



CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO Informe Científico¹

PERIODO ²: 2013-2014

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

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

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 Fsiología Vegetal (INFIVE, CONICET-UNLP)

Cátedra: Fisiología Vegetal (Cs. Naturales)

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 este período he continuado con los estudios sobre el mecanismo y regulación de la degradación del aparato fotosintético durante la senescencia, iniciando el estudio de proteasas involucradas en este proceso, y he mantenido colaboraciones con otros grupos en el INFIVE.

Las principales actividades de investigación que realicé en el período 2013-2014 fueron:

Continué trabajando en proteasas y degradación de proteínas durante la senescencia. En esta línea publiqué en colaboración dos trabajos de investigación (-3 Carrión et al., 2013, 9-Martínez et al. 2014), una revisión (-8 Carrión et al., 2014), y un capítulo en un libro (-10 Costa et al., 2013). Finalmente, hay en prensa una capítulo sobre métodos para estudiar proteasas cisteínicas en hojas senescentes (-11 Martínez et al., 2014); algunos de estos métodos han sido puestos a punto para su uso en vegetales en nuestro laboratorio.

Realicé también trabajos sobre aspectos generales de la senescencia foliar, o no específicamente ligados a proteasas. Por ejemplo, publiqué una revisión sobre los cambios en el apoplasto de las hojas durante la senescencia (-5 Martínez et al., 2014, esta revisión ha servido de base al trabajo de tesis doctoral iniciado por la Lic. Lucía Borniego), y fueron aceptados y publicados dos trabajos enviados en 2012 (período correspondiente al informe anterior) sobre la síntesis de óxido nítrico, una molécula con actividad retardante de la senescencia (-1 Galatro et al., 2013) y sobre la senescencia pos-cosecha de la albahaca (-2 Costa et al., 2013).

Por otra parte, continué con el estudio del impacto de la senescencia en especies de cultivo. Estos estudios de fisiología de cultivos en condiciones realistas de campo se plasmaron en tres publicaciones (-4 Antonietta et al., 2014, -6 Acciaresi et al. 2014, -7 Maydup et al., 2014).

En este período dirigí a dos Investigadoras Asistentes del CONICET (ML Costa y DE Martínez) hasta su promoción a la categoría Adjunto a principios de 2014, dos becarios post-doctorales y tres becarios doctorales del CONICET, y 2 Profesionales de apoyo de CICBA. Fui director de dos tesis doctorales y co-director de otras tres, y director de una tesis de maestría defendidas en 2013-2014. Por último, he continuado con la dirección del Instituto de Fisiología Vegetal (CONICET-UNLP).



7. PERIODO (1/1/2011 – 31/12/2012).

PUBLICACIONES.

-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. (enviado en 2012).

Abstract

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, electron 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 realización de las observaciones por microscopía confocal, y en la revisión 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. (enviado en 2012).

Abstract

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°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 la revisión del manuscrito.

- 3 Carrión CA, Costa ML, Martínez DE, Mohr C, Humbeck K, Guamet JJ (2013) In vivo inhibition of cysteine proteases provides evidence for the involvement of “Senescence-Associated Vacuoles” in chloroplast protein degradation during dark-induced senescence of tobacco leaves. *Jour. Exp. Bot.* 64: 4967-4980.

Abstract

Breakdown of leaf proteins, particularly chloroplast proteins, is a massive process in senescing leaves. In spite of its importance in internal N recycling, the mechanism(s) and the enzymes involved are largely unknown. Senescence Associated Vacuoles (SAV) are small, acidic vacuoles with high cysteine peptidase activity. Chloroplast-targeted proteins re-localize to SAVs during senescence, suggesting that SAVs might be involved in chloroplast protein degradation.

SAVs were undetectable in mature, non-senescent tobacco leaves. Their abundance, visualized either with the acidotropic marker LysoTracker Red or by GFP fluorescence in a line expressing the senescence-associated cysteine protease SAG12 fused to GFP, increased during senescence induction in darkness, and peaked after 2-4 days, when chloroplast dismantling was most intense. Increased abundance of SAVs correlated with higher levels of SAG12 mRNA. Activity labelling with a biotinylated derivative of the cysteine protease inhibitor E-64 was used to detect active cysteine proteases. The two apparently most abundant cysteine proteases of senescing leaves, of 40 and 33 kDa were detected in isolated SAVs. Rubisco degradation in isolated SAVs was completely blocked by E-64. Treatment of leaf disks with E-64 in vivo substantially reduced degradation of Rubisco and leaf proteins. Overall, these results indicate that SAVs contain most of the cysteine protease activity of senescing cells, and that SAVs cysteine proteases are at least partly responsible for the degradation of stromal proteins of the chloroplast.

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



- 4 Antonietta M, Fanello DD, Acciaresi HA, Guamet JJ (2014) Senescence and yield responses to plant density in stay green and earlier-senescing maize hybrids from Argentina. *Field Crops Res.* 155: 111-119.

Abstract

Increases in maize (*Zea mays* L.) yield over the past few decades have been associated with breeding for tolerance to progressively higher plant densities. Since high plant density exacerbates interplant competition, it has been suggested that improved resource capture through delayed senescence might be advantageous in such situations. The main objectives of this work were to determine (1) the time-course of canopy senescence, (2) post-silking C and N accumulation and (3) yield responses of contemporary maize hybrids with different expression of the stay green character grown in a range of plant densities from moderate to intense crowding stress. Three experiments consisting of a combination of different plant densities (from 6 to 10 pl m⁻²) and commercial hybrids with different timing of senescence were carried out. High density accelerated leaf senescence at the lower canopy layer. The SG hybrids delayed senescence and retained green leaves at physiological maturity at all tested densities. One of these hybrids (NK880), with a strong SG character, retained green leaves at all canopy layers, even at the lower layer exposed to limiting irradiance. Lower canopy leaves maintained high respiratory rates in NK880, while leaves of the NSG hybrid (DK682) senesced and their respiration became not detectable. At the highest tested density, the NSG DK682 achieved greater grain yields than the SG NK880. Increased density reduced kernel weight (KW), and this decrease was more pronounced for the SG NK880 (6-18% comparing 10 vs 8 pl m⁻²). In spite of delayed senescence in NK880, no hybrid differences were found for post-silking dry matter accumulation and plant dry matter at physiological maturity. Unexpectedly, plant nitrogen content (Nc) at harvest was similar (Exp.I) or even lower (P<0.05, Exp.II) in the SG NK880. This was the result of lower net N accumulation during the post-silking period (Exp. I) or lower Nc achieved at silking (Exp. II) in the SG NK880. A strong positive relation was found between KW and N concentration in kernels, with %N in kernels being below the critical N concentration to achieve potential KW (around 1.4%) in the SG hybrid. This suggests that yield in NK880 was limited by N. In the SG genotype, N remobilization from vegetative organs did not seem to compensate for the N deficit for optimum grain growth. In summary, at high densities the NK880 hybrid displayed a strong, constitutive SG character, even if it accumulated less N, and senescence delay was not reflected in higher grain yield.

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

- 5 Martínez DE, Guamet JJ (2014) Senescence related changes in the leaf apoplast. *Jour. Plant Growth Regul.* 33: 44-55.

Abstract

The extracellular space of leaves is a highly dynamic compartment harbouring a number of activities involved in signal recognition, import/export of organic and inorganic compounds and defence against pathogens. Although this has not been extensively studied, there are evidences for the involvement of the extracellular space in signal perception and nutrient remobilization during senescence. Integration of the apoplast into the larger picture of cellular activities during senescence may help understand key events in the terminal phase of leaf development. Important events associated with senescence occur in the apoplast, and these events may offer targets for genetic manipulation to modulate senescence. In this paper we look into changes in



the extracellular space of leaves accompanying senescence, with a special focus on apoplastic proteins and plasma membrane proteins related to signaling and export of amino acids. Other, not less relevant senescence-related metabolic changes, such as NH_4 accumulation, and the oxidative burst, are beyond the scope of this review.

En este trabajo de revisión participé en la discusión de la idea original, el relevamiento de la bibliografía y la redacción del manuscrito.

- 6 Acciaresi HA, Tambussi EA, Antonietta M, Zuluaga MS, Andrade FH, Guiamet JJ (2014) Carbon assimilation, leaf area dynamics, and grain yield in contemporary earlier- and later-senescing maize hybrids. *Eur.J. Agron.* 59: 29-38.

Abstract

Maize breeding has been associated with a delay of leaf senescence, but it is not clear whether this trait is likewise associated with higher grain yield in modern hybrids. Post-silking growth, leaf area dynamics, photosynthetic parameters and yield were compared in maize hybrids differing in canopy senescence rate. In the first two experiments, four hybrids were grown in the field at Balcarce, Argentina (37°45' S, 58°18' W). In spite of differences in chlorophyll retention and photosynthesis of the ear leaf, post-silking growth and grain yield were very similar in all four hybrids while kernel N concentration was lower in the later-senescing hybrids. In a third experiment, a later-senescing (NK870) and an earlier-senescing (DK682) hybrid were grown to analyze the potential photosynthetic contribution of delayed leaf senescence. Leaf area and chlorophyll content were larger in NK870, especially at the lower canopy level (0.75 m). However, hybrids did not differ for canopy light interception. Because photosynthetic photon flux density below 1 m was less than 10% of incident radiation and photosynthesis quantum yield did not change during senescence, the potential photosynthetic output of lower leaves below 1 m was very low. Lower leaves of NK870 had N concentrations higher than those needed to sustain photosynthesis at the light conditions below 1 m. Therefore, we show that delayed senescence does not necessarily improve post-silking C accumulation because: (i) canopy light interception is not reduced by senescence except at very late stages of grain filling; (ii) contrasting hybrids show more pronounced senescence differences at canopy levels where 90% of incident radiation has been already intercepted; (iii) delayed senescing hybrids present lower kernel N concentrations while extra N is retained in leaves exposed to a light limiting micro-environment. Delayed senescence at lower canopy levels may be unproductive, at least under non-stressing conditions.

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



- 7 Maydup ML, Antonietta M, Graciano C, Guiamet JJ, Tambussi EA (2014) The contribution of the awns of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) to grain filling: Responses to water deficit and the effects of awns on ear temperature and hydraulic conductance. *Field Crops Res.* 167: 102-111.

Abstract

The awns of the ear have been reported as important sources of assimilates in wheat. However, their actual importance in grain filling is not well known. We analyzed several aspects of the awns and their role in the grain filling, and the objectives of this work were: (i) to study the photosynthetic activity during the grain filling, comparing flag leaf, ear body and awns in two cultivars differing in ear contribution to grain filling, (ii) to estimate the influence of awns on the temperature and the hydraulic conductance of the ear (iii) to analyze the response of the flag leaf vs. awns to water deficit, (iv) to analyze if there is a correlation between awn size vs. ear and awn contribution to the grain filling in six modern Argentinean cultivars, and (v) to explore if awn size and awn contribution have changed during the past century, analyzing old and modern Argentinean cultivars. In this paper we show that: (1) during late grain filling, ear parts (particularly the body of the ear) maintained a higher photosynthetic activity than the flag leaf, (2) awns showed some 'tolerance' to water deficit, maintaining a higher relative water content and electron transport rate than the flag leaf under drought, (3) awns increase water conductance of the ear (particularly in the cv. K. Escudo), decrease the ear temperature during the morning, but increase ear temperature after midday (4) there is a moderately positive relationship between awn size and contribution of the ear to grain filling, and (5) in the retrospective analysis we did not find a clear tendency in awn size and awn contribution to grain filling along the years. However, in general terms modern cultivars seem to have a higher awn contribution (and higher awns size) than old ones.

In summary, awns may have positive (increased photosynthetic area and activity, tolerance to drought) and negative (increased ear temperature) effects on grain filling, and their final impact on yield will depend on the interaction between these effects and prevailing environmental conditions.

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

- 8 Carrión CA, Martínez DE, Costa ML, Guiamet JJ (2014) Senescence-associated vacuoles, a specific lytic compartment for degradation of chloroplast proteins? *Plants* 3: 498-512. doi:10.3390/plants3040498

Abstract

Degradation of chloroplasts and chloroplast components is a distinctive feature of leaf senescence. In spite of its importance in the nutrient economy of plants,



knowledge about the mechanism(s) involved in the breakdown of chloroplast proteins is incomplete. A novel class of vacuoles, “senescence-associated vacuoles” (SAVs), characterized by intense proteolytic activity appear during senescence in chloroplast-containing cells of leaves. Since SAVs contain some chloroplast proteins, they are candidate organelles to participate in chloroplast breakdown. In this review we discuss the characteristics of SAVs, and their possible involvement in the degradation of Rubisco, the most abundant chloroplast protein. Finally, SAVs are compared with other extra-plastidial protein degradation pathways operating in senescing leaves.

En este trabajo de revisión participé en la discusión de la idea original, el relevamiento de la bibliografía y la redacción del manuscrito.

- 9 Martínez DE, Borniego ML, Battchikova N, Aro E-M, Tyystjärvi E, Guamet JJ (2014) SASP, a Senescence-Associated Subtilisin Protease, is involved in reproductive development and determination of silique number in *Arabidopsis*. Jour. Exp. Bot.66: 161-174. doi:10.1093/jxb/eru409.

Abstract

Senescence involves increased expression of proteases, which may participate in nitrogen recycling or cellular signalling. Two-dimensional zymograms detected two spots with increased proteolytic activity in senescing leaves of *Arabidopsis thaliana*. A proteomic analysis revealed that both spots correspond to a subtilisin protease coded by At3g14067, hereafter called “Senescence-Associated Subtilisin Protease” (SASP). SASP mRNA levels and enzyme activity increase during leaf senescence, both in leaves senescing during the vegetative or the reproductive phase of the plant life cycle, but this increase is more pronounced in reproductive plants. SASP is expressed in all above-ground organs, but not in roots.

Putative AtSASP orthologs were identified in dicot and monocot crop species. A phylogenetic analysis shows AtSASP and its putative orthologs clustering in one discrete group of subtilisin proteases in which no other *Arabidopsis* subtilisin protease is present.

Phenotypic analysis of two knock out lines for SASP showed that mutant plants develop more inflorescence branches during reproductive development. Both AtSASP and its putative rice ortholog (OsSASP) were constitutively expressed in *sasp-1* to complement the mutant phenotype. At maturity, *sasp-1* plants produced 25% more inflorescence branches and siliques than either the wild type or the rescued lines. These differences were mostly due to an increased number of second and third order branches. The increased number of siliques was compensated for by a small decrease (5%) in seed size. SASP down-regulates branching and silique production during monocarpic senescence, and its function is at least partially conserved between *Arabidopsis* and rice.

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



- 10 Costa M.L., Martínez D.E., Gomez F.M., Carrión C.A. y Guiamet J.J. (2013) Chloroplast protein degradation: involvement of Senescence-associated Vacuoles. Capítulo 18 en Advances in Photosynthesis and Respiration Series, Springer Science+Business Media Dordrecht (editores: Basanti Biswal, Karin Krupinska y Udaya Chand Biswal, editores de la serie: Govindjee y Tom Sharkey).

Abstract

Senescence, the last developmental phase in the life of a leaf, is characterized by massive degradation of chloroplast proteins and redistribution of the released amino acids and peptides to other parts of the plant. Chloroplast protein degradation plays an important role in the nitrogen economy of plants.

Loss of chloroplast proteins is associated with cessation of protein synthesis and an increase in rates of protein degradation. For some photosynthesis-associated proteins, there is clear evidence for degradation within the plastid itself. For example, chloroplastic FtsH metalloproteases and DegP serine-proteases are involved in the breakdown of the D1 protein upon photoinhibition of photosystem II, and these same proteases might degrade D1 during senescence. The involvement of chloroplast proteases in the degradation of Rubisco, the most abundant leaf protein, is less clear.

Senescence-associated vacuoles (SAVs) are a class of small, acidic, lytic vacuoles that occur in senescing leaf cells. They develop in chloroplast-containing cells (i.e., mesophyll and guard cells) and are characterized by high peptidase activity, particularly of cysteine-type proteases. SAVs seem to be different from "Rubisco Containing Bodies", and development of SAVs does not depend on the operation of the autophagic pathway. A role for SAVs in chloroplast protein degradation can be implied from the fact that stromal proteins of the chloroplast and PSI are re-located to SAVs during senescence. *In vitro*, cysteine-type proteases within SAVs degrade the chloroplast proteins contained in these vacuoles. SAVs may be part of an extra-plastidial degradation pathway for chloroplast stroma and PSI proteins.

En este trabajo de revisión participé en la discusión de la idea original, el relevamiento de la bibliografía, y la redacción del manuscrito.

a. TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN.

- 11 Martínez D.E., Costa M.L., y Guiamet J.J. (2014) Activities of vacuolar cysteine proteases in plant senescence. En Plant Senescence: Methods and Protocols, Series Methods in Molecular Biology, Springer editor: Yongfeng Guo (aceptado).

Abstract

Plant senescence is accompanied by a marked increase in proteolytic activity, and cysteine proteases (Cys-protease) represent the prevailing class among the responsible proteases. Cys-proteases predominantly locate to lytic compartments, i.e., to the central vacuole (CV) and to Senescence-Associated Vacuoles (SAVs), the latter specific to the photosynthetic cells of senescing leaves. Cellular fractionation of vacuolar compartments may facilitate Cys-proteases purification and their concentration for further analysis. Active Cys-proteases may be analyzed by different, albeit complementary approaches: 1-*In vivo* examination of proteolytic activity by fluorescence microscopy using specific substrates which become fluorescent upon cleavage by Cys-proteases. 2-*Protease labeling* with specific probes that react irreversibly with the active enzyme, 3-*Zymography*, whereby protease activity is detected in polyacrylamide gels co-polymerized with a substrate for proteases. Here we describe 1- the three methods mentioned above for detection of active Cys-proteases, 2- a cellular fractionation technique to isolate SAVs.



En este trabajo sobre métodos participé en la discusión de la idea original, y en la redacción y revisión del manuscrito.

b. TRABAJOS ENVIADOS PARA SU PUBLICACION

No consigna

c. COMUNICACIONES.

1. Gortari F, Graciano C, Guiamet JJ (2014) Daño en la integridad del Fotosistema II en diferentes clones de álamo debido a la combinación de roya y estrés hídrico. P.45. XV Congreso Latinoamericano y XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Mar del Plata, 21-24 de setiembre de 2014
2. Antonietta M, Maydup ML, Fanello D, Tambussi EA, Guiamet JJ (2014) In maize hybrids delayed senescence is associated with higher dry matter accumulation under drought stress. P.49. XV Congreso Latinoamericano y XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Mar del Plata, 21-24 de setiembre de 2014
3. Corrons MA, Costa ML, Tambussi EA, Guiamet JJ (2014) Participación de SAG12 en la degradación de Rubisco y su posible rol en la removilización de N. P.97. XV Congreso Latinoamericano y XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Mar del Plata, 21-24 de setiembre de 2014
4. Fanello D, Bartoli CG, Guiamet JJ (2014) Variaciones fenológicas de la actividad metabólica radical en Glycine max. P.98. XV Congreso Latinoamericano y XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Mar del Plata, 21-24 de setiembre de 2014
5. Rolny NS, Costa ML, Andrade L, Guiamet JJ (2014) La fertilización con N aumenta la acumulación transitoria de amonio durante la senescencia de hojas de cebada. P.102. XV Congreso Latinoamericano y XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Mar del Plata, 21-24 de setiembre de 2014
6. Curin F, Seco A, Hisse I, Galizia L, D'Andrea K, Antonietta M, Olmos S, Guiamet JJ (2014) Fluorescencia de la clorofila en híbridos de maíz y líneas endocriadas cultivadas en condiciones contrastantes de nitrógeno. P.121. XV Congreso Latinoamericano y XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Mar del Plata, 21-24 de setiembre de 2014
7. Maydup ML, Antonietta M, Cano MG, Guiamet JJ, Tambussi EA (2014) Efecto del sombreado en el peso de granos de trigo pan y posibles mecanismos fisiológicos compensatorios. P.131. XV Congreso Latinoamericano y XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Mar del Plata, 21-24 de setiembre de 2014

INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS. No consigna

2. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.

a. DESARROLLOS TECNOLÓGICOS.

No consigna

b. PATENTES O EQUIVALENTES.



No consigna

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

No consigna

d. **OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO
SEAN PUBLICABLES**

No consigna

e.

3. **SERVICIOS TECNOLÓGICOS.**

4. **PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:**

a. **DOCENCIA**

b. **DIVULGACIÓN**

Participación en las actividades por el “Día de la Fascinación de las Plantas”, una jornada de divulgación de la importancia de las plantas en la vida humana auspiciada por la European Plant Science Organization, desarrolladas en el INFIVE en 2013 y 2014.

5. **DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES.**

Investigadores:

Dra. María Lorenza Costa – Investigador Asistente CONICET, hasta 2014

Dra. Dana E. Martínez – Investigador Asistente CONICET, hasta 2014

Personal de Apoyo:

Lic. Laura Almaraz – Profesional CICBA

Ing. Ftal. Fabio Achinelly – Profesional CICBA

Becarios

Dra. Mariana Antonietta - Becaria Postdoctoral CONICET - 2013-2015

Dra. Cristian A. Carrión - Becario Postdoctoral CONICET - 2014-2016

Lic. Diego Fanello - Becario Doctoral CONICET - 2014-2016

Lic. María Alicia Corrons - Becaria Doctoral CONICET – 2013-2018

Lic. María Lucía Borniego - Becaria Doctoral CONICET – 2013-2018



6. DIRECCION DE TESIS.

Tesis doctorales

Año: 2013 Apellido y Nombres: Antonietta, Mariana (Director)

Tema: Impacto de la senescencia foliar sobre la producción de fotoasimilados y el rendimiento de maíz (*Zea mays* L.) bajo condiciones de estrés abiótico.

Universidad: U.N.L.P.

Calificación: 10

Año: 2013 Apellido y Nombres: Carrión, Cristian (Director)

Tema: Vacuolas asociadas a la senescencia: participación en la degradación de proteínas fotosintéticas e interacción con la vía autofágica.

Universidad: U.N.L.P.

Calificación: 10

Año: 2013 Apellido y Nombres: Faustino, Laura I. (Co-director)

Tema: Cambios en la arquitectura y fisiología de *Pinus taeda* en respuesta a la fertilización y el estrés por sequía.

Universidad: U.N.L.P.

Calificación: 10

Año: 2013 Apellido y Nombres: Maydup, María Lujan (Co-director)

Tema: Contribución de la fotosíntesis de la espiga al rendimiento de trigo pan (*Triticum aestivum*) en condiciones limitadas por la disponibilidad de asimilados post-antesis

Universidad: U.N.L.P.

Calificación: 10

Año: 2014 Apellido y Nombres: Rolny, Nadia Soledad (Co-director)

Tema: Potencial emisión de amonio y su relación con el metabolismo de nitrógeno durante la senescencia de cebada (*Hordeum vulgare* L.)

Universidad: U.N.L.P.

Calificación: 10

Tesis de Maestría

Año: 2014 Apellido y Nombres: Cortizo, Silvia C..

Tema: Efecto de la roya del álamo sobre el crecimiento del año y del rebrote de la siguiente temporada en tres clones con distinta susceptibilidad y arquitectura del canopeo.

Maestría en Producción Vegetal UBA

Calificación: Sobresaliente

Defendida 29 4 2014

4. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS.

1. Expositor en la XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Mar del Plata, 21-24 de setiembre, 2014.

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



6. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO.

Institución otorgante: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica

Nº de proyecto: PICT 2012-1862

Monto: \$ 328.640

Duración: 2013-2016

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 Nº 1390 – UNLP Nº 25, 1/6/2009.
2. Miembro de la Comisión Asesora Honoraria de Ciencias Agrarias, CICBA, desde 2013.
3. Miembro de la Comisión Asesora ad-hoc para Ingresos a la Carrera del Investigador Científico, CONICET, 2013.

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



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

PROTEASAS Y VIAS PROTEOLÍTICAS RESPONSABLES DE LA DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS FOTOSINTÉTICAS DURANTE LA SENESCENCIA EN PLANTAS SUPERIORES

Para este próximo período el plan de trabajo será una continuación del que propuse para el período 2013-2014 (incluyendo algunos objetivos no concluidos, todavía en marcha) y que se enmarca en el contexto del PICT-2012 1862. El objetivo general de este proyecto será dilucidar los mecanismos involucrados en el desmantelamiento del aparato fotosintético durante la senescencia foliar, tanto en especies de cultivo (soja y maíz) como en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*.

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.

Entre la proteasas cisteínicas asociadas a la senescencia, SAG12 ("Senescence Associated Gene 12) se destaca por su patrón de expresión específico, esto es, SAG12 se transcribe y traduce exclusivamente en tejidos senescentes (v.g., Grbic 2003). Sin embargo, a pesar de numerosos trabajos que destacan la estrecha asociación entre la expresión de SAG12 y el desmantelamiento del aparato fotosintético, su función específica durante la senescencia (y su potencial como blanco del mejoramiento genético) permanece ignorada.



Los objetivos específicos para el período 2014-2015 son:

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 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 3. – Determinar la función de SAG12 en la degradación de proteínas fotosintéticas en Arabidopsis.

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.

Aprovechando la disponibilidad en Arabidopsis thaliana de líneas “knock out” (KO) para el gen SAG12 se realizará un análisis funcional de SAG12, con énfasis en su participación en la degradación de proteínas fotosintéticas comparando la evolución durante la ontogenia foliar de Rubisco (la proteína más abundante en los cloroplastos) en genotipos salvajes y SAG 12 KO.

BIBLIOGRAFIA

1. Donnison IS, Gay AP, Thomas H, Edwards KJ, Edwards D, James CL, Thomas A, Ougham H (2006) New Phytol. 173: 481-494.
2. Grbic V (2003) Physiol Plant 119: 1-7.
3. Gregersen PL, Holm PB, Krupinska K (2008) Plant Biol. 10: 37-49.
4. Kumudini S, Hume DJ, Chu G (2002) Crop Sci. 42: 141-145.
5. Martínez DE, Bartoli CG, Grbic V, Guamet JJ (2007) J Exp Bot 58: 1099-1107.
- 6.
7. Otegui M, Noh Y-S, Martínez D, Vila-Petroff M, Staehelin A, Amasino R, Guamet JJ (2005) The Plant Journal 41: 831-844.
8. 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.



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.