



CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

Informe Científico¹

PERIODO ²: 2011-2012

Legajo N°:

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: GUIAMET

NOMBRES: Juan José

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: Gonnet CP: 1897 Tel:

*Dirección electrónica (donde desea recibir información):
jguiamet@fcnym.unlp.edu.ar*

2. TEMA DE INVESTIGACION

**DEGRADACIÓN DE PROTEINAS CLOROPLÁSTICAS Y RECICLADO DE
NITRÓGENO: MECANISMO Y REGULACIÓN**

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: Asistente Fecha: Setiembre 1987

ACTUAL: Categoría: Principal desde fecha: Noviembre 13, 2009

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: Universidad Nacional de La Plata

Facultad: Ciencias Naturales y Museo y Cs. Agrarias y Forestales

Departamento: Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE, CONICET-UNLP)

Cátedra: Fisiología Vegetal (Cs. Naturales)

Otros:

Dirección Particular: Calle: Diag 113 N°: 495

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel: 0221 4236618

Cargo que ocupa: Investigador Principal

¹ Art. 11; Inc. "e" ; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico).

² El informe deberá referenciar a años calendarios completos. Ej.: en el año 2006 deberá informar sobre la actividad del período 1-1-2004 al 31-12-2005.



5. DIRECTOR DE TRABAJOS. No corresponde

.....
Firma del Director (si corresponde)

.....
Firma del Investigador
Fecha 31/ 05 / 2013



6. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.

En el período indicado he continuado con los estudios sobre el mecanismo y regulación de la degradación del aparato fotosintético y he mantenido colaboraciones con otros grupos en el INFIVE.

Las principales actividades que realicé en el período 2011-2012 fueron:

1. A través de una aproximación farmacológica utilizando un inhibidor de proteasas cisteínicas in vivo, aportamos evidencias sobre la participación de las proteasas cisteínicas localizadas en las Vacuolas Asociadas a la Senescencia (VAS) como responsables de la degradación de importantes proteínas cloroplásticas (v.g., Rubisco) durante la senescencia foliar. Estos trabajos son la base de un manuscrito en preparación, no enviado, en 2012.
2. Demostramos que el método de lixiviación de solutos, muy empleado para estimar la estabilidad de membranas en tejidos vegetales, sufre una seria interferencia por la producción de amonio en hojas senescentes. Este trabajo (Rolny et al., 2011), además puso en evidencia la notable acumulación de amonio en hojas senescentes, que estamos investigando y posiblemente constituye una pérdida importante de nitrógeno desde los cultivos a la atmósfera.
3. En colaboración con otro grupo del INFIVE (ver el trabajo Galatro et al., 2013, enviado en 2012) demostramos que los cloroplastos son una fuente importante de óxido nítrico (NO, una importante molécula señal), y que la síntesis cloroplástica de NO depende de la funcionalidad del aparato fotosintético.
4. Junto con la Dra. M.L.Costa investigamos la posibilidad de retrasar la senescencia pos-cosecha de albahaba, un vegetal altamente perecedero, a través de la aplicación de pulsos de luz de baja intensidad. Este trabajo fue enviado a publicar en 2012 (Costa et al., 2013).

Finalmente, he publicado otros trabajos en colaboración con los grupos de fisiología de especies forestales (1 ms.) y de ecofisiología de trigo (2 ms) del INFIVE.

En este período he dirigido o co-dirigido 5 tesis doctorales (en curso), 3 investigadores (CICBA o CONICET), y 2 Profesionales de apoyo de CICBA, y he continuado con la dirección del Instituto de Fisiología Vegetal (CONICET-UNLP).



7. PERIODO (1/1/2011 – 31/12/2012).

PUBLICACIONES.

1. Leguizamón E., Yanniccari M.E., Guiamet J.J. y Acciaresi H. (2011) Growth, gas exchange, and competitive ability of Sorghum halepense populations under different soil water availability. Can. J. Plant Sci 91: 1011-1025.

Abstract

Different studies have determined that environmental variation is a key factor determining the outcome of competition within plant communities. Considering the importance of the resource water in non-irrigated lands of Argentina, the aim was to determine the effects of water deficit on relative growth rate (RGR), root length ratio (RLR), gas exchange and competitive ability of Sorghum halepense populations collected in humid and subhumid regions of the Pampa plains. Under semi-controlled conditions, we compared plants of seven S. halepense populations subjected to three different levels of soil water availability during 3wk: Field capacity (FC), 75% FC and drought (D). Moreover, total above-ground biomass of S. halepense and Zea mays plants growing together in competition was determined. It was found that those plants collected in humid or subhumid regions had greater RGR, gas exchange and RLR under FC and D, respectively. Zea mays achieved a higher competitive ability than S. halepense under FC, but plants collected in humid regions out-competed the crop when grown at 75% FC. Sorghum halepense plants collected in subhumid regions dominated under D. Root length ratio may have favored the maintenance of high levels of gas exchange and also high RGR, thus contributing to sustain a competitive hierarchy under soil water stress.

En este trabajo participé en la discusión de la idea original, el diseño y la planificación de los experimentos, y en la revisión del manuscrito.

2. Rolny N.S., Costa M.L., Carrión C.A. y Guiamet J.J. (2011) Is the electrolyte leakage assay an unequivocal test of membrane deterioration during leaf senescence? Plant Physiol. Biochem. 49: 1220-1227

Abstract

The main symptoms of leaf senescence are the degradation of chlorophyll and proteins (which may be accompanied by ammonium accumulation), and an increase of electrolyte leakage (EL), which has been traditionally attributed to disruption of cell membranes. The aim of this study was to determine if ammonium efflux contributes to the increase EL in senescing barley leaves. During senescence of detached leaves the increase of EL correlated with ammonium leakage ($r^2 = 0.82$) and ammonium content in tissues ($r^2 = 0.73$), but not with K^{1+} leakage ($r^2 = 0.23$). Although lower amounts of ammonium accumulated in senescing attached leaves, again changes in EL paralleled



ammonium accumulation. EL increased early during senescence even though ion leakage was selective (leaves leaked proportionally more ammonium than K^{1+}), and membranes appeared intact as judged from staining with the cell impermeant stain propidium iodide. Detached leaves maintained their capacity to regreen after 3 days of senescence-aceleration in darkness, i.e., membrane integrity was not severely compromised. During the early stages of senescence, EL increases due to ammonium accumulation (possibly resulting from protein degradation) even if there is no massive disruption of cell membranes. Therefore, increased EL in senescing leaves is not an unequivocal symptom of cell membrane damage.

En este trabajo participé en la discusión de la idea original, el diseño y la planificación de los experimentos, y en el análisis de los resultados y redacción del manuscrito.

3. Faustino L.I., Graciano C., Gortari F. y Guiamet J.J. (2011) ¿Cómo afectan los nutrientes el uso del agua en plantas leñosas? *Ecología Austral* 21: 233-250.

En esta revisión se analiza la información disponible sobre los mecanismos mediante los cuales los nutrientes pueden afectar el uso de agua que realizan las plantas. Puede modificarse el consumo de agua (consumo total por planta, tasa transpiratoria, eficiencia del uso del agua, etc.), las relaciones hídricas (ajuste osmótico, modificaciones en el potencial hídrico, modificaciones en el control estomático, etc) o las características hidráulicas de las plantas (conductividad hidráulica de raíces, tallo, ramas). Se recopiló la información disponible desde los niveles subcelular, órgano, planta entera y población. Se concluye que la disponibilidad de nutrientes afecta el uso del agua a través de modificaciones en la arquitectura hidráulica en cada nivel de organización, que pueden resultar en diferente consumo de agua a nivel de individuo y población. La variedad de modificaciones posibles hace que resulte difícil predecir el resultado del cambio en la disponibilidad de nutrientes en el uso del agua, ya que además de la interacción entre los recursos abióticos (agua y cada nutriente) hay que considerar las diferencias genotípicas en la capacidad de respuesta.

En este trabajo participé en la discusión de la idea original, y en la revisión de una versión avanzada del manuscrito.



4. Maydup, M.L., Antonietta, M., Guiamet, J.J., y Tambussi, E.A. (2012) The contribution of green parts of the ear to grain filling in old and modern cultivars of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Evidence for genetic gains over the past century. Field Crops Res. 134: 208-215.

Abstract

Green parts of the ear (e.g., glumes, and particularly the awns) are recognized as sources of photosynthates in C_3 cereals. However, the contribution of ear photosynthesis to grain filling in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is less known compared with other sources of assimilates (e.g., flag leaf photosynthesis, C stem retranslocation). There is no information whether ear contribution has changed with genetic improvement and it is not known clearly the role of each part of the ear (in particular awns) in grain filling. In this paper we analyze the ear contribution to grain filling of bread wheat in two experiments under field conditions in La Plata (Argentina): (i) a retrospective study including cultivars released in Argentina from 1920 to 2008, and (ii) an experiment with six modern cultivars differing in awn size.

In both experiments we employed de-awning and ear shading (with an aluminum foil) treatments performed after anthesis, in intact and defoliated plants. Grain weight per ear was measured and the ear contribution to grain filling was calculated as: $[(GW_{ear} \text{ of non shaded ear} - GW_{ear} \text{ of shaded ear}) * 100 / GW_{ear} \text{ of non shaded ear}]$, where GW_{ear} is total grain weight per ear.

In the retrospective study we found an increase of the photosynthetic ear contribution in modern cultivars, which was higher in defoliated than intact plants. In the modern cv. Taita (released in 2008) the grains of distal positions (G3) in the central spikelets were more affected than proximal grains (G1 or G2) by treatments of defoliation, de-awning and/or ear shading. Ear contribution was strong and negatively correlated with plant height ($r^2 = 0.62$ and 0.71 in intact and defoliated plants, respectively) and especially with stem dry weight ($r^2 = 0.75$ and 0.80 in intact and defoliated plants respectively). Dry matter translocation efficiency (DMT_e) did not change consistently with year of release of the cultivars. However, the contribution of preanthesis stem assimilates to grain yield (CPA, i.e. the ratio of stem mobilized reserves to GW_{ear}) clearly decreased in more modern cultivars.

The correlation of ear contribution with awn size was rather low in this retrospective study, although this could be explained by the low variability in awn size in the ten cultivars of the historical series. In the analysis of six modern cultivars differing in awn size we found a high correlation between fresh weight of awns per spikelet and photosynthetic ear contribution, at least in intact plants ($r^2 = 0.83$); in defoliated plant the correlation was lower ($r^2 = 0.52$).

In summary, genetic improvement seems to have increased photosynthetic ear contribution to yield, associated with the decrease in stem biomass of semi-dwarf modern cultivars. Although we found a correlation between awn size and ear contribution in six modern cultivars, awn size seems to explain only partially the increase in ear contribution in our historical series.

En este trabajo participé en la discusión de la idea original, en el análisis de los datos y en la revisión del manuscrito.



5. Maydup, M.L., Graciano C., Guiamet, J.J., y Tambussi, E.A (2012) Analysis of early vigour in twenty modern cultivars of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Crop Pasture Sci. 63: 987-996.

Fast development of seedling leaf area is a relevant trait in order to increase early resources acquisition. The use of semi dwarf genotypes of wheat has decreased early vigour of modern cultivars. We studied early vigour of twenty cultivars cropped in Argentina, and our main objectives were: (i) to analyse the genotypic variability in early vigour (ii) to study morphological traits that can be good indicators of early vigour, such as seed mass, leaf width and specific leaf area and (iii) to analyse if increased dry mass allocation to roots impacts negatively on early vigour. Experiments with non size-selected and size-selected seeds were carried out in a greenhouse. In addition, a field trial was carried out in order to test the reliability of the greenhouse results. Seeds mass was the main parameter related to early vigour. However, results from the experiment with seeds selected by size (45-50 mg per seed) showed that seed mass *per se* only partially explains early vigour, since a significant coefficient of determination was observed between the seedling leaf area of each cultivar in both experiments (i.e., with randomly chosen or size-selected seeds).

We observed high coefficient of determination between net assimilation rate (NAR) and changes in the ranking of early vigour of the cultivars with time after transplant. Root biomass was positively correlated with leaf area, indicating that both traits were not mutually exclusive.

We built simple models by multiple regression to predict early vigour, including some parameters easy to measure. Seed mass and leaf width taken together showed better fit than seed mass or leaf width alone. We found a significant coefficient of determination between early vigour of greenhouse and field experiments, thus, screening for early vigour under semi-controlled conditions may be feasible.

En este trabajo participé en la discusión de la idea original, en el análisis de los datos y en la revisión del manuscrito.

TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN.



TRABAJOS ENVIADOS PARA SU PUBLICACION (en 2012).

- 1 Galatro A, Puntarulo S., Guiamet J.J. y Simontacchi M. (2013) Chloroplast functionality has a positive effect on nitric oxide level in soybean cotyledons. *Plant Physiol. Biochem.* 66: 26-33.

The sub-cellular localization of NO generation in soybean cotyledons, and the relationship between NO synthesis and *in vivo* chloroplast performance were studied. Employing the NO probe 4-aminomethyl-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM DA) and fluorescence microscopy, a strongly punctuated fluorescence was detected in mesophyll cells. The co-localization of DAF-FM and chlorophyll fluorescence, in confocal laser microscopy images, indicated the presence of NO in the chloroplasts. NO visualization was dependent on light, seedling age, and chloroplast function throughout cotyledons lifespan. The addition of herbicides with action in chloroplasts (DCMU and paraquat) dramatically reduced the quantum yield of photosystem II (ϕ_{PSII}), and lead to images with absence of punctuated green fluorescence. Moreover, electronic paramagnetic resonance signals corresponding to NO-spin trap adduct observed in cotyledon homogenates decreased significantly by the treatment with herbicides, as compared to controls.

Neither chloroplast function nor NO content were significantly different in cotyledons from plants growing in the presence of ammonium or nitrate as the nitrogen source.

These findings suggest that chloroplasts are organelles that contribute to NO synthesis *in vivo*, and that their proper functionality is essential for maintaining NO levels in soybean cotyledons.

En este trabajo participé en la discusión de la idea original, el diseño y la planificación de algunos de los experimentos, la ejecución de algunos de los experimentos y en el análisis de los resultados y redacción del manuscrito.

- 2 Costa ML, Millan Montano Y, Carrion C, Rolny NS, Guiamet JJ (2013) Application of low intensity light pulses to delay postharvest senescence of *Ocimum basilicum* leaves. *Postharvest Biol. Technol.* 86: 181-191.

Fresh basil (*Ocimum basilicum* L.) is a highly perishable leafy green vegetable with a storage life of 4-5 days at room temperature. Exposure of basil leaves to temperatures below 12 °C during storage results in chilling injury; therefore, refrigeration cannot be used to extend postharvest life of basil. Typically, leafy vegetables are stored in darkness or extremely low irradiances. Darkness is known to induce senescence, and the initial phase of senescence is reversible by exposure to light. In this work, we studied the effects of low-intensity white light pulses at room temperature on postharvest senescence of basil leaves. Daily exposure for 2 h to 30-37 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of light was effective to delay postharvest senescence of basil leaves. Chlorophyll and protein levels decreased, ammonium accumulated and leaves developed visual symptoms of deterioration (darkening) during storage in darkness. Light pulses reduced the intensity of these senescence symptoms. The photosynthesis light compensation point of basil leaves was 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i.e., higher than the intensity



used in this study, and the effect of treatment with red light was the same as with white light, while far red light was ineffective. Light pulses exerted a local effect on chlorophyll loss, but the effect on protein degradation was systemic (i.e., spreading beyond the illuminated parts of the leaf blade). The results of this study indicate that daily treatment during 2 h with low intensity light ($30\text{--}37\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ every day) during storage at $20\ ^\circ\text{C}$ is an effective treatment to delay postharvest senescence of basil leaves. The delay of postharvest senescence by low intensity light pulses seems to be mediated by phytochrome, and it is systemic for protein, and partially systemic for chlorophyll degradation.

En este trabajo participé en la discusión de la idea original, el diseño y la planificación de algunos de los experimentos, y en el análisis de los resultados y redacción del manuscrito.

COMUNICACIONES.

1. Hollmann J, Carrión CA, Matros A, Gregersen PL, Mock H-P, Guamet JJ, Krupinska K (2011) Identification of a cysteine protease in senescent barley leaves. The 1st International Conference on Plant Proteases, Hemavan, Suecia, 10-14 de abril.
2. Rolny N, Costa ML, Ruiz M, Zucca C, Guamét JJ (2012) Efecto del déficit hídrico por sequía sobre el patrón de acumulación de amonio durante la senescencia de hojas de cebada. DS6. XXIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Mar del Plata, 17-20 de setiembre.
3. Galatro A, Puntarulo S, Guamét JJ, Simontacchi M (2012) Nitric oxide generation in soybean cotyledons is dependent on chloroplast function. DS16. XXIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Mar del Plata, 17-20 de setiembre.
4. Fanello DD, Guamet JJ, Bartoli CG (2012) Variaciones de la actividad mitocondrial radicular durante la senescencia inducida en *Arabidopsis thaliana*. DS28. XXIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Mar del Plata, 17-20 de setiembre.
5. Carrion CA, Mohr C, Costa ML, Humbeck K, Guamet JJ (2012) La expresión de SAG12 se correlaciona con la aparición de "Vacuolas asociadas a la senescencia" en *Nicotiana tabacum*. DS32. XXIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Mar del Plata, 17-20 de setiembre.
6. Antonietta M, Girón P, Costa ML, Guamet JJ (2012) Senescencia foliar y rendimiento en híbridos de maíz (*Zea mays* L.) frente a variaciones en el nitrógeno disponible. EC39. XXIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Mar del Plata, 17-20 de setiembre.
7. Maydup ML, Antonietta M, Guamet JJ, Tambussi EA (2012) Contribución fotosintética de la espiga de trigo pan (*Triticum aestivum* L.) al llenado de granos: cambios con la mejora. EC58. XXIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Mar del Plata, 17-20 de setiembre.



INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS. No consigna

8. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.

DESARROLLOS TECNOLÓGICOS.

No consigna

PATENTES O EQUIVALENTES.

No consigna

PROYECTOS POTENCIALMENTE TRANSFERIBLES, NO CONCLUIDOS Y QUE ESTAN EN DESARROLLO.

No consigna

OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES

No consigna

9. SERVICIOS TECNOLÓGICOS.

Servicio de ensayo de los efectos del producto "VLV" sobre la tolerancia a la sequía en soja, trabajo realizado para la empresa SYNGENTA S.A.

**10. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:
DOCENCIA**

DIVULGACIÓN

Divulgación para alumnos del último año del Colegio Nacional de La Plata, tema: "Cómo se estudian las plantas", 30 de octubre de 2012.

11. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES.

Investigadores:

1. Dra. María Lorenza Costa - Investigador Asistente CONICET desde 31/3/2008
2. Dra. Dana E. Martínez - Investigador Asistente CONICET desde 03/2008
3. Dr. Horacio Acciaresi - Investigador Asistente CICBA desde 13/7/06.

Personal de Apoyo

1. Lic. Laura Almaraz, Profesional CICBA
2. Ing Ftal. Fabio Achinelli, Profesional CICBA

Becarios

1. Lic. Cristian Carrión, Becario Doctoral tipo II CONICET (01/04/2011 – 31/03/2013)
3. Lic. Mariana Antonietta, Becaria Doctoral tipo II CONICET (01/04/2011 – 31/03/2013)
4. Lic. María Lujan Maydup, Becaria Doctoral tipo II CONICET (co-director) (01/04/2001– 31/03/2013)
5. Lic. Diego D. Fanello, Becario de Estudio CICBA (desde 01/04/2012 -)

12. DIRECCION DE TESIS.

1. Bioq. Facundo Gomez - Director de tesis doctoral "Regulación del inicio de la degradación de clorofila", Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, aprobada en marzo de 2012. Calificación: Sobresaliente.



**Comisión de
Investigaciones Científicas**

Gobierno de la Provincia
de Buenos Aires

2. Lic. Cristian Carrión – Director de la tesis doctoral “Vacuolas asociadas a la senescencia: participación en la degradación de proteínas fotosintéticas e interacción con la vía autofágica”, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, en curso en 2011-2012.

3. Lic. María Lujan Maydup – Director de la tesis doctoral “Contribución de la fotosíntesis de la espiga al rendimiento de trigo pan (*Triticum aestivum*) en condiciones de estrés hídrico post-antesis, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, en curso en 2011-2012.

4. Lic. Mariana Antonietta – Director de la tesis doctoral “Impacto de la senescencia foliar sobre la producción de fotoasimilados y el rendimiento de maíz (*Zea mays* L.) bajo condiciones de estrés abiótico”, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, en curso en curso en 2011-2012.

5. Lic. Diego D. Fanello - Co-director de la tesis doctoral "Cambios funcionales y estructurales en las mitocondrias durante la senescencia de hojas y raíces", Facultad de Ciencias Naturales y Museo, en curso en 2011.2012.

4. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS.

1. Expositor en la XXIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Mar del Plata, 17-20 de setiembre.

5. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.

6. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO.

FONCYT – PICT 00784 - \$ 265799,⁰⁴ – 2008-2011.

7. OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

8. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.

9. ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA.

1. Director del Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), por concurso, Resolución conjunta CONICET N° 1390 – UNLP N° 25, 1/6/2009.

10. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.

1. Dictado del curso de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata. Dedicación simple (9 hs semanales, equivalentes al 20% de mi dedicación laboral total).

2. Dictado del curso “Resistencia a herbicidas”, Programa de Magister Scientiae en Protección Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, diciembre de 2012

3. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES.



4. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO.

IDENTIFICACION DE LAS PROTEASAS Y LAS VIAS PROTEOLÍTICAS RESPONSABLES DE LA DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS FOTOSINTÉTICAS DURANTE LA SENESCENCIA EN SOJA Y MAÍZ

El objetivo general de este proyecto es dilucidar los mecanismos involucrados en el desmantelamiento del aparato fotosintético durante la senescencia foliar en soja y maíz. La senescencia foliar es un proceso normal del desarrollo de las plantas caracterizado por la degradación masiva de las proteínas fotosintéticas y la subsecuente exportación del N, P y otros nutrientes a los órganos jóvenes en crecimiento. El reciclaje de N desde las hojas senescentes es un proceso importante en los cultivos, dado que aporta entre 20 y 70% del N cosechado en los granos de trigo (Peoples y Dalling 1988; Gregersen et al. 2008). Sin embargo, la senescencia foliar puede tener un impacto negativo sobre el rendimiento potencial de algunas especies ya que causa una declinación de la capacidad fotosintética del canopeo (en soja los aumentos de rendimiento en cultivares modernos están relacionados con una demora de la senescencia, v.g., Kumudini et al. 2002). Manipular el inicio o el ritmo del desmantelamiento del aparato fotosintético y sus proteínas podría prolongar la actividad fotosintética para aumentar el rendimiento potencial de varios cultivos.

En muchas especies, la degradación de proteínas foliares durante la senescencia está consistentemente asociada con un aumento en la expresión de proteasas cisteínicas (v.g., Donnison et al., 2006, Martinez et al., 2007), que están contenidas mayormente en "Vacuolas Asociadas a la Senescencia" (VAS, Otegui et al. 2005). Un objetivo central de este proyecto es la identificación de proteasas cisteínicas asociadas a la senescencia en soja y maíz empleando una aproximación proteómica, que es posible actualmente dada la reciente secuenciación de los genomas de estas dos especies. Una vez identificadas las proteasas cisteínicas asociadas a la senescencia, se relacionarán los cambios en su expresión (proteína y ARNm) con el ritmo de degradación de los cloroplastos, y se examinará la posible variabilidad genotípica en el ritmo de senescencia y expresión de proteasas. En el caso de maíz (metabolismo fotosintético C4), donde además de las proteínas cloroplásticas puede ser también importante la degradación de proteínas citosólicas en las células del mesófilo (v.g., PEPCasa), se examinará también la participación de otras vías de degradación celular (v.g., mecanismos autofágicos) durante la senescencia.

En este proyecto se empleará una combinación de aproximaciones experimentales que incluyen la identificación proteómica de proteasas, y estudios de la expresión génica e inmunolocalización de proteínas. Se emplearán líneas homocigotas (cultivares en el caso de soja, líneas endocriadas en maíz) y se hará uso de las herramientas biológicas y bioinformáticas (en primer lugar, los genomas secuenciados) en ambas especies. En general el proyecto intenta aprovechar las nuevas herramientas disponibles en soja y maíz para extender el conocimiento sobre el desmantelamiento del aparato fotosintético en estas dos especies.



OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las hipótesis (H) principales de este proyecto, y los objetivos que se desprenden de ellas son:

H1- Durante la senescencia en soja (especie con metabolismo fotosintético C3) la mayor parte de las proteínas foliares son degradadas por proteasas cisteínicas.

Objetivo 1.1.- Identificar proteasas cisteínicas cuya actividad aumenta durante la senescencia en soja.

Objetivo 1.2.- Analizar los cambios en la expresión de las proteasas identificadas en 1.1. tanto en genotipos salvajes como en mutantes *stay green*, y en distintas situaciones que modulan el avance de la senescencia.

Objetivo 1.3.- Analizar la variabilidad en el ritmo de declinación de proteínas fotosintéticas en cultivares comerciales de soja y establecer su relación con los niveles de expresión de las proteasas cisteínicas identificadas en 1.1.

H2- En maíz (especie C4) la degradación de proteínas cloroplásticas de la vaina del haz vascular (v.g., Rubisco) involucra proteasas cisteínicas localizadas en “Vacuolas Asociadas a la Senescencia” (VAS), mientras que las proteínas fotosintéticas citosólicas del mesófilo (v.g., PEPCasa) serían degradadas por un mecanismo autofágico.

Objetivo 2.1.- Identificar proteasas cisteínicas cuya actividad aumenta durante la senescencia en maíz.

Objetivo 2.2.- Relacionar la degradación de las proteínas cloroplásticas de la vaina del haz vascular con la actividad de proteasas cisteínicas, y con la aparición de VAS.

Objetivo 2.3.- Relacionar la degradación de las proteínas citosólicas del mesófilo (PEPCasa) con la actividad y localización tisular de la vía autofágica en maíz.

Objetivo 2.4. - Analizar el ritmo de la senescencia y la expresión de las proteasas cisteínicas identificadas en 2.1. en líneas endocriadas de maíz.

H3- La autofagia y las VAS constituyen vías independientes de degradación de proteínas durante la senescencia.

Objetivo 3.1.- Evaluar las posibles interacciones entre la vía autofágica y el desarrollo de las “Vacuolas Asociadas a la Senescencia”



Para identificar las proteasas cisteínicas asociadas a la senescencia foliar en soja y maíz utilizaremos un método de marcación de proteasas cisteínicas activas con DCG-04 (Greengard et al. 2000). Las proteínas se aislarán de los geles 2D para su identificación por espectrometría de masas (ESI-MS/MS) en la Umea Protein Analysis Facility a través de una colaboración en marcha con la Dra. Christiane Funk (Univ. Umea, Suecia). En estos experimentos se empleará el cv. Williams 82 de soja y la línea endocriada de maíz B73, cuyos genomas están completamente secuenciados (Schnable et al. 2009; Schmutz et al. 2010). Cabe destacar que ya hemos utilizado exitosamente esta metodología para identificar tres proteasas asociadas a la senescencia en cebada (Hollman et al. 2011). Los cambios en la expresión a nivel de ARNm de las proteasas identificadas por métodos proteómicos se determinarán por RT-qPCR (Watson et al. 2004) empleando cebadores diseñados a partir de las secuencias identificadas (por ejemplo, utilizando el programa "Primer Express"). Como gen normalizador se utilizará ubiquitina10, que ya hemos utilizado con resultados satisfactorios.

Para analizar la variabilidad genética en el ritmo de la senescencia en soja se tomará un conjunto de cultivares comerciales de soja (al menos 20) de similar grupo de maduración (IV o V). Se inocularán y sembrarán en la fecha recomendada a campo, en parcelas con surcos distanciados a 50 cm y riego suplementario para evitar déficit hídrico. Se tomará especial precaución en mantener las plantas libres de insectos o enfermedades que puedan afectar la senescencia. A partir del estadio R5 (inicio del llenado de las semillas), y cada 10 días aproximadamente, se tomarán muestras para determinar la evolución del área foliar por planta, la actividad fotoquímica con un medidor de la fluorescencia modulada de la clorofila (FMS2, Hansatech, UK), y el contenido de clorofila y proteínas de hojas selectas (una hoja apical plenamente expandida en R5).

Para validar la participación de las proteasas identificadas en maíz, se relacionará la variabilidad del ritmo de la senescencia entre líneas endocriadas de maíz con la expresión de las proteasas cisteínicas. Se utilizarán 27 líneas endocriadas del programa "Nested Association Mapping" (Maize Genetics Cooperation Stock Center, <http://www.panzea.org/lit/germplasm.html>) y líneas endocriadas del programa de mejoramiento de INTA Pergamino que difieren en rasgos ecofisiológicos relacionados con la eficiencia de uso del nitrógeno (v.g., generación y permanencia de área foliar, producción y partición de biomasa, *stay-green* y concentración de N foliar, D'Andrea et al. 2006; 2009). Es interesante (y auspicioso) que estas líneas presentan variaciones alélicas en la secuencia del gen ZmNAC-B1 (S. Olmos, no publicado). Este gen de maíz es considerado el gen ortólogo al WNAC-B1 de trigo que acelera el ritmo de senescencia (Uauy et al. 2006). Se espera que, por analogía con lo reportado en trigo, las líneas de maíz muy probablemente presenten diferencias en los dominios NAC funcionales de la proteína y en consecuencia diferencias en el ritmo de senescencia.

Para examinar la participación de la vía autofágica en maíz, se estudiará la expresión de ATG8 (AuToPhagic 8), tanto a nivel de proteína como de ARNm. ATG8 constituye un buen marcador de autofagosomas (Thompson y Vierstra 2005; Ishida et al. 2008). En maíz, ATG8 es codificado por una pequeña familia de cinco genes (Chung et al. 2009). Los niveles de ATG8 se determinarán por *Western blot* utilizando un anticuerpo anti-ATG8 cedido por el Dr. R. Vierstra (Univ. of Wisconsin) que



reconoce con igual sensibilidad las cinco proteínas ATG8 de maíz (Chung et al. 2009). El análisis de los cambios en los niveles de ARNm correspondientes a los cinco genes que codifican ATG8 en maíz (Chung et al. 2009) se hará por RT-qPCR como se describió precedentemente.

BIBLIOGRAFIA

1. Chung T, Suttangkakul A, Vierstra RD (2009) *Plant Physiol.* 149: 220-234.
2. D'Andrea KE, Otegui ME, Cirilo AG, Eyherabide G (2006) *Crop Sci.* 46: 1266-1276.
3. D'Andrea KE, Otegui ME, Cirilo AG, Eyherabide G (2009) *Field Crops Res.* 114:147-158.
4. Donnison IS, Gay AP, Thomas H, Edwards KJ, Edwards D, James CL, Thomas A, Ougham H (2006) *New Phytol.* 173: 481-494.
5. Gregersen PL, Holm PB, Krupinska K (2008) *Plant Biol.* 10: 37-49.
6. Greengbaum D, Medzihradsky KF, Burlingame A, Bogoy M (2000) *Chem Biol* 7: 569-581.
7. Hollman J, Carrión C, Matros A, Gregersen PL, Mock H-P, Guamet JJ, Krupinska K (2011) First Conference in Plant Proteases, Hernan, Suecia.
8. Ishida H, Yoshimoto K, Izumi M, Reisen D, Yano Y, Makino A, Ohsumi Y, Hanson MR, Mae T (2008) *Plant Physiol.* 148: 142-155.
9. Kumudini S, Hume DJ, Chu G (2002) *Crop Sci.* 42: 141-145.
10. Martínez DE, Bartoli CG, Grbic V, Guamet JJ (2007) *J Exp Bot* 58: 1099-1107.
- 11.
12. Otegui M, Noh Y-S, Martínez D, Vila-Petroff M, Staehelin A, Amasino R, Guamet JJ (2005) *The Plant Journal* 41: 831-844.
13. Peoples MB, Dalling MJ (1988) The interplay between proteolysis and amino acid metabolism during senescence and nitrogen reallocation. En *Senescence and Aging in Plants* (LD Noodén y AC Leopold eds), p. 181-217. Academic Press, San Diego CA.
14. Schmutz J, Cannon SB, Schlueter JB, et al. (2010) *Nature* 463: 178-183.
15. Schnable PS, Ware D, Fulton RS, et al., (2009) *Science* 326: 1112-1115.
16. Thompson A, Vierstra RD (2005) *Curr. Opin. Plant Biol.* 8:165-173.
17. Uauy C, Distelfeld A, Fashima T, Blechl A, Dubcovsky J (2006) *Science* 314: 1298-1301.
18. Watson JD, Baker TA, Bell S P, Gann A, Levine M, Losick R (2004). *Molecular Biology of the Gene* (Fifth ed.). San Francisco, Benjamin Cummings. ISBN 0-321-22368-3.



Condiciones de la presentación:

La presentación deberá incluir:

- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 21)
 - b. Una copia en soporte electrónico, la que será remitida por correo electrónico a la siguiente dirección: infinvest@cic.gba.gov.ar. Deberá realizarse en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus. Si se trabaja sobre el documento modelo, se deberán eliminar las instrucciones.
 - c. En el mismo correo electrónico referido en el punto b), se deberá incluir como un segundo documento un currículum resumido (no más de dos páginas A4), consignando apellido y nombres, disciplina de investigación, trabajos publicados en el período informado (con las direcciones de Internet de las respectivas revistas) y un resumen del proyecto de investigación en no más de 250 palabras, incluyendo palabras clave.
 - d. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, en una carpeta o caja, en cuyo rótulo se consignará el apellido y nombres del investigador y la leyenda "Informe Científico Período".
 - e. Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.
-

Nota: El Investigador que desee ser considerado a los fines de una promoción, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.