



Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Carrera de Ciencias Biológicas

**“Estrés térmico e hídrico sobre la
regulación del proceso autofágico en
Arabidopsis thaliana”**

Tesinista: Tatiana Bellagio

Firma:.....

Director: Hernán Ramiro Lascano

Firma:.....

Codirector: Germán Robert

Firma:.....

“Estrés térmico e hídrico sobre la regulación del proceso autofágico en *Arabidopsis thaliana*”

Tribunal examinador

Nombre y apellido: Firma:

Nombre y apellido: Firma:

Nombre y apellido: Firma:

Calificación:.....

Fecha:.....

ÍNDICE

Resumen	3
Introducción.....	4
Materiales y Métodos	12
Resultados	15
Discusión.....	29
Conclusión	33
Bibliografía.....	34
Figuras Suplementarias.....	42

Resumen

Autofagia es un mecanismo de homeostasis celular clave para degradar y reciclar material intracelular no deseado o dañado durante el desarrollo o bajo condiciones de estrés. Condiciones de estrés térmico (ET) y/o hídrico (EH) serán cada vez más frecuentes en el contexto del cambio climático global, afectando así el crecimiento, desarrollo y productividad de las plantas. Dichas condiciones de estrés ambiental se encuentran estrechamente asociadas a aumentos de procesos oxidativos e inducción de senescencia temprana. Asimismo, diversas evidencias indican que la maquinaria autofágica estaría involucrada en reciclado y removilización de nutrientes (principalmente nitrógeno) durante la senescencia, jugando un importante rol en el crecimiento y calidad de semillas. Si bien actualmente el estudio de autofagia está en auge, el efecto de estreses ambientales sobre autofagia y el impacto que esto podría tener sobre los procesos de removilización de nutrientes no está del todo esclarecido. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del estrés térmico e hídrico sobre el proceso autofágico durante el desarrollo vegetativo y reproductivo, y su implicancia en la removilización de nutrientes en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Los resultados mostraron que condiciones de EH, ET y tratamientos con ácido abscísico, hormona que media las respuestas a estas condiciones de estrés, son potentes inductores del proceso autofágico en estadíos vegetativos. Asimismo, mutantes autofágicos (*atg*) mostraron mayor sensibilidad al ET durante el crecimiento vegetativo. Por último, se observaron claras diferencias en el crecimiento reproductivo entre mutantes *atg* y plantas nativas.

Introducción

La autofagia es un mecanismo altamente conservado en eucariotas mediante el cual se degradan componentes citoplasmáticos como proteínas e incluso organelas bajo condiciones de estrés o durante ciertos estadios del desarrollo (Klionsky et al., 2005; Liu et al., 2012; Michaeli et al., 2016). Autofagia puede ser dividida en: microautofagia, macroautofagia y autofagia mediada por chaperonas (Galluzzi et al., 2017). En plantas solo se ha demostrado la existencia de macro y micro autofagia. Durante la microautofagia, la membrana lisosomal o vacuolar envuelve e incorpora directamente el objetivo formando una vesícula que finalmente se desprende hacia el lumen (Nakamura et al., 2018). La macroautofagia se caracteriza por la formación *de novo* de una organela de doble membrana, el autofagosoma, que envuelve componentes citoplasmáticos y/u organelas y los transporta a vacuolas líticas o lisosomas para su degradación. Este trabajo se centrará en la macroautofagia (de acá en más referida como autofagia) (Fig. 1).

Estudios genéticos en levaduras identificaron varios genes relacionados a la autofagia (ATG *AuTophagic Genes*) que son necesarios para la iniciación, maduración y fusión del autofagosoma con la vacuola (Figura 1.). Ortólogos de los genes ATG, se encuentran presentes en plantas y su función ha sido estudiada mediante la complementación de mutantes atg en levaduras, el estudio de ARN de interferencia (ARNi) y mutantes knock-out (Doelling et al., 2002; Hanaoka et al., 2002; Yoshimoto et al., 2004; Xiong et al., 2005; Contento et al., 2005; Thompson et al., 2005). En *Arabidopsis*, cerca de 40 genes ATG han sido identificados, los cuales cumplen funciones específicas en diferentes etapas del proceso (Fig. 1) (Yoshimoto et al., 2012). La inducción del proceso está regulada por una cascada de señalización dependiente de kinasas (Fig. 1). TOR kinasa hiperfosforila ATG1 y ATG13 impidiendo así su asociación. Bajo condiciones deficientes de nutrientes, ATG1 y ATG13 son desfosforilados, lo que conlleva a la re-asociación y activación del complejo (Fig. 1). Posteriormente, tiene lugar la distribución de membranas y la nucleación de vesículas que soportan el crecimiento del autofagosoma, donde ATG9 y el complejo PI3K, entre otros, cumplen funciones claves (Fig. 1). Asimismo, la formación y maduración del autofagosoma implica dos vías de conjugación de proteínas: el complejo ATG12-ATG5 y ATG8 (Fig. 1). ATG8 se encuentra en dos formas: cuando autofagia se activa, ATG8 se

lipida con fosfatidil-etanolamina (ATG8-PE) y localiza en la membrana del autofagosoma; cuando autofagia no se induce, ATG8 está libre y localiza en el citoplasma. El proceso de lipidación es iniciado mediante el clivado del ultimo residuo C terminal de ATG8 por acción de la proteasa ATG4, donde posteriormente, el complejo ATG5-ATG12-ATG16 actuará como una ligasa facilitando la unión de ATG8 con el lípido (Marshall y Vierstra, 2018). Una vez completada la vesícula autofágica, el complejo ATG12-ATG5 se disocia. ATG8 no se disocia del autofagosoma, por lo cual, como veremos más adelante, es ampliamente utilizada como marcadora del proceso. Finalmente, los autofagosomas son transportados hacia la vacuola, donde la membrana externa del autofagosoma se fusiona con el tonoplasto liberando la vesícula interna (cuerpo autofágico) en el lumen vacuolar para su degradación (fig. 1). Mutaciones en cualquiera de estos genes, llevará a insuficiencias en el desarrollo de la autofagia.

Resulta importante destacar que la identificación de los genes que subyacen al proceso de autofagia ha permitido el desarrollo de herramientas de biología molecular para el estudio del proceso, lo cual ha sido de vital importancia para el estudio de las implicancias fisiológicas de autofagia. La unión de ATG8 a los autofagosomas ocurre tempranamente durante su formación y persiste hasta etapas tardías del proceso tales como la fusión de los autofagosomas a la vacuola, incluso en los cuerpos autofágicos presentes en el lumen vacuolar. Esta característica ha permitido la observación de los autofagosomas mediante microscopía de fluorescencia en organismos modificados genéticamente que expresan proteínas reporteras fluorescentes fusionadas al extremo N terminal de ATG8 (por ejemplo, GFP-ATG8) (Le Bars et al., 2014; Suttangkakul et al., 2011; Yoshimoto et al., 2012). Además, mediante análisis de Western Blot es posible analizar el flujo autofágico; es decir, el tráfico de autofagosomas a la vacuola, mediante el análisis de degradación de la proteína fusión GFP-ATG8 utilizando anticuerpos contra GFP. Así, la cuantificación de los niveles de GFP libre respecto a la cantidad de proteína fusión GFP-ATG8 resulta un indicador ampliamente utilizado para estimar el flujo autofágico (Li et al., 2015; Slavikova et al., 2008).

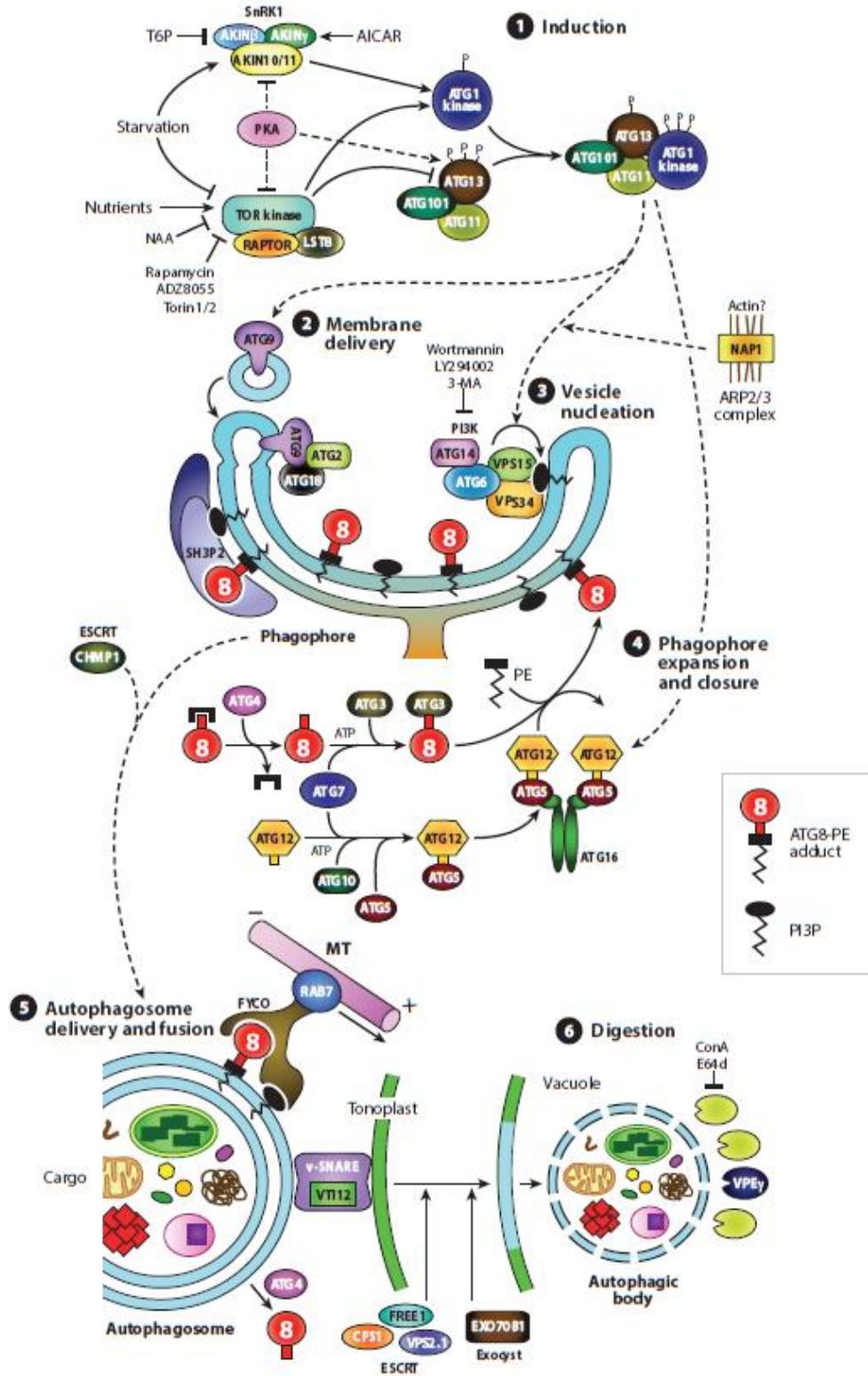


Figura 1. Simplificación de las distintas etapas del proceso autofágico. Se puede observar la inducción de autofagia, seguida por la nucleación de las diferentes proteínas ATG al sitio de formación y expansión del fagóforo. Una vez formado el autofagosoma, será dirigido hacia la vacuola para su fusión con el tonoplasto. Dentro de la vacuola la estructura de membrana simple, el cuerpo autofágico, será degradado junto con los componentes que transportaba por proteasas vacuolares (ver texto para más detalles). Marshall RS y Viestra RD (2018).

Los mutantes *atg* aislados hasta la fecha evidencian que defectos en la autofagia comprometen la viabilidad, crecimiento, desarrollo y productividad de las plantas, como así también las respuestas a condiciones de estrés abiótico y biótico (Zhou et al., 2013, 2014a, 2014b; Liu et al., 2009; Wang et al., 2015, 2016; Guiboileau et al., 2012; Bassham et al., 2006; Li and Hafren et al., 2017; Haxim et al., 2017; Lenz et al., 2011). La forma en que autofagia contribuye a hacer frente a estas condiciones de estrés podría resumirse en el reciclado de macromoléculas innecesarias o dañadas, contribuyendo a la biosíntesis de componentes anti-estrés, generación de energía y la eliminación de materiales tóxicos del citoplasma (Xiong et al., 2007; Zhou et al., 2013).

Estrés ambiental

Las plantas son organismos sésiles que deben hacer frente a condiciones ambientales fluctuantes. El estrés térmico (ET) así como el estrés hídrico (EH) son las principales condiciones de estrés asociadas al cambio climático global, considerando que se pronostican grandes aumentos en los episodios de sequías y altas temperaturas por el panel intergubernamental de cambio climático (IPCC, 2013). Asimismo, existe una estrecha correlación entre condiciones de estrés y aumentos de la producción de especies activas de oxígeno (EAO), que devienen en aumentos de procesos oxidativos, daños oxidativos en macromoléculas y senescencia acelerada (Lu et al., 2008; Das et al., 2014). En este sentido, resulta importante mencionar que condiciones generadoras de estrés oxidativo también promueven la activación del proceso autofágico (Xiong et al., 2007a; Pérez-Pérez et al., 2012). Más aún, ha sido reportada la participación de autofagia en la degradación de proteínas oxidadas (Xiong et al., 2007b; Xiong et al., 2007a) sugiriendo así una amplia participación de autofagia frente a diversas condiciones de estrés.

Por otro lado, el ET y EH son dos factores ambientales que afectan dramáticamente características agronómicas claves para el rendimiento de los cultivos de grano, tales como los procesos reproductivos y el llenado de grano (Barnabas et al. 2008, Prasad et al. 2008), procesos en los cuales, como veremos más adelante, autofagia cumpliría funciones importantes.

- **Estrés térmico y autofagia**

A nivel sistémico, el estrés causado por altas temperaturas (ET) afecta la germinación, la producción del vástago, el crecimiento vegetativo, la producción de materia seca, el desarrollo reproductivo (como la iniciación de la floración), procesos reproductivos (como la polinización o fertilización), el rendimiento de grano (Saini and Aspinall et al., 1981, 1982; Porter and Gawith et al., 1999; Boyer and Westgate et al., 2004; Ergo et al., 2017) y la calidad del mismo (Gooding et al. 2003, Britz et al. 2007).

A nivel celular, se ha demostrado que el ET, resulta en alteraciones en la fluidez de membranas que afectan el transporte de electrones a nivel cloroplástico y mitocondrial, la acumulación de proteínas insolubles no plegadas y oxidadas (Zhou et al., 2013) que a su vez inducen el proceso autofágico (Yang X C et al., 2016). En este sentido, se ha observado que tratamientos de ET inducen no sólo la expresión de genes *ATG*, sino también la formación de autofagosomas en plantas de *Arabidopsis* GFP-ATG8, reporteras de autofagia, sugiriendo la participación del proceso en las respuestas a dichas condiciones (Zhou et al., 2013). Además, plantas mutantes *atg5* y *atg7*, mostraron menor tolerancia al ET y acumularon grandes cantidades de agregados proteicos ubiquitinados (Zhou et al., 2013).

- **Estrés hídrico (EH) y autofagia**

Tanto condiciones de sequía como salinidad pueden causar déficit hídrico. Como se mencionó anteriormente, el rol del proceso autofágico en la degradación de proteínas oxidadas y en la modulación de las respuestas de defensa sugiere que autofagia también participaría en respuesta a este tipo de estreses. De hecho, ha sido demostrada la inducción en la expresión de genes *ATG* tanto en *Arabidopsis* como en arroz, en respuesta a estrés

osmótico (Slavikova et al., 2008). Posteriormente, Liu y colaboradores (2009) observaron tanto la inducción de la expresión de genes *ATG* como así también la formación de autofagosomas en raíces de plantas de *Arabidopsis* tratadas con manitol 350 mM. Asimismo reportaron hipersensibilidad de plantas mutantes *atg* ante estrés osmótico y salino. A su vez, estudios en plantas de interés económico como el tomate han sugerido que la tolerancia al estrés hídrico estaría sustentada por una activación de autofagia y la consecuente degradación de proteínas ubiquitinadas (Wang et al., 2015). Sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado la actividad autofágica en órganos foliares (fuentes clave en procesos de removilización), ni se han experimentado condiciones de estrés osmótico menos agudas.

- **Estrés, senescencia, autofagia y llenado de grano**

Como se mencionó anteriormente, diferentes condiciones de estrés conllevan aumentos en la generación de especies activas del oxígeno (EAO), daños oxidativos en macromoléculas de las células vegetales e inducen procesos de senescencia temprana. La senescencia es una respuesta adaptativa y de aclimatación elástica, caracterizada por la transición entre la asimilación de nutrientes al reciclado y removilización de los mismos (Masclaux et al., 2010). En este sentido el nitrógeno es un nutriente esencial para el crecimiento de cualquier planta y es uno de los fertilizantes más utilizados en agricultura. Procesos que permitan el reciclado de nitrógeno orgánico y su exportación desde órganos senescentes a sumideros como las semillas son determinantes cruciales en la calidad y productividad de las plantas, como así también en la sustentabilidad de los sistemas productivos (Masclaux-Daubresse et al., 2010). Los cloroplastos son la principal fuente para reciclado y removilización de nitrógeno durante la senescencia foliar (Masclaux-Daubresse et al., 2000). Dependiendo de las especies de plantas, 75% o más del nitrógeno está presente en estas organelas (Wittenbach, 1978; Mae *et al.*, 1983; Peoples and Dalling, 1988) y son las primeras en ser desmanteladas durante la senescencia (Peterson and Huffaker, 1975; Matile, 1992). La forma en que las proteínas del cloroplasto son degradadas durante la senescencia foliar (natural o inducida por algún tipo de estrés) no se conoce en su totalidad. La degradación de proteínas del estroma podría ocurrir tanto dentro como fuera de la organela (Martinez et al., 2008; Reumann et al., 2010) En este sentido, el

ambiente oxidativo existente en el cloroplasto durante la senescencia o bajo condiciones de estrés catalizaría la fragmentación oxidativa de RuBisCo (Ishida et al., 1997) y los péptidos oxidados resultantes serían unidos a la envuelta cloroplástica para ser distribuidos en compartimentos citoplasmáticos de tipo vesicular llamados RCB (Rubisco Containing Bodies) (García-Ferris & Moreno, 1994; Chiba et al., 2003; Prins et al., 2008). Existen evidencias que indican que la maquinaria autofágica participa en el tráfico de los RCB a la vacuola central (Ishida et al., 2008; Wada et al., 2009; Izumi et al., 2010). En este sentido, mutantes *atg5* poseen interrumpida la acumulación de RCBs en la vacuola, indicando así que el proceso autofágico estaría participando en el reciclado cloroplástico (Ishida et al., 2008; Wada et al., 2009). Posteriores evidencias muestran que el proceso autofágico resulta clave en el manejo de nitrógeno a nivel sistémico de la planta mediante el control de la removilización del mismo (Guiboileau et al., 2012; Li et al., 2015; Chen et al., 2018). Por último, resultan interesantes reportes enfocados en semillas, en donde se demuestra que si bien los mutantes *atg* poseen una menor removilización de nitrógeno desde las fuentes, poseen mayores porcentajes de contenido de nitrógeno en las semillas contrariamente a lo esperado. Estos autores plantean que el mayor número de aborto de semillas en las mutantes disminuye la demanda total de los sumideros, permitiendo la correcta nutrición de las pocas semillas restantes. Además hipotetizan un rol fisiológico de autofagia en las semillas independientemente de su rol en la planta madre (Di Berardino et al., 2018).

Si bien actualmente el estudio de autofagia como mecanismo de degradación de componentes celulares y su rol fisiológico en i) la tolerancia a condiciones de estrés y ii) la eficiencia en el uso del nitrógeno está en auge, el efecto de los estreses ambientales sobre autofagia y como esto impacta sobre los procesos de removilización de nutrientes resulta aún desconocido. Dados estos antecedentes, se plantean para este trabajo la siguiente hipótesis y objetivos:

Hipótesis

La regulación del proceso autofágico posee un rol clave en la respuesta a condiciones de estrés hídrico y térmico, tanto en etapas de desarrollo vegetativo como reproductivo, afectando finalmente el reciclado y removilización de nutrientes en *Arabidopsis thaliana*.

Objetivo general

En el presente trabajo se plantea como objetivo general la evaluación del efecto del estrés térmico e hídrico sobre el proceso autofágico durante el desarrollo vegetativo y reproductivo y su implicancia en la removilización de nutrientes en plantas *Arabidopsis thaliana*.

Objetivos específicos

1. Caracterizar las respuestas morfofisiológicas y el desarrollo vegetativo de plantas de *Arabidopsis thaliana* nativas y mutantes *atg* sometidas a estrés térmico e hídrico.
2. Evaluar la participación de la autofagia durante estadíos vegetativos en plantas *Arabidopsis thaliana* sometidas a los tratamientos de estrés mencionados anteriormente.
3. Evaluar la incidencia de condiciones de estrés hídrico y térmico sobre el proceso de autofagia durante el desarrollo reproductivo y su impacto sobre el rendimiento y calidad de semilla (peso y contenido de proteínas).

Materiales y Métodos

Material vegetal y condiciones de crecimiento: se trabajó con plantas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) i) nativas, ii) trasgénicas reporteras de autofagia 35S:GFP-ATG8a y iii) mutantes *atg5* y *atg4*. Las plantas fueron crecidas en cámaras de cultivo bajo condiciones controladas de luz (16/8h luz/oscuridad), temperatura (23 °C) y humedad controlada (50 %) salvo que se indique lo contrario.

Objetivo específico I: Plantas *Arabidopsis thaliana* nativas y mutantes *atg4* y *atg5* fueron crecidas en medio Murashide Skog (MS) en placas de Petri durante 7 días. Posteriormente,

las plantas fueron sometidas a condiciones de i) estrés térmico, en placas de Petri con MS colocadas en cámara térmica de 35°C o, ii) estrés hídrico, en placas de Petri con medio MS suplementado con manitol 150. Luego de 3 días de tratamiento, se tomaron imágenes de las plantas y se evaluaron las siguientes variables de crecimiento: largo de raíz principal (LRP), número de raíces laterales (NRL), largo de raíces laterales (LRL= suma del largo de todas las raíces laterales de la planta) y como una estimación de la Superficie Radical, la suma del largo de la raíz principal y laterales (SR= LRP + LRL). Una vez obtenidos estos parámetros se calculó el porcentaje de reducción de cada variable bajo el tratamiento respecto a la condición control. Las mediciones se realizaron con el software imageJ.

Objetivo específico II: Con el objetivo de evaluar el proceso de autofagia en las hojas de plantas sometidas a las condiciones de estrés mencionadas, y debido a que *Arabidopsis* desarrolla su primer hoja luego de 2 semanas de crecimiento, plantas transgénicas 35S:GFP-ATG8a reporteras de autofagia fueron crecidas en tierra:vermiculita (1:2). Luego de 2 semanas, se escindieron las primeras hojas y se sometieron a los tratamientos de i) estrés hídrico (EH) con manitol 150 mM, ii) estrés térmico (ET) en cámara térmica a 35°C o, iii) diferentes concentraciones (1, 5, 10 y 20 μ M) de la hormona del estrés ácido abscisico. Luego de 2, 4, 6 y 24 h de EH, 2, 4, 6 y 8 h de ET y 6 h de tratamiento con ABA se evaluó la formación de autofagosomas mediante microscopía de fluorescencia, como así también el flujo autofágico por análisis de liberación de GFP mediante Western Blot. La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida se realizó en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), de acuerdo con el método de Laemmli (1970). Se utilizaron anticuerpos primarios antiGFP y secundarios con actividad Fosfatasa alcalina asociada. Los niveles de proteínas se determinaron por el método de Lowry (1951) utilizando como estándar de proteína albúmina de suero bovina (BSA).

Objetivo específico III: Se trabajó con plantas *Arabidopsis thaliana* tanto nativas como mutantes *atg4* y *atg5* crecidas en tierra:vermiculita (1:2) en macetas de 200 cc.

Al ser *Arabidopsis thaliana* una planta con crecimiento reproductivo indeterminado, el período de determinación del número de semillas y el periodo de llenado de las mismas se encuentran constantemente superpuestos. Además, las mutantes *atg* muestran leves alteraciones fenológicas respecto el genotipo nativo. Entonces, para la estimación del

período de llenado de grano específico de cada genotipo se realizaron evaluaciones fenotípicas durante el crecimiento reproductivo, desde el momento de aparición de las primeras silicuas (30-35 días desde la siembra (DDS)) hasta el cese de producción de las mismas (50-60 DDS). Asimismo, se realizó una curva temporal de producción de silicuas y peso por silicua. A su vez, se midió la eficiencia cuántica del fotosistema II de las hojas 5 y 6 de la roseta utilizando un fluorómetro de pulso modulado, con el objetivo de encontrar síntomas de senescencia ya que consiste en un indicador de procesos de removilización.

Una vez definido el período de llenado de las semillas, un total de 54 plantas, incluyendo 18 *atg4*, 18 *atg5* y 18 nativas (6 por cada tratamiento) fueron crecidas en macetas individuales. Los tratamientos de EH o ET fueron realizados durante el período de llenado de grano establecido para cada genotipo. El ET se realizó en episodios diarios de aumentos de 10 °C sobre la temperatura de crecimiento y 6h de duración. El EH se llevó a cabo mediante suspensión de riego una semana antes del período de llenado de grano establecido, con el fin de llegar al período crítico con niveles significativos de EH.

Luego de 7 días de estrés las plantas fueron cosechadas, el material procesado y determinadas las siguientes variables: i) peso de 1000 semillas como un indicador de rendimiento ii) contenido de proteína en semillas como un indicador de calidad de las mismas iii) contenido de proteína en Vainas de Silicuas (VS) y restos secos (RS=hojas de roseta, tallo y hojas caulinares). Estos valores luego se utilizaron para calcular los Índices de cosecha de proteína (ICPs) como indicadores de removilización: ICP de Restos Vegetales a Semilla ($ICP = \frac{\text{Prot en semillas}}{\text{Prot Sem} + \text{Prot RV}}$), ICP de Vainas de Silicuas a Semilla ($ICP = \frac{\text{Prot en semillas}}{\text{Prot Sem} + \text{Prot VS}}$) e ICP de Total a Semilla ($ICP = \frac{\text{Prot en semillas}}{\text{Prot Sem} + \text{Prot VS} + \text{Prot RV}}$).

Resultados

1. Efectos del EH y ET sobre el desarrollo radical de plantas *Arabidopsis* nativas y mutantes de autofagia

Plantas de *Arabidopsis* fueron sembradas y crecidas en medio MS durante 7 días, para ser luego sometidas a tratamientos de EH o ET durante 3 días. Primero, se evaluaron plantas de 7 días en condiciones control, y se observó que plantas nativas y mutantes *atg*, no presentan diferencias significativas entre sí en ninguno de los 4 parámetros de crecimiento evaluados: largo de raíz principal (LRP), número de raíces laterales (NRL), largo de raíces laterales (LRL) y superficie radical (SR) (Figura 2.).

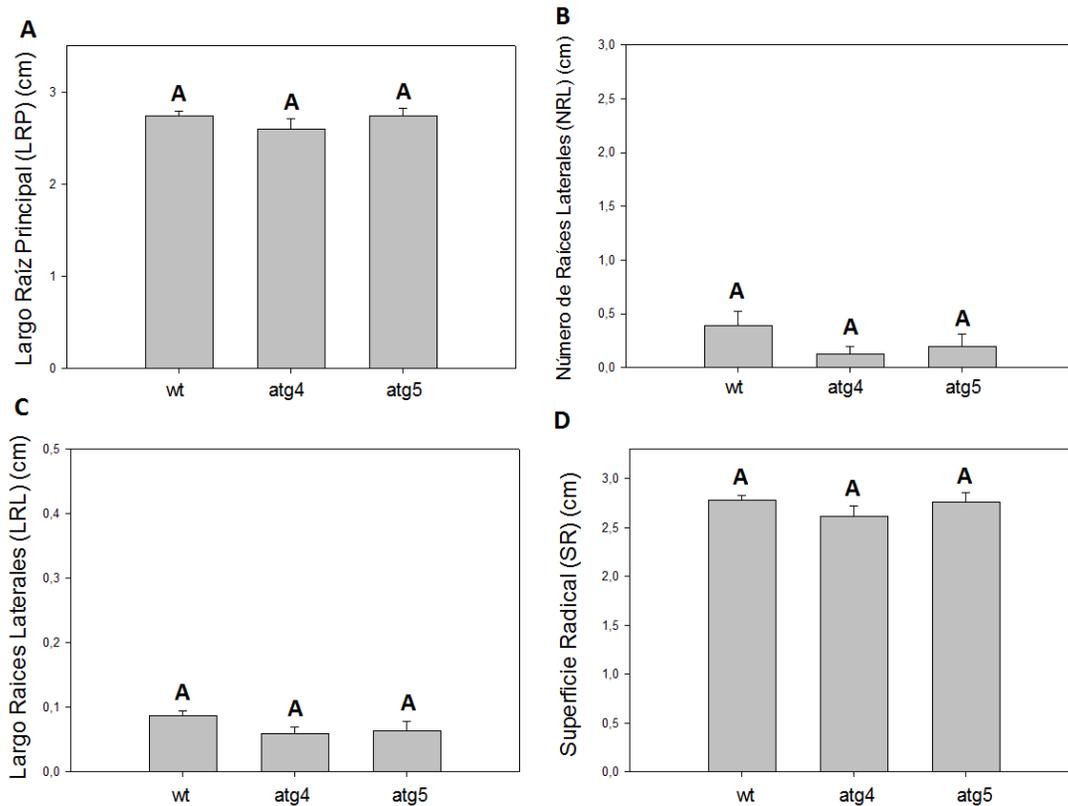


Figura 2. Efectos de las mutaciones en los genes *atg* sobre los parámetros de crecimiento vegetativo: A. Largo de raíz principal, B. Número de raíces laterales, C. Largo de raíces laterales, D. Superficie radical. Plantas nativas y mutantes *atg4* y *atg5* de 7 días sembradas y crecidas en placas de Petri con medio MS en condiciones control. No se observan diferencias significativas entre los genotipos en ninguno de los parámetros evaluados. La estadística ANOVA se realizó dentro de cada variable entre los diferentes genotipos. Las letras indican diferencias significativas. Test DGC. $P < 0.05$.

Para el tratamiento de EH, las plantas fueron transferidas a medio MS suplementado con Manitol 150 mM. Luego de 3 días de tratamiento de EH se observa una reducción en el desarrollo tanto de la raíz principal (largo de raíz principal, LRP) como de raíces laterales (número de raíces laterales, NRL; largo de raíces laterales, LRL), afectándose así la superficie radical total (superficie radical, SR) en todos los genotipos respecto la condición control (Fig. Tabla 1). Curiosamente, no se observaron diferencias significativas en los efectos del EH sobre el desarrollo radical entre el genotipo nativo y los mutantes *atg*, salvo el LRL en las mutantes *atg4* las cuales fueron menos afectadas por el EH (Tabla 1.).

Tabla 1. Efecto del estrés hídrico sobre variables de crecimiento vegetativo: largo de raíz principal, número de raíces laterales, largo de raíces laterales y superficie radical. El efecto se expresa como porcentaje de reducción de la variable bajo EH respecto al control (=1-(EH/Control))*100). La estadística ANOVA se realizó dentro de cada variable entre los diferentes genotipos. Las letras indican diferencias significativas. Test DGC. P<0.05

<i>Variables de crecimiento</i>	<i>Genotipo</i>	<i>% Reducción bajo EH respecto al control</i>
<i>Largo de raíz principal (LRP)</i>	wt	47.15 ± 5.04 % ^A
	<i>atg5</i>	35.37 ± 3.15 % ^A
	<i>atg4</i>	42.61 ± 8.03 % ^A
<i>Número de raíces laterales (NRL)</i>	wt	61.55 ± 10.94 % ^A
	<i>atg5</i>	53.99 ± 7.43 % ^A
	<i>atg4</i>	65.71 ± 15.91 % ^A
<i>Largo de raíces laterales (LRL)</i>	wt	72.28 ± 6.3 % ^A
	<i>atg5</i>	70.05.44 ± 5.72 % ^A
	<i>atg4</i>	37.70 ± 14.91 % ^B
<i>Superficie radical (SR)</i>	wt	68.25 ± 5.9 % ^A
	<i>atg5</i>	57.56 ± 4.37 % ^A
	<i>atg4</i>	51.38 ± 14.98 % ^A

Para evaluar los efectos del ET sobre el desarrollo radical, plantas de 7 días fueron transferidas a placas de Petri con MS y sometidas a episodios de estrés térmico diarios de 35°C y 6 h de duración. En plantas nativas, el tratamiento de ET afectó negativamente el desarrollo de raíces laterales (NRL, LRL), mientras que no se observó tal efecto sobre el

crecimiento de la raíz principal (LRP) respecto la condición control. No obstante, el LRT se vió afectado negativamente bajo condiciones de ET (Tabla 1). En las plantas mutantes *atg*, el efecto del ET sobre el desarrollo de las raíces laterales (NRL, LRL) y el LRT fue significativamente más dramático que en las plantas nativas, observándose una caída de hasta el 96% en el caso del NRL y LRL en las mutantes *atg5*, y del 98% y 97% en los parámetros de NRL y LRL en las mutantes *atg4* respecto a la condición control (Tabla 2).

Tabla 2. . Efecto del estrés térmico sobre variables de crecimiento vegetativo: largo de raíz principal, número de raíces laterales, largo de raíces laterales y largo total de raíces. El efecto se expresa como porcentaje de reducción de la variable bajo ET respecto al control ($=1-(ET/Control)*100$). La estadística ANOVA se realizó dentro de cada variable entre los diferentes genotipos. Las letras indican diferencias significativas. Test DGC. $P<0.05$.

<i>Variables de crecimiento</i>	<i>Genotipo</i>	<i>% Reducción bajo ET respecto al control</i>
<i>Largo de raíz principal (LRP)</i>	wt	$8.58 \pm 5.28 \%^A$
	<i>atg5</i>	$-7.23 \pm 17.7 \%^A$
	<i>atg4</i>	$22.43 \pm 5.59 \%^A$
<i>Número de raíces laterales (NRL)</i>	wt	$70 \pm 9.73 \%^A$
	<i>atg5</i>	$95.12 \pm 4.59 \%^B$
	<i>atg4</i>	$98 \pm 1.91 \%^B$
<i>Largo de raíces laterales (LRL)</i>	wt	$69.98 \pm 10.14 \%^A$
	<i>atg5</i>	$96.4 \pm 2.33 \%^B$
	<i>atg4</i>	$97.11 \pm 1.94 \%^B$
<i>Superficie radical (SR)</i>	wt	$24.33 \pm 4.84 \%^A$
	<i>atg5</i>	$44.87 \pm 0.17 \%^B$
	<i>atg4</i>	$43.35 \pm 4.16 \%^B$

2. Efectos del EH y ET sobre autofagia: activación específica del proceso dependiente del órgano

Con el objetivo de evaluar los efectos del EH y ET sobre autofagia en hoja, plantas de *Arabidopsis* reporteras del proceso, 35S:GFP-ATG8a, fueron crecidas 2 semanas en tierra:vermiculita (1:2). Posteriormente, las hojas fueron escindidas y sometidas a los distintos tratamientos: Control, incubación en agua; EH, manitol 150 mM y ET mediante incubaciones a 35°C. La activación de autofagia fue estimada mediante microscopía de fluorescencia (formación de autofagosomas) y por Western Blot anti GFP (flujo

autofágico). En la figura 3 se observa que bajo condiciones de EH se indujo la formación de autofagosomas (Figura 3 B.) como así también el flujo de los mismos hacia la vacuola (Figura 3 A-C), indicando la activación del proceso en hojas. Además, con el objetivo de evaluar autofagia en raíz, plantas de dos semanas fueron sometidas a EH en placa de Petri con MS suplementado con manitol 150 mM y se analizó la formación de autofagosomas. Como se observa en la figura 4, también hubo un incremento en la formación de vesículas autofágicas en las raíces de plantas sometidas a EH.

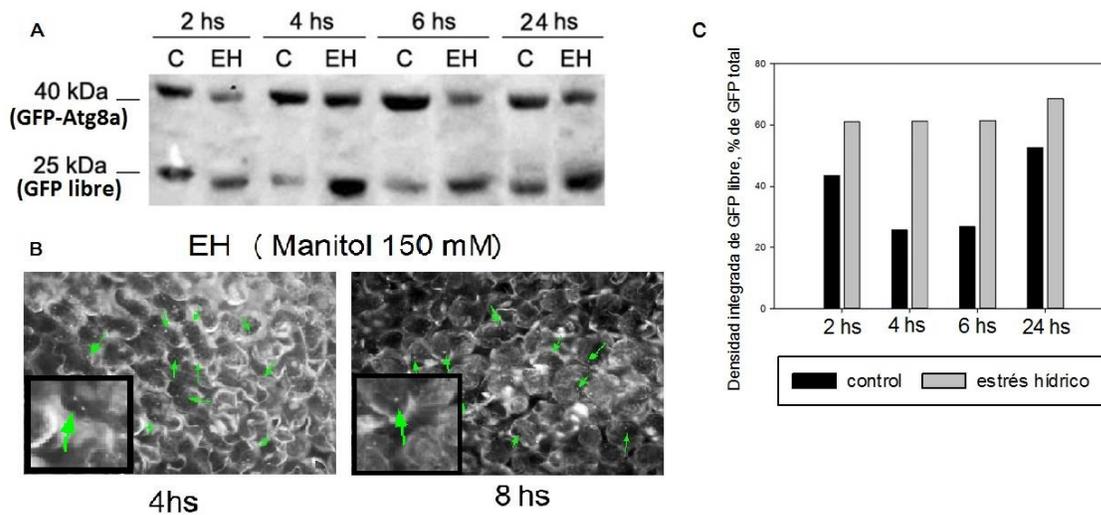


Figura 3. Efecto del estrés osmótico sobre el flujo autofágico a 2, 4, 6 y 24 hs de tratamiento sobre las primeras 2 hojas de plantas transgénicas *GFP-ATG8* de 2 semanas de edad. A. Análisis de Western Blot con anticuerpo anti-GFP, mostrando la relación entre la fusión GFP-ATG8a (~40 kDa); y GFP libre (~25 kDa). B. Densitometría del ensayo de clivaje de GFP-ATG8a en A, GFP libre fue expresado como porcentaje de GFP total en cada muestra. C. Los autofagosomas fueron observados en el mesófilo de las hojas con microscopia de fluorescencia. Las flechas indican autofagosomas unidos a GFP.

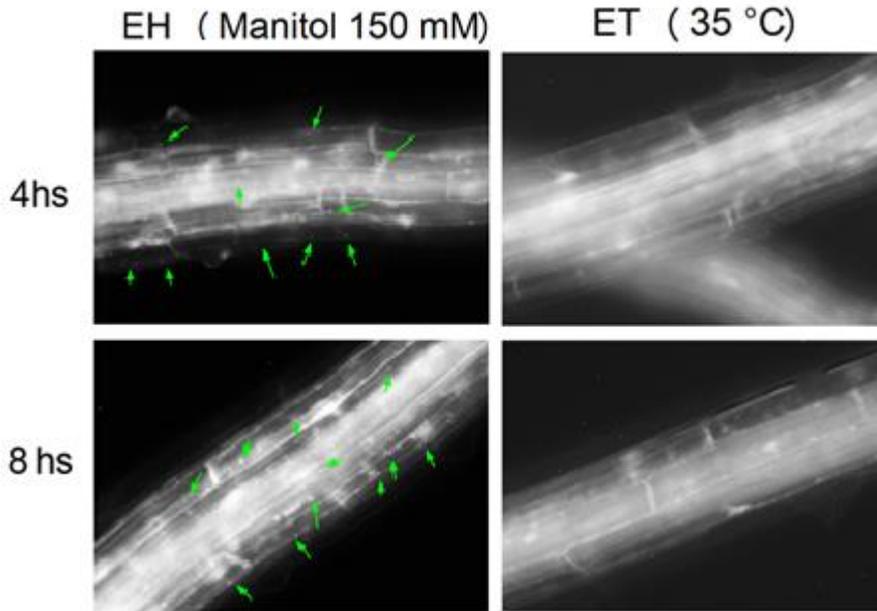


Figura 4. Autofagia se activa en raíces al ser sometidas a EH, pero no así bajo ET. Plantas de 2 semanas reporteras de autofagia (ATG8-GFP) crecidas en placas de Petri en medio MS, en donde se muestra la activación del proceso autofágico en raíces al ser sometidas a EH (Manitol 150 mM) durante 4 y 8 hs, pero no así al ser sometidas a ET (35°C) durante los mismos tiempos La observación fue realizada mediante microscopía de fluorescencia. Se advierten con flechas verdes autofagosomas marcados con la proteína de fusión ATG8-GFP.

Bajo condiciones de ET, el proceso de autofagia también se vió activado en las hojas, observándose una inducción en la formación de autofagosomas (Figura 5 B.) como así también del flujo autofágico, principalmente en los tiempos más tempranos (Figura 5 A-C). Sin embargo, a diferencia de lo observado en los tratamientos de EH, no se pudo evidenciar formación de autofagosomas en las raíces de las plantas sometidas a ET (Figura 4.).

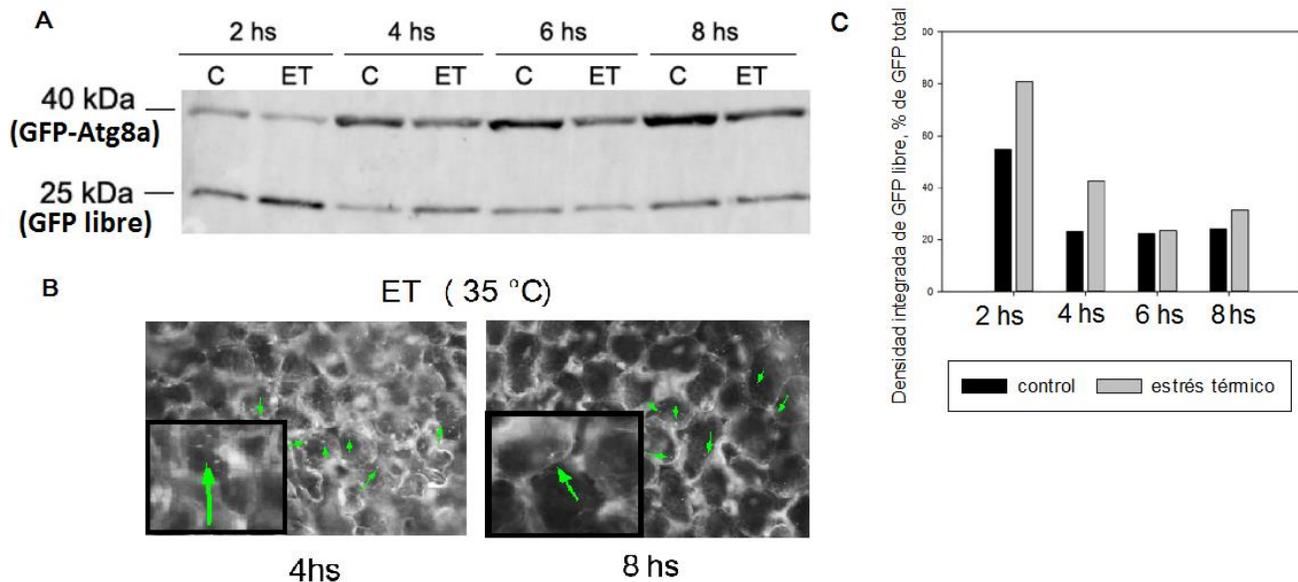


Figura 5. Efecto del estrés térmico sobre el flujo autofágico a 2, 4, 6 y 8 hs de tratamiento sobre las primeras 2 hojas de plantas transgénicas *GFP-ATG8* de 2 semanas de edad. A. Análisis de Western Blot con anticuerpo anti-GFP, mostrando la relación entre la fusión GFP-ATG8a (~40 kDa); y GFP libre (~25 kDa). B. Densitometría del ensayo de clivaje de GFP-ATG8a en A, GFP libre fue expresado como porcentaje de GFP total en cada muestra. C. Los autofagosomas fueron observados en el mesófilo de las hojas con microscopía de fluorescencia. Las flechas indican autofagosomas unidos a GFP.

Por último, se realizaron tratamientos con ácido abscísico (ABA), hormona que participa en los mecanismos de respuestas a las condiciones de estrés evaluadas. Hojas de plantas reporteras de autofagia de 2 semanas fueron incubadas 6 h con diferentes concentraciones de ABA, emulando concentraciones endógenas basales (entre 0,7 a 1,5 μM) y concentraciones mayores asociadas a condiciones de estrés (entre 5 a 20 μM) y se analizó la formación de autofagosomas por microscopía de fluorescencia (Figura 6.). Los tratamientos con ABA mostraron una inducción en la formación de autofagosomas (Figura 6.).

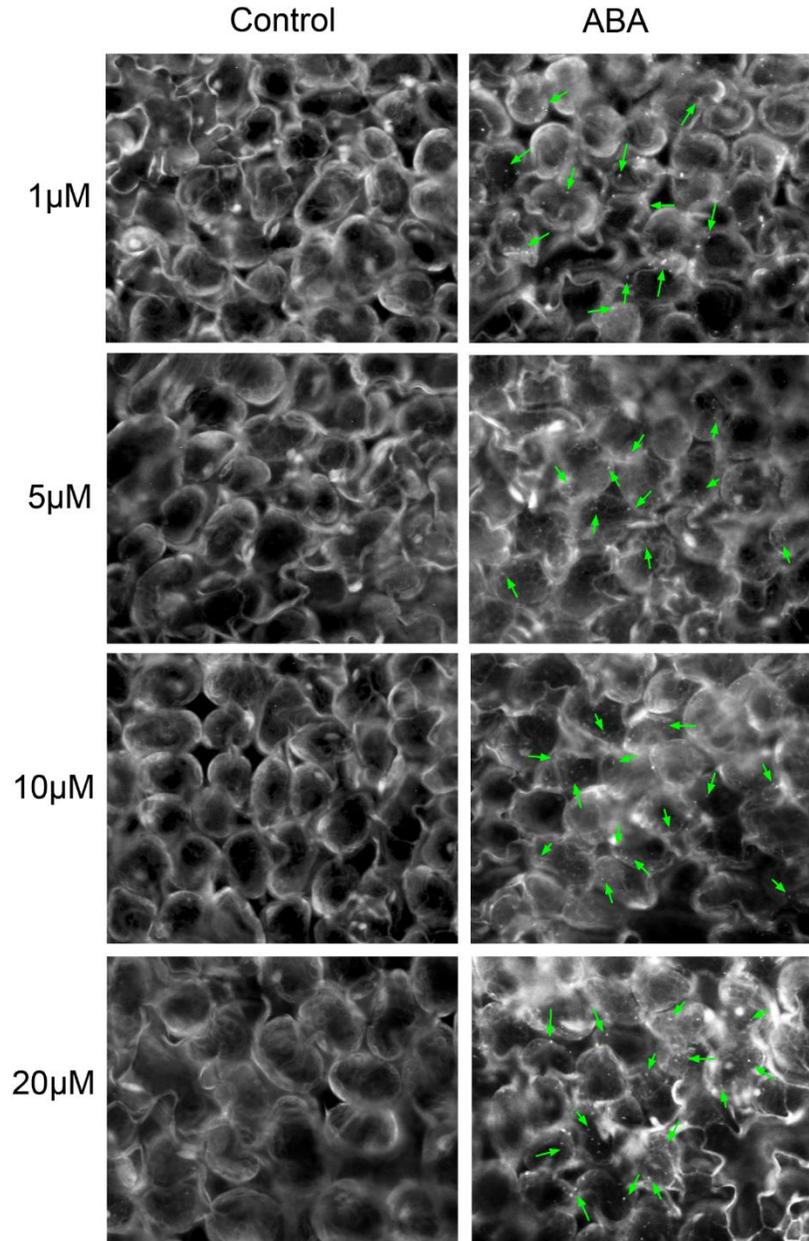


Figura 6. La hormona ABA genera una activación del proceso autofágico. Fotos de hojas de plantas de 2 semanas reporteras de autofagia (ATG8-GFP) en donde se muestra una clara activación de la autofagia al ser sometidas a diferentes concentraciones (1, 5, 10 y 20 μ M) de la hormona ácido absísico durante 6 hs. La observación fue realizada mediante microscopía de fluorescencia. Se advierten con flechas verdes autofagosomas marcados con la proteína de fusión ATG8-GFP. Se imitaron concentraciones endógenas basales (0,7 a 1,5 μ M) y condiciones de estrés (20-30 μ M) de la hormona ABA en células vegetales.

3. Rendimiento y calidad de semillas bajo condiciones de EH y ET: ¿está implicada autofagia?

Con el objetivo de caracterizar la fenología del crecimiento reproductivo en *A. thaliana* nativa y mutantes *atg* y su relación con la senescencia foliar, se midieron a diferentes tiempos las siguientes variables: número y peso de silicuas y rendimiento cuántico fotoquímico del fotosistema II de las hojas 5 y 6 (Figura 7.). Las plantas nativas llegaron a partir de los 50 DDS (días después de la siembra) a una meseta en la producción de silicuas (Figura 7 A.), mientras que el peso máximo por silicua se alcanzó dentro de los 50-55 DDS (Figura 7 B.). La eficiencia fotosintética de la hoja 5 y 6 cayeron por debajo del valor 0,6 entre los 50-55 DDS y cercano a los 55 DDS, respectivamente (Figura 7 A.-B.). En el caso de las mutantes *atg*, la meseta en la producción de silicuas se alcanzó 5 días más temprano respecto las plantas nativas (45 DDS, Figura 7 A.), el peso máximo por silicua se alcanzó dentro de los 40-45 DDS (Figura 5. B) y la eficiencia fotosintética de la hoja 5 y 6 cayeron por debajo de 0,6 entre los 40-45 DDS y cercano a los 45 DDS, respectivamente (Figura 5. A. y B.). Como se observa, las plantas mutantes *atg* presentaron un menor rendimiento respecto las plantas nativas, no sólo debido a una menor producción de silicuas, sino también menor peso de las mismas (Figura 8.). Además, y de acuerdo a reportes previos, las plantas *atg* mostraron un fenotipo de senescencia acelerada (Figura 7 C-D.)

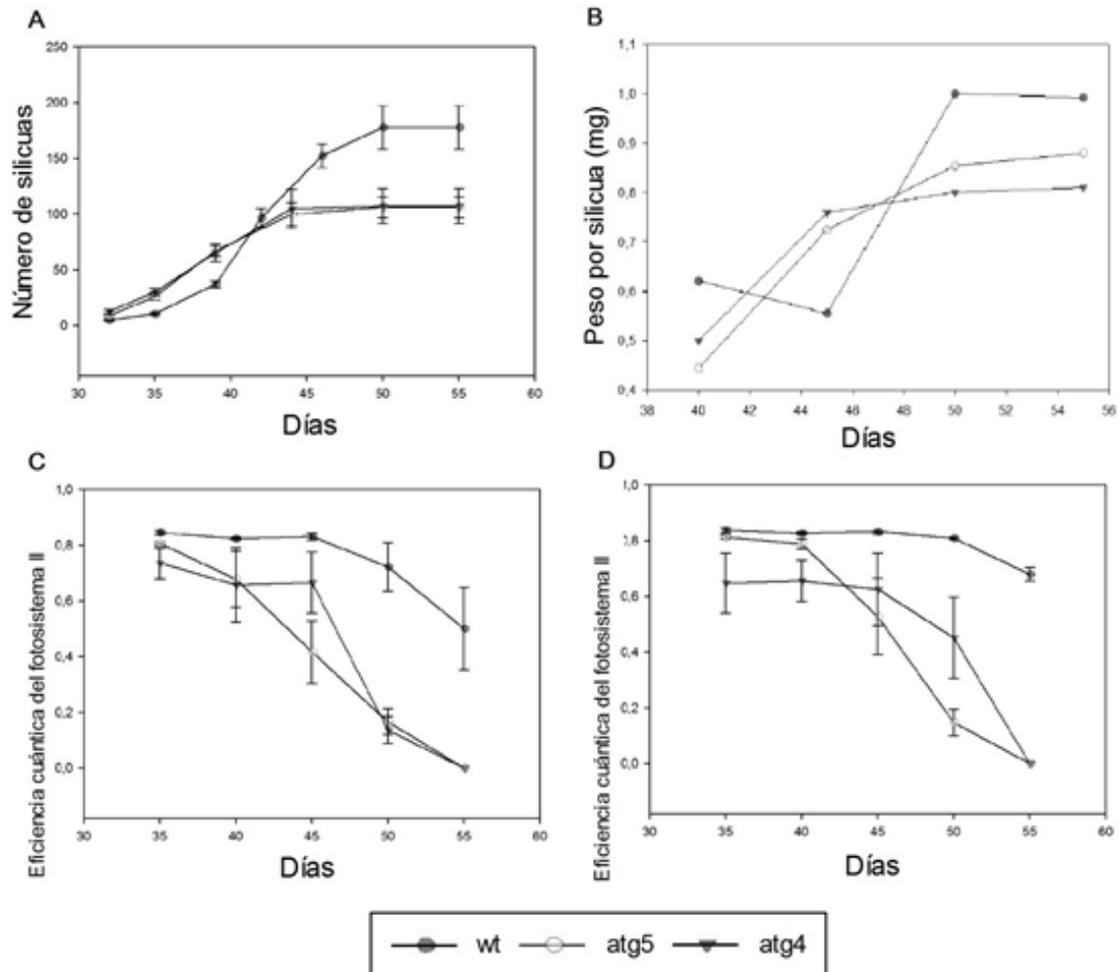


Figura 7. Seguimiento del número de silicuas, peso de silicuas y rendimiento cuántico fotoquímico del fotosistema II de las hojas 5 y 6 durante el crecimiento reproductivo de plantas de *Arabidopsis* nativas y mutantes *atg*. Los parámetros fueron evaluados desde el momento de aparición de las primeras silicuas 30-35 DDS hasta la llegada a una meseta en la aparición de nuevas silicuas 50-60 DDS. A. Curvas de acumulación de silicuas en el tiempo. B. Curvas de peso por silicua en el tiempo. C. Curvas de caída de la eficiencia cuántica del fotosistema II de la hoja 5 en el tiempo. D. Curva de caída de la eficiencia cuántica del fotosistema II de la hoja 6 en el tiempo.

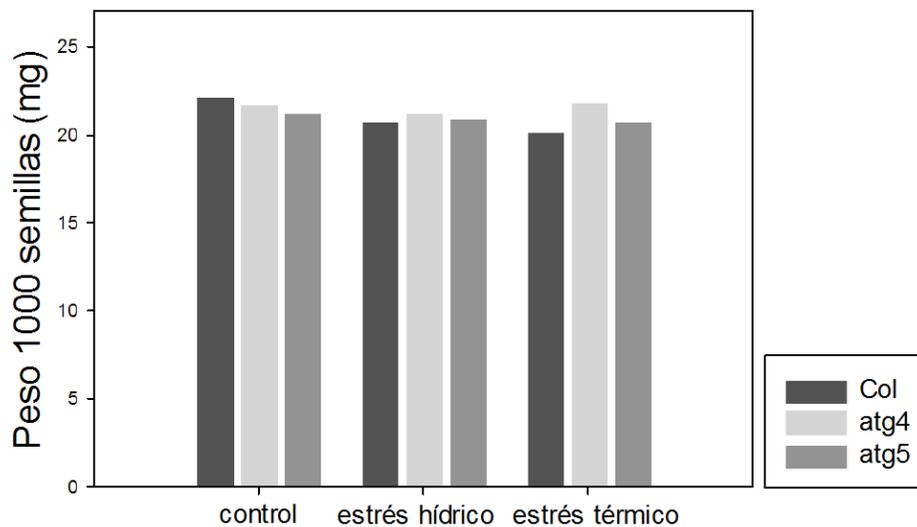


Figura 8. Peso de 1000 semillas (mg) de plantas nativas y mutantes *atg* sometidas a EH y ET. Luego de ser sometidas durante 7 días a ET, EH o condiciones control según corresponda, plantas de 54 DDS mutantes *atg*, y de 60 DDS nativas fueron cosechadas y las semillas secadas. Luego se cuantificaron 1000 semillas para ser pesadas. El pesado se realizó con una balanza de precisión y la cuantificación mediante el software Image J.

Teniendo en cuenta todos los datos obtenidos, y a fin de no afectar de manera significativa el número de silicuas, se estimó como período para la aplicación del EH y ET a partir del día 53 DDS para las plantas nativas y a partir del día 46 DDS para las mutantes *atg*, y 7 días de duración. Cabe aclarar que para los tratamientos de EH, el riego fue suspendido una semana previa al día establecido para el tratamiento, de modo tal de llegar al período crítico con niveles significativos de EH. Luego de realizados los tratamientos, se cosecharon las silicuas y se separaron las semillas de las vainas y los restos vegetales (RV) (tallo y hojas) y se secaron en estufa a 60°C. Resulta importante en aclarar que, debido a la característica dehiscente de los frutos de *Arabidopsis*, muchas semillas fueron perdidas en el transcurso de los experimentos, por lo que no se cuenta con el número total de las mismas.

Con el objetivo de estimar los procesos de removilización, particularmente de nitrógeno, se midieron los contenidos de proteínas en semillas, vainas y restos vegetativos en plantas de *Arabidopsis* nativas y mutantes *atg* sometidas a condiciones de EH, ET y bajo condiciones control (Figura 9. y Figura 10.). Si bien se observa que el contenido de proteína en semillas se encuentra reducido en plantas nativas sometidas a condiciones de estrés, particularmente bajo EH, las diferencias no son significativas (Figura 9 A.). Asimismo, el contenido de proteína en vaina fue afectado negativamente por ambas condiciones de estrés

(Figura 9 B.), mientras que sólo en ET se observaron incrementados los niveles de proteína en los restos vegetales (Figura 9 C.).

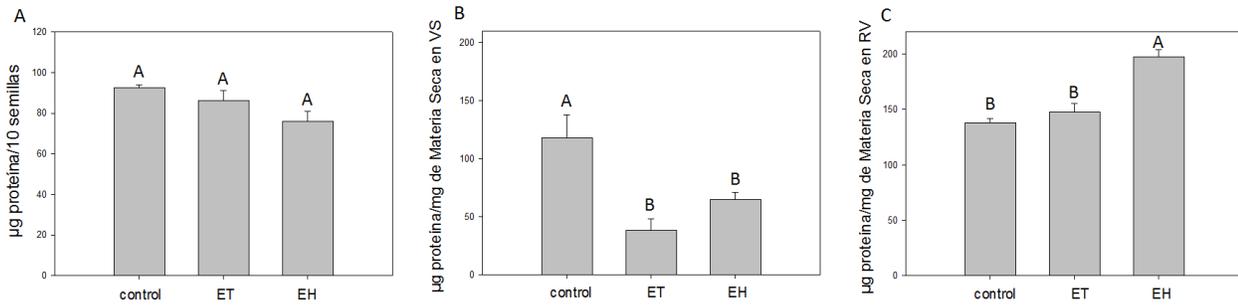


Figura 9. Efecto del estrés hídrico y térmico sobre el contenido de proteínas en semillas (A), vainas de silicuas (B), y restos vegetales (C) de *A. thaliana* wt. Plantas de 60 DDS fueron sometidas a 7 días de EH, episodios de ET o condiciones control, para ser luego cosechadas, separadas las semillas, las vainas de silicuas y los restos vegetales y cuantificados sus contenidos proteicos. Contenido de proteínas en semillas expresado como μg proteína/10 semillas (A). Contenido de proteínas de vainas de silicuas y restos vegetales expresados como μg de proteína/mg de Materia Seca. Las letras indican diferencias significativas entre los tratamientos. Test DGC. $P < 0.05$.

De acuerdo a lo reportado previamente, los mutantes *atg5* mostraron mayor acumulación de proteína en semilla respecto las plantas nativas en condiciones control, mientras que las plantas *atg4* presentaron menores contenidos de proteínas en semillas (figura 10 A.). La mayor acumulación de proteína en semilla de las plantas *atg5* no se vió asociada con una menor acumulación de proteínas en los RV, de hecho los niveles en RV fueron mayores respecto las plantas nativas (Figura 10 C.). Por otro lado, estos mutantes presentaron menores contenidos proteicos que el genotipo nativo en las VS (Figura 10 A.). Asimismo, al observar los índices de cosecha de proteína (ICP) de los mutantes *atg5* en condiciones control, no se observa un menor ICP_{PC} (planta completa) en comparación al genotipo nativo (Figura 11 A.). Sin embargo, al desglosar dicho índice entre la cosecha desde VS y desde los RV, si se observa una mayor cosecha desde las vainas (Figura 11 A-B-C.). Curiosamente, todo esto indicaría una eficiente removilización en los mutantes *atg5* desde el último tejido materno en contacto con la semilla en formación y explicaría sus mayores contenidos proteicos en semilla. Por otro lado, en condiciones control, los mutantes *atg4* acumularon menor cantidad de proteína en semillas que las plantas nativas (Figura 10 A.). Asimismo, poseen mayores cantidades de proteína tanto en VS como en RV comparado con el genotipo nativo (Figura 10. B-C.). Congruentemente estos mutantes

presentan el menor ICP total (Figura 11 A.). Todo esto iría acorde a lo esperado para plantas carentes en autofagia, con procesos de removilización alterados.

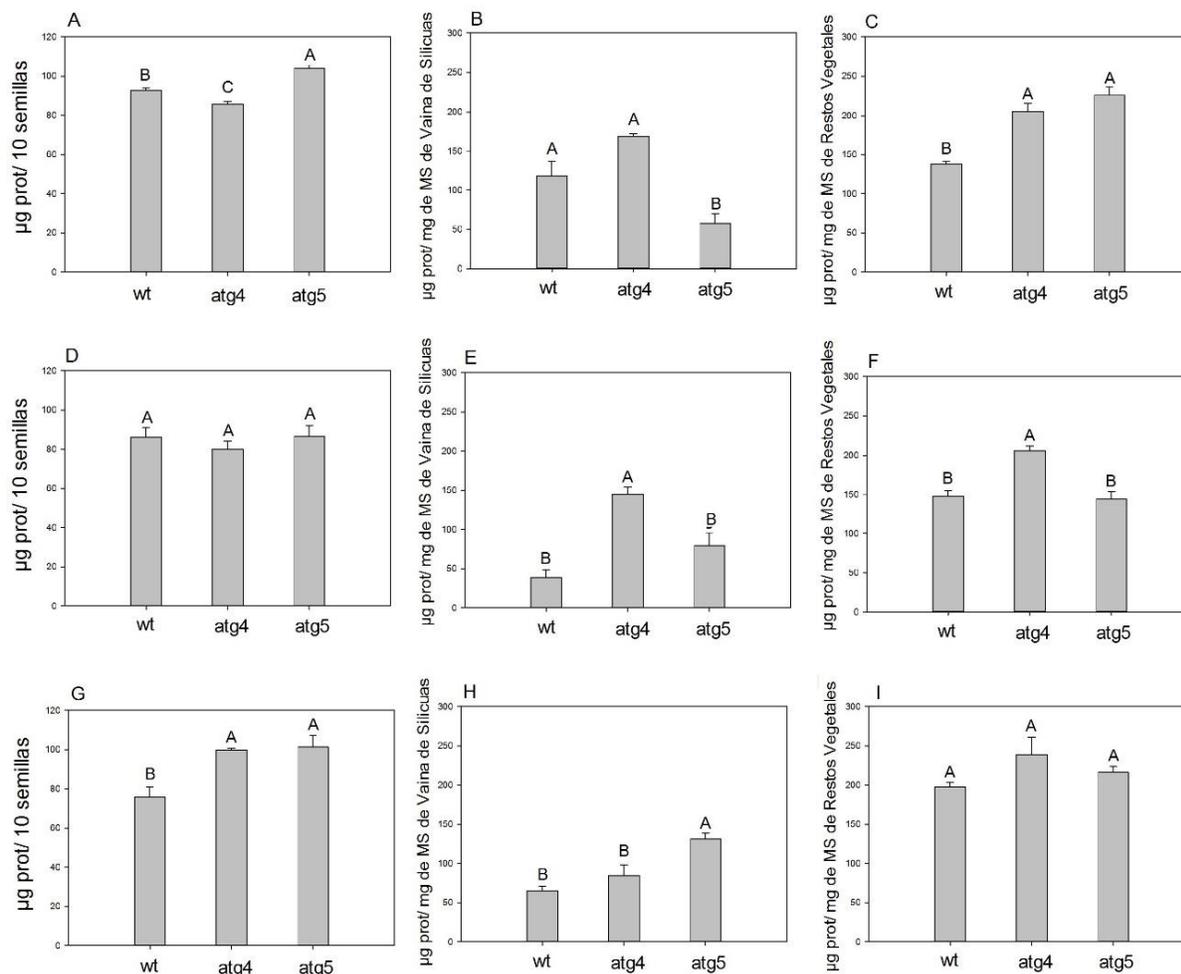


Figura 10. Efecto del estrés hídrico y térmico sobre el contenido de proteínas en semillas, vainas, y restos vegetales de *A. thaliana* wt y mutantes *atg*. Luego de ser sometidas durante 7 días a EH, episodios de ET o condiciones control según corresponda, plantas de 54 DDS mutantes *atg*, y de 60 DDS nativas fueron cosechadas y separadas las semillas, las vainas de silicuas y los restos vegetales para la posterior cuantificación de proteínas. A-B-C. Plantas en condiciones control. D-E-F. Plantas sometidas a episodios diarios de ET. G-H-I. Plantas sometidas a EH. A-D-G. Contenido proteico de semillas expresado como µg proteína/10 semillas. B-E-H. Contenido proteico de vainas de silicuas expresado como µg de proteína/mg de Materia Seca. D-F-I. Contenido proteico de restos vegetales expresado como µg de proteína/ mg de Materia Seca. Las letras indican diferencias significativas entre los genotipos. Test DGC. P<0.05.

En condiciones de EH, llamativamente, las plantas nativas presentaron un menor contenido de proteína en semilla que las mutantes (Figura 10 G.) Las mutantes *atg5*

mostraron la mayor cantidad de proteína en VS, revirtiéndose el fenotipo de mayor removilización desde VS observado en la condición control (Figura 11 B.). No se observaron diferencias significativas en el caso de los RV (Figura 10 C.) ni tampoco en los ICP en esta condición (Figura 11 G-H-I.). En términos generales, las mutantes *atg5* y *atg4* mostraron un comportamiento similar bajo condiciones de estrés (Figura 10 D-I.), mientras que en términos de ICP no se observaron diferencias significativas respecto las plantas nativas en las condiciones mencionadas (11 D-I.). Bajo condiciones de ET, la concentración de proteína en semillas se iguala para todos los genotipos no encontrando diferencias significativas entre los mismos (Figura 10 E.). A su vez, bajo ET los mutantes *atg5*, acumulan la misma cantidad de proteína en VS y RV que las plantas nativas (Figura 10. E-F.) y los ICP desde VS, desde RV y planta completa se igualan al genotipo nativo (Figura 11. D-F.). Por su parte, las plantas mutantes *atg4* acumularon mayores cantidades de proteína tanto en VS como en RV (Figura 10. D-F.) viéndose esto reflejado en los ICP (Figura 11. D-F.).

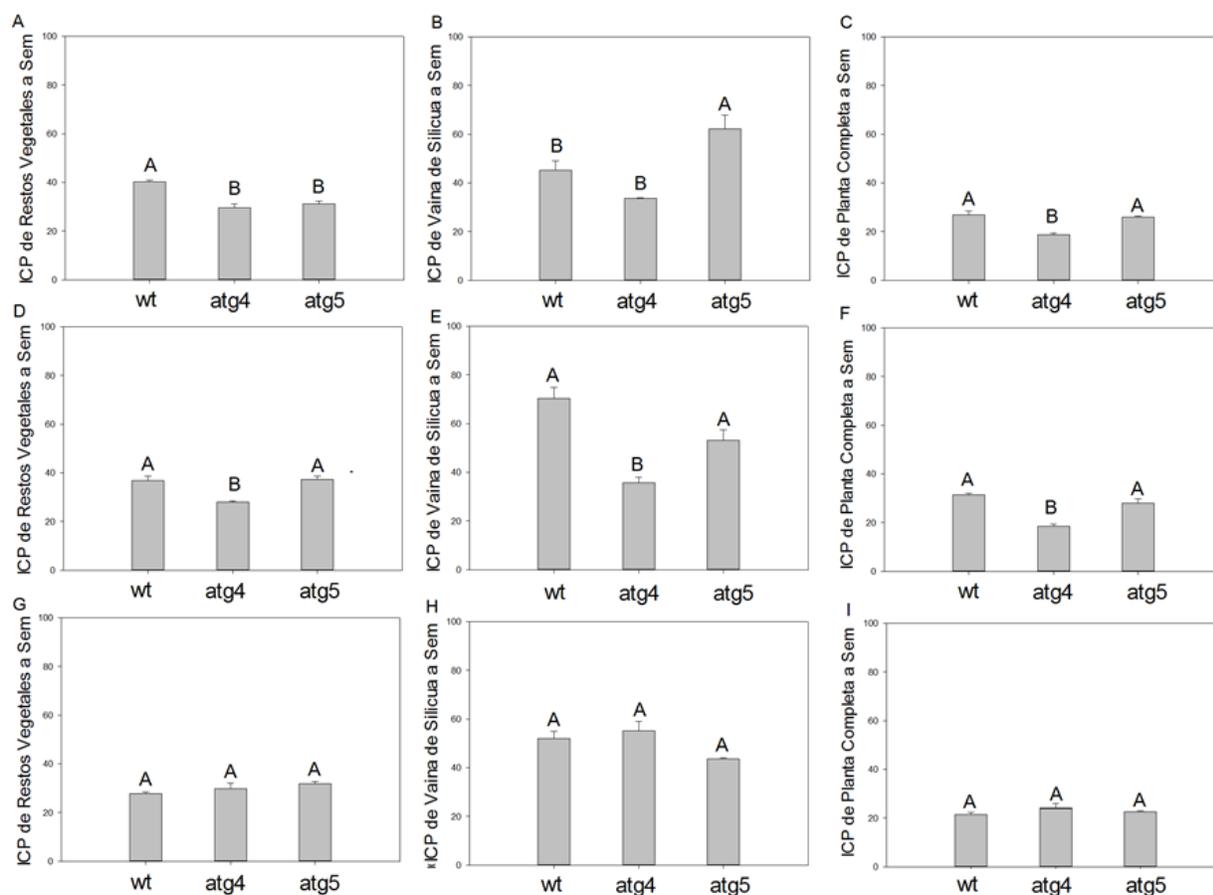


Figura 7. Efectos del estrés hídrico y térmico sobre ICPs (Índices de Cosecha de Proteína) de *A. thaliana* wt y mutantes *atg*. Luego de ser sometidas durante 7 días a EH, episodios de ET o condiciones control según corresponda, plantas de 54 DDS mutantes *atg*, y de 60 DDS nativas fueron cosechadas y separadas las semillas, las vainas de silicuas y los restos vegetales para la posterior cuantificación de proteínas y cálculo de los ICN. A-B-C Plantas en condiciones control. D-E-F. Plantas sometidas a episodios diarios de ET. G-H-I. Plantas sometidas a EH. A-D-G. ICP_{RV} de Restos Vegetales (RV) a semillas ($=\text{Prot Sem} / (\text{Prot RV} + \text{Prot Sem})$). B-E-H. ICP_{VS} de Vainas de Silicuas (VS) a semillas ($=\text{Prot Sem} / (\text{Prot VS} + \text{Prot Sem})$). D-F-I. ICP_{PC} (planta completa) a semilla ($=\text{Prot Sem} / (\text{Prot RV} + \text{Prot VS} + \text{Prot Sem})$). Las Test DGC. $P < 0$. Las letras indican diferencias significativas entre los genotipos. Test DGC. $P < 0.05$.

Discusión

Autofagia es un proceso clave para hacer frente a condiciones de estrés, permitiendo el reciclado de macromoléculas innecesarias o dañadas, contribuyendo a la biosíntesis de componentes anti-estrés, generación de energía y la eliminación de materiales tóxicos del citoplasma (Xiong et al., 2007; Zhou et al., 2013). Si bien existen trabajos en donde se ha mostrado una mayor vulnerabilidad de los mutantes autofágicos a condiciones de EH y ET (Zhou et al., 2013; Liu et al., 2009), en ningún trabajo se había realizado un seguimiento de las variables de crecimiento al aplicar estos tratamientos. En este trabajo, las plantas sometidas a EH mostraron una disminución tanto del LRP, NRL, LRL, viéndose reflejado esto en la SR, tanto en plantas nativas como mutantes *atg* (Tabla 1.). Asimismo, no se observaron diferencias significativas en los efectos del EH sobre las variables estudiadas entre los genotipos nativo y mutantes (Tabla 1.). Estos resultados podrían deberse a que el ambiente óptimo que supone una placa de cultivo sumado de la juventud de las plantas (7 días), no habría permitido expresar un fenotipo diferencial en los mutantes. No obstante, se observó acumulación de autofagosomas en raíces de plantas sometidas a EH (Figura 4.), lo que sugiere una participación de autofagia en respuesta al mencionado estrés. Por otro lado, observamos que episodios diarios de ET tuvieron un claro efecto sobre la arquitectura radical afectando negativamente el desarrollo de raíces laterales, tanto en plantas nativas como mutantes *atg* (Tabla 2.). Dicho efecto resultó más agudo sobre los mutantes *atg* y significativamente diferente a las plantas nativas, generando disminuciones de entre un 95% y un 98% en el NRL y LRL con respecto a las condiciones control (Tabla 1.). Sin embargo, no se observó la formación de autofagosomas en las raíces de las plantas sometidas a ET (Figura 4.).

Los resultados de Western Blot y microscopia de fluorescencia muestran una clara activación del flujo autofágico ante condiciones de EH a varios tiempos tanto en hoja como en raíz (Figura 3 y 4.) e incluso a una presión osmótica menor a la demostrada por los trabajos previos de Liu (2009). Por otro lado, Jung (2016) no logra evidenciar por microscopía la presencia de autofagosomas al tratar plántulas con manitol y plantea que los resultados observados en los Western Blot se debían en realidad a una inhibición de la degradación de la proteína fusión debido a cambios en la vacuola generados por el estrés

osmótico. Estos cambios, estabilizarían GFP libre simulando un aumento del flujo autofágico ante EH. Nosotros logramos la observación directa de autofagosomas tanto en hojas como en raíces de plantas de 2 semanas y plántulas enteras de 2 semanas respectivamente con 150mM de manitol (Figura 3 y 4.). Además, resultados no publicados del grupo de trabajo demuestran que el análisis de flujo autofágico mediante western blot de GFP es una metodología más sensible que la observación de autofagosomas por microscopia. Por lo tanto nuestros resultados reafirman la activación de la autofagia en tejidos foliares ante condiciones de EH a diferentes tiempos.

Según los resultados obtenidos por Liu (2009), inhibidores de la NADPH oxidasa no logran bloquear la inducción de autofagia bajo estrés osmótico causado por manitol. La NADPH oxidasa es un complejo clave en la inducción de autofagia en varios tipos de estreses (por ej: salino o hambreado de nitrógeno). Estos autores plantean que existiría una vía dependiente y otra independiente del complejo NADPH oxidasa para la inducción de autofagia bajo condiciones de estrés. En plantas existen dos vías principales de respuesta a estrés osmótico, una dependiente de ABA y otra independiente de la hormona (Chinnusamy V. et al., 2004), por lo que ABA podría ser un importante mediador de esta vía independiente de EAO. Además, estudios implican a la autofagia selectiva en el proceso de degradación de ciertas proteínas de membrana inducidas transcientemente por estrés abiótico (Vanhee and Batoko, 2011). Si bien en el trabajo de Liu (2009) se indica que tratamientos con la hormona ABA no generan activación de autofagia, en este trabajo se puede ver una clara formación de autofagosomas en plantas transgénicas que expresan GFP-ATG8a en respuesta a diferentes concentraciones de la hormona. Esto último abre puertas a estudios para conocer más a fondo la regulación diferencial de autofagia ante diferentes condiciones de estrés.

Los resultados de Western Blot obtenidos bajo ET, muestran una activación transitoria del flujo autofágico (Figura 5.). El flujo aumenta a tiempo cortos (2 hs), pero disminuye a tiempos prolongados (4 a 8 h). Esto complementa lo obtenido por Zhou y colaboradores (2013), quienes reportaron inducción de la expresión de genes *Atg* y de la formación de autofagosomas en respuesta a ET. Además, al ser realizados nuestros estudios en hojas se confirma la activación del proceso bajo ET en órganos fuentes importantes en la

removilización de nutrientes a sumideros. Además, resulta interesante en destacar que bajo ET, contrariamente a lo observado bajo EH, no se observaron autofagosomas en raíz (Figura 4.). Esto abre puertas a futuros análisis relacionados a la activación órgano específico o sistémico de la autofagia. En este sentido, trabajos previos han postulado un rol para autofagia en el control de calidad de los peroxisomas en forma específica de órganos (Yoshimoto et al., 2014).

Trabajos previos demuestran el rol clave del proceso autofágico en el manejo de nitrógeno a nivel sistémico (Guilboileau et al., 2012; Li et al., 2015) así como su rol a nivel celular en el desmantelado de cloroplastos (~ 75% del N total de la planta) (Ishida et al., 2008). Otros trabajos advierten que la degradación de proteínas como RuBisco durante la senescencia foliar se encuentra fuertemente aumentada por condiciones de estrés ambiental (Jiang et al., 1999), por lo que resulta de gran interés conocer el efecto del ET y EH sobre variables de calidad y rendimiento de las semillas de *Arabidopsis* mutantes *atg*. Bajo esta premisa, resultó de vital importancia la caracterización del crecimiento reproductivo de plantas de *Arabidopsis thaliana* tanto nativas como mutantes *atg* para lograr estimar el período de llenado de las semillas y determinar el período de aplicación de los estreses. *Arabidopsis* es una planta de crecimiento reproductivo indeterminado, por lo que los períodos de determinación del número de semillas y el llenado de las mismas no se encuentran separados discretamente, si no que forman parte de un continuo. Una manera de lograr cierta separación de ambos, es con un sistema experimental limitado, en donde las plantas llegarían pronto a una meseta en la generación de nuevas silicuas, suponiendo desde allí el período netamente de llenado de semillas. Asimismo, cuando se trabaja con genotipos diferentes (nativas y mutantes) es de fundamental importancia tener en cuenta las diferencias fenológicas a la hora de aplicar condiciones de estrés y comparar sus efectos. Si bien diferentes trabajos han demostrado modificaciones en el ciclo de vida de las plantas mutantes *atg*, destacando su fenotipo de senescencia foliar temprana (Hanaoka et al., 2002; Xiong et al., 2005), no se han reportado efectos sobre la fenología del crecimiento reproductivo. Como era esperado, existen diferencias en el crecimiento reproductivo de las mutantes *atg* en comparación a las nativas, presentando una menor cantidad de silicuas, así como un cese en la producción de las mismas a tiempos más cortos que el genotipo nativo (Figura 7 A.) menores pesos de silicuas (Figura 7 B.) y un caída más rápida de la eficiencia

fotosintética del fotosistema II en las hojas 5 y 6 en el tiempo (Figura 7 C y D.). Estas variables permitieron establecer que el momento para la aplicación de los estreses sería a partir del día 46 DDS para las mutantes y del día 53 DDS para las nativas.

Luego de la cosecha, al medir el peso de 1000 semillas como un indicador del rendimiento, se observó que las plantas nativas en condiciones control correspondían a las semillas más pesadas. Sin embargo, estas no presentan diferencias tan marcadas con las mutantes en las mismas condiciones como lo presentado por Di Bernardino (2018). Para los 3 genotipos en las 3 condiciones, las diferencias fueron muy pequeñas notándose gran homogeneidad (Figura 8.). Probablemente el peso de semillas no presenta cambios tan evidentes bajo diferentes condiciones como ocurre en plantas de grano, por ejemplo soja. Igualmente, bajo condiciones de estrés se observa una tendencia de reducción en el contenido de proteína en las semillas acompañada de mayores concentraciones en RV, lo que indicaría defectos en los procesos de degradación/removilización. Asimismo, los niveles estables de proteína en grano en la planta nativa bajo condiciones de estrés podría estar compensado por parte de la VS (Figura 9.).

Los resultados obtenidos sobre la calidad de las semillas en genotipos *atg* arrojaron interesantes discrepancias con otros trabajos. Bajo condiciones control, los RV de las plantas nativas concentraron menor cantidad de proteínas que los mutantes *atg*, suponiendo esto una menor removilización por parte de los mutantes (Figura 10 C.). Esto último se ve reflejado en el mayor ICP de RV a semilla de las plantas nativas (Figura 11 A.). En segundo lugar en condiciones control, los mutantes *atg5* acumularon mayores cantidades de proteínas en semillas comparado con las nativas, fenotipo ya descrito por trabajos previos (Guilboileau 2012; Di Bernardino et al., 2018). Llamativamente, no observamos el mismo fenotipo en las mutantes *atg4*, que presentan incluso menores cantidades de proteína que las nativas (Figura 10 A.). Según Di Bernardino (2018) se puede explicar los altos contenidos proteicos en semillas *atg5* por dos razones: la primera es un mayor aborto de semillas (menos semillas mejor alimentadas), y la segunda es que defectos en autofagia habrían limitado la duración de la fijación de C (senescencia acelerada), impidiendo el llenado de las semillas con C y concentrando el N. Según nuestras observaciones, las mutantes *atg4* tenían rosetas muy pequeñas en comparación a las *atg5*, incluso antes de ser sometidas a las

condiciones de estrés (Figura suplementaria 1.). Una senescencia acelerada permitiría un desbalance en los contenidos de C y N de las semillas en el caso de las mutantes *atg5*. Por el contrario, cuando el tamaño de las rosetas es tan reducido (alto déficit fotosintético), incluso para el transporte de N se necesitarían estructuras carbonadas inexistentes que impedirían la correcta alimentación de las semillas. Esto explicaría lo observado en las semillas de las mutantes *atg4* y su menor índice ICP_{PE} (Figura 11 C.). Los resultados más novedosos bajo condiciones control, se encuentran en las concentraciones de proteína en las VS, siendo estas uno de los últimos tejidos maternos en contacto con las semillas. Las mutantes *atg5* poseen las menores concentraciones de proteína en VS (Figura 10 B.) y los mayores ICP de vaina a semilla (Figura 11 B.), lo cual correlaciona con la mayor acumulación de proteína en semilla en las plantas *atg5*. Paradójicamente, esto no se correlaciona con lo demostrado por Di Bernardino (2018), en donde muestran mayor expresión de ATG8F en tejidos maternos en contacto con la semilla.

En términos generales, bajo condiciones de estrés se observó una reducción en las diferencias en el ICP entre los diferentes genotipos (Figura 11. D-I). Asimismo, cabe destacar que nuestros experimentos se han realizado bajo condiciones nutricionales óptimas, donde los contenidos de nitrógeno en el sustrato nunca fueron una limitante. Los mutantes *atg* compensan la falta de nitrógeno proveniente de la removilización de las hojas de roseta, asimilando nitrógeno exógeno durante la fase reproductiva y el desarrollo de la semilla (Masclaux-Daubresse et al., 2010). Por lo que este contexto nutricional podría haber llevado a una compensación en los mutantes *atg*. Sería interesante combinar experimentos de EH, ET y condiciones de deficiencia de nitrógeno. Además, en los cereales está bien aceptado que la senescencia se encuentra directamente asociada con altos índices de cosecha en semillas y altos índices de removilización de nitrógeno (Kichey et al., 2007). Sin embargo, estudios muestran que en las plantas de *Arabidopsis*, la correlación entre la eficiencia en la removilización de nitrógeno para la producción de semillas y la senescencia de la planta no es tan obvia como en cereales (Diaz et al., 2008; Masclaux-Daubresse y Chardon, 2011). Esto explicaría los pocos cambios observados en el rendimiento de las semillas de *Arabidopsis* (peso y calidad).

Conclusión

Este trabajo, suma nuevas evidencias a la participación del proceso autofágico en las respuestas frente a condiciones de EH y ET. Asimismo, se reporta una activación diferencial del proceso dependiente del órgano, abriendo puertas para nuevos estudios en cuanto a la modulación específica de autofagia y los componentes de su señalización, como por ejemplo la hormona ABA. Por otro lado, todavía quedan interrogantes por responder en la interacción entre autofagia y la removilización de nutrientes a semillas bajo ET y EH.

Bibliografía

Barnabas B, Jager K, Feher A. 2008. The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant Cell Environ.* 31, 11–38.

Boyer JS, Westgate ME. 2004. Grain yield with limited water. *J. Exp. Bot.* 55, 2385–2394.

Chiba A, Ishida H, Nishizawa NK, Makino A, Mae T. 2003. Exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. *Plant and Cell Physiology* 44: 914–921.

Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu JK. 2004. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J Exp Bot*; 55:225-36.

Das K, Roychoudhury A. 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front Environmental Science* 10.3389

Di Berardino J, Marmagne A, Berger A, Yoshimoto K, Cueff G, Chardon F, Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M. 2018. Autophagy controls resource allocation and protein storage accumulation in *Arabidopsis* seeds. *Journal of Experimental Botany* Vol. 69, No. 6 pp. 1403–1414.

Foyer H, Graham N. 2011. Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox. *Plant Physiology* 155 (1) 2.

Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A. 2017. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO Journal* 36, 1811-1836.

García-Ferris C, Moreno J. 1994. Oxidative modification and breakdown of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase induced in *Euglena gracilis* by nitrogen starvation. *Planta* 193: 208–215.

Gooding MJ, Ellis RH, Shewry PR, Schofield JD. 2003. Effects of restricted water availability and increased temperature on the grain filling, drying and quality of winter wheat. *J. Cereal Sci.* 37, 295–309.

Guiboileau A, Yoshimoto K, Soulay F, Bataille MP, Avice JC, Masclaux-Daubresse C. 2012. Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-plant level under both limiting and ample nitrate conditions in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 194, 732-740.

Guiboileau A, Yoshimoto K, Soulay F, Bataille MP, Avice JC, Masclaux-Daubresse C. 2012. Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-plant level under both limiting and ample nitrate conditions in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 194(3):732-40

Hafren A, Macia JL, Love AJ, Milner JJ, Drucker M, Hofius D. 2017. Selective limits of cauliflower mosaic virus infection by NBR1-mediated targeting of viral capsid protein and particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 114, E2026-E2035.

Haxim Y, Ismayil A, Jia Q, et al. 2017. Autophagy functions as an antiviral mechanism against geminiviruses in plants. *Elife* 6.

Ishida H, Nishimori Y, Sigisawa M, Makino A, Mae T. 1997. The large subunit of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase / oxygenase is fragmented into 37-kDa and 16-kDa polypeptides by active oxygen in the lysates of chloroplasts from primary leaves of wheat. *Plant and Cell Physiology* 38: 471–479.

Ishida H, Yoshimoto K, Izumi M, Reisen D, Yano Y, Makino A, Ohsumi Y, Hanson MR, Mae T. 2008. Mobilization of Rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiology* 148: 142-155.

Izumi M, Wada S, Makino A, Ishida H. 2010. The autophagic degradation of chloroplasts via Rubisco-containing bodies is specifically linked to leaf carbon status but not nitrogen status in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 154: 1196–1209.

Jiang WB, Lers A, Lomaniec E, Aharoni N. 1999. Senescence-related serine protease in parsley. *Phytochemistry* 50 377-382.

Klionsky DJ (2005) Autophagy. *Curr Biol* 15: R282–283.

Le Bars R, Marion J, Le Borgne R, Satiat-Jeunemaitre B, Bianchi MW. 2014. ATG5 defines a phagophore domain connected to the endoplasmic reticulum during autophagosome formation in plants. *Nature Communications* 5, 4121.

Lenz HD, Haller E, Melzer E, et al. 2011. Autophagy differentially controls plant basal immunity to biotrophic and necrotrophic pathogens. *Plant Journal* 66, 818-830.

Li F, Chung T, Pennington JG, Federico ML, Kaeppler HF, Kaeppler SM, Otegui MS, Vierstra RD. 2015. Autophagic recycling plays a central role in maize nitrogen remobilization. *Plant Cell* 27, 1389-1408.

Liu Y M, Bassham D C. Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annual Review of Plant Biology*, 2012, 63(1): 215–237

Liu Y M, Xiong Y, Bassham D C. 2009. Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy*, 5(7): 954–963 23.

Liu Y, Xiong Y, Bassham DC. 2009. Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy* 5, 954-963

Liu YM, Bassham DC. 2012. Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1): 215–237.

Lu T, Finkel T. 2008. Free Radicals and senescence. *Experimental Cell Research*. Volume 314, Issue 9. 1918-1922.

Martinez DE, Costa ML, Guamet JJ. 2008. Senescence-associated degradation of chloroplast proteins inside and outside the organelle. *Plant Biology* 10: 5–22.

Masclaux-Daubresse C, Valadier MH, Brugiére N, Morot-Gaudry JF, Hirel B. 2000. Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* 211: 510–518.

Masclaux-Daubresse C, Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A. 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* 105:1141-1157

Massey AC, Zhang C, Cuervo AM. 2006. Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr Top Dev Biol* 73:205–235

Matile P. 1992. Chloroplast senescence. In: Baker NR, Thomas H, eds. *Crop photosynthesis: spatial and temporal determinants*. Amsterdam: Elsevier, 413–440.

Michaeli S, Galili G, Genschik P, Fernie A R, Avin-Wittenberg T. Autophagy in plants—what’s new on the menu? *Trends in Plant Science*, 2016, 21(2): 134–144

Michaeli S, Galili G, Genschik P, Fernie AR, Avin-Wittenberg T. 2016. Autophagy in plants—what’s new on the menu? *Trends in Plant Science*, 21(2): 134–144.

Peoples M, Dalling M. 1988. The interplay between proteolysis and amino acid metabolism during senescence and nitrogen reallocation. *Senescence and aging in plants*. San Diego: Academic Press, 181–217.

Pérez-Pérez ME, Lemaire SD, Crespo JL. 2012. Reactive Oxygen Species and Autophagy in Plants and Algae. *Plant physiology* 160, 156–64

Peterson LW, Huffaker RC. 1975. Loss of ribulose 1, 5-diphosphate carboxylase in proteolytic activity during senescence of detached primary barley leaves. *Plant Physiology* 55, 1009–1015.

Porter JR, Gawith M. 1999. Temperature growth and development of wheat: a review. *Eur. J. Agron.* 10, 23–36.

Prasad PVV, Staggenborg SA, Ristic Z. 2008. Impacts of drought and/or heat stress on physiological, developmental, growth and yield processes of crop plants. *Advances in Agricultural Modeling Series 1*, 301–355.

Prins A, van HeerdenPDR, Olmos E, Kunert KJ, Foyer CH. 2008. Cysteine proteinases regulate chloroplast protein content and composition in tobacco leaves: a model for dynamic interactions with ribulose-1,5-biphosphate carboxylase / oxygenase (Rubisco) vesicular bodies. *Journal of Experimental Botany* 59: 1935–1950.

Reumann S, Voitsekhovskaja O, Lillo C. 2010. From signal transduction to autophagy plant cell organelles: lessons from yeast and mammals and plant-specific features. *Protoplasma* 247: 233–256.

Sah SK, Reddy KR, Li J. 2016. Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants, *Front. Plant Sci.* 7 571.

Saini HS, Aspinall D. 1982. Abnormal sporogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by short periods of high temperature. *Ann. Bot.* 49, 835–846.

Nakamura S & Izumi M. 2018. Chlorophagy is *ATG* gene-dependent microautophagy process, *Plant Signaling & Behavior*, 10.1080

Slavikova S, Ufaz S, Avin-Wittenberg T, Levanony H, Galili G. 2008. An autophagy associated ATG8 protein is involved in the responses of *Arabidopsis* seedlings to hormonal controls and abiotic stresses. *Journal of Experimental Botany* 59, 4029-4043.

Suttangkakul A, Li F, Chung T, Vierstra RD. 2011. The ATG1/ATG13 protein kinase complex is both a regulator and a target of autophagic recycling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 3761-3779.

Tsugane K, Kobayashi K, Niwa Y, Ohba Y, Wada K, Kobayashi H. 1999. A Recessive Arabidopsis Mutant That Grows Photoautotrophically under Salt Stress Shows Enhanced Active Oxygen Detoxification. *The Plant Cell*, 11 (7) 1195-206.

Tsukada M, Ohsumi Y. 1993. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 333, 169-174.

Vanhee C, Batoko H. 2011b. Autophagy involvement in responses to abscisic acid by plant cells, *Autophagy*. 7655–656.

Wada S, Ishida H, Izumi M, Yoshimoto K, Ohsumi Y, Mae T, Makino A. 2009. Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiology* 149: 885–893.

Wang F, Guo ZX, Li HZ, Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., and Elazar, Z. (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of ATG4. *EMBO J*26, 1749–1760.

Wang F, Onac E, Zhou J, Xia X J, Shi K, Yu J Q, Zhou Y H. 2016. Phytochrome A and B function antagonistically to regulate cold tolerance via abscisic acid-dependent jasmonate signaling. *Plant Physiology*, 170(1): 459–471.

Wang P, Sun X, Wang N, Jia X, F. M. 2016. Ectopic expression of an autophagy associated *MdATG7b* gene from apple alters growth and tolerance to nutrient stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1-15.

Wang Y, Cai S, Yin L, Shi K, Xia X, Zhou Y, Yu J, Zhou J. 2015a. Tomato HsfA1a plays a critical role in plant drought tolerance by activating *ATG* genes and inducing autophagy. *Autophagy* 11, 2033-2047.

Wittenbach VA. 1978. Breakdown of ribulose biphosphate carboxylase and change in proteolytic activity during dark-induced senescence of wheat seedlings. *Plant Physiology* 62, 604–608.

Xiong, Y, Contento, AL, Bassham, DC 2007a. Disruption of autophagy results in constitutive oxidative stress in Arabidopsis. *Autophagy* 3, 257–258.

Xiong, Y, Contento, AL, Nguyen, PQ, Bassham, DC. 2007b. Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in Arabidopsis. *Plant Physiology* 143, 291–299.

Yang XC, Srivastava R, Howell SH, Bassham DC. 2016. Activation of autophagy by unfolded proteins during endoplasmic reticulum stress. *Plant Journal*, 85(1): 83–95 70.

Zhou J, Wang J, Cheng Y, Chi Y J, Fan B F, Yu J Q, Chen Z X. 2013. NBR1-mediated selective autophagy targets insoluble ubiquitinated protein aggregates in plant stress responses. *PLOS Genetics*, 9(1): e1003196.

Zhou J, Wang J, Cheng Y, Chi YJ, Fan B, Yu JQ, Chen Z. 2013. NBR1-mediated selective autophagy targets insoluble ubiquitinated protein aggregates in plant stress responses. *PLoS Genetics* 9, e1003196.

Zhou J, Wang J, Yu JQ, Chen Z. 2014a. Role and regulation of autophagy in heat stress responses of tomato plants. *Frontiers in Plant Science* 5, 174.

Zhou J, Yu JQ, Chen Z. 2014b. The perplexing role of autophagy in plant innate immune responses. *Molecular Plant Pathology* 15, 637-645.

Zhu J K. Cell signaling under salt, water and cold stresses. 2001. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(5): 401–406.

Zimmermann P and Zenrgraf U. 2005. Correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Celular and Molecular Biology Letters*. Vol 10 pp 515-534

Figuras Suplementarias



Figura suplementaria 1. Rosetas de plantas de 35 DDS. Figura A. Rosetas de plantas wt. Figura B. Rosetas de plantas *atg5*. Figura C. Rosetas de plantas *atg4*. Las rosetas de las plantas mutantes resultan más pequeñas que las wt. Al comparar las mutaciones entre sí, las rosetas de las *atg4* son de tamaños aun más reducidos que las *atg5*.