (APX), Catalasa (CAT), Monodehydroascorbato Reductasa (MDAR), Dehydroascorbato Reductasa (DHAR), Glutación Peroxidasa (GPX) y Glutación Reductasa (GR) (Foyer, 2002). Por otro lado, existen metabolitos cuyas concentraciones se elevan en condiciones de estrés oxidativo. El ácido Ascórbico (AsA), ha sido reportado como un potente agente antioxidante mediante el secuestro directo de $^1\text{O}_2$, O_2^- y OH^\cdot (Padh, 1990) y sus niveles en hoja están fuertemente correlacionados con la intensidad lumínica (Reddy y Raghavendra, 2006). Por otro lado, el Glutación (GSH) es un tripéptido soluble cuyos niveles también están correlacionados con la tolerancia al estrés, mediante una serie de reacciones de óxido-reducción conocidas bajo el nombre “Ciclo del Ascorbato-Glutación”. Este ciclo tiene un rol central en el secuestro de H_2O_2 (Reddy y Raghavendra, 2006).

A pesar de que se ha observado que una elevada tasa de producción de EAO es dañina para los tejidos de la planta, en los últimos años se ha visto que éstas están involucradas en la señalización y control de procesos como la muerte celular programada, aclimatación y tolerancia al estrés abiótico y defensa ante patógenos (Mittler, 2002). La intensidad, duración y localización de la señalización mediada por EAO está determinada por el balance entre procesos de producción y secuestro de estas moléculas (Mittler y *Cols.*, 2004). Particularmente, se ha descrito que las EAO están implicadas en la señalización por ácido Abscísico (ABA, Kwak y *Cols.*, 2003), conocida como “la hormona del estrés”, debido a su rol protector en las respuestas al estrés salino, sequía y por bajas temperaturas (Taiz y Zeiger, 2006).

Entre los metabolitos nitrogenados, cuya síntesis y degradación se encuentra alterada bajo situaciones de estrés, particularmente salino y osmótico, en los últimos años ha merecido especial atención la alantoína (Shestopalov y *Cols.*, 2006). La alantoína, es un ureido generado en la vía de degradación de las purinas (Figura 1). Inicialmente, fue sugerido que la alantoína podría actuar como un intermediario en el reciclado del Nitrógeno desde tejidos fuente, como las hojas senescentes, a órganos destino, como flores y semillas (Werner y White, 2011). Luego, se observó que las leguminosas tropicales sintetizan purinas *de novo* durante el proceso de Fijación Biológica del Nitrógeno y utilizan los ureidos alantoína y ácido alantoico para el transporte de nitrógeno orgánico de la raíz a la parte aérea de la planta (Schubert, 1986). Debido a la importancia de los ureidos en el transporte del Nitrógeno fijado, su metabolismo ha sido estudiado casi exclusivamente en leguminosas. Sin embargo, a partir de estudios recientes se ha descubierto que los componentes moleculares para la síntesis y transporte de ureidos están

presentes en plantas que normalmente transportan amidas, como la planta modelo *Arabidopsis thaliana* L. (Desimone y Cols., 2002).

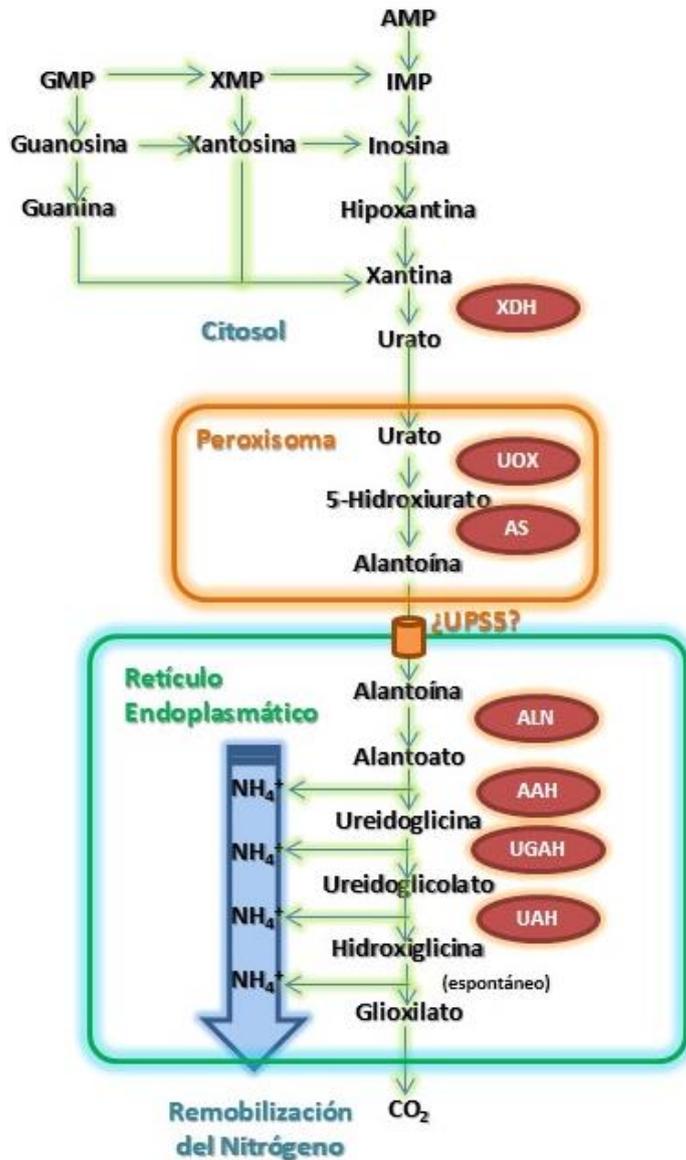


Figura 1: Vía de degradación de las purinas.

Abreviaturas:
 XDH, Xantina deshidrogenasa;
 UOX, Urato oxidasa/uricasa;
 AS, Alantoína sintasa;
 ALN, Alantoinasa;
 AAH, Ácido alantoico amidohidrolasa;
 UGAH, Ureidoglicina aminohidrolasa;
 UAH, ureidoglicolato amidohidrolasa;
 UPS5, Permeasa de Ureidos 5
 (adaptado de Watanabe, y Cols., 2014).

Numerosos trabajos han descrito que distintas condiciones de estrés abiótico promueven la acumulación de alantoína en *Arabidopsis*, como la oscuridad prolongada (Brychkova y Cols., 2008), estrés osmótico (Watanabe y Cols., 2014), estrés por contaminación con metales pesados (Nourimand y Cols., 2016), sequía (Irani y Todd, 2016) y alta intensidad lumínica (Irani y Cols., 2017).

Particularmente, Lescano y Cols. (2016) describieron que los genes involucrados en la biosíntesis de alantoína (*AtUOX* y *AtAS*) son inducidos, mientras que el gen que codifica la enzima que cataliza su degradación (*AtALN*) es reprimido en las raíces de plantas bajo

tratamiento salino. Mediante la utilización de plantas transgénicas (*aln-1 knockout* y pRD29A:ALN/*aln-2*), se sugirió que la alantoína presenta un importante rol en la tolerancia a dicho estrés. Bajo tratamiento salino, las plantas que acumulan alantoína constitutivamente (*aln-1*) presentaron un mejor crecimiento vegetativo y menor pérdida de clorofilas respecto al genotipo silvestre, mientras que la línea transgénica pRD29A:ALN/*aln-2*, que sobreexpresa la enzima alantoinasa en condiciones de estrés, presentó un fenotipo sensible (Lescano y *Cols.*, 2006). Por otro lado, Iraní y *Cols.*, 2017 describieron que en plantas enteras, bajo condiciones de alta intensidad lumínica, la alantoína se acumula debido principalmente a un aumento transcripcional de *AtUOX*.

Existen varias hipótesis sobre cómo la alantoína promovería tolerancia a condiciones de estrés. Por un lado, podría ejercer protección oxidativa mediante el secuestro directo de EAO. Gus'kov y *Cols.* (2002) observaron un efecto protector directo de la alantoína sobre mutaciones del DNA inducidas por H₂O₂, en *Escherichia coli*. Además, cálculos termodinámicos proveen fundamentación teórica que sugieren que la alantoína podría ser un potente antioxidante (Gus'kov y *Cols.*, 2002). Brychkova y *Cols.* (2008) observaron que plantas mutantes en *AtXDH*, la primer enzima en la vía de degradación de las purinas (Figura 1), presentan elevados niveles de H₂O₂, los cuales disminuyen mediante la aplicación exógena de alantoína o alantoato, lo que podría sugerir secuestro directo de EAO (Brychkova y *Cols.*, 2008).

Por otro lado, se ha vinculado a la alantoína con la señalización de respuestas de tolerancia al estrés. Al respecto, se ha propuesto que la alantoína podría conferir resistencia al estrés oxidativo mediante el ajuste de los niveles hormonales. Watanabe y *Cols.* (2014) observaron que la acumulación de alantoína en mutantes *aln* está fuertemente ligada al aumento de la transcripción de *AtNCED3*, enzima clave en la biosíntesis de ABA, y su activación post-transcripcional mediante la formación del complejo *AtBGlu1*, que cataliza la hidrólisis de ABA conjugado y liberación de ABA libre. También se ha descrito que la alantoína modula la expresión de *AtMYC2*, un factor de transcripción que activa la expresión de genes de metabolismo, respuesta y señalización por ácido Jasmónico (JA) (Takagi y *Cols.*, 2016). Sin embargo, mutantes deficientes en ABA suprimen el efecto de la alantoína, lo que sugiere que la misma podría señalar las vías de JA mediante el aumento en los niveles de ABA ya descritos (Takagi y *Cols.*, 2016).

Otros estudios sugieren que la acumulación de alantoína favorecería la tolerancia al estrés abiótico mediante la reducción del daño oxidativo, por inducción de las enzimas antioxidantes *AtSOD* y *AtAPX*, especialmente en mutantes *aln-3 knockout* de *Arabidopsis*

(Nourimand y Cols, 2016). Esta hipótesis sería consistente con la anterior, ya que se conoce que el ABA activa el sistema antioxidante (Mittler y Blumwald, 2015). Estos datos sugieren que la alantoína podría señalar un aumento de la actividad antioxidante, a través de la activación de la síntesis y desconjugación de ABA. Otro estudio reciente reportó aumento de expresión de genes de enzimas antioxidantes *AtAPX*, *AtCAT*, y *AtSOD* en plántulas sometidas a estrés salino que se incrementa aún más cuando el medio de crecimiento también es suplementado con alantoína (Irani y Todd, 2016). Estos resultados constituyen evidencias que indican que es probable que la alantoína actúe como una molécula señal, más que como un antioxidante clásico.

En la Cátedra de Fisiología Vegetal se ha estudiado el transporte de alantoína en *Arabidopsis* desde hace varios años. En su Tesis Doctoral, Lescano (2017) observó que en condiciones de estrés salino, las concentraciones de alantoína en la parte aérea duplican a las de la raíz, sugiriendo que la alantoína se transporta desde la raíz a la parte aérea. Vale destacar que las primeras permeasas de ureidos (Proteínas UPS) de plantas fueron descritas en *Arabidopsis* (Desimone y Cols., 2002). Entre ellas, *AtUPS5* sería un candidato para el transporte de alantoína desde la raíz a la parte aérea, ya que posee alta afinidad por la misma y se expresa en el córtex y endodermis de la raíz (Schmidt y Cols., 2006). Además, la expresión de *AtUPS5* aumenta considerablemente en la zona terminal de la raíz primaria bajo estas condiciones de estrés. Esto podría tener relevancia fisiológica, ya que el ápice de la raíz se ha reportado como un sitio importante para la biosíntesis de ABA en respuesta al estrés (Dinneny y Cols., 2008). Lescano (2017) estudió también la localización subcelular de dos variantes de corte y empalme (*splicing*) de los transcritos de *AtUPS5*: *AtUP5s* (por corto o *short*) y *AtUPS5L* (por largo o *long*). Para ello, expresó *AtUPS5L* y *AtUPS5s* fusionadas a las proteínas fluorescentes verde y roja, respectivamente, bajo el control del promotor constitutivo pUBI10 en líneas *ups5*. La funcionalidad de estas construcciones fue determinada mediante experimentos en los que estas líneas crecieron con alantoína como única fuente de nitrógeno. Con estas herramientas se determinó la localización subcelular de ambas variantes en el retículo endoplasmático, mientras que *UPS5L* también se encontró en la red trans-Golgi. Estos resultados sugieren que estas variantes de *splicing* de *AtUPS5* estarían involucradas en la removilización y compartimentalización subcelular de la alantoína.

De acuerdo a los antecedentes expuestos, se plantea la siguiente **hipótesis** de trabajo: “La alantoína es una molécula que confiere tolerancia al estrés abiótico por regulación del nivel de EAO en la parte aérea”. En relación a ello se plantearon los siguientes **objetivos**:

1. Determinar si la acumulación de alantoína está relacionada con la tolerancia al estrés oxidativo en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.
 - a. Cuantificar el contenido de alantoína en plantas salvajes (WT), *knockout* (*aln-1*) y sobreexpresantes de la enzima alantoinasa (pUBI10:ALN/WT) en condiciones normales de desarrollo.
 - b. Poner a punto condiciones de inducción de estrés oxidativo y detección de sus síntomas.
 - c. Evaluar la respuesta de plantas WT, *aln-1* y pUBI10:ALN/WT a condiciones de estrés oxidativo.

2. Conocer si el transporte de alantoína desde la raíz a la parte aérea está vinculado con la regulación de los niveles de EAO.
 - a. Caracterizar el transporte de alantoína desde la raíz a la parte aérea en plantas WT y mutantes *ups5*, mediante su aplicación en forma exógena.
 - b. Cuantificar la producción de EAO en parte aérea en plantas tratadas con alantoína exógena.

Materiales y métodos

Material vegetal:

Semillas, plántulas y plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* L. (ecotipo Col-0) de diferentes genotipos:

- Plantas WT o tipo silvestre, obtenidas desde *el Arabidopsis Resource Center* (ARBC, Universidad del Estado de Ohio).

- Líneas de inserción de T-DNA: en *AtALN* (*aln-1*, Salk_146783) y en *AtUPS5* (*ups5.1*, Salk_044810); obtenidas desde *el Arabidopsis Resource Center* (ARBC, Universidad del Estado de Ohio) y confirmadas por PCR y RT-PCR por Lescano y Cols., (2016).

- Líneas pUBI10:UPS5L::eGFP4/*ups5.1* y pUBI10:UPS5s::mRFP/*ups5.1*: Líneas que expresan dos variantes de *splicing* de UPS5, UPS5L (forma larga) y UPS5s (forma corta), en las que se fusionaron las proteínas fluorescentes verde y roja, respectivamente, a sus *loop* centrales. Estas construcciones se expresaron bajo el control del promotor constitutivo pUBI10, en un *background ups5.1*. Mediante experimentos en los que se utilizó alantoína como única fuente de nitrógeno, se determinó que estas líneas revierten el fenotipo de plantas *ups5* (Lescano, 2017).

- Líneas sobreexpresantes de alantoinasa pUBI10:ALN/WT, desarrolladas por Lescano (2017). La sobreexpresión de la enzima fue confirmada por ensayos de RT-PCR (Lescano, 2017).

Condiciones de crecimiento:

- **Sistema de crecimiento en tierra:vermiculita (1:1):**

Se sembraron superficialmente semillas de *Arabidopsis* en tierra-vermiculita en partes iguales (1:1 v/v) y se estratificaron en oscuridad durante 48-72 horas a 4°C. El objetivo de este paso es homogeneizar los tiempos de germinación de las semillas. Posteriormente, las bandejas fueron transferidas a una cámara de cultivo con condiciones de crecimiento controladas: 80 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ PAR de intensidad lumínica, 22°C, fotoperíodo 16:8 y 80% de HRA (Figura 2, a), siendo regadas con 150 ml de agua potable cada 3 días.



Figura 2: Sistema de crecimiento en tierra:vermiculita (1:1).

- **Sistema de crecimiento en placas verticales:**

Para la siembra en placas de Petri con medio MS 0,5 X (Agar 1%) las semillas fueron esterilizadas. Para ello se colocaron en tubos eppendorf de 1 ml, con solución de lavado (Tritón X-100 0,05%, etanol 70%), fueron mezcladas con vórtex y se dejaron reposar por 10 minutos. Se descartó la solución y se agregó 1 ml de etanol 96% a los tubos. El contenido de los tubos fue mezclado con vórtex, y los tubos se dejaron reposar por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el lavado de las semillas con etanol 96% fue repetido nuevamente. Luego las semillas fueron colocadas en papel de filtro estéril en cámara de flujo laminar para su secado.

La siembra se realizó en la cámara de flujo laminar utilizando palillos estériles y las placas fueron selladas. La estratificación fue realizada de la manera ya descripta. Posteriormente, las placas fueron transferidas a la cámara de cultivo y colocadas en forma vertical (Figura 3) bajo las condiciones de temperatura, fotoperíodo e intensidad lumínica descriptas anteriormente.



Figura 3: Sistema de crecimiento en placas verticales.

Tratamiento con agentes prooxidantes.

A las 3 semanas de crecimiento en tierra:vermiculita, hojas entre la tercera y quinta de la roseta fueron aisladas y e incubadas con buffer MES 3 mM, de acuerdo a lo realizado por Woo y *Cols.* (2004), con el agregado de metilviológeno (MV), H₂O₂, o aminotriazol (AT) (Figura 4), por un período máximo de 24 horas. Para calibrar la concentración de MV a utilizar, se realizaron curvas de dosis respuesta. La selección de la concentración de H₂O₂ y AT se basó en la bibliografía existente (Brychkova y *Cols.*, 2008; May y Leaver, 1993). Para calibrar la intensidad lumínica a utilizar durante los experimentos, se comparó la eficiencia cuántica del fotosistema II (Φ PSII) de hojas incubadas en buffer MES 3mM a 80 y 200 μ E/m²s PAR.

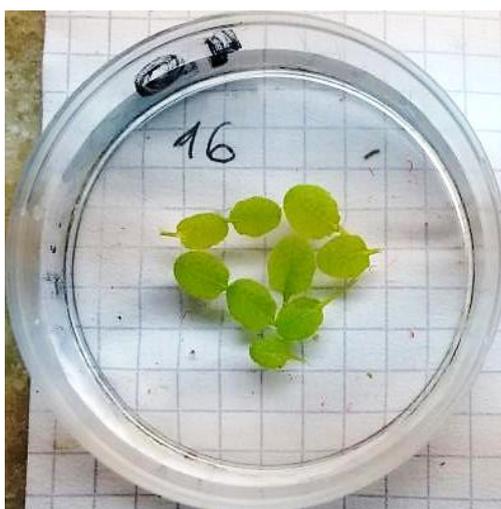


Figura 4: Hojas aisladas incubadas con agente prooxidante.

Cuantificación de ureidos, clorofilas totales y malondialdehído.

Para determinar la concentración de ureidos, las muestras fueron hervidas en agua destilada durante 20 minutos, centrifugadas por 5 minutos a 14.000 RPM. Los sobrenadantes fueron rescatados y de cada uno se separaron tres extractos (A, B y C). En primer lugar, se realizó una hidrólisis básica en los tubos C con Na(OH) 0,5 N a 100°C durante 8 minutos y, posteriormente, una hidrólisis ácida con HCl (0,15 N para los tubos B y 0,65N para los tubos C) a 100°C durante 4 minutos. Luego, todos los tubos fueron enfriados en baño de hielo, y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente con buffer K₃PO₄ y fenilhidrazina. Por último, se realizó una incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente con HCl y K₃[Fe(CN)₆] e inmediatamente se midió la absorbancia a 520 nm. Se determinaron las absorbancias absolutas descontando los valores de los diferentes tubos: A₅₂₀B-A₅₂₀A para ácido alantoico y A₅₂₀C-A₅₂₀B para alantoína, de acuerdo al protocolo propuesto por Vogels y Van der Drift (1970) y modificado por Lescano y *Cols.* (2016).

Para cuantificar el contenido de clorofilas, las muestras fueron colocadas en etanol 80%, decoloradas a 80°C durante 20 minutos y centrifugadas a 14.000 RPM durante 5 minutos. Se leyó la densidad óptica de los sobrenadantes a 654 nm siguiendo el protocolo de Wintermans y de De Mots (1965).

Posteriormente, 500 µl del extracto etanólico fueron incubados con 500 µl ácido Tricloroacético (TCA) 20% y ácido Tiobarbitúrico (TBA) 0,5% a 80°C por 20 minutos, enfriados en hielo y centrifugados a 14.000 RPM. Se determinaron las densidades ópticas a 532 y 600 nm de los sobrenadantes y se estimó el contenido de malondialdehído de acuerdo al protocolo propuesto por Heath y Packer (1968).

Medición de la eficiencia cuántica del fotosistema II (Φ PSII):

Se utilizó un medidor de pulso modulado FMS2 (Hansatech Instruments, Pentney King's Lynn, Gran Bretaña).

Determinación de los niveles de EAO.

Se determinó el nivel de $O_2^{\cdot -}$ mediante tinción con cloruro de nitroblue tetrazolium (NBT) de acuerdo al protocolo propuesto por Jabs y *Cols.* (1996). Las muestras fueron lavadas y colocadas en NBT 0,01 %. Posteriormente, se infiltraron realizando vacío durante 2'30'' cortando cada 15'' y fueron incubadas a 28°C durante una hora.

La determinación del nivel de H_2O_2 se realizó mediante incubación con diaminobencidina (DAB) 1mg/ml durante 24 horas a temperatura ambiente de acuerdo a lo propuesto por Brychkova y *Cols.*, (2008).

Luego de la incubación, se extrajeron las clorofilas de las muestras con etanol 70% durante 5 minutos a 80 °C. Tanto el NBT como el DAB, al reaccionar con $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 , respectivamente, forman un precipitado coloreado en el lugar donde se producen estas EAO. Por lo tanto, las tinciones fueron visualizadas con lupa, se obtuvieron imágenes que se analizaron utilizando el software ImageJ (Schindelin y *Cols.*, 2012) y se estimaron los niveles de ambas EAO mediante la cuantificación de la intensidad de color.

Determinación del peso de las muestras:

Para determinar el peso fresco, las muestras fueron secadas con papel absorbente y pesadas utilizando balanza de precisión (error de \pm 1mg). Para determinar el peso seco, las muestras fueron secadas en estufa a 65°C por al menos 16 horas y posteriormente pesadas con balanza de precisión (error de \pm 1mg).

Tratamiento de los datos y análisis estadístico:

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Infostat (Di Rienzo y *Cols.*, 2013):

- Para los experimentos que involucraron determinaciones del contenido de clorofilas y MDA, cada réplica fue constituida por 4 hojas y se realizaron 4 réplicas por tratamiento. Los valores obtenidos fueron relativizados al PS de la réplica; o en los casos en se encontró una disminución de este parámetro en respuesta al tratamiento, los valores absolutos fueron relativizados al número de hojas de la réplica. Para su análisis se utilizó estadística descriptiva (Test Duncan o DGC con $p\text{-valor}<0,05$).
- Para los experimentos que requirieron estimación de la ΦPSII , cada hoja constituyó una réplica, utilizándose 8 réplicas por tratamiento. En estos casos, debido a que los datos no cumplieron los supuestos de la estadística descriptiva, debió utilizarse el Test Kruskal Wallis ($p\text{-valor}<0,05$).
- En los experimentos en los que se estudió la translocación de alantoína y se determinó su contenido en parte aérea, se realizaron 4 réplicas estando cada una constituida por aproximadamente 20 mg de PF de material vegetal. Los valores absolutos fueron relativizados al PF de la réplica. Se utilizó el Test DGC, con $p\text{-valor}<0,05$.
- En los experimentos en los que se realizó una estimación semicuantitativa de los niveles de EAO mediante análisis de imágenes, cada hoja constituyó una réplica, teniendo 20 réplicas por cada tratamiento. Se utilizó el Test Duncan, con $p\text{-valor}<0,05$.

Los gráficos se confeccionaron con SigmaPlot (Systat Software Inc., San José, CA, Estados Unidos).

Resultados

1. Respuesta de plantas WT y *aln-1* a condiciones inductoras de estrés oxidativo.

Los mutantes *aln-1* acumulan alantoína en forma constitutiva.

Para conocer si la acumulación de alantoína endógena promueve la tolerancia al estrés oxidativo, se utilizaron líneas transgénicas que presentan distintos niveles de expresión de la enzima alantoinasa (*AtALN*) (Lescano, 2017). En una primera etapa se analizó el contenido de ureidos de plantas de 3 semanas de edad crecidas en tierra-vermiculita (Figura 5).

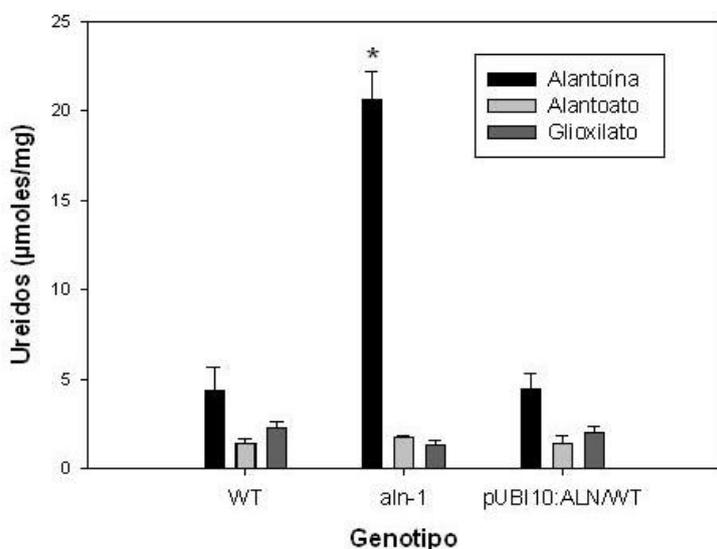


Figura 5: Contenido de ureidos en WT, *aln-1* y pUBI10:ALN/WT. El asterisco indica diferencias significativas con $p < 0,001$ (Test Duncan, $n=5$).

Los resultados indicaron que, las plantas *aln-1* acumulan alantoína en forma constitutiva en condiciones control, en concordancia con la expresión nula de *AtALN* en estas líneas (Lescano y *Cols.*, (2016). Por ello, esta línea fue seleccionada para los experimentos subsiguientes.

En la línea pUBI10:ALN/WT la secuencia codificante para la enzima alantoinasa se expresa bajo el control del promotor constitutivo pUBI10. Ya que se ha observado que en estas plantas la expresión de *AtALN* es mayor que en el genotipo silvestre (Lescano, 2017), se esperaría entonces un menor contenido de alantoína en plantas pUBI10:ALN/WT que en WT. Sin embargo, el contenido de alantoína de la línea silvestre y pUBI10:ALN/WT resultó similar (Figura 5). Estos datos sugieren que en las condiciones analizadas *AtALN* se encontraría activa en plantas WT, o que existiría una retroalimentación negativa en pUBI10:ALN/WT. Esto

último implica que, a pesar de que la sobreexpresión de *AtALN* resulte en una mayor degradación de alantoína, este proceso podría activar la vía de síntesis de la misma. Dado que las plantas pUBI10:ALN/WT no presentaron diferencias claras respecto a las WT en el contenido de alantoína, no fueron utilizadas para los siguientes experimentos.

Evolución de parámetros oxidativos de plantas WT y *aln-1* en condiciones control.

Las condiciones experimentales a las que son sometidas las plantas, muchas veces, son estresantes. Se conoce que cuando se produce una herida, como el corte de la hoja, se producen EAO, incluyendo $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 (Minibayeva y *Cols.*, 2009). Por otro lado, se ha citado que la luz es una de las principales causas ambientales de inducción de estrés oxidativo en plantas (Reddy y Raghavendra, 2006). Las EAO inician la degradación de la clorofila (Rentel y *Cols.*, 2004); siendo éste uno de los síntomas de estrés oxidativo y envejecimiento foliar. Para determinar el daño en el aparato fotosintético, se han utilizado técnicas que miden la proporción de la energía lumínica que la hoja es capaz de utilizar para reacciones fotoquímicas, como el parámetro eficiencia cuántica del fotosistema II ($\Phi PSII$) (Kurepa y *Cols.*, 1998). Por otro lado, históricamente se ha estudiado al malondialdehído (MDA) como un parámetro de estrés oxidativo; ya que constituye un metabolito secundario que se produce como consecuencia de la peroxidación de ácidos grasos de membrana, y cuya concentración aumenta en dichas situaciones de estrés (Weber y *Cols.*, 2004).

Por ello, se decidió evaluar el contenido de clorofilas y MDA de hojas aisladas WT y *aln-1* incubadas en buffer MES 3 mM por 24 horas (Figura 6, a y b). Paralelamente, para evaluar el efecto de la luz continua sobre el aparato fotosintético y determinar la intensidad lumínica a utilizar en los experimentos, se midió la $\Phi PSII$ de hojas aisladas bajo 80 (condición control) y 200 $\mu E/m_2s$ PAR por 24 horas (Figura 6, c).

Los resultados mostraron que el aislamiento de la hoja produce degradación de clorofilas y aumento del MDA a las 24 horas, lo que indica que las hojas de ambos genotipos sufren estrés bajo esta condición experimental (Figura 6, a y b). Por esta razón, no se realizaron tratamientos con duraciones mayores a 24 horas.

Por otro lado, la $\Phi PSII$ en ambos genotipos, bajo la condición control, se mantiene constante dentro de las 24 horas de ser aisladas (Figura 6, c). Cuando las hojas son expuestas a 200 $\mu E/m_2s$ PAR, la $\Phi PSII$ disminuye notoriamente (Figura 6, c); de acuerdo con el conocido efecto de la alta intensidad lumínica como agente inductor de estrés oxidativo (Reddy y

Raghavendra, 2006). Por ello, se decidió experimentar con las plantas manteniendo las mismas condiciones lumínicas en que crecieron, es decir, a 80 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ PAR.

Bajo estas condiciones, los mutantes *aln-1* mostraron niveles menores de clorofila iniciales y mayores de MDA a las 24 horas que las plantas WT (Figura 6, a y b). Sin embargo, en proporción, a las 24 horas de ser aisladas, las hojas WT mostraron una mayor degradación de clorofilas que las *aln-1* (Figura 6, a).

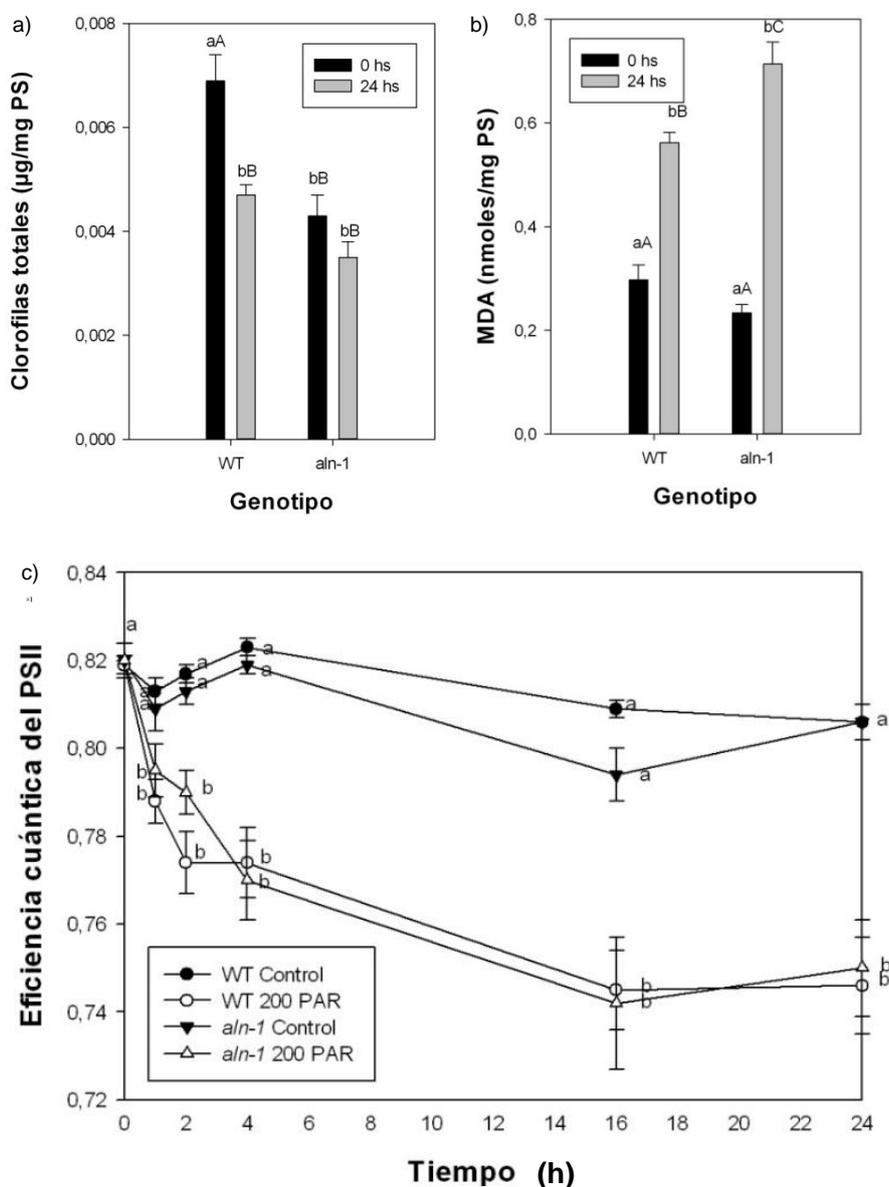


Figura 6: Parámetros oxidativos en condiciones control en WT y *aln-1*. a) contenido de clorofilas totales y b) MDA en hojas WT y *aln-1* bajo condiciones control, a las 24 horas de ser aisladas; y c) efecto sobre la Eficiencia cuántica del PSII (ΦPSII) de la exposición a luz continua de 80 (control) y 200 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ PAR, a lo largo del tiempo. Letras minúsculas indican diferencias significativas a diferentes tiempos para el mismo genotipo. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre genotipos comparados en el mismo tiempo (Test DGC, $n=4$, para los gráficos a) y b); y Test Kruskal Wallis para el gráfico c), $p\text{-valor}<0,05$).

Por otro lado, no se encontraron diferencias entre los genotipos al ser expuestos a 80 o 200 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ PAR de intensidad lumínica (Figura 6, c). En conjunto, estos resultados no aportan evidencias claras respecto a que la acumulación de alantoína, en los mutantes *aln-1*, promueva la tolerancia al estrés por corte y a la alta intensidad lumínica.

Evolución de parámetros oxidativos de plantas WT y *aln-1* en respuesta al MV.

El MV es un herbicida que ha sido ampliamente utilizado para inducir estrés oxidativo, ya que toma electrones del fotosistema I y los transfiere al O_2 molecular, generando ión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Taiz y Zeiger, 2006). Se propuso utilizarlo en el presente trabajo a fin de inducir estrés oxidativo en plantas WT y *aln-1* y comparar sus respuestas. Para determinar la concentración de MV a utilizar en los experimentos, se evaluó la respuesta de plantas WT a distintas concentraciones (Figura 7).

Se conoce que el ión $\text{O}_2^{\cdot-}$ posee una vida media *in vivo* muy corta (2-4 μs), siendo rápidamente dismutado a H_2O_2 (Vranova y *Cols.*, 2002). Por ello, un aumento en las concentraciones de MDA en los tejidos de la hoja tratada con MV, indicaría un daño en las membranas celulares lipídicas debido al aumento en dichas EAO. Sin embargo, a diferencia de lo esperado, el contenido de MDA disminuyó con respecto al control, en la mayoría de las concentraciones utilizadas (Figura 7, a). Al respecto, se ha informado que bajo distintas condiciones de estrés los niveles totales de MDA (libre o conjugado) no se modifican demasiado; sin embargo, bajo tratamiento con Diquat y mediante una técnica mejorada de Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), que permite estimar los niveles de MDA libre, se detectó un aumento de este metabolito (Weber y *Cols.*, 2004). Esto sugiere la ineficiencia de la técnica disponible para la cuantificación del MDA libre bajo tratamientos con herbicidas derivados del amonio, como el Diquat o el MV. Por lo antes expuesto, se desestimó a este parámetro como un buen indicador de estrés oxidativo inducido por MV, con las técnicas y condiciones experimentales que se disponen.

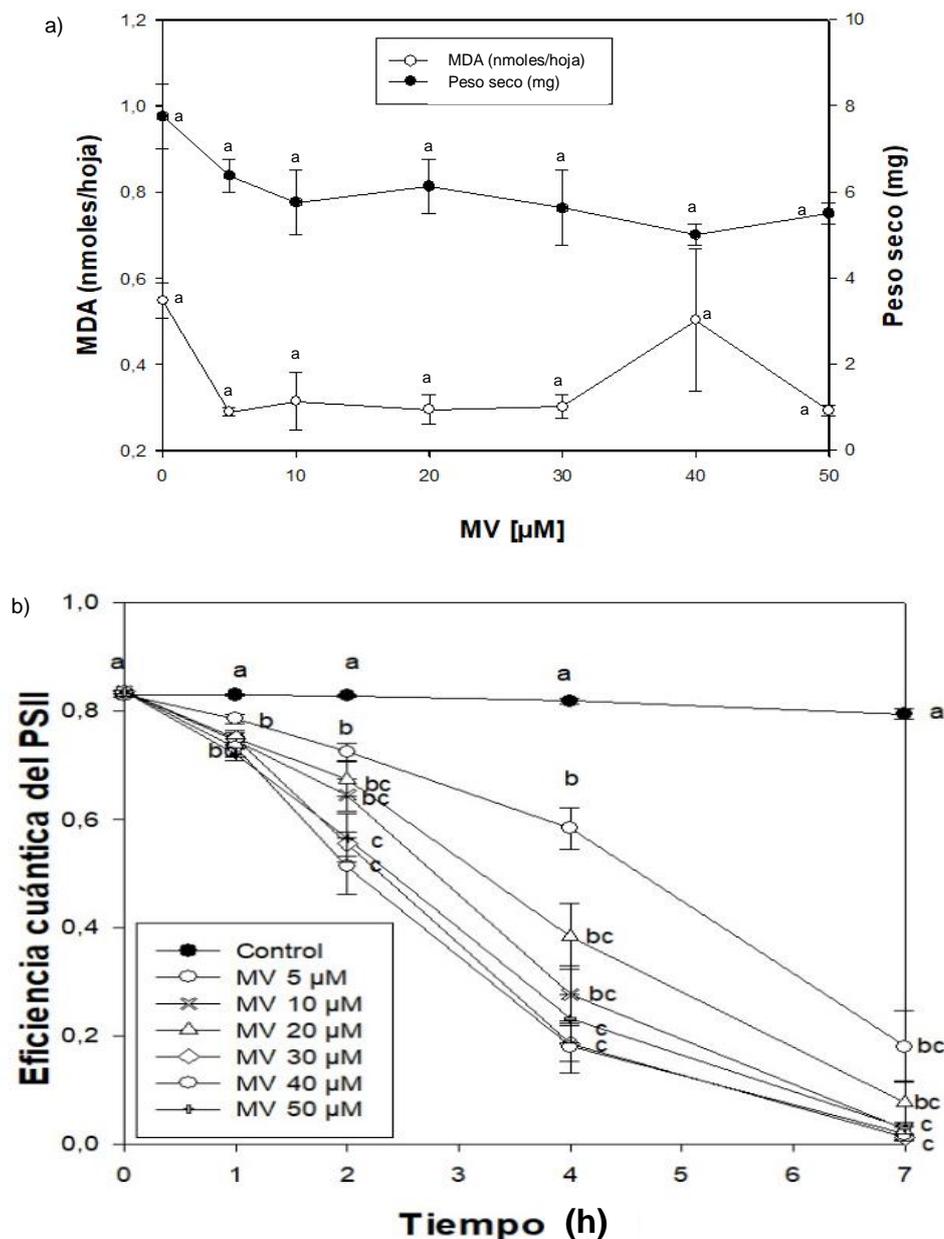


Figura 7: Calibración de los tratamientos con MV en plantas WT. Determinación del a) contenido de MDA, peso seco y b) eficiencia cuántica del PSII (Φ PSII), de hojas aisladas bajo tratamiento con concentraciones crecientes de MV durante 7 horas. Letras diferentes indican diferencias significativas con p -valor $<0,05$ (Test Kruskal Wallis, $n=4$, p -valor $<0,05$).

Por otro lado, se detectó un efecto negativo del MV, incluso en la menor concentración utilizada (5 µM), sobre la evolución del peso seco y la Φ PSII (Figura 7). Por ello, se seleccionó esta concentración para los experimentos. Dado que se observó que a las 7 horas de tratamiento con MV 5 µM la Φ PSII era casi nula, aunque no se observaron diferencias macroscópicas, las hojas control y las tratadas con MV 5 µM fueron transferidas a una cámara de luz continua de igual intensidad y se determinó el contenido de clorofilas totales a las 24 horas. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 8); por lo cual también se

desestimó al contenido de clorofilas como un buen indicador del estrés oxidativo inducido por MV.

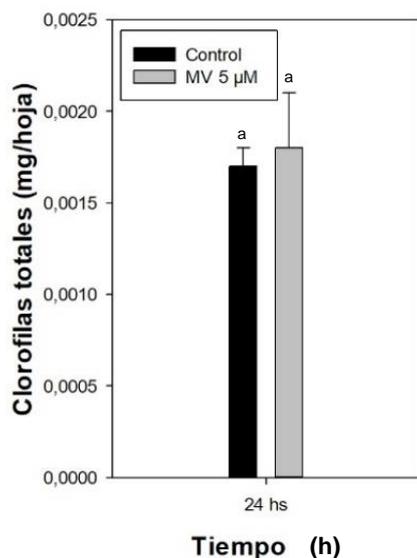


Figura 8: Niveles de clorofilas totales en hojas aisladas tratadas con MV 5 μM por 24 horas (Test DGC, n=4, p-valor<0,05).

La Φ PSII resultó ser un parámetro sensible al tratamiento con MV (Figura 7, b). Una hoja en condiciones normales posee una Φ PSII de aproximadamente 0,81. Por debajo de 0,75 se considera que la hoja se encuentra estresada y por debajo de 0,5 el daño en el aparato fotosintético es irreversible (Björkman and Demmig, 1987). Por ello, para conocer si la acumulación de alantoína en los mutantes *aln-1* modula la evolución del estrés oxidativo, inducido por MV, se determinó la Φ PSII de hojas WT y *aln-1* tratadas con MV 5 μM (Figura 9).

Los resultados indican que no hay una respuesta diferencial de los genotipos frente al tratamiento con MV 5μM, lo que sugiere que, a diferencia de lo esperado, la acumulación constitutiva de alantoína en los mutantes *aln-1* no promueve tolerancia al estrés oxidativo inducido por MV, al menos en estas condiciones experimentales.

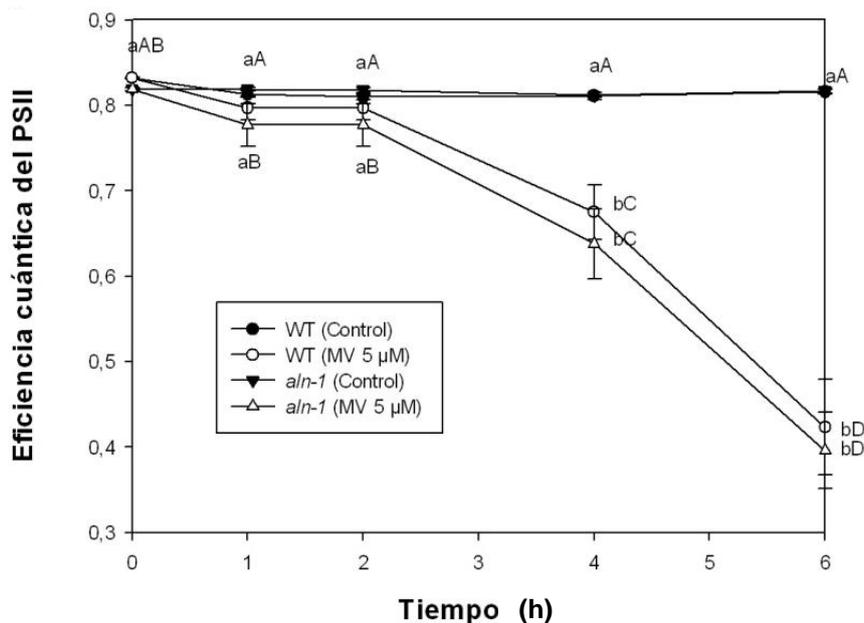


Figura 9: Efecto sobre la Eficiencia cuántica del PSII (Φ PSII) del tratamiento con MV 5 μ M en WT y *aln-1* a lo largo del tiempo. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos al mismo tiempo. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre diferentes tiempos para el mismo tratamiento (Test Kruskal Wallis, p-valor<0,05).

Evolución de parámetros oxidativos de plantas WT y *aln-1* en respuesta al H₂O₂.

El H₂O₂ es una molécula muy reactiva, con una vida media de 1 ms, que aumenta en condiciones de estrés (Vranova y *Cols.*, 2002). Por su naturaleza apolar, consigue atravesar las membranas celulares fácilmente, atacando las bicapas lipídicas (Mittler y *Cols.*, 2004). Trabajos previos utilizaron H₂O₂ aplicado en forma exógena para inducir estrés oxidativo, encontrando degradación del contenido de clorofilas, aumento en el MDA y disminución de la Φ PSII (Woo y *Cols.*, 2004; Brychkova y *Cols.*, 2008).

Para conocer si la acumulación de alantoína tiene efectos en la respuesta al estrés oxidativo inducido por H₂O₂, hojas aisladas de plantas WT y *aln-1* fueron tratadas con H₂O₂ 20 mM por 24 horas (Figuras 10 y 11). A lo largo del experimento no se observaron diferencias macroscópicas marcadas entre las hojas tratadas y su control o entre ambos genotipos.

Los resultados indicaron que el H₂O₂ 20 mM aplicado en forma exógena causa la degradación de clorofilas en ambos genotipos luego de 24 horas de tratamiento (Figura 10, a). Sin embargo, ésta solo fue estadísticamente significativa en el genotipo silvestre comparándolo con su control (Figura 10, a). También se determinó el contenido de MDA de estas muestras, mostrando el genotipo *aln-1* niveles menores de este metabolito respecto al genotipo silvestre

(Figura 10, b). Estos resultados sugieren que las hojas *aln-1* serían más tolerantes que las WT al tratamiento con H₂O₂. No se registraron diferencias estadísticamente significativas entre el peso seco de las muestras de ambos genotipos, control o tratadas con H₂O₂ 20 mM (Figura 10, c).

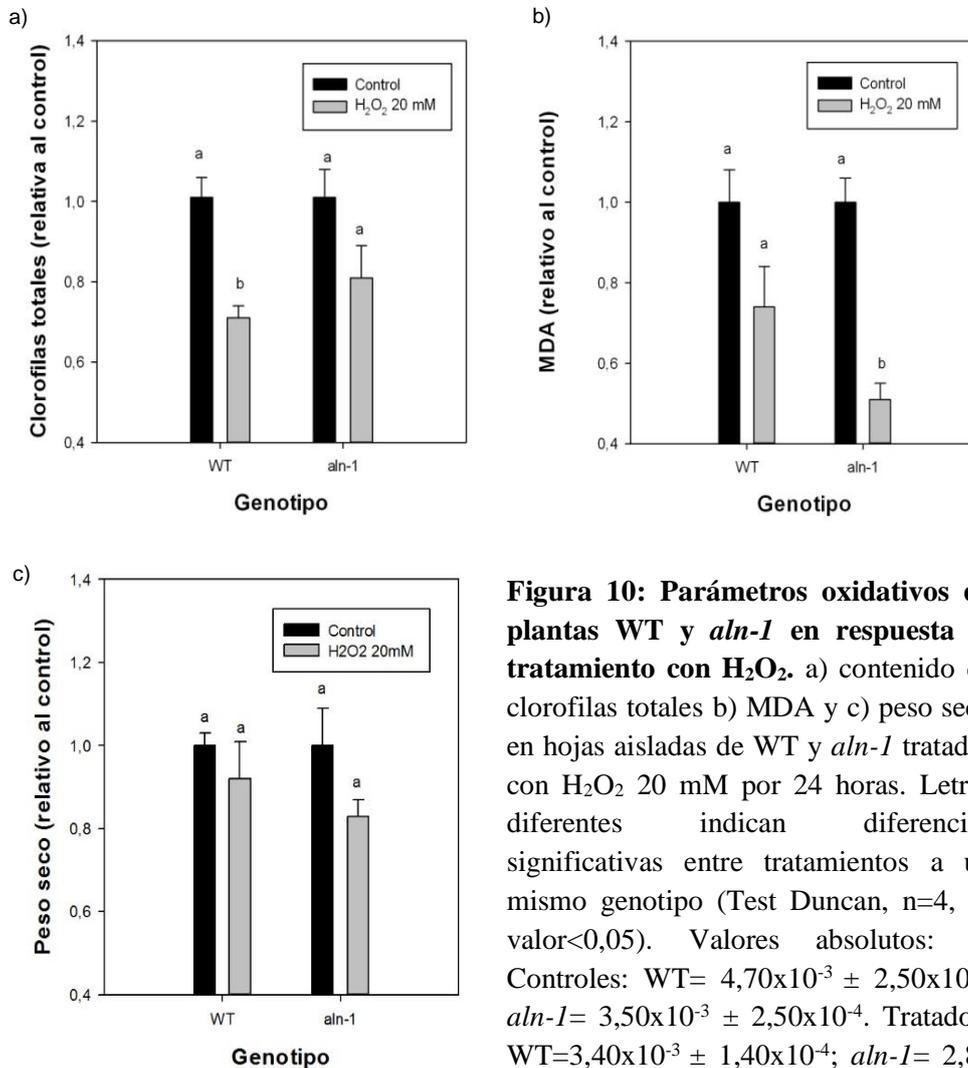


Figura 10: Parámetros oxidativos de plantas WT y *aln-1* en respuesta al tratamiento con H₂O₂. a) contenido de clorofilas totales b) MDA y c) peso seco en hojas aisladas de WT y *aln-1* tratadas con H₂O₂ 20 mM por 24 horas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a un mismo genotipo (Test Duncan, n=4, p-valor<0,05). Valores absolutos: a) Controles: WT= $4,70 \times 10^{-3} \pm 2,50 \times 10^{-4}$; *aln-1*= $3,50 \times 10^{-3} \pm 2,50 \times 10^{-4}$. Tratados: WT= $3,40 \times 10^{-3} \pm 1,40 \times 10^{-4}$; *aln-1*= $2,80 \times 10^{-3} \pm 2,70 \times 10^{-4}$. b) Controles: WT= $1,2404 \pm 9,68 \times 10^{-2}$; *aln-1*= $1,3106 \pm 8,44 \times 10^{-2}$. Tratados: WT= $0,9136 \pm 0,1293$; *aln-1*= $0,6747 \pm 4,68 \times 10^{-2}$. c) Controles: WT= 5 ± 0 ; *aln-1*= $6 \pm 0,41$. Tratados: WT= $4,68 \pm 0,24$; *aln-1*= $4,875 \pm 0,31$.

En relación a la ΦPSII, se encontró una disminución en las hojas tratadas a partir las 16 horas, pero no se detectaron diferencias entre los genotipos analizados (Figura 11). Este resultado sugiere que la acumulación de alantoína en el genotipo *aln-1* no estaría implicada en

el mantenimiento de la eficiencia fotosintética bajo estrés oxidativo inducido por H₂O₂ exógeno.

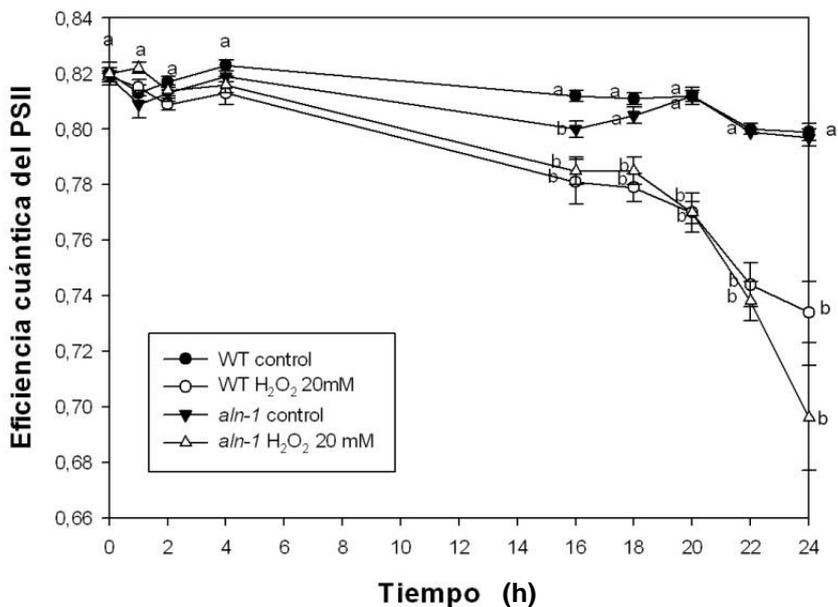


Figura 11: Efecto del tratamiento con H₂O₂ 20 mM sobre la Eficiencia cuántica del PSII (Φ PSII) de hojas aisladas WT y *aln-1* a lo largo del tiempo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos al mismo tiempo (Test Kruskal Wallis; p-valor<0,05).

Dado que la diferente localización subcelular y propiedades bioquímicas de las enzimas antioxidantes modulan la acumulación de las EAO en forma diferencial, tanto temporal como espacialmente (Vranova y *Cols.*, 2002); se consideró que los efectos de las EAO podrían ser diferentes según su origen. Por ello, se evaluó la respuesta de ambos genotipos al tratamiento con aminotriazol (AT) 20 mM, un inhibidor de la enzima catalasa (May y Leaver, 1993), que promueve la acumulación de H₂O₂ en los peroxisomas (Figura 12). A partir de las 8 horas del tratamiento con AT se registraron diferencias significativas en la Φ PSII entre las hojas tratadas y sus respectivos controles. Esto podría atribuirse a daños en el aparato fotosintético por acumulación de H₂O₂ debido a la inhibición de la actividad catalasa por AT. Luego de 24 horas del inicio del tratamiento se observó un menor valor de Φ PSII en plantas WT respecto a *aln-1* tratadas con AT, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 12).

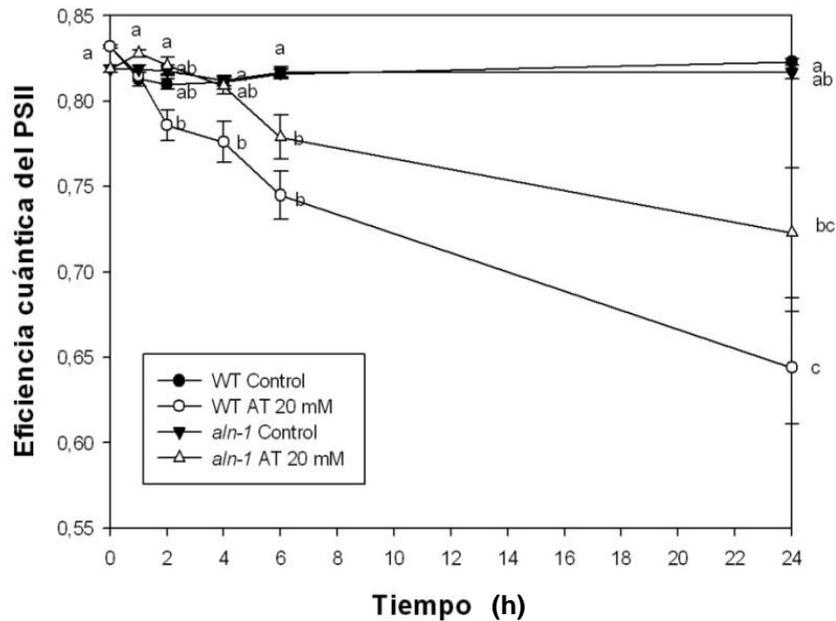


Figura 12: Efecto sobre la Eficiencia cuántica del PSII (Φ PSII) de AT 20 mM en hojas aisladas WT y *aln-1* a lo largo del tiempo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos al mismo tiempo (Test Kruskal Wallis; p-valor<0,05).

En conjunto, los resultados anteriores no aportan evidencias claras sobre el rol de la acumulación de alantoína ante el estrés oxidativo inducido por distintos agentes. Bajo tratamiento con H₂O₂ 20 mM, los mutantes *aln-1* mostraron una menor degradación de clorofilas y producción de MDA que las plantas WT, lo que sugiere que la acumulación de alantoína endógena promueve la tolerancia al estrés oxidativo inducido por H₂O₂. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos al analizar la evolución de Φ PSII bajo tratamiento con ninguno de los agentes prooxidantes utilizados. Esto condujo a considerar el análisis de otros mecanismos por los cuales la alantoína podría estar implicada en la tolerancia al estrés oxidativo.

2. Estudio de la translocación de alantoína y niveles de EAO foliares.

La tolerancia al estrés oxidativo de las hojas aisladas, no parece estar claramente relacionada con la acumulación de alantoína en los mutantes *aln-1*; sin embargo, numerosos autores describieron que estos mutantes presentan mayor tolerancia a otros factores de estrés, tales como la oscuridad extendida (Brychkova y *Cols.*, 2008), el déficit hídrico (Watanabe y

Cols., 2014), la contaminación por metales pesados (Nourimand y *Cols.*, 2016), el estrés salino (Lescano y *Cols.*, 2016) y la alta intensidad lumínica (Iraní y Todd, 2017).

Particularmente, trabajos previos realizados en la Cátedra de Fisiología Vegetal, determinaron que la alantoína estaría implicada en la tolerancia del estrés salino (Lescano y *Cols.*, 2016). En plantas sometidas a estas condiciones de estrés, la alantoína se acumula en raíz mediante la represión transcripcional de *AtALN* y se transporta hacia la parte aérea a través del transportador de ureidos *AtUPS5*. Además, líneas mutantes en *AtUPS5* (*ups5.1* y *ups5.2*) presentan fenotipos sensibles al estrés salino, sugiriendo que el sitio donde la alantoína se sintetiza difiere de aquel en el cual ejerce su acción protectora (Lescano, 2017).

Ya que se conoce que tanto el estrés salino (Dajic, 2006), como otros factores de estrés abiótico aceleran la producción de EAO (Reddy y Raghavendra, 2006), se propuso estudiar los efectos de la translocación de alantoína desde la raíz en los niveles de EAO en parte aérea.

La alantoína se transporta de raíz a parte aérea.

Para estudiar la translocación de alantoína, se eligió utilizar el sistema de crecimiento en placas verticales ya que permite suministrar alantoína fácilmente desde la raíz mediante el trasplante a medio suplementado. Por otro lado, este sistema fue el utilizado por Lescano (2017) en sus experimentos relacionados al transporte de alantoína.

Se trasplantaron plántulas de 7 días de edad a medio MS 0,5X control o suplementado con alantoína 5 mM y se determinó el contenido de ureidos en la parte aérea luego de 3 y 6 horas de tratamiento (Figura 13, a). Seguidamente, se comparó el transporte de alantoína entre líneas WT, *knockout* en *AtUPS5* (línea *ups5.1*) y dos líneas que expresan las variantes de *splicing* corta y larga de este transportador (líneas pUBI10:UPS5s::mRFP/*ups5* y pUBI10:UPS5L::eGFP4/*ups5*; Figura 13, b).

No se encontraron diferencias significativas entre los genotipos WT y *ups5* antes de realizar el trasplante al medio suplementado. El contenido de alantoína inicial de las líneas pUBI10:UPS5L::eGFP4/*ups5* y pUBI10:UPS5s::mRFP/*ups5* fue tan bajo que resultó indetectable mediante la técnica utilizada (Figura 13, b). En cambio, luego de 3 horas de tratamiento, todas las líneas, exceptuando *ups5*, reportaron un aumento estadísticamente significativo respecto a sus controles, en los niveles de alantoína en la parte aérea. Curiosamente, las líneas pUBI10:UPS5L::eGFP4/*ups5* y pUBI10:UPS5s::mRFP/*ups5* presentaron cerca del doble del contenido de alantoína en parte aérea respecto al genotipo silvestre; y triplicaron el de los mutantes *ups5* (Figura 13, b). Este resultado, indica que la

expresión de *UPS5L* o *UPS5s* en *ups5* complementó el transporte de alantoína, coincidiendo con los experimentos de crecimiento de estas líneas utilizando alantoína como única fuente de nitrógeno realizados por Lescano (2017).

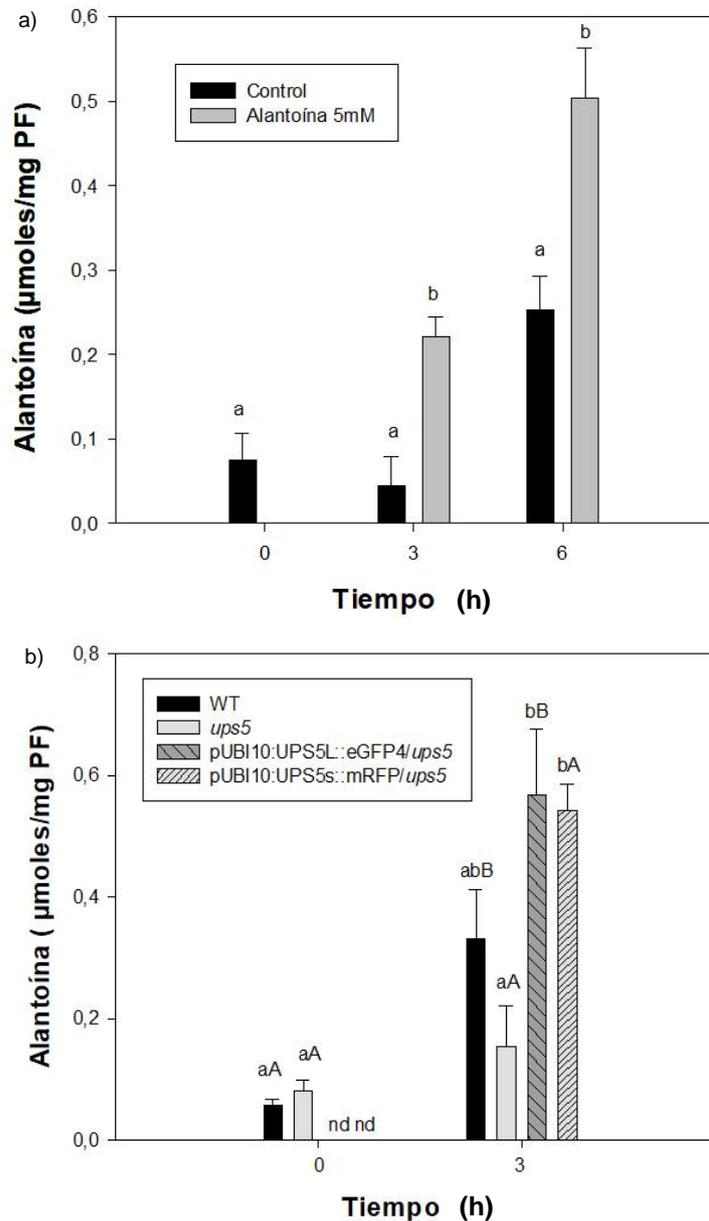


Figura 13: Estudio del transporte de alantoína de raíz a parte aérea. Determinación del contenido de alantoína en parte aérea de plantas a) WT tratadas por 3 y 6 horas y b) WT, *ups5*, pUBI10:UPS5L::eGFP4/*ups5* y pUBI10:UPS5s::mRFP/*ups5* tratadas por 3 horas; mediante trasplante a medio MS 0,5X suplementado con alantoína 5mM. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre genotipos para el mismo tiempo. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los distintos tiempos para el mismo genotipo. nd= no detectado (Test DGC, n=4, p-valor<0,05)

Efecto de la alantoína exógena sobre el nivel de EAO en plantas WT y *ups5*.

Para estudiar el efecto del transporte de alantoína mediado por *AtUPS5* sobre los niveles de EAO, en una primera instancia se compararon los niveles de $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 basales de plantas WT y *ups5*. Para ello se incubaron plántulas de 10 días de edad crecidas en medio MS 0,5X con Nitroblue tetrazolium (NBT) y Diaminobencidina (DAB) (Figura 14).

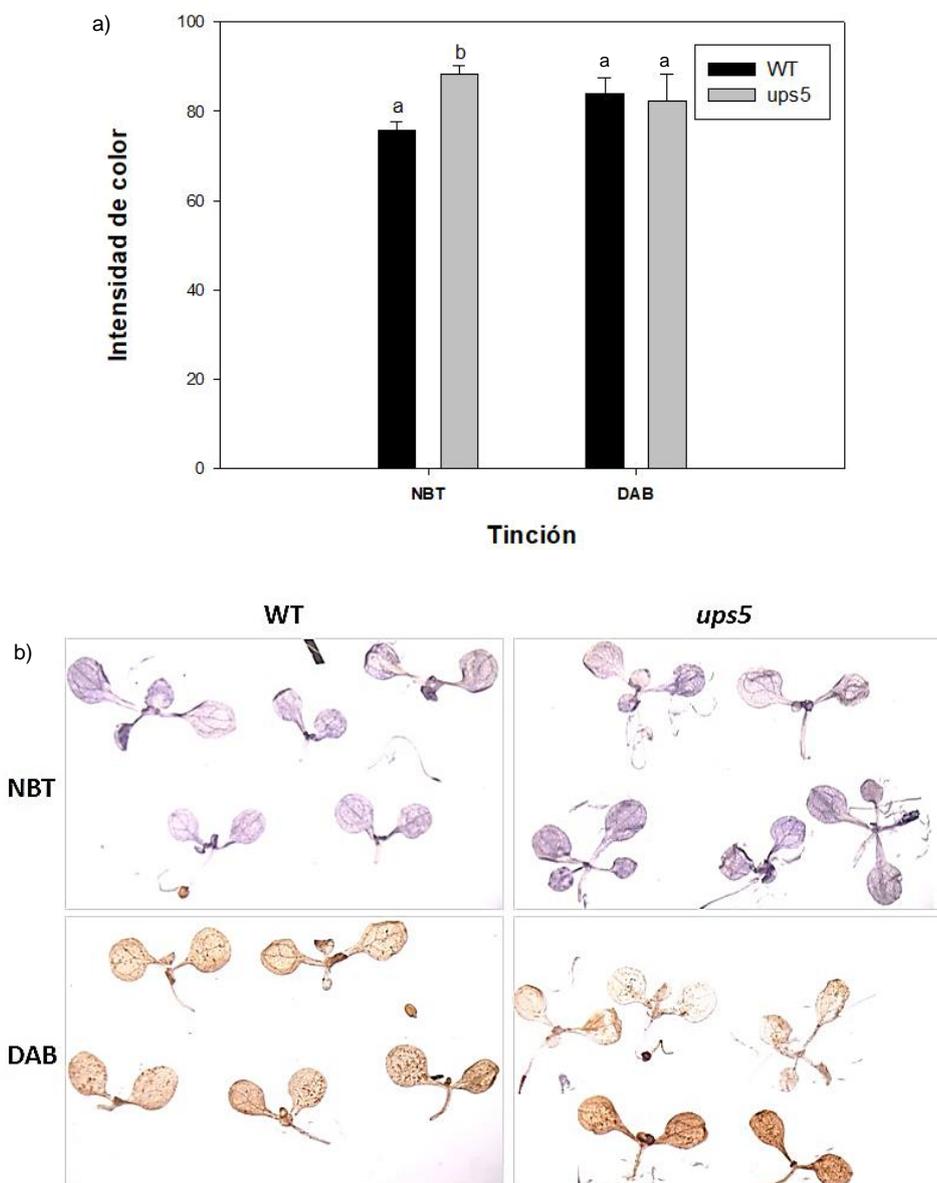


Figura 14: Determinación semicuantitativa de los niveles de EAO iniciales en WT y *ups5*. a) Cuantificación de los niveles constitutivos de $O_2^{\cdot -}$ (tinción NBT) y H_2O_2 (tinción DAB). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los genotipos analizados con p -valor $<0,05$ (Test Duncan, $n=20$) b) Fotos representativas.

Si bien no se encontraron diferencias en los niveles de H_2O_2 entre los genotipos estudiados, los niveles de $O_2^{\cdot -}$ fueron ligeramente mayores en *ups5* (Figura 14). Al analizar el contenido inicial de alantoína de la parte aérea de estos mutantes, no se encontraron diferencias respecto al de las plantas WT (Figura 13, b); lo que sugiere que la diferencia en los niveles de $O_2^{\cdot -}$ no estaría relacionada con un contenido diferencial de alantoína en los mutantes *ups5*.

Posteriormente, se estudió el efecto de la alantoína exógena en los niveles de EAO en WT y *ups5*. Plántulas WT y *ups5* fueron trasplantadas a medio suplementado con alantoína 5 mM durante 3 y 24 horas e incubadas con NBT (Figura 15) y DAB (Figura 16). Adicionalmente, se realizaron controles, con trasplantes a medio no suplementado.

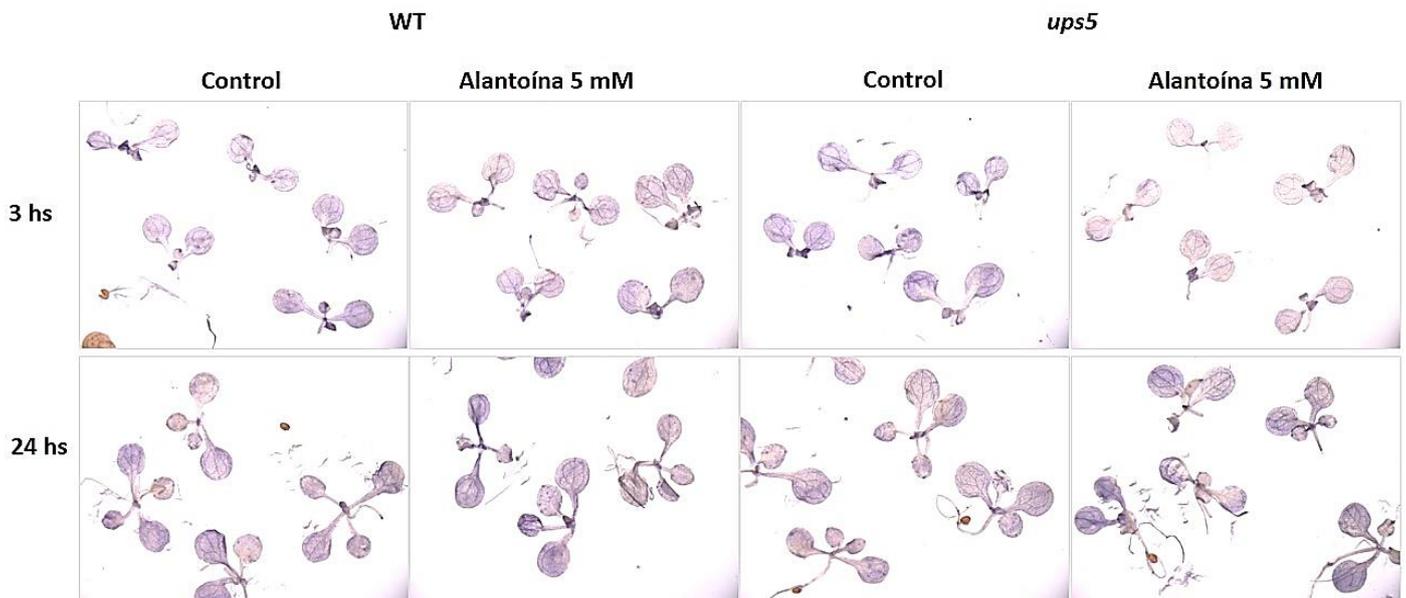
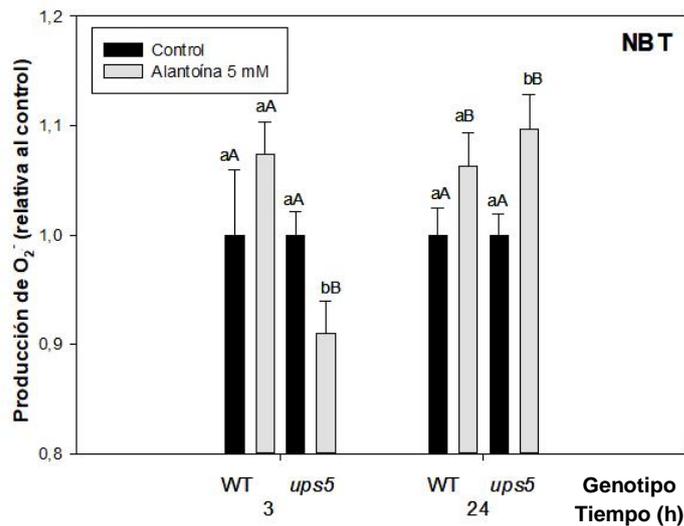


Figura 15: Determinación semicuantitativa de los niveles de $O_2^{\cdot -}$ de plantas WT y *ups5* tratadas con alantoína 5 mM por 3 y 24 horas. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para el mismo genotipo y tiempo. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre genotipos para el mismo tratamiento y tiempo (Test Duncan, $n=20$; p -valor $<0,05$).

En general, el tratamiento con alantoína exógena indujo un aumento en los niveles de EAO foliares en el genotipo silvestre. Se encontró un aumento, aunque no estadísticamente significativo, en los niveles de $O_2^{\cdot -}$ tanto a las 3 como a las 24 horas de tratamiento (Figura 15). Si bien luego de 3 horas de incubación no se detectaron cambios en los niveles de H_2O_2 en la parte aérea de las plantas WT; luego de 24 horas de tratamiento, se observó un aumento significativo en esta EAO (Figura 16). Estos resultados sugieren la translocación de alantoína podría estar implicada en el aumento de los niveles de EAO foliares.

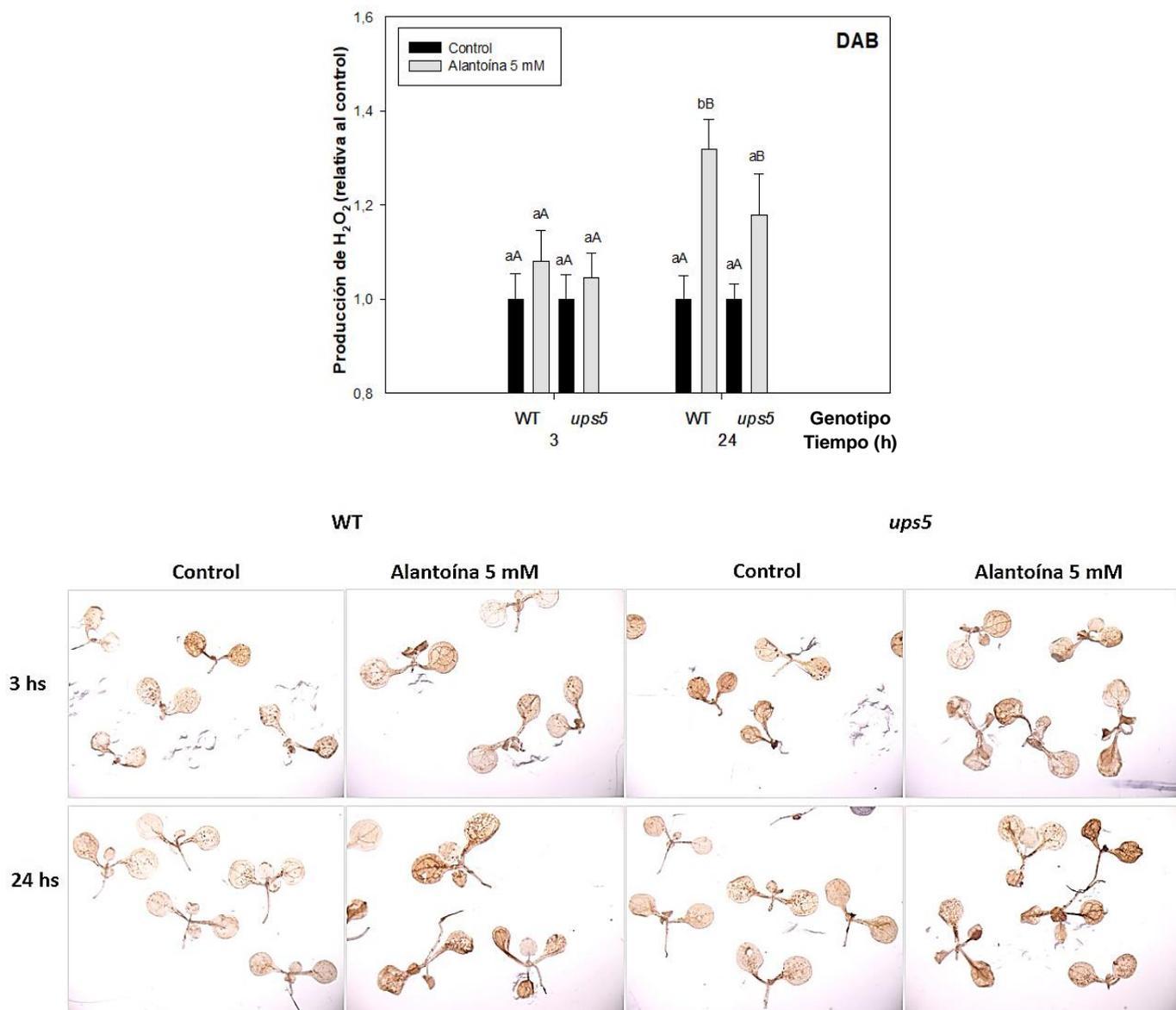


Figura 16: Determinación semicuantitativa de los niveles de H_2O_2 de plantas WT y *ups5* tratadas con alantoína 5 mM por 3 y 24 horas. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para el mismo genotipo y tiempo. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre genotipos para el mismo tratamiento y tiempo (Test Duncan, n=20; p-valor<0,05).

Por otro lado, luego de 3 horas de tratamiento con alantoína exógena, se observaron niveles menores de $O_2^{\cdot -}$ en las partes aéreas de los mutantes *ups5*, respecto a su control y al genotipo silvestre (Figura 15). Esto podría deberse a que, como en *ups5* el transporte de alantoína es deficiente (Figura 13, b), la alantoína suministrada por raíz no podría ejercer este efecto inductor del aumento de $O_2^{\cdot -}$ en la parte aérea. En esta línea, al igual que en las plantas WT, no fueron registradas diferencias en los niveles de H_2O_2 luego de 3 horas de tratamiento (Figura 16).

Curiosamente, luego de 24 horas de tratamiento con alantoína exógena se registró un aumento de ambas EAO en *ups5* (Figuras 15 y 16). Si bien este resultado refuerza la hipótesis de que la alantoína promueve el aumento en las EAO, sugiere que su translocación podría no mediarse exclusivamente por *AtUPS5*. Al respecto, se han descrito otros transportadores de ureidos en *Arabidopsis* capaces de transportar alantoína. *AtUPS1* (Desimone y *Cols.*, 2002), transporta alantoína, aunque con una menor afinidad que a otras bases púricas (Schmidt y *Cols.*, 2006). Sin embargo, su expresión aumenta en plantas crecidas en medio con alantoína como única fuente de nitrógeno (Desimone y *Cols.*, 2002); por lo tanto, podría funcionar como un transportador alternativo bajo estas condiciones.

Discusión

Numerosos autores han relacionado la acumulación de alantoína, que se produce en plantas de *Arabidopsis* sometidas a condiciones de estrés abiótico, con la tolerancia al estrés (Brychkova y *Cols.*, 2008; Watanabe y *Cols.*, 2014; Nourimand y *Cols.*, 2016; Irani y Todd, 2016; Lescano y *Cols.*, 2016; Iraní y *Cols.*, 2017). Puesto que se conoce que distintos estreses abióticos promueven, en algún momento de su evolución, un incremento en las EAO a nivel celular (Reddy y Raghavendra, 2006); se ha especulado que la alantoína podría conferir tolerancia al estrés abiótico mediante la regulación de los niveles de EAO, reduciendo el daño oxidativo (Irani y Todd, 2016; Nourimand y *Cols.*, 2016).

Se ha planteado dos hipótesis respecto al mecanismo mediante el cual la alantoína podría conferir tolerancia al estrés oxidativo. Por un lado, la acumulación de alantoína en plantas bajo condiciones de estrés, podría estar relacionada con un efecto antioxidante directo de la misma, es decir, reaccionando molécula a molécula con las EAO (Gus'kov y *Cols.*, 2002; Brychkova, y *Cols.*, 2008). Por otro, varios autores sugieren que la acumulación de alantoína tendría un efecto señalizador sobre la regulación de los niveles de algunas hormonas, tales como ABA y JA (Watanabe y *Cols.*, 2014; Takagi y *Cols.*, 2016) y una consecuente activación del sistema antioxidante enzimático (Nourimand y *Cols.*, 2016). Consistentemente con esta idea, se ha observado que mutantes *aln-1* sobreexpresan genes de respuesta al estrés (Irani y *Cols.*, 2016), entre ellos, de peroxidasas dependientes de tioredoxina (Watanabe y *Cols.*, 2014: Tabla S2).

En el estudio de la evolución de los parámetros oxidativos de hojas, se observó que las plantas WT y los mutantes *aln-1* presentaron diferentes contenidos de clorofilas en condiciones control al momento de ser aisladas (Figura 6, a). Este hecho resultó sorprendente, puesto que el contenido de clorofilas bajo condiciones normales de crecimiento, no guardaría, en principio, relación alguna con la acumulación de alantoína en *aln-1* (Watanabe y *Cols.*, 2014). Sin embargo, al medir la Φ_{PSII} , parámetro indicador de daños en el aparato fotosintético, las hojas de ambos genotipos presentaron valores considerados normales, superiores a 0.81 (Figura 6, c). Por otro lado, el contenido de MDA en plantas WT y *aln-1* fue similar (Figura 6, b). Bajo condiciones control, las hojas de los dos genotipos presentaron una evolución contrastante de clorofilas y MDA luego de 24 horas de ser aisladas (Figura 6, a y b); mientras que la eficiencia fotosintética se mantuvo en valores normales bajo 80 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ PAR de intensidad lumínica (Figura 6, c). En su conjunto, pareciera que la acumulación de alantoína endógena en los

mutantes *aln-1* modula algunos aspectos de la fisiología de la hoja, de difícil comprensión por el momento.

El estudio del estrés oxidativo, sobre hojas aisladas WT y *aln-1*, inducido por varios agentes prooxidantes durante 24 horas, demostró que la evolución de los parámetros oxidativos en cada genotipo fue dependiente del agente utilizado. Por un lado, no se obtuvieron resultados concluyentes sobre el efecto del MV sobre el contenido de clorofilas y MDA. Sin embargo, las hojas *aln-1* presentaron un mayor contenido de clorofilas y menor de MDA que las WT cuando fueron tratadas con H₂O₂ 20mM (Figura 10, a y b), sugiriendo que la acumulación de alantoína endógena podría jugar algún rol en la respuesta de las hojas frente al estrés oxidativo inducido por H₂O₂. Esto podría guardar relación con que los mutantes *aln-1* tengan mayor capacidad de eliminar el H₂O₂. En concordancia con esto, se ha descrito que mutantes *aln-3*, otra línea que también presenta expresión nula de *AtALN*, poseen mayores niveles constitutivos de enzimas antioxidantes, tales como SOD y APX, en parte aérea (Nourimand y *Cols.*, 2016).

Una situación, diferente a las descritas, surge cuando se analiza la eficiencia fotosintética, puesto que no se encontraron diferencias significativas de este parámetro, entre las hojas de plantas WT o *aln-1* tratadas con alta intensidad de luz (Figura 6, c), MV (Figura 9), H₂O₂ (Figura 11) o AT (Figura 12). Podría argumentarse que 24 horas de tratamiento no son suficientes para detectar diferencias significativas entre genotipos, en cuanto a la evolución de la Φ PSII. Sin embargo, se conoce que las plantas de *Arabidopsis* acumulan alantoína durante estrés hídrico (Watanabe y *Cols.*, 2014), salino (Lescano y *Cols.*, 2016), por alta intensidad lumínica (Iraní y Todd, 2017) o por contaminación con metales pesados (Nourimand y *Cols.*, 2016). Una posibilidad es que las hojas aisladas del genotipo silvestre tratadas con alta intensidad de luz, MV, H₂O₂ o AT, también puedan acumular alantoína, y su respuesta sea similar a la de las plantas *aln-1*. Determinar el efecto de estos agentes prooxidantes sobre la expresión y actividad de las enzimas de la vía metabólica de ureidos (Figura 1), ayudaría a desentrañar los mecanismos mediante los cuales la alantoína podría conferir tolerancia al estrés oxidativo.

Por otro lado, trabajos precedentes realizados en la Cátedra de Fisiología Vegetal con plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés salino, sugieren que la acumulación de alantoína en raíz y su transporte a la parte aérea, mediante el transportador *AtUPS5*, es necesaria para lograr tolerancia a dicho estrés (Lescano y *Cols.*, 2016; Lescano, 2017). Lescano y *Cols.* (2016) encontró que los mutantes *ups5* muestran mayor sensibilidad al estrés salino; y por otro lado, es bien conocido que el estrés salino promueve el incremento en los niveles de EAO (Dajic,

2006); por lo tanto, es probable que el transporte de alantoína module diferencialmente el contenido de EAO en WT y *ups5* en parte aérea.

En este trabajo, en una primera instancia se estudió el transporte de alantoína de raíz a parte aérea. Por un lado, se observó que *AtUPS5* está implicado en este proceso; ya que los mutantes *ups5* presentaron un menor contenido de alantoína en parte aérea que las plantas WT, a las 3 horas de tratamiento con alantoína suministrada por raíz (Figura 13, b). Por otro lado, se demostró la importancia funcional de las variantes de *splicing* corta y larga de *AtUPS5* en el transporte de alantoína, a partir de la complementación de plantas *ups5* con una u otra variante (Figura 13, b). Consistentemente, estas líneas presentaron un mayor transporte de alantoína que *ups5*, superando también al genotipo silvestre (Figura 13, b). Estos datos concuerdan con el análisis de crecimiento de estas líneas en medio con alantoína como única fuente de nitrógeno (Lescano y *Col.*, datos sin publicar).

Habiendo caracterizado al transporte de alantoína mediado *AtUPS5*, en esta Tesina resultó de interés conocer la relación de este proceso con la evolución del nivel de EAO en la parte aérea. Para ello, se estudiaron los niveles de EAO basales y en respuesta al tratamiento con alantoína exógena en plantas WT y *ups5*. Mientras que el contenido de H₂O₂ basal fue similar en ambos genotipos, los niveles de O₂⁻ fueron ligeramente mayores en los mutantes *ups5* (Figura 14). Tanto en WT como en *ups5* el contenido de alantoína inicial resultó similar (Figura 13, b); por lo que las diferencias encontradas en los niveles de O₂⁻ serían consecuencia de algún proceso desconocido derivado de la mutación en *AtUPS5*, no relacionado con un contenido diferencial de alantoína en estos mutantes o con el transporte de alantoína a larga distancia mediado por este transportador.

Posteriormente, se analizaron los niveles de EAO foliares en plantas WT y *ups5* tratadas con alantoína exógena. En el genotipo silvestre se observó una tendencia al aumento en los niveles de O₂⁻, aunque no esta no fue estadísticamente significativa (Figura 15). Curiosamente, las plantas WT presentaron un aumento significativo en los niveles de H₂O₂ luego de 24 horas de tratamiento (Figura 16). En este genotipo se observó un incremento significativo en el contenido de alantoína en la parte aérea, a partir de las 3 horas de tratamiento con alantoína (Figura 13). Estos resultados sugieren que el aumento de la concentración de alantoína en parte aérea debido a su translocación, promueve el incremento de las EAO foliares.

Por otro lado, se observó que los niveles de O₂⁻ de los mutantes *ups5* disminuyeron respecto al genotipo silvestre y a su propio control luego de 3 horas de incubación en medio suplementado con alantoína (Figura 15). Consistentemente con lo anterior, este resultado

sugiere que el transporte de alantoína ineficiente de los mutantes *ups5* (Figura 13, b), estaría relacionado con una menor producción de O_2^- en su parte aérea.

Curiosamente, ambos genotipos presentaron un aumento en O_2^- y H_2O_2 luego de 24 horas de tratamiento con alantoína exógena (Figuras 15 y 16). Si bien este resultado apoyaría la hipótesis de que la alantoína promueve el incremento en los niveles de EAO, sugiere que la translocación de alantoína en *Arabidopsis* no solamente está mediada por *AtUPS5*. Podría acontecer que bajo tratamientos mayores a 3 horas con alantoína exógena se active la expresión de otro transportador de ureidos, o que aumente el transporte mediado por transportadores con menor afinidad a la misma. En relación a esto, se han descrito otros transportadores candidatos a transportar alantoína en *Arabidopsis* (Desimone y *Cols.*, 2002). Particularmente, se ha observado que *AtUPS1* se expresa en mayor medida en plantas que crecen en medio con alantoína como única fuente de nitrógeno en relación a aquellas crecidas con NH_4NO_3 (Desimone y *Cols.*, 2002); eventualmente *AtUPS1* también podría activarse al tratamiento con alantoína exógena como fuente adicional de nitrógeno. Por otro lado, UPS5 posee mayor afinidad a la alantoína que a otras nucleobases; mientras que UPS1 es más afín al uracilo (Schmidt y *Cols.*, 2004), lo que haría que el transporte de alantoína mediado por *AtUPS5* sea más rápido que aquel mediado por *AtUPS1*. Estudiar la expresión de otras Permeasas de Ureidos, como *AtUPS1*, en respuesta a tratamientos con alantoína exógena como fuente adicional de nitrógeno, permitiría desentrañar aún más el rol del transporte a larga distancia de alantoína en la modulación de las EAO.

Los resultados de este trabajo no apoyan la hipótesis de que la alantoína sea un secuestrador de EAO; ya que la acumulación de alantoína en los mutantes *aln-1* no mostró un efecto claro en relación a la evolución de los parámetros oxidativos de plantas WT y *aln-1* tratadas con diversos agentes prooxidantes. En relación a esto, si bien se ha sugerido que la alantoína podría actuar como antioxidante directo, teniendo un efecto protector sobre la mutagénesis inducida por H_2O_2 en *E. Coli* (Gus'kov y *Cols.*, 2002); no se encontró actividad antioxidante *in vitro* mediante ensayos de secuestro de radicales libres, inhibición de la peroxidación del ácido linoleico y poder reductor (Wang y *Cols.*, 2012). Además, el hecho de que los niveles de alantoína determinados en tejidos vegetales sea del orden micromolar (Figura 5), mientras que la de los antioxidantes no enzimáticos clásicos, Ascorbato y Glutatión, es del orden milimolar, plantea aún más incertidumbres acerca de un efecto antioxidante directo de la misma. No obstante, se debe tener en cuenta que poco se conoce sobre la compartimentalización subcelular de la alantoína. Es probable que en algún compartimento,

como el Peroxisoma o el Retículo Endoplasmático, donde se encuentran las enzimas para su síntesis y degradación respectivamente (Figura 1), la alantoína alcance concentraciones mayores.

En cambio, el hecho de que la alantoína exógena moduló los niveles de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en la parte aérea de las plantas apoyaría la hipótesis sobre un rol señalizador de la misma. Al respecto, Watanabe y *Cols.* (2014) propone que la alantoína confiere tolerancia al estrés salino mediante la activación de genes de síntesis y desconjugación de ABA. Se conoce que el aumento en los niveles de esta hormona en situaciones de estrés deriva en la activación de otros sistemas hormonales y del sistema antioxidante enzimático (Taiz y Zeiger, 2006). En relación a esto, Takagi y *Cols.*, (2016) encuentra que los mutantes *aln-1* tienen activada constitutivamente la síntesis de JA, siendo este fenotipo dependiente de ABA; y Nourimand y *Cols.* (2016) describe que los mutantes *aln-3* poseen niveles elevados de varias enzimas del sistema antioxidante. Por otro lado, se conoce que las EAO cumplen un rol dual en la respuesta de las plantas al estrés, tanto como productos tóxicos del metabolismo o como moléculas de transducción de señales, para aclimatarse o activar respuestas de defensa (Miller y *Cols.*, 2010). A raíz de los resultados de este trabajo, se propone que la translocación de alantoína promueve la producción de EAO; que podrían señalar el aumento de los niveles de ABA, derivando en las respuesta de tolerancia al estrés ya descriptas. En la figura 17 se propone un modelo que relaciona a la alantoína con la tolerancia al estrés abiótico.

Resulta interesante el hecho de que los mutantes *aln-1*, que acumulan alantoína constitutivamente, hayan sido más tolerantes al tratamiento con H_2O_2 (Figura 10, a y b), probablemente por poseer mecanismos para su eliminación activados en forma constitutiva (Nourimand y *Cols.*, 2016); mientras que plantas WT tratadas con alantoína exógena incrementen la producción de esta EAO (Figura 16). Esto sugiere que los efectos de alantoína serían diferentes según se acumule endógenamente o se la aplique en forma exógena. Por un lado, la mutación *aln-1* estaría promoviendo la acumulación de la alantoína en el RE, compartimiento donde se encuentra la enzima alantoinasa (Figura 1). Por otro, el tratamiento con alantoína suministrada por raíz, supone un mecanismo de transporte a larga distancia. Mittler y *Cols.*, (2004) indica que las moléculas que señalizan la homeostasis de las EAO actúan de forma específica, ya sea en relación a una célula o a un compartimento subcelular en particular. Es probable, entonces, que los procesos de compartimentalización y removilización subcelular de alantoína estén relacionados con que los efectos de la alantoína sobre los niveles

de EAO sean diferentes según ésta se acumule endógenamente o se la aplique en forma exógena.

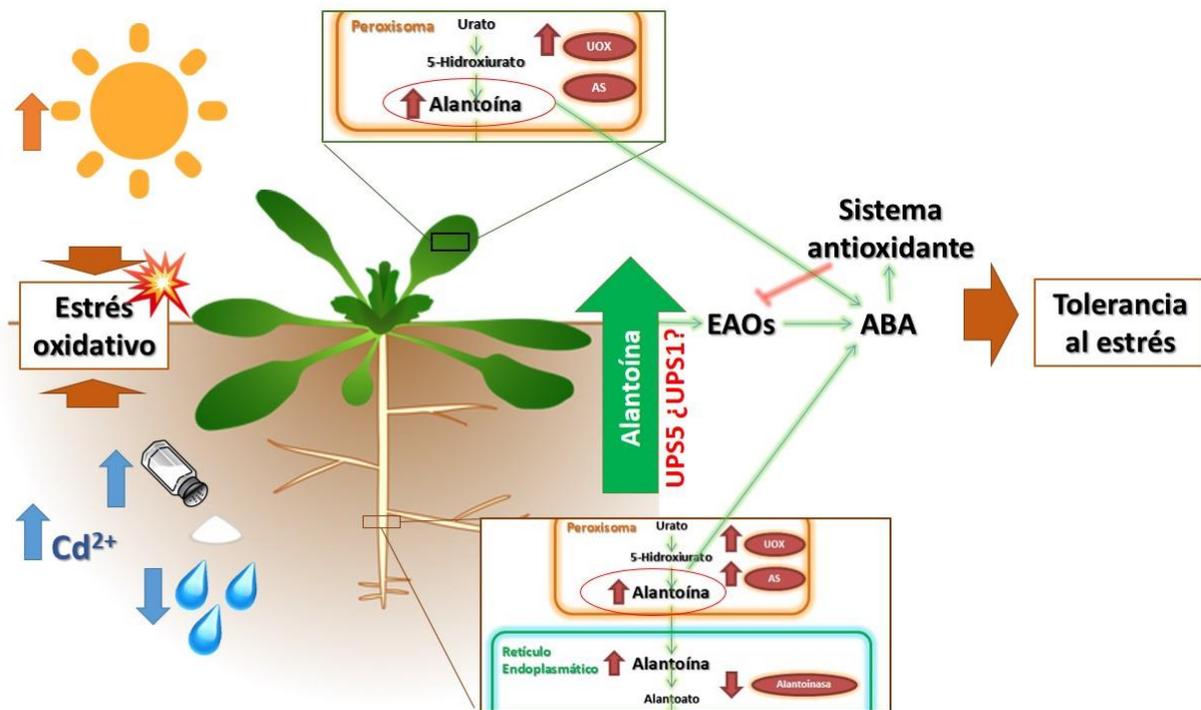


Figura 17: Rol de la alantoína en la tolerancia al estrés abiótico. Las condiciones de estrés abiótico, tales como la alta intensidad lumínica, el incremento en la salinidad del suelo, el déficit hídrico y la contaminación por metales pesados, conducen al estrés oxidativo y a la acumulación de alantoína. Esta acumulación se da en la raíz por un incremento en la expresión de las enzimas *AtUOX* y *AtAS* y una represión de la síntesis de *AtALN*, y en la parte aérea por un incremento en la expresión de *AtUOX*, principalmente; promoviendo la síntesis y desconjugación de ABA. El transporte de alantoína de raíz a parte aérea, mediante *AtUPS5*, bajo tratamientos cortos con alantoína exógena, y otro transportador, probablemente *AtUPS1*, en tratamientos largos; está implicado en la modulación de las EAO en parte aérea, que también podrían señalar al incremento del ABA. El ABA induce al sistema antioxidante enzimático, lo que deriva en la disminución de los niveles de EAO y la consecuente tolerancia al estrés.

Vale aclarar que poco es lo que se conoce acerca de estos procesos. Lescano (2017), describió que UPS5s y UPS5L se expresan en el RE y UPS5L también en la red trans-Golgi; lo que sugiere que estas variantes de *AtUPS5* están implicadas en la compartimentalización de la alantoína. Por otro lado, experimentos de complementación de levaduras (Schmidt y *Cols.*, 2006) y utilizando reporteros fluorescentes (Lescano, 2017) sugieren que estas dos variantes de *AtUPS5* presentarían diferente orientación en las membranas; indicando una función diferencial de las mismas en la removilización de la alantoína. Esto, sumado al hecho de que las líneas que expresan estas variantes muestran un transporte rápido de alantoína de raíz a parte aérea (Figura 13, b) las convierte en excelentes candidatas para continuar estudiando la compartimentalización de la alantoína y sus posibles implicancias en la regulación de las EAO.

Conclusiones

A partir de los resultados del presente trabajo se concluyó que, en primer lugar, la tolerancia al estrés oxidativo no estaría claramente relacionada con la acumulación de alantoína en los mutantes *aln-1*. Si bien estos mutantes degradaron clorofilas y produjeron MDA en menor medida bajo tratamiento con H₂O₂; no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre plantas WT y *aln-1* en la evolución de la ΦPSII, bajo tratamiento con MV, H₂O₂, AT y alta intensidad lumínica.

Por otro lado, se determinó que el transportador *AtUPS5* está involucrado en la translocación de alantoína; y que este proceso promueve la producción de EAO en la parte aérea del genotipo silvestre. Sin embargo, también se produjo aumento en los niveles de H₂O₂ en los mutantes *ups5* bajo tratamiento con alantoína exógena durante 24 horas, lo que sugiere que *AtUPS5* no es el único transportador involucrado en la translocación bajo tratamientos más largos.

Por último, los resultados obtenidos en la presente Tesina sugieren que la alantoína no es un antioxidante clásico, sino que es más probable que su rol en la tolerancia al estrés abiótico esté relacionado con la señalización.

Referencias Bibliográficas:

- Björkman, O., & Demmig, B. (1987). Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170(4), 489-504.
- Brychkova, G., Alikulov, Z., Fluhr, R., & Sagi, M. (2008). A critical role for ureides in dark and senescence-induced purine remobilization is unmasked in the Atxdh1 *Arabidopsis* mutant. *The Plant Journal*, 54(3), 496-509.
- Dajic, Z. (2006). Salt Stress. En Rao, K. M., Raghavendra, A. S., & Reddy, K. J. (Eds.). (2006). *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. Pp 41- 100. Springer Science & Business Media.
- Desimone, M., Catoni, E., Ludewig, U., Hilpert, M., Schneider, A., Kunze, R., ... & Schumacher, K. (2002). A novel superfamily of transporters for allantoin and other oxo derivatives of nitrogen heterocyclic compounds in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 14(4), 847-856.
- Dinneny, J. R., Long, T. a, Wang, J. Y., Jung, J. W., Mace, D., Pointer, S., Barron, C., Brady, S. M., Schiefelbein, J., Benfey, P. N. (2008). Cell identity mediates the response of *Arabidopsis* roots to abiotic stress. *Science*, 320(5878), 942-945.
- Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C (2013) InfoStat Versión 2013. Grupo InfoStat. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Foyer, C. H. (2002). The contribution of photosynthetic oxygen metabolism to oxidative stress in plants. In: *Oxidative stress in plants* (Inzé, D. and M. V. Montagu eds.), New York, USA: Taylor and Francis Publishers, pp. 33-68.
- Gus' kov, E. P., Kletskii, M. E., Kornienko, I. V., Olekhovich, L. P., Chistyakov, V. A., Shkurat, T. P., Prokof'ev V.N., & Zhdanov, Y. A. (2002). Allantoin as a free-radical scavenger. In *Doklady Biochemistry and Biophysics* (Vol. 383, No. 1, pp. 105-108). MAIK Nauka/Interperiodica.
- Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1), 189-198.
- Irani, S., & Todd, C. D. (2016). Ureide metabolism under abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of plant physiology*, 199, 87-95.
- Irani, S., Lobo, J. M., Gray, G. R., & Todd, C. D. (2017). Allantoin accumulation in response to increased growth irradiance in *Arabidopsis thaliana*. *Biologia Plantarum*, 1-7.
- Jabs, T., Dietrich, R. A., & Dangl, J. L. (1996). Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science-AAAS-Weekly Paper Edition*, 273(5283), 1853-1855.
- Kurepa, J., Smalle, J., Montagu, M. V., & Inzé, D. (1998). Polyamines and paraquat toxicity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and cell physiology*, 39(9), 987-992.
- Kwak, J. M., Mori, I. C., Pei, Z. M., Leonhardt, N., Torres, M. A., Dangl, J. L., ... & Schroeder, J. I. (2003). NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *The EMBO journal*, 22(11), 2623-2633.
- Lescano, C. I., Martini, C., González, C. A., & Desimone, M. (2016). Allantoin accumulation mediated by allantoinase downregulation and transport by Ureide Permease 5 confers salt stress tolerance to *Arabidopsis* plants. *Plant Molecular Biology*, 91(4-5), 581-595
- Lescano, C. I (2017) Función de la síntesis, acumulación y transporte de ureidos en *Arabidopsis thaliana* L. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Córdoba
- May, M. J., & Leaver, C. J. (1993). Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant Physiology*, 103(2), 621-627.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., & Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, cell & environment*, 33(4), 453-467.

- Minibayeva, F., Kolesnikov, O., Chasov, A., Beckett, R. P., Lüthje, S., Vylegzhanina, N., ... & Böttger, M. (2009). Wound-induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species. *Plant, cell & environment*, 32(5), 497-508.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*, 9(10), 490-498.
- Mittler, R., & Blumwald, E. (2015). The Roles of ROS and ABA in Systemic Acquired Acclimation. *The Plant Cell Online*, 27(1), 64–70.
- Nourimand, M., & Todd, C. D. (2016). Allantoin increases cadmium tolerance in Arabidopsis via activation of antioxidant mechanisms. *Plant and Cell Physiology*, 57(12), 2485-2496.
- Padh, H. (1990). Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem. Cell Biol.* 68, 1166-1173.
- Rao, K. M. (2006) Introduction. En Rao, K. M., Raghavendra, A. S., & Reddy, K. J. (Eds.). (2006). *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. Pp 1- 14. Springer Science & Business Media.
- Reddy, K. J & Raghavendra, A. S. (2006). Photooxidative stress. En Rao, K. M., Raghavendra, A. S., & Reddy, K. J. (Eds.). (2006). *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. Pp 157- 186. Springer Science & Business Media.
- Rentel, M. C., Lecourieux, D., Ouaked, F., Usher, S. L., Petersen, L., Okamoto, H., ... & Knight, M. R. (2004). OXII kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in Arabidopsis. *Nature*, 427(6977), 858.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... & Tinevez, J. Y. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676-682.
- Schmidt, A., Su, Y. H., Kunze, R., Warner, S., Hewitt, M., Slocum, R. D., ... & Desimone, M. (2004). UPS1 and UPS2 from Arabidopsis mediate high affinity transport of uracil and 5-fluorouracil. *Journal of Biological Chemistry*, 279(43), 44817-44824.
- Schmidt, A., Baumann, N., Schwarzkopf, A., Frommer, W. B., & Desimone, M. (2006). Comparative studies on Ureide Permeases in Arabidopsis thaliana and analysis of two alternative splice variants of AtUPS5. *Planta*, 224(6), 1329–1340.
- Shestopalov, A. V., Shkurat, T. P., Mikashinovich, Z. I., Kryzhanovskaya, I. O., Bogacheva, M. A., Lomteva, S. V., Prokof'eva, V.N., and Gus'kov, E. P. (2006). Biological functions of allantoin. *Biology Bulletin*, 33(5), 437–440.
- Schubert, K. R. (1986). Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*, 37(1), 539-574.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal* (Vol. 10). Universitat Jaume I.
- Takagi, H., Ishiga, Y., Watanabe, S., Konishi, T., Egusa, M., Akiyoshi, N., ... Sakamoto, A. (2016). Allantoin, a stress-related purine metabolite, can activate jasmonate signaling in a MYC2-regulated and abscisic acid-dependent manner. *Journal of Experimental Botany*, 67(8), 2519–2532.
- Vranova, E., Inzé, D., & Van Breusegem, F. (2002). Signal transduction during oxidative stress. *Journal of experimental botany*, 53(372), 1227-1236.
- Vogels, G. D., & Van der Drift, C. (1970). Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Analytical biochemistry*, 33(1), 143-157.
- Wang, P., Kong, C. H., Sun, B., & Xu, X. H. (2012). Distribution and function of allantoin (5-ureidohydantoin) in rice grains. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(11), 2793-2798.
- Watanabe, S., Matsumoto, M., Hakomori, Y., Takagi, H., Shimada, H., & Sakamoto, A. (2014). The purine metabolite allantoin enhances abiotic stress tolerance through synergistic activation of abscisic acid metabolism. *Plant, Cell and Environment*, 37(4), 1022–1036.

- Weber, H., Chételat, A., Reymond, P., & Farmer, E. E. (2004). Selective and powerful stress gene expression in Arabidopsis in response to malondialdehyde. *The Plant Journal*, 37(6), 877-888.
- Werner, A. K., & Witte, C. P. (2011). The biochemistry of nitrogen mobilization: Purine ring catabolism. *Trends in Plant Science*.
- Wintermans, J. F. G. M., & De Mots, A. S. (1965). Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their phenophytins in ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biophysics including Photosynthesis*, 109(2), 448-453.
- Woo, H. R., Kim, J. H., Nam, H. G., & Lim, P. O. (2004). The delayed leaf senescence mutants of Arabidopsis, ore1, ore3, and ore9 are tolerant to oxidative stress. *Plant and Cell Physiology*, 45(7), 923-932.