

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales

Facultad de Agronomía

“Efecto de la disponibilidad de azufre sobre los procesos de removilización de asimilados y senescencia foliar en plantas de cebada (*Hordeum vulgare* L.) y su impacto sobre la calidad de los granos”

Cintia Gabriela Veliz

Licenciada en Ciencias Biológicas

Directora de Tesis: Dra. Carla Caputo

Directora Adjunta de Tesis: Dra. Irma N. Roberts

Consejera de Estudio: Dra. Susana M. Gallego

Tesis para optar por el título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires

2017

A mis padres, Martha y Eduardo, por brindarme lo mejor desde el más sincero de los amores.

A mi hermano, Maxi, por ser mi sostén y ejemplo.

A mi esposo, Gustavo, mi gran compañero de vida.

A mi familia y amigos.

Agradecimientos

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas que me han brindado los medios para desarrollar este trabajo de Tesis.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA que me formaron en el ámbito científico.

A los directivos e integrantes del INBA y de la Facultad de Agronomía de la UBA por brindarme el espacio para realizar esta Tesis y por acompañar mi crecimiento profesional.

A Carla Caputo e Irma Roberts por dirigir esta Tesis con tanta paciencia. Por guiarme en el ámbito profesional y aconsejarme en el personal. Son mucho más que mis directoras, me acompañaron en momentos muy importantes para mí.

A Susana Gallego, por responder siempre a mis inquietudes con tanta amabilidad y buena predisposición.

A Victoria Criado por su colaboración en la corrección de este trabajo y por compartir conmigo sus conocimientos en el laboratorio.

A Flavio Gutiérrez Boem por confiarme mi primera beca doctoral y por toda la colaboración brindada al grupo de trabajo.

A Federico Gómez, Ignacio Olaechea y Nicolás Mansilla por la ayuda brindada.

A mis compañeros y amigos del INBA (Fede S., Naty, Eli, Jime V., Marie, Mika, Oksana, Juan, Ferni, Fer, Jesi, Agus, Flor, Fede P., Maru) por hacer más placentero el trabajo en el laboratorio, por todo lo compartido dentro y fuera del instituto.

A Ro y Lu, con quienes compartimos la profesión y esta linda amistad.

A Marisa Olmos, por su destacable vocación docente que aún sigue resonando en mí.

Lista de publicaciones científicas

Los resultados e información presentados en esta Tesis han sido parcialmente publicados en los siguientes trabajos científicos:

Revistas internacionales:

Sulphur deficiency inhibits nitrogen assimilation and recycling in barley plants. Cintia G. Veliz, Irma N. Roberts, María Victoria Criado, Carla Caputo. Original article in: *Biologia Plantarum*; pp 1-10; February 2017. DOI: 10.1007/s10535-017-0722-y.

Phloem sugars and amino acids as potential regulators of hordein expression in field grown malting barley (*Hordeum vulgare* L.). Cintia G. Veliz, María Victoria Criado, Irma N. Roberts, Mariela Echeverría, Pablo Prystupa, Paula Prieto, Flavio H. Gutierrez Boem, Carla Caputo. Original research paper in: *Journal of Cereal Science*; Volume 60, Issue 2, pp 433-439; September 2014. DOI: 10.1016/j.jcs.2014.04.008.

Revista nacional:

Relevancia de la disponibilidad de azufre y removilización de asimilados sobre la calidad de la cebada cervecera. Cintia G. Veliz, Irma N. Roberts, M. Victoria Criado, Mariela Echeverría, Carla Caputo. Revisión Breve en: *Revista Química Viva*; Volumen 15, N°2; Agosto 2016. ISSN 1666-7948.

Capítulo de libro:

La fertilización con azufre promueve la removilización del carbono y del nitrógeno en cebada cervecera. Cintia G. Veliz, María Victoria Criado, Flavio H. Gutierrez Boem, Carla Caputo. Capítulo de libro en *CEREALES DE INVIERNO. Investigación científico-técnica*. Editorial UNCPBA, Tandil Pcia. Bs. As. Editores del libro: Moreno E.M., Cogliatti, M., Stenglein, S.A., Rogers, W.J., Carmona, M.A. y Lavado, R.S. Páginas 63-70. Octubre 2012. ISBN: 978-950-658-301-9.

Resumen

En los últimos años la cebada cervecera se ha presentado como una alternativa de creciente interés como cultivo de invierno en la Argentina, siendo su principal destino el de la industria maltera para la fabricación de cerveza. La removilización de asimilados desde las hojas desarrolladas es una fuente importante de nitrógeno, azufre y carbono para los granos en desarrollo. Este proceso juega un rol clave para lograr los objetivos de calidad impuesto por la industria maltera, entre los cuales se encuentra un rango acotado de proteínas en los granos. Una posible estrategia para mejorar la calidad de los mismos sin aumentar el uso de fertilizantes radicaría en aumentar la eficiencia de la removilización, para lo cual resulta fundamental estudiar la regulación de este proceso y los factores que lo afectan. Dado que en los últimos años se han registrado deficiencias de azufre en varias regiones del mundo, incluyendo la región Pampeana (principal zona de cultivo de cebada en la Argentina), en esta tesis nos planteamos estudiar el efecto de la deficiencia de azufre sobre el proceso de removilización de asimilados y los fundamentos bioquímicos y moleculares que subyacen, haciendo hincapié en el metabolismo y transporte a larga distancia del nitrógeno. Para ello trabajamos con plantas de cebada cultivadas en cámara de cultivo, invernáculo y a campo sometidas a diferentes disponibilidades de azufre, en las que se determinaron parámetros ecofisiológicos, bioquímicos y moleculares sobre los tejidos fuente y destino en distintos momentos del desarrollo de las plantas.

En todas las condiciones ensayadas encontramos que la deficiencia de azufre inhibió el transporte de azúcares y aminoácidos a través del floema. Además, generó una disrupción significativa del metabolismo del nitrógeno, manifestado como un menor contenido de proteínas y una acumulación de aminoácidos y nitrato en los tejidos fuente y destino. Asimismo, produjo un retraso en el desarrollo y en la senescencia foliar, por lo que las plantas deficientes evidenciaron una menor biomasa aérea, menor emergencia de las espigas, una mayor sobrevivencia de las hojas y un mayor contenido de clorofila. Finalmente, produjo una inhibición de la expresión génica de todas las isoformas de la glutamina sintetasa, de cinco de los seis transportadores de aminoácidos y de siete de las ocho proteasas analizadas, todos ellos componentes clave en la asimilación y reciclado del nitrógeno dentro de la planta.

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que la inhibición en el transporte de aminoácidos vía floema causada por la deficiencia de S se correlaciona con una menor expresión de *HvGS1_1*, *HvGS1_2*, *HvAAP6* y *HvAAP7* en las plantas deficientes. A su vez, el retraso en la senescencia foliar es acompañado por un retraso en la inducción de las proteasas asociadas con este proceso. Sin embargo, el retraso en la inducción de tales proteasas no sería el factor desencadenante del retraso en la

senescencia, ya que ambas condiciones pudieron ser inducidas por un estímulo hormonal aún en ausencia de azufre. Finalmente, sugerimos que el transporte de azúcares y aminoácidos vía floema regularía la expresión de los genes de hordeínas B y C, respectivamente, por lo que una adecuada disponibilidad azufre no solo sería esencial para promover la removilización de asimilados sino también para determinar la proporción en que las distintas fracciones de hordeínas son acumuladas en los granos.

Abreviaturas

AA = aminoácido
AAP = aminoácido permeasas
ADNc = copia de ácido desoxirribonucleico
ANOVA = análisis de varianza
APS = adenosín-5'-fosfosulfato
ARNm = ácido ribonucleico mensajero
ATP = adenosín trifosfato
BS = bajo azufre
C = control
d = días de incubación con metil-jasmonato
DDA = días después de antesis
DDH = días de hambreado
DDS = días después de siembra
EDTA = ácido etilen-di-amino-tetra-acético
GS = glutamina sintetasa
GS1= glutamina sintetasa citosólica
GS2 = glutamina sintetasa plastídica
GSH = glutatión reducido
GSSG = glutatión oxidado
HB = hoja bandera
HS = hambreado de azufre
IC = índice de cosecha
ICN = índice de cosecha de nitrógeno
ICS = índice de cosecha de azufre
LSD = test de la mínima diferencia significativa
Metilcelosolve = éter monometílico del etilenglicol
MJ = metil-jasmonato
N0S0 = plantas sin fertilizar
N0S1 = plantas fertilizadas con azufre
N1S0 = plantas fertilizadas con nitrógeno
N1S1 = plantas fertilizadas con nitrógeno y azufre
OAS = O-acetilserina
OASTL = O-acetilserin(thiol)liasa
PCR = reacción en cadena de la polimerasa
PF = peso fresco

PS = peso seco

qRT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RT = retrotranscriptasa

RUBISCO = ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa

SAGs = genes asociados a senescencia

–SH = grupos tioles

T = tiempo

TAA = transportador de aminoácidos

TCA = ácido tricloroacético

TD = tejido destino

TF = tejido fuente

NOTA: Al igual que los términos incluidos en latín que se encuentran en *itálica*, se ha utilizado el mismo criterio para otras palabras que se han conservado en su idioma original y los neologismos incluidos.

Índice general

	Página
Agradecimientos	i
Listado de publicaciones	iii
Resumen	iv
Abreviaturas	vi
Índice general	viii
Índice de tablas y figuras	xi
Capítulo 1. Introducción, objetivos e hipótesis	1 – 19
Introducción	1
1.1. Nutrición azufrada	2
1.1.1. Ciclo biogeoquímico del S	2
1.1.2. Metabolismo del S	4
1.1.3. Importancia del S en la fisiología de la planta	5
1.2. Características generales del cultivo de cebada	7
1.2.1. Criterios de calidad del grano de cebada	9
1.2.2. Proteínas de reserva del grano de cebada y su relación con la calidad maltera	10
1.3. Removilización de N y S hacia los granos	11
1.3.1. Transporte a larga distancia vía floema	12
1.3.2. Transporte apoplástico: transportadores de aminoácidos	13
1.3.3. Síntesis de aminoácidos para el transporte: glutamina sintetasa	14
1.3.4. Degradación de proteínas durante la senescencia foliar: proteasas asociadas	16
Objetivos e hipótesis	18
Capítulo 2. Materiales y métodos	20 – 31
2.1. Material vegetal	20
2.2. Condiciones de cultivo	20
2.2.1. Campo	20
2.2.2. Cámara de cultivo	20
2.2.3. Invernáculo	20
2.3. Diseño experimental y toma de muestras	21
2.4. Análisis del crecimiento y desarrollo de las plantas	21
2.4.1. Determinación de biomasa, rendimiento e índice de cosecha	21

2.4.2. Determinación del estadio de desarrollo de las espigas	22
2.5. Extracción del exudado floemático	23
2.6. Estimación del contenido de clorofila	24
2.7. Preparación de los extractos	24
2.8. Determinaciones bioquímicas	24
2.8.1. Determinación de proteínas solubles	24
2.8.2. Determinación de aminoácidos libres	24
2.8.3. Determinación de nitrato	25
2.8.4. Determinación de azúcares solubles	25
2.8.5. Determinación de almidón	25
2.8.6. Determinación del contenido de S	26
2.8.7. Determinación del contenido de N	26
2.9. Determinaciones moleculares	27
2.9.1. Extracción del ARN total	27
2.9.2. Síntesis de ADN copia a partir del ARN mensajero	27
2.9.3. Análisis semi-cuantitativo de los genes de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR semi-cuantitativa)	28
2.9.4. Análisis por PCR en tiempo real (qRT-PCR) de los genes de interés	28
2.10. Análisis estadístico	29

Capítulo 3. Resultados y discusión **32 – 44**

La tasa de exportación de azúcares y aminoácidos por floema regularía la expresión de las hordeínas B y C en plantas de cebada cultivadas a campo

3.1. Diseño experimental y toma de muestras	32
3.2. Crecimiento y desarrollo	33
3.3. Determinaciones bioquímicas en el tejido fuente	34
3.4. Aminoácidos y azúcares en el exudado floemático	36
3.5. Determinaciones bioquímicas y moleculares en el tejido destino	38
3.6. Discusión	40

Capítulo 4. Resultados y discusión **45 – 65**

La deficiencia de azufre inhibe la asimilación y transporte de nitrógeno modulando la expresión de la glutamina sintetasa y de ciertos transportadores de aminoácidos

4.1. Ensayo de curva de S	46
4.1.1. Diseño experimental y toma de muestras	46
4.1.2. Crecimiento y desarrollo	46
4.1.3. Determinaciones bioquímicas	47

4.1.4. Determinaciones moleculares	51
4.2. Ensayo de hambreado de S	52
4.2.1. Diseño experimental y toma de muestras	52
4.2.2. Crecimiento y desarrollo	52
4.2.3. Determinaciones bioquímicas	54
4.2.4. Determinaciones moleculares	58
4.3. Discusión	61
Capítulo 5. Resultados y discusión	66 – 80
<i>La deficiencia de azufre retrasa la inducción de proteasas asociadas a senescencia</i>	
5.1. Ensayo de hambreado de S	67
5.1.1. Diseño experimental y toma de muestras	67
5.1.2. Determinaciones moleculares	67
5.2. Senescencia inducida por metil-jasmonato	70
5.2.1. Diseño experimental y toma de muestras	70
5.2.2. Determinaciones bioquímicas	70
5.2.3. Determinaciones moleculares	72
5.3. Ensayo de curva de S	74
5.3.1. Diseño experimental y toma de muestras	74
5.3.2. Determinaciones moleculares	74
5.4. Senescencia natural	75
5.4.1. Diseño experimental y toma de muestras	75
5.4.2. Crecimiento y desarrollo	75
5.4.3. Determinaciones moleculares	77
5.5. Discusión	77
Capítulo 6. Resultados y discusión	81 – 93
<i>La deficiencia de S inhibe la expresión de los genes potencialmente involucrados en la removilización de aminoácidos durante la floración</i>	
6.1. Diseño experimental y toma de muestras	81
6.2. Crecimiento y desarrollo	82
6.3. Determinaciones bioquímicas	85
6.4. Determinaciones moleculares	88
6.5. Discusión	90

Capítulo 7. Conclusiones y perspectivas	94 – 96
Conclusiones	94
Perspectivas	96
Bibliografía	97

Índice de tablas y figuras

	Página
Capítulo 1. Introducción, objetivos e hipótesis:	
Figura 1.1: Esquema fuentes de azufre	3
Figura 1.2: Esquema asimilación del azufre	5
Figura 1.3: Fotografías plantas de cebada	8
Figura 1.4: Esquema estructura del floema	12
Figura 1.5: Árbol filogenético transportadores de aminoácidos	13
Figura 1.6: Esquema localización tisular de la glutamina sintetasa	15
Figura 1.7: Mecanismo de clivaje por proteólisis	17
Capítulo 2. Materiales y métodos:	
Tabla 2.1: Soluciones nutritivas	30
Tabla 2.2: Lista de cebadores	31
Figura 2.1: Esquema escala Zadoks	22
Figura 2.2: Esquema método obtención del exudado floemático	23
Capítulo 3. Resultados y discusión:	
<i>Ensayo interacción NxS a campo</i>	
Figura 3.1: Biomasa, Rendimiento, N y S en grano	33
Figura 3.2: Determinaciones bioquímicas en el tejido fuente	35
Figura 3.3: Aminoácidos y azúcares en el floema	37
Figura 3.4: Determinaciones bioquímicas y moleculares en el tejido destino	39
Figura 3.5: Correlación hordeínas y exudado floemático	44

Capítulo 4. Resultados y discusión:

Tabla 4.1: Correlación de Pearson aminoácidos floema con <i>HvGS1</i> y <i>HvTAA</i>	61
---	----

Ensayo curva de S en cámara de cultivo

Figura 4.1: Biomasa, índice de verdor y fotografías de las plantas	47
Figura 4.2: Determinaciones bioquímicas en el tejido fuente	48
Figura 4.3: Aminoácidos y azúcares en el floema	49
Figura 4.4: Determinaciones bioquímicas en el tejido destino	50
Figura 4.5: Determinación molecular de <i>HvGS</i> en el tejido fuente y destino	51
Figura 4.6: Determinación molecular de <i>HvTAA</i> en el tejido fuente	52

Ensayo hambreado de S en cámara de cultivo

Figura 4.7: Biomasa, índice de verdor y fotografías de las plantas	53
Figura 4.8: Determinaciones bioquímicas en el tejido fuente	55
Figura 4.9: Aminoácidos y azúcares en el floema	56
Figura 4.10: Determinaciones bioquímicas en el tejido destino	57
Figura 4.11: Determinación molecular de <i>HvGS</i> en el tejido fuente	58
Figura 4.12: Determinación molecular de <i>HvGS</i> en el tejido destino	59
Figura 4.13: Determinación molecular de <i>HvTAA</i> en el tejido fuente	60

Capítulo 5. Resultados y discusión:

Tabla 5.1: Valores de ANOVA control vs deficiencia ensayo inducción de senescencia	74
---	----

Ensayo hambreado de S en cámara de cultivo

Figura 5.1: Gel de agarosa de <i>HvActina</i> y <i>HvSAG12</i>	67
Figura 5.2: Fotografía de plantas control	68
Figura 5.3: Determinación molecular de proteasas en el tejido fuente	69

Ensayo senescencia inducida en cámara de cultivo

Figura 5.4: Fotografía de las plantas	71
Figura 5.5: Índice de verdor y determinaciones bioquímicas en el tejido fuente	72
Figura 5.6: Determinación molecular de proteasas en el tejido fuente	73

Ensayo curva de S en cámara de cultivo

Figura 5.7: Determinación molecular de proteasas en el tejido	75
--	----

Ensayo senescencia natural en cámara de cultivo

Figura 5.8: Biomasa, índice de verdor y fotografías de las plantas	76
Figura 5.9: Determinación molecular de proteasas en el tejido fuente	77

Capítulo 6. Resultados y discusión:

Tabla 6.1: Correlación de Pearson aminoácidos floema con <i>HvGS1</i> y <i>HvTAA</i>	90
---	----

Ensayo hambreado de S en invernáculo

Figura 6.1: Biomasa e índice de cosecha	82
Figura 6.2: Contenido e índice de azufre y nitrógeno	83
Figura 6.3: Desarrollo de espiga según escala Zadoks	84
Figura 6.4: Índice de verdor y fotografía de las plantas	85
Figura 6.5: Determinaciones bioquímicas en tejido fuente	86
Figura 6.6: Aminoácidos floema	86
Figura 6.7: Determinaciones bioquímicas en tejido destino	87
Figura 6.8: Determinaciones moleculares en tejido fuente	89
Figura 6.9: Fotografía hojas hambreadas de S y control	92

Capítulo 7. Conclusiones y perspectivas:

Figura 7.1: Esquema efectos de la deficiencia de azufre	95
--	----

Capítulo 1

Introducción, Objetivos
e Hipótesis

Capítulo 1

Introducción

En la región Pampeana, la histórica falta de reposición de los nutrientes exportados con las cosechas y la erosión condujeron a una disminución en la disponibilidad de nutrientes en los suelos. En la actualidad los nutrientes que más frecuentemente limitan la producción de cultivos de granos son el nitrógeno (N) y el fósforo (P). Sin embargo, en los últimos años se han registrado deficiencias de azufre (S), generando una preocupación creciente para los productores ya que este elemento es requerido por las plantas en proporciones casi iguales al P (Tisdale, 1990) y afecta el rendimiento y la calidad de los cultivos (Haneklaus *et al.*, 2007). Debido a esto, el uso de fertilizantes ha sido un factor decisivo para el aumento de la producción de cereales. Sin embargo, el uso excesivo de los mismos a menudo conlleva no sólo un quebranto económico para los productores sino efectos ambientales nocivos (Grupta *et al.*, 1988; Bolan *et al.*, 2003; Adesemoye y Kloepper, 2009).

A su vez, en el caso del cultivo de cebada, la fertilización no asegura la obtención de granos aptos para la industria cervecera. Por ejemplo, si bien la fertilización nitrogenada puede aumentar los rendimientos de los cultivos en situaciones de deficiencia de N, también puede determinar una pérdida de calidad de los granos al incrementar su contenido proteico y disminuir su calibre (Prystupa, 2003; Savin *et al.*, 2006). Por otra parte, la fertilización con S y N repercute sobre la cantidad y composición final de las distintas fracciones de hordeínas (proteínas de reserva), las cuales poseen diferente contenido de S e impactan diferencialmente sobre la calidad de la malta (Howard *et al.*, 1996; Molina-Cano *et al.*, 2000; Simic *et al.*, 2007).

Por lo tanto, una de las metas más importantes de los planes de mejoramiento de los cultivos modernos es compatibilizar la alta productividad y calidad de los granos sin aumentar el uso de fertilizantes. Dentro de este contexto, la removilización de aminoácidos se vuelve una estrategia prometedora ya que los aminoácidos transportados vía floema son una fuente importante de S y N para el crecimiento de los órganos en desarrollo, especialmente en cereales (Hirel *et al.*, 2007). Comprender mejor los mecanismos de regulación de este proceso podría permitir generar herramientas para regular en forma más precisa el contenido y calidad de las proteínas del grano sin detrimento del rendimiento y con un menor costo de producción. Sin embargo, la falta de conocimiento sobre la regulación fisiológica, bioquímica y genética de los procesos de senescencia y

removilización de los nutrientes dentro de la planta impide lograr mejoras en este aspecto (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008). Particularmente es poco lo que se conoce sobre el efecto de la nutrición azufrada sobre la removilización de asimilados, por lo que resulta clave avanzar en el estudio de los efectos que posee la deficiencia de S sobre la regulación del proceso de removilización y su potencial relación con la concentración y calidad de las proteínas del grano de cebada.

1.1. Nutrición azufrada

Hasta hace apenas un par de décadas atrás la disponibilidad de S en los suelos no era un tema de mayor importancia. Sin embargo, la deficiencia de este nutriente se ha convertido en una limitante importante de la producción agrícola en diversas regiones del mundo. Esto se debe principalmente a las políticas ambientales aplicadas en Europa para disminuir las deposiciones atmosféricas de S por parte de las industrias y al uso de fertilizantes nitrogenados y fosforados más puros que ya no contienen trazas de S (Schnug y Haneklaus, 1998; Scherer, 2001; Haneklaus *et al.*, 2007). Particularmente en la región Pampeana, la disminución en la disponibilidad del S fue consecuencia de la histórica falta de reposición de los nutrientes exportados con las cosechas y la erosión. Esto generó una creciente preocupación por el estudio de la repercusión de la nutrición azufrada en la fisiología de los distintos cultivos ya que deficiencias severas de S no sólo disminuyen la productividad y la calidad de los cultivos, sino que además afectan la salud de la planta, causando reducciones en su crecimiento, vigor y resistencia a estreses abióticos y bióticos (Haneklaus *et al.*, 2007; Lewandowska y Sirko, 2008). En el caso particular de los cereales, la preocupación radica no sólo en el efecto de la deficiencia de S sobre el rendimiento de los cultivos sino también sobre la calidad proteica de los granos. Específicamente en los cultivos de cebada cervecera dicho efecto tiene un impacto directo sobre la calidad maltera de los granos con importantes pérdidas a nivel comercial (Zhao *et al.*, 2006).

1.1.1. Ciclo biogeoquímico del S

El S es uno de los elementos más abundantes sobre la Tierra. En forma natural se encuentra en una mezcla de los cuatro isótopos (^{32}S , ^{33}S , ^{34}S y ^{35}S) (Benavides, 1998). Este elemento se encuentra en estados de oxidación que van desde +6 hasta -2, siendo el sulfato (SO_4^{-2}) la forma más comúnmente utilizado por las plantas como fuente de S del suelo.

Este elemento se encuentra distribuido en la atmósfera, los océanos y los suelos y además es incorporado a estos últimos en los fertilizantes, herbicidas y fungicidas y por descomposición de la materia orgánica. El S gaseoso (dióxido de S, SO_2 , y ácido sulfhídrico, H_2S) proveniente de las emanaciones por parte de las erupciones volcánicas y de los procesos biológicos o artificiales como la combustión del carbón y/o petróleo por parte de las

industrias, es regresado a los suelos por medio de las precipitaciones en la forma de ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Figura 1.1).

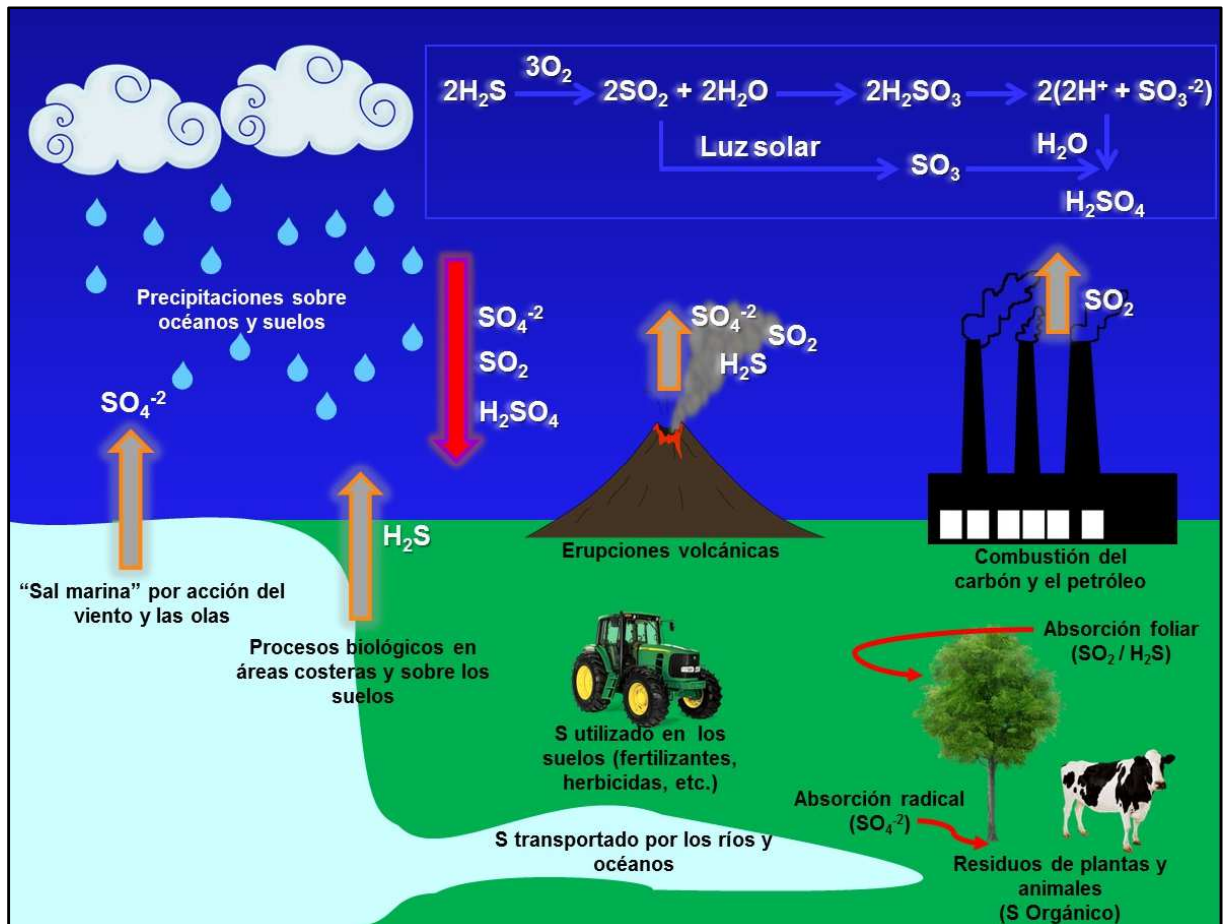


Figura 1.1. Esquema de las fuentes más comunes de azufre (S). SO_3^{-2} , anión sulfito; SO_4^{-2} , anión sulfato; H_2S , ácido sulfhídrico; H_2SO_3 , ácido sulfuroso; H_2SO_4 , ácido sulfúrico; SO_2 , dióxido de azufre; SO_3 , trióxido de azufre.

Cuando la concentración atmosférica de S es elevada (por ejemplo, en áreas cercanas a actividades volcánicas o industriales) muchas plantas pueden absorber el S gaseoso (SO_2 y/o H_2S) foliarmente a través de los estomas y metabolizarlo directamente (Rennenberg, 1984; Wainwright, 1984; Haneklaus *et al.*, 2007). La tasa de absorción foliar va a depender de la conductancia de los estomas y del interior de la hoja (mesófilo) para dichos gases y de la concentración de estos en la atmósfera (Haneklaus *et al.*, 2007).

Sin embargo, la principal forma de S absorbido por parte de las plantas es el SO_4^{-2} del suelo mediante un transporte activo a través de la membrana plasmática de las células de la raíz (Haneklaus *et al.*, 2007).

1.1.2. Metabolismo del S

La absorción y transporte del SO_4^{-2} en las plantas es mediada por proteínas transportadoras específicas de este anión, que se encuentran presentes en las células de las raíces, siendo dicho proceso energéticamente dependiente (impulsado por un gradiente de protón generado por ATPasas) a través de un co-transporte $\text{H}^+-\text{SO}_4^{-2}$. Existen transportadores de SO_4^{-2} de alta y baja afinidad, los cuales operan a concentraciones inferiores o superiores a 0,1 mM de SO_4^{-2} en el suelo, respectivamente. Los transportadores de SO_4^{-2} se expresan diferencialmente en distintos tejidos de la planta y son regulados, principalmente, por el estado nutricional de S de la planta a través del monitoreo de la concentración intracelular de SO_4^{-2} y de los productos del metabolismo del S (Rennenberg, 1984; Hesse, 2004; Haneklaus *et al.*, 2007).

Luego de su absorción, el SO_4^{-2} es cargado en los vasos del xilema y transportado hacia el tallo mediante la corriente de transpiración. Pese a que los plástidos de las raíces contienen todas las enzimas necesarias para la reducción del SO_4^{-2} , es en los cloroplastos de las células fotosintéticas donde tiene principalmente lugar la asimilación del S inorgánico (SO_4^{-2}) en S orgánico a través de sucesivas reducciones (Benavides, 1998; Haneklaus *et al.*, 2007). La asimilación del SO_4^{-2} da como producto final al aminoácido cisteína que es la primera molécula sintetizada en el metabolismo de las plantas que contiene tanto S como N y que es el precursor del resto de los metabolitos azufrados, claves en diversos caminos metabólicos (Hesse, 2004).

Los pasos de asimilación del S son (**Figura 1.2**; Haneklaus *et al.*, 2007): 1) el SO_4^{-2} , previo a su reducción, es activado, mediante su unión covalente con ATP, dando lugar a adenosín-5'-fosfosulfato (APS) mediante una reacción catalizada por una ATP-sulfurilasa, 2) el SO_4^{-2} activado (APS) es reducido por una APS-reductasa a sulfito (SO_3^{-2}), reacción donde el glutatión actúa como agente reductor, 3) el SO_3^{-2} es reducido a sulfuro (S^{-2}) mediante una sulfito-reductasa siendo la ferredoxina reducida el agente reductor en este paso, 4) el S^{-2} es entonces transferido a una serina activada (O-acetilserina, OAS) por la O-acetilserin(thiol)liasa (OASTL) para formar cisteína. La OAS, es sintetizada por la serina acetiltransferasa (SAT), enzima que forma un complejo junto con la OASTL denominado cisteína sintasa, 5) a continuación, la cisteína sintetizada actúa como un dador de S^{-2} para la síntesis de metionina, el otro aminoácido que contiene S que se encuentra presente en mayor proporción en las plantas, a través de la denominada trans-sulfurilación. Además de ser incorporada en las proteínas, la cisteína es el precursor directo para la síntesis de otros compuestos azufrados de importancia fisiológica para la planta.

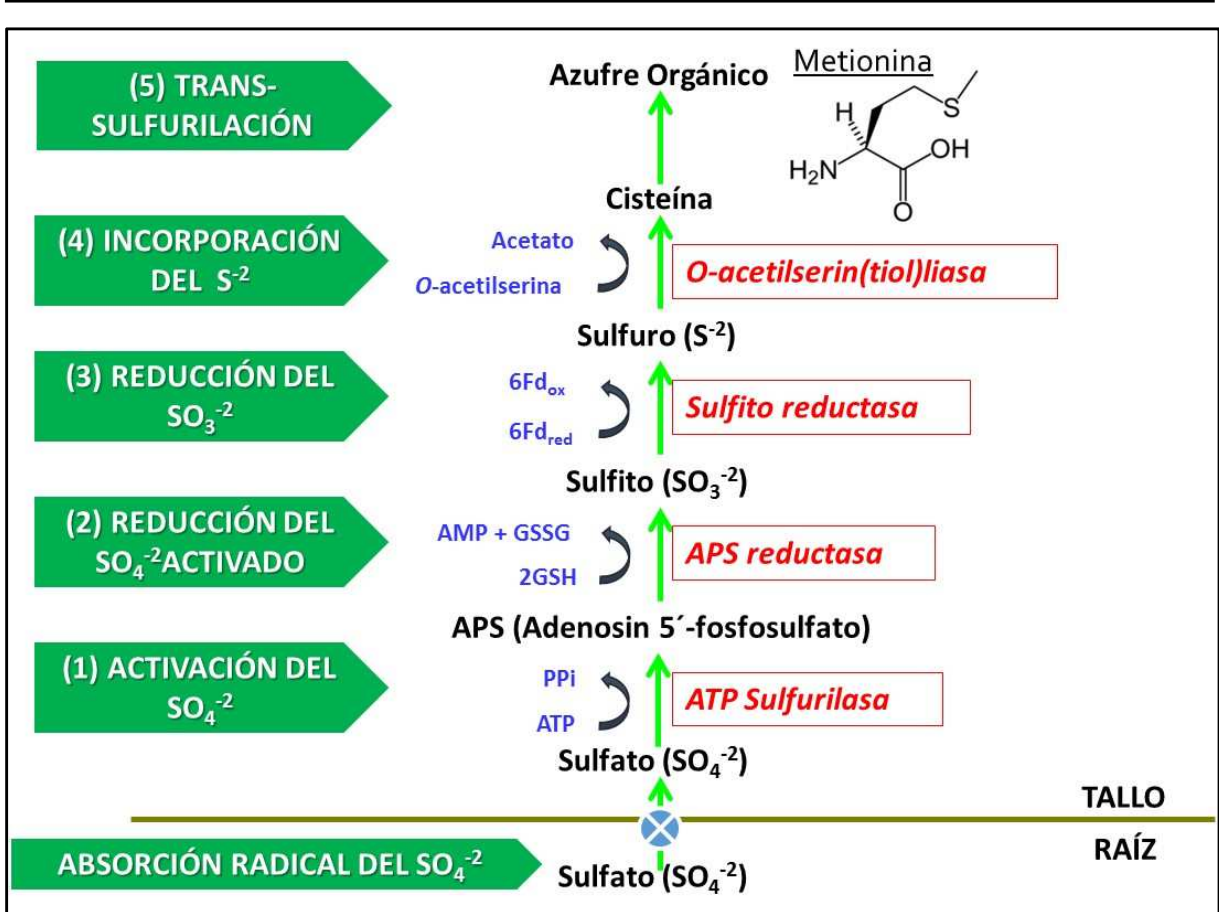


Figura 1.2. Esquema de la reducción del sulfato (SO_4^{-2}) y su asimilación en las plantas. ATP, adenosín trifosfato; P_i, pirofosfato; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; F_{d_{red}}, ferredoxina reducida; F_{d_{ox}}, ferredoxina oxidada (Haneklaus *et al.*, 2007).

1.1.3. Importancia del S en la fisiología de la planta

El S es un macronutriente esencial en la nutrición de las plantas requerido para el apropiado crecimiento y desarrollo de las mismas. Además de intervenir en la síntesis de aminoácidos azufrados (cisteína y metionina) y luego ser incorporado a las proteínas, interviene en la síntesis de compuestos azufrados de importante significancia en la funcionalidad de las plantas (Scott y Eagleson, 1988; Haneklaus *et al.*, 2007; Lewandowska y Sirko, 2008; Lunde, 2008). Entre ellos se puede mencionar a la S-adenosil-l-metionina (SAM), agente metilante más importante conocido en todos los organismos que interviene en reacciones de transmetilación claves para la regulación de la expresión génica y la actividad de diversas enzimas. El grupo sulfuro-hierro del aparato fotosintético y del sistema de transporte de electrones que intervienen en la asimilación del dióxido de carbono (CO_2) por parte de las plantas y en la captura de la energía lumínica necesaria para realizar la fotosíntesis. El glutatión (GSH/GSSG), que cumple diversos roles claves dentro de la planta: es el agente reductor en uno de los pasos de la asimilación del S, es la principal forma de S reducido transportable a larga distancia y durante la germinación y provee protección a la planta contra estreses y cambios ambientales (ej.: polución, sequía, bajas temperaturas,

radiación UV-B, entre otras) actuando como protector contra las especies reactivas del oxígeno formadas durante dichos estreses. Finalmente, otra molécula azufrada de importancia en la fisiología de la planta es la glutatión S-transferasa, una enzima que actúa protegiendo las macromoléculas biológicas de la planta (proteínas y ácidos nucleicos) de las consecuencias tóxicas de los herbicidas o insecticidas al catalizar la conjugación del glutatión endógeno con las sustancias xenobióticas, incrementando su solubilidad y permitiendo así la eliminación del compuesto tóxico.

A su vez, los puentes disulfuro que se forman en las proteínas entre los grupos sulfhidrilos, también llamados grupos tioles ($-SH$), de los residuos de cisteína juegan un rol crucial en la formación y mantenimiento de las estructuras y funcionalidad proteica (Haneklaus *et al.*, 2007).

Además de estas funciones estructurales, el S es un constituyente esencial en la actividad enzimática; se sabe que aproximadamente un 40% de las enzimas (entre ellas ferredoxinas, nitrogenasas, entre otras) dependen para su actividad catalítica de la presencia de grupos $-SH$. Dichos grupos proporcionan sitios de unión para metales tóxicos o fisiológicamente importantes y se ven involucrados en numerosas reacciones redox debido a su relativa facilidad de oxidación (Benavides, 1998).

Por lo tanto, la deficiencia de este nutriente conlleva a impactos negativos de variada índole sobre la planta. Deficiencias severas de S disminuyen el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como también generan una marcada reducción del aparato fotosintético, provocando la aparición de hojas uniformemente amarillas o verdes pálidas por el menor contenido de clorofila y de la enzima ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), la cual posee un alto contenido de S por molécula (Miziorko y Lorimer, 1983; Gilbert *et al.*, 1997; Ferraris, 2007; Lunde *et al.*, 2008). Asimismo, la deficiencia de S provoca una disminución en el contenido de aminoácidos azufrados y del contenido proteico en general, mientras que causa una acumulación de compuestos nitrogenados no azufrados (entre ellos glutamina, arginina, asparagina, nitrato, entre otros) debido a una disrupción en el metabolismo del N (Hesse *et al.*, 2004; Nikiforova *et al.*, 2004; Abdallah *et al.*, 2011; De Bona *et al.*, 2011; Sorin *et al.*, 2015).

1.2. Características generales del cultivo de cebada

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) es una planta monocotiledónea anual, de ciclo corto, que pertenece a la familia de las gramíneas, junto con el trigo, arroz, avena, maíz y sorgo. Se cultiva principalmente en climas fríos como cosecha de primavera, pero su grano es altamente adaptable y puede crecer en climas desde subárticos hasta subtropicales (FAO, 2009).

Ocupa el cuarto lugar en importancia entre los cereales a nivel mundial después del trigo, maíz y arroz (www.minagri.gov.ar, 2015; Guo *et al.*, 2016) y su grano no sólo se utiliza ampliamente para alimentación tanto humana como animal, sino que también es el más utilizado para el malteado y la elaboración de cerveza (Lapitan *et al.*, 2009; Colgrave *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2016).

Particularmente en Argentina, el cultivo de cebada cervecera se ha incrementado de manera notoria en los últimos años como una alternativa de creciente interés como cultivo de invierno (Marinissen *et al.*, 2009), debido a la menor duración del ciclo de este cultivo en comparación con otros cereales invernales (Giménez y Tomaso, 2008), lo cual permite la siembra de soja de segunda, y a su vez a causa de una creciente demanda nacional e internacional de malta para la fabricación de cerveza (FAO, 2009).

Básicamente la cebada (**Figura 1.3A**) se clasifica según la disposición de los granos en las espigas y/o según el momento de siembra. Según el primer criterio se pueden discriminar las de seis hileras (**Figura 1.3B**) y las de dos (**Figura 1.3C**), mientras que según el segundo criterio se discriminan las de invierno y las de primavera. A su vez, las de invierno pueden ser de dos o seis hileras mientras que las de primavera lo son sólo de dos. Los granos de la cebada de dos hileras presentan menor contenido proteico y mayor calibre que la de seis, por lo cual es más adecuada para la producción de malta, mientras que la de seis lo es más para la alimentación de ganado (FAO, 2009).



Figura 1.3. (A) Fotografía tomada en octubre de 2010 de un cultivo de cebada cervecera en un campo de la localidad de Junín, provincia de Buenos Aires. (B) Imagen de una espiga de cebada de seis hileras. (C) Imagen de una espiga de cebada de dos hileras.

1.2.1. Criterios de calidad del grano de cebada

La cebada se emplea principalmente para producir malta, la principal materia prima en la fabricación de cerveza. Durante el proceso de malteado los granos de cebada son germinados bajo condiciones estrictamente controladas, para que se sinteticen y/o induzcan las enzimas hidrolíticas, que se encuentran naturalmente presentes en el grano (por ejemplo amilasas y proteasas), necesarias para convertir los componentes de alto peso molecular del grano (almidón y proteínas de almacenamiento) a moléculas más pequeñas (azúcares simples, péptidos, aminoácidos) que luego serán requeridos en la última etapa de la fabricación de cerveza (la fermentación) por parte de las levaduras para crecer y metabolizar los azúcares a fin de producir alcohol (Briggs *et al.*, 2004; Jones, 2005; Lapitan *et al.* 2009). La actividad hidrolítica comienza durante el proceso de malteado, pero ocurre principalmente durante la maceración (primer paso de la fabricación de cerveza) generando un extracto azucarado denominado extracto de malta.

Dado que las determinaciones de calidad de malta son costosas y lentas, para la comercialización en la industria cervecera se utilizan ciertas características del grano de cebada que se correlacionan con la calidad maltera. Estas características son principalmente el contenido total de N, como indicador del contenido proteico, y el calibre o tamaño de los granos, relacionado con el contenido de almidón. La industria maltera y cervecera requieren valores de proteínas entre 10 y 12% ya que valores excesivamente bajos limitan el crecimiento de las levaduras encargadas de la fermentación durante el proceso de producción de cerveza, mientras que contenidos proteicos excesivamente altos disminuyen el rendimiento de la malta y generan problemas de turbidez en la cerveza (García del Moral *et al.*, 1998; Briggs *et al.*, 2004).

Sin embargo, la calidad de los granos no sólo depende de la concentración proteica total sino también de la composición de proteínas que contienen. Las hordeínas son las principales proteínas de reserva del grano de cebada y se encuentran formando una matriz proteica que contiene los gránulos de almidón en el endosperma, dificultando el acceso de las enzimas amilolíticas (Slack *et al.*, 1979; Molina-Cano *et al.*, 2000). De este modo, se ha postulado que variaciones en la proporción de las diferentes subunidades de hordeínas afectan la calidad del extracto de malta (Peltonen *et al.*, 1994; Howard *et al.*, 1996; Molina-Cano *et al.*, 2000, 2002; Simic *et al.*, 2007).

1.2.2. Proteínas de reserva del grano de cebada y su relación con la calidad maltera

Tradicionalmente, las proteínas de reserva de los cereales se clasifican en base al solvente que se emplea para su extracción. De este modo se logran discriminar cuatro tipos: 1) las albúminas, solubles en agua; 2) las globulinas, solubles en soluciones salinas diluidas; 3) las prolaminas, solubles en alcoholes acuosos; y 4) las glutelinas, solubles en ácidos o álcalis diluidos (Gubatz y Shewry, 2011).

En la mayoría de los granos de cereales el principal grupo de proteínas de almacenamiento son las prolaminas, denominadas hordeínas en el caso particular de la cebada. Éstas se localizan en el endosperma amiláceo, comprendiendo entre el 30 y el 50% de la proteína total del grano.

Las hordeínas se clasifican en base a sus movilidades electroforéticas y su composición de aminoácidos, en las fracciones B, C, D y γ . Las fracciones B y C representan el 70-80% y el 10-20%, respectivamente, del total del contenido de hordeínas, mientras que los grupos D y γ son componentes cuantitativamente menores que comprenden menos del 5% de la fracción total de hordeínas.

Con respecto a su composición, las fracciones B y γ son ricas en S mientras que la fracción D tiene un contenido intermedio de S y la C es pobre en este nutriente (Shewry y Tatham, 1990; Howard *et al.*, 1996; Gubatz y Shewry, 2011). Por lo tanto, variaciones en la disponibilidad de S repercuten sobre la cantidad final de cada fracción proteica que se establece en los granos (Shewry *et al.*, 1983; Dostálová *et al.*, 2015; Holopainen *et al.*, 2015).

En varios trabajos se ha observado que las hordeínas B y D se encuentran negativamente correlacionadas con el extracto de malta (Baxter y Wainwright, 1979; Smith y Lister, 1983; Peltonen *et al.*, 1994; Howard *et al.*, 1996; Molina-Cano *et al.*, 2000; 2002; Qi *et al.*, 2005; Simic *et al.*, 2007). Esto podría explicarse por las estrechas asociaciones que se forman entre el almidón y estas hordeínas dando lugar a agregados coloidales que, consecuentemente, inhibirían la hidrólisis del almidón disminuyendo así su posterior disponibilidad para las enzimas amilolíticas durante la fabricación de cerveza (Slack *et al.*, 1979; Baxter, 1981; Smith y Lister, 1983).

1.3. Removilización de N y S hacia los granos

La síntesis de las proteínas de reserva del grano requiere el aporte de N y S, entre otros nutrientes. Estos pueden provenir de dos vías: 1) de la absorción de nitrato y sulfato por parte de las raíces durante el periodo de crecimiento de los granos, los cuales serán transportados directamente hacia ellos vía xilema o 2) del N y S previamente almacenados en los tejidos vegetativos (también denominados tejidos fuente) en un proceso que se denomina removilización y que requiere la previa degradación de las proteínas de las hojas a fin de dar lugar a péptidos más pequeños y aminoácidos libres que serán transportados hacia los granos en desarrollo vía floema.

La enzima Rubisco ha sido postulada como fuente importante de reserva de N y S, ya que cuenta con ambos elementos en su estructura y representa alrededor del 50% del total de proteína soluble de las hojas en las plantas C3, cantidad que excede notablemente los requerimientos para la fotosíntesis (Hirel *et al.*, 2007). Una vez degradadas las proteínas, el N se transporta al grano principalmente como glutamina y glutamato (Raymond y Hanson, 1979) mientras que el S lo hace como S-metilmetionina (Bourgis *et al.*, 1999) y glutatión (Rennenberg *et al.*, 1979) a través del floema. (Hirel *et al.*, 2007). La contribución relativa de estos dos procesos, absorción y removilización, varía según la especie y las condiciones ambientales; sin embargo, numerosos estudios realizados en cereales como cebada, trigo y arroz han demostrado que hasta el 90% del N del grano proviene de la removilización del N almacenado en los tejidos vegetativos (Gregersen *et al.*, 2008). A su vez, en entornos con baja disponibilidad de nutrientes la eficiencia de removilización se vuelve esencial para el aporte de N y S para el desarrollo de los granos (Dalling, 1985; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008; 2010), mientras que frente a alta disponibilidad de N en el medio la eficiencia de absorción es más importante que la de removilización y por ende una cantidad significativa de N permanece en la paja después de la cosecha (Dalling, 1985; Ercoli *et al.*, 2008).

En líneas generales la tasa de removilización de asimilados varía de una especie a otra, según el estado de desarrollo tanto vegetativo como reproductivo, la tasa de crecimiento y la relación fuente–destino establecida. Asimismo, es influenciada por la disponibilidad de nutrientes en el suelo en los distintos períodos del desarrollo de las plantas, por el momento de la aplicación del fertilizante y por condiciones ambientales como la luz o estreses bióticos y abióticos, así como ante variaciones en el contenido de ciertos reguladores del crecimiento (Gan y Amasino, 1997). Entre estos, el grupo de fitohormonas citocininas (CK) regula la tasa de removilización a través de su participación en la regulación de la absorción de nutrientes, la distribución fuente–destino de los asimilados y la senescencia (Gan y Amasino, 1997; Jordi, *et al.*, 2000; Cowan *et al.*, 2005).

De esta forma se evidencia que la regulación de la removilización de N y S no es sencilla y esto en parte puede deberse a que en la determinación de su eficiencia

intervienen diversos procesos. Entre ellos se encuentra el mecanismo de carga de los aminoácidos al floema y la generación de un reservorio de aminoácidos transportables, los cuales pueden provenir tanto de la asimilación como de la degradación de proteínas almacenadas. Todos estos procesos son en sí mismo complejos y sus regulaciones aún no han sido comprendidas en su totalidad.

1.3.1. Transporte a larga distancia vía floema

El tejido encargado del transporte a larga distancia de los metabolitos orgánicos producidos por la planta, principalmente azúcares y aminoácidos, es el floema. Este tejido está formado por dos tipos celulares relacionados: los elementos o tubos cribosos y las células acompañantes (**Figura 1.4**).

Los elementos cribosos son células altamente modificadas que durante la maduración pierden el núcleo y las mitocondrias y que poseen abundantes perforaciones en las paredes celulares en las zonas donde se unen a otros elementos cribosos para formar conductos conocidos como tubos cribosos por donde viajan los metabolitos. Las células acompañantes, que se caracterizan por tener un protoplasma denso, núcleo y numerosas mitocondrias, se encuentran conectadas a los elementos cribosos por un conjunto de plasmodesmos de tal forma que la funcionalidad metabólica de los elementos cribosos depende de los procesos que ocurren en las células acompañantes (Nabors, 2006).

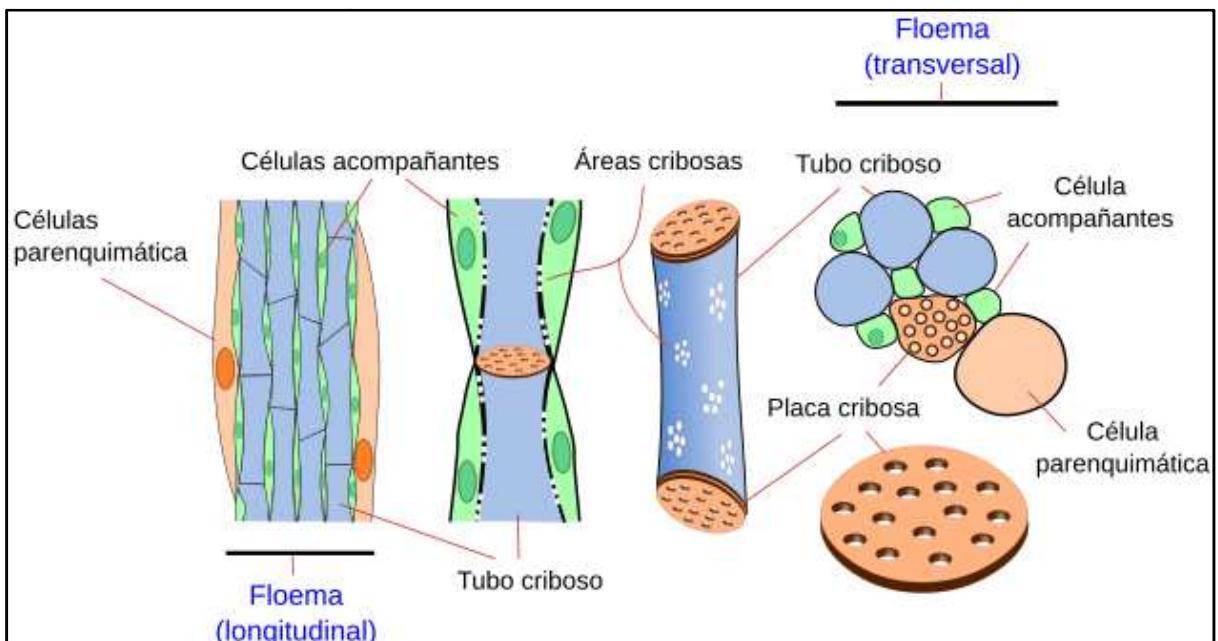


Figura 1.4. Esquema donde se representan la estructura y los principales tipos celulares del floema de una angiosperma sacado del “Atlas de histología vegetal y animal”.

En el floema, los azúcares y aminoácidos son concentrados para luego ser liberados de manera controlada en los tejidos destino. Ambos procesos son afectados por factores

ambientales, bioquímicos, fisiológicos y de desarrollo que en conjunto determinan la cantidad de metabolitos que pueden ser descargados en los tejidos destino.

Tanto en la carga como en la descarga del floema existen mecanismos apoplásticos, simplásticos o su combinación (Tofiño, 2007). El transporte simplástico se basa en la comunicación entre el complejo tubo criboso-célula acompañante y las células del mesófilo vecinas a través de la red interconectada de protoplastos (plasmodesmos). Este transporte es más común en los vegetales de climas cálidos. Por otra parte, el transporte apoplástico es más común en los vegetales de climas templados o fríos y se basa en el pasaje de moléculas a través del conjunto de espacios intercelulares y las paredes que forman el espacio circundante fuera de los protoplastos, el cual depende de las proteínas integrales de membrana llamadas permeasas o transportadores (Nabors, 2006).

1.3.2. Transporte apoplástico: transportadores de aminoácidos

Los transportadores de aminoácidos (TAA) se encuentran agrupados en varias familias de genes, de los cuales la familia de las aminoácido permeasas (AAP) es considerada como potencial candidata para el traspaso de los aminoácidos desde el tejido fuente hacia el destino, mediando la carga apoplástica de los mismos al floema (Tegeder, 2012; Tegeder y Ward, 2012).

Kohl *et al.* (2012) reportaron la identificación y análisis filogenético de 53 TAA de cebada en relación a transportadores conocidos en otras especies de plantas y determinaron que las AAP serían los transportadores predominantes en la removilización del N y el llenado de los granos (**Figura 1.5**). Además, encontraron una alta expresión de los genes de seis TAA (*HvAAP2*, *HvAAP4*, *HvAAP6*, *HvAAP7*, *HvLHT2*, *HvProT1*) en la hoja bandera de plantas de cebada.

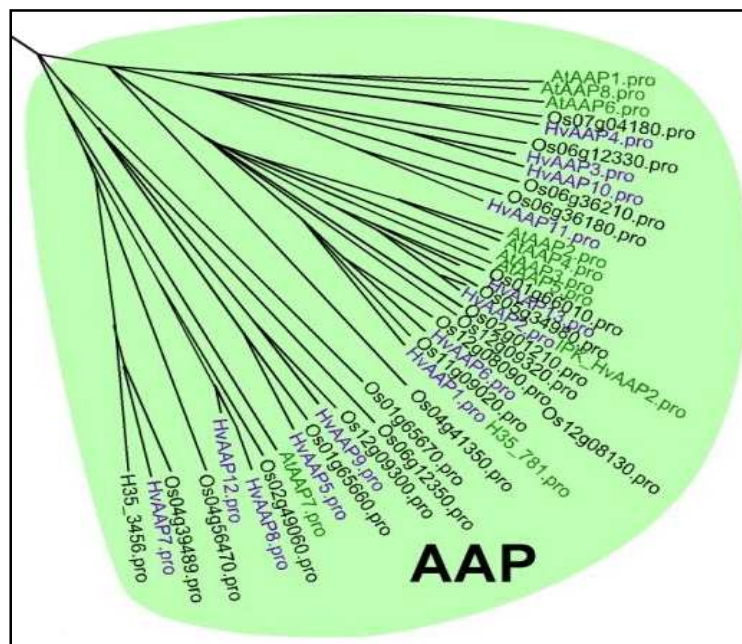


Figura 1.5. Segmento del árbol filogenético publicado por Kohl *et al.* (2012) donde se agrupan las aminoácido permeasa (AAP) por homología con los transportadores de aminoácidos (TAA) de Arabidopsis, arroz y cebada. Las secuencias pertenecientes a las AAP de cebada se destacan en violeta y los TAA cuya funcionalidad está bien caracterizada se destacan en verde.

En base a la homología de secuencias entre los TAA de *Arabidopsis* y cebada, Kohl *et al.* (2012) determinaron que *HvAAP2* y *HvAAP6*, activos sólo en los tejidos fuente, están estrechamente relacionados con *AtAAP2* y *AtAAP5* de *Arabidopsis*, los cuales se cree que están involucrados en el transporte a larga distancia de los aminoácidos, especialmente glutamina, cumpliendo un rol en la carga de los mismos hacia el floema (Tegeeder y Rentsch, 2010). Por otra parte, *HvAAP4* no sólo se expresó altamente en los tejidos fuente (hoja bandera y glumelas) sino que también lo hizo en el tejido destino (granos) de plantas de cebada, mostrando una alta similitud de secuencia con *AtAAP1* y *AtAAP8* (Kohl *et al.*, 2012), los cuales juegan un rol en el suministro de N a las semillas en desarrollo de *A. thaliana* (Tegeeder, 2012). Con respecto a *HvProT1*, cuyo gen correspondería a un transportador de prolina, se sabe que los genes de este transportador se inducen frente a numerosos tipos de estreses (Pratelli y Pilot, 2014) y que la prolina se acumula en muchas especies de plantas cuando éstas son afectadas por condiciones desfavorables, tales como estrés hídrico, estrés salino, intoxicación con N, daño físico, entre otros (Claussen, 2002; Ashraf y Harris, 2004; Claussen, 2005). Finalmente, si bien no se encontró homología significativa de *HvAAP7* con secuencias conocidas, el estudio de la regulación de este transportador junto con el de *HvLHT2* (transportador tipo lisina/histidina) resulta interesante debido a su alta expresión en hoja bandera y en las glumelas durante el llenado del grano de cebada (Kohl *et al.*, 2012).

Hasta el momento es escasa la información que se tiene sobre los mecanismos que regulan la expresión de los genes de TAA en cebada, dado que pocos de ellos han sido totalmente caracterizados, siendo muy pocos los reportes sobre los estreses abióticos y bióticos que afectan la expresión de estos transportadores (Pratelli y Pilot, 2014) e incluso ninguno de ellos hace referencia a la disponibilidad de S.

1.3.3. Síntesis de aminoácidos para el transporte: glutamina sintetasa

La glutamina sintetasa (GS), enzima que asimila el amonio (NH_4^+) a una molécula orgánica (glutamato para generar glutamina), ha sido postulada como una enzima clave tanto en la asimilación como en el reciclado del N dentro de la planta. En plantas superiores existen dos isoformas de esta enzima: 1) una citosólica (GS1, codificada por una familia multigénica) y 2) una plastídica (GS2, codificada por un solo gen). La proporción relativa en que se presentan estas dos isoformas varía dentro de los distintos órganos de una misma planta y/o entre distintas especies de plantas, dependiendo tanto de su condición fotosintética como de las condiciones ambientales. Asimismo, estas isoformas se encuentran reguladas por su compartimentalización en los distintos órganos y tejidos celulares de las plantas, a nivel tanto transcripcional como post-transcripcional (Cren y Hirel, 1999).

En cebada han sido identificadas tres isoformas génicas de la GS1: 1) la *HvGS1_1*, cuya principal localización es en las células vasculares de distintos tejidos; 2) la *HvGS1_2*, localizada primordialmente en las células del mesófilo, el córtex y periciclo de las raíces; y 3) la *HvGS1_3*, predominantemente localizada en el grano (Goodall *et al.*, 2013).

En la **Figura 1.6** se esquematiza la localización celular y tisular de las distintas isoformas de la GS de cebada, resumiendo lo reportado en los trabajos de Cren y Hirel (1999), Goodall *et al.* (2013) y Thomsen *et al.* (2014).

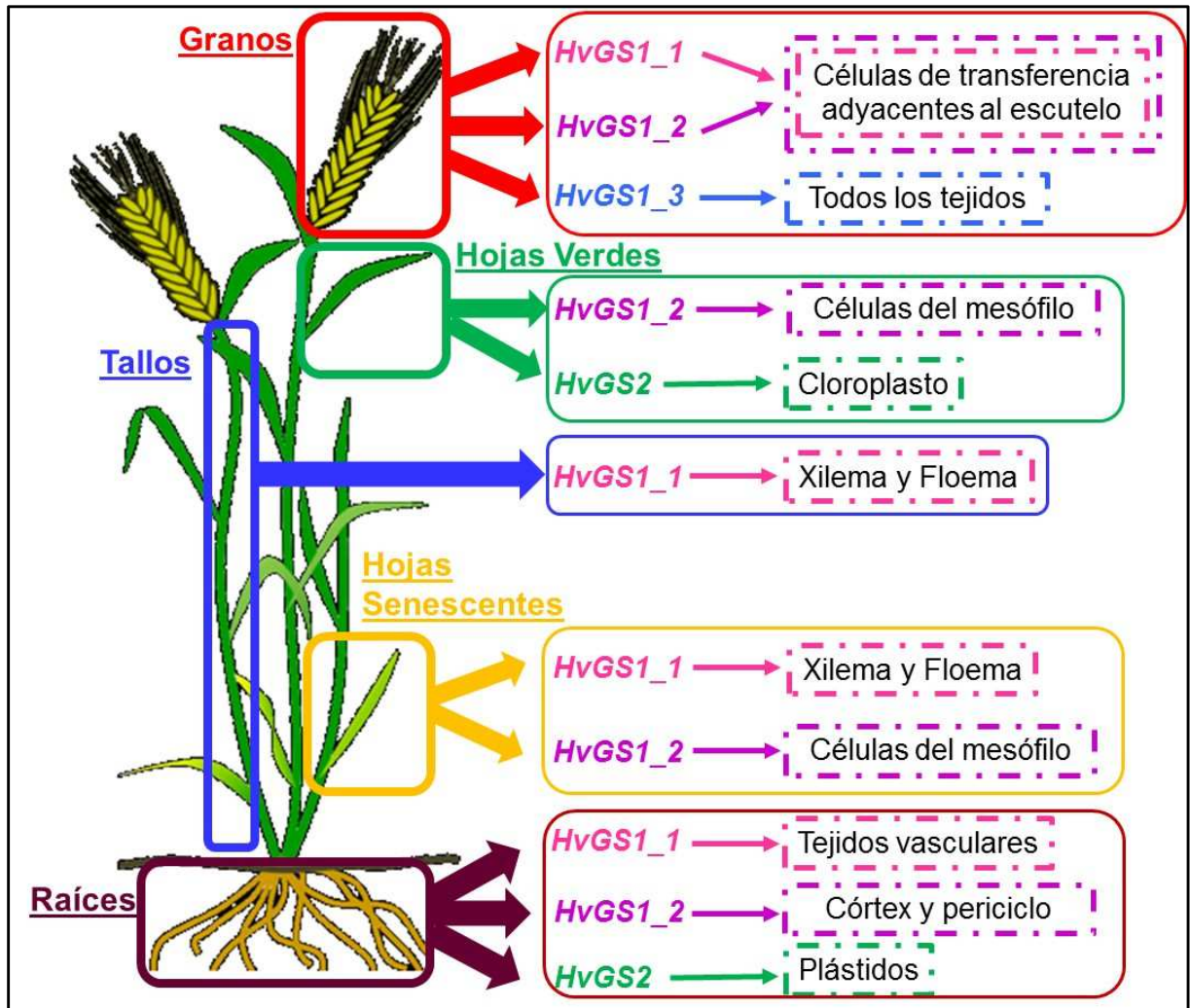


Figura 1.6. Esquema especificando los tejidos en donde se expresan los genes de las distintas isoformas de la GS en cebada bajo condiciones normales de crecimiento.

En conjunto, la GS1 tiene un rol importante en la asimilación primaria del NH_4^+ en las raíces y en la re-asimilación del NH_4^+ generado durante el reciclado (“turnover”) de las proteínas en las hojas. Por otra parte, la GS2 tiene un rol dominante en la re-asimilación del NH_4^+ proveniente de la fotorrespiración en los cloroplastos y en la asimilación del NH_4^+ derivado de la reducción del nitrato en los plástidos (Thomsen *et al.*, 2014).

Se cree que la isoforma citosólica GS1_1 estaría involucrada en la removilización del N desde las hojas senescentes durante el llenado del grano en especies anuales. Esta función se le atribuye principalmente debido a: su localización en tejidos vasculares, tanto en el xilema como en el floema de hojas y tallos, y en las células de transferencia adyacentes al escutelo en los granos en desarrollo (Goodall *et al.*, 2013); su regulación por la disponibilidad de N (Bernard y Habash, 2009; Goodall *et al.*, 2013); y su importancia durante la senescencia (Mifflin y Habash, 2002) y el llenado del grano (Tabuchi *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2006). Además, en plantas jóvenes de trigo se ha observado que los niveles de expresión de GS1_1 se correlacionan con la tasa de exportación de aminoácidos que llegan al floema (Caputo *et al.*, 2009).

Por otro lado, Goodall *et al.* (2013) también le atribuyen a la GS1_2 de cebada un rol en la removilización del N durante la senescencia, pero mencionan que sus funciones estarían mayormente ligadas con la asimilación primaria del NH_4^+ generado durante la reducción del nitrato en las hojas y en las raíces. Esto lo atribuyen a su localización predominante en las células del mesófilo, córtex y periciclo en las raíces y al aumento en los niveles de expresión de esta isoenzima en las hojas de plantas cultivadas con alta disponibilidad de N (opuesto a lo que ocurre con GS1_1). Del mismo modo, basándose en su localización y mayor abundancia en las hojas con respecto a la GS1_1, mencionan que la GS1_2 complementaría el rol que cumple la GS2 ya que en las células del mesófilo de las hojas la principal fuente de NH_4^+ es aquella proveniente de la fotorrespiración.

En cuanto a la influencia de la disponibilidad del S sobre esta enzima, se observó que en hojas de plantas sujetas a largos periodos de deficiencia de este nutriente los niveles de glutamina aumentaron, posiblemente debido a una inducción de la actividad de la GS con el fin de contrarrestar la toxicidad producida por la acumulación de NH_4^+ (Hesse *et al.*, 2004).

1.3.4. Degradación de proteínas durante la senescencia foliar: proteasas asociadas

La senescencia foliar es básicamente un proceso de reciclado de nutrientes donde se produce una degradación masiva de moléculas complejas, como las proteínas, lo que lleva a la muerte de las hojas. Durante esta etapa los nutrientes acumulados en los tejidos senescentes son re-direccionados hacia los tejidos que se encuentran en desarrollo (Buchanan-Wollaston, 1997). Por lo general, este proceso se ve inducido frente a ciertos estreses abióticos como la deficiencia de N, con el fin de potenciar la removilización de los nutrientes desde las hojas maduras hacia las hojas más jóvenes, asegurando así la supervivencia de la especie (Avicé y Etienne, 2014). Sin embargo, ha sido reportado que la deficiencia de S retrasaría este proceso en plantas de colza (Dubousset *et al.*, 2009; Abdallah *et al.*, 2011).

La senescencia se encuentra genéticamente controlada e involucra la síntesis de proteínas “*de novo*”, la regulación positiva (como el caso de los SAGs, del inglés “*senescence-associated genes*”) o negativa de genes específicos, una caída en la fotosíntesis y en la síntesis proteica neta y un aumento de la degradación de las proteínas presentes en las hojas, que es llevado a cabo por enzimas hidrolíticas denominadas proteasas (Gan y Amasino, 1997; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Kant *et al.*, 2011; Avice y Etienne, 2014).

Las proteasas no sólo tienen un rol durante la senescencia, sino que además poseen diversas funciones claves durante todas las etapas de la vida de la planta tales como el “*turnover*” de las proteínas, la degradación de proteínas dañadas, mal plegadas o potencialmente dañinas, la ruptura selectiva de proteínas regulatorias del crecimiento, desarrollo y defensa, modificaciones post-traduccionales y la maduración de enzimas (Schaller, 2004; van der Hoorn, 2008; Roberts *et al.*, 2012).

Las proteasas pueden clasificarse en función de diversas características, pero la clasificación más utilizada se basa en su actividad catalítica. En la **Figura 1.7** se esquematiza el mecanismo de clivaje y las diferencias entre las cuatro clases principales de proteasas (cisteín, serín, metalo y aspárticas), basándose en la naturaleza del nucleófilo y el oxianión estabilizador de cada grupo (van der Hoorn, 2008).

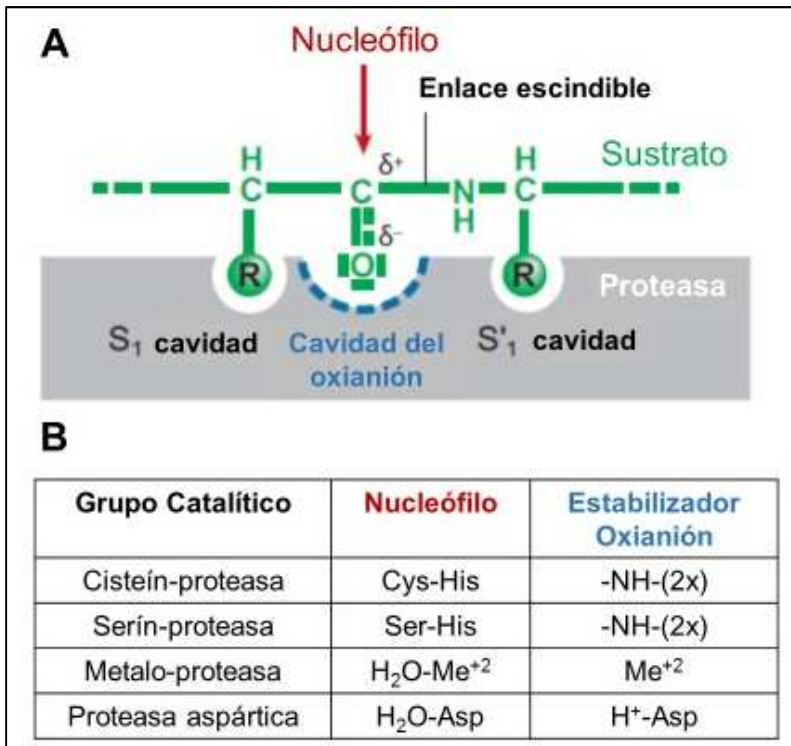


Figura 1.7. (A) Mecanismo de clivaje por proteólisis: la proteína (sustrato, verde) se une a través del residuo aminoacídico (R) al sitio de unión a sustrato de la proteasa (gris), mediante la interacción con la cavidad para el sustrato (S) de la enzima. El enlace escindible del péptido es adyacente al grupo carbonilo, el cual es polarizado por la enzima al estabilizar la cavidad del oxianión (azul), lo cual torna vulnerable al C del grupo carbonilo al ataque del nucleófilo (rojo). **(B)** Diferencias de las cuatro clases principales de proteasas en base a la naturaleza del nucleófilo y del oxianión estabilizador. Asp = aspartato; Cys = cisteína; His = histidina; Me⁺² = ión metal; R = residuo aminoacídico; S = sustrato; Ser = serina. (van der Hoorn, 2008).

Particularmente en cebada todavía es muy poco lo que se conoce sobre la proteólisis asociada a la senescencia y su rol en la removilización de N y S. En un trabajo de Parrott *et al.* (2010) se ha sugerido que las cisteín-proteasas serían las principales enzimas involucradas en la proteólisis masiva durante la senescencia en cebada. Sin embargo, el rol de las proteasas durante la senescencia vegetal y el efecto de la disponibilidad de S sobre éstas es un aspecto de la fisiología del cultivo de cebada que aún debe ser estudiado con mayor profundidad.

.....

Objetivos e hipótesis

Objetivo general

Avanzar en la comprensión del efecto de la nutrición azufrada sobre la exportación de asimilados desde los tejidos fuente a los destinos y la senescencia foliar, tanto a nivel bioquímico como molecular, y su relación con la concentración y calidad de proteínas en el grano de cebada.

Objetivo específico 1

Determinar el modo en que las variaciones en la disponibilidad de N y S influyen sobre el transporte de azúcares y aminoácidos vía floema y su impacto sobre la expresión de las hordeínas B y C durante el llenado de los granos.

Las **hipótesis** a poner a prueba en este objetivo son:

- a. La tasa de exportación de aminoácidos y azúcares vía floema desde los tejidos fuente aumenta ante una baja disponibilidad tanto de N como de S en el suelo, por lo que las plantas deficientes de ambos nutrientes son las de mayor tasa de exportación.
- b. Las variaciones en la exportación de aminoácidos y azúcares desde los tejidos fuente impactan sobre la dinámica de la acumulación de metabolitos nitrogenados y carbonados en los granos (tejidos destino).
- c. La acumulación de transcriptos de hordeínas B aumenta con la disponibilidad de S mientras que la de las hordeínas C lo hace con la de N.

Objetivo Específico 2

Determinar el efecto de la disponibilidad de S sobre la expresión génica de diversos componentes claves involucrados en el ciclado y removilización del N desde los tejidos fuente a los tejidos destino.

Las **hipótesis** a poner a prueba en este objetivo son:

- a. La deficiencia de S induce la expresión de los genes de GS1 y ciertos TAA involucrados en la carga de los aminoácidos al floema en el tejido fuente.
- b. La tasa de exportación de aminoácidos varía de acuerdo con los cambios en la expresión de GS1 y TAA.

Objetivo Específico 3

Determinar el modo en que la disponibilidad de S afecta la expresión génica de distintas proteasas asociadas al proceso de senescencia foliar y su relación con la dinámica de degradación de las proteínas.

La **hipótesis** a poner a prueba en este objetivo es:

- a. La deficiencia de S retrasa el normal desarrollo de la senescencia de las hojas, influyendo negativamente sobre la expresión de ciertas proteasas asociadas a este proceso, afectando así la dinámica de degradación de las proteínas y el metabolismo del N en general.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

Capítulo 2

Materiales y métodos

2.1. Material vegetal

Se trabajó con plantas de cebada (*Hordeum vulgare* L.) de la variedad Scarlett.

2.2. Condiciones de cultivo

2.2.1. Campo

Se delimitaron parcelas de 20 m² por tratamiento dentro de lotes comerciales de cebada cervecera en la localidad de Junín, al norte de la provincia de Buenos Aires, durante los meses de junio a noviembre. Las semillas fueron sembradas por el productor del lote mediante siembra directa. Las plantas fueron fertilizadas por única vez, al boleo post-siembra, con combinaciones de N (60 kg.ha⁻¹ de N suplementado como urea) y S (10 kg.ha⁻¹ de S suplementado como sulfato de calcio). A su vez todas las parcelas fueron fertilizadas con 30 kg.ha⁻¹ de P para evitar la deficiencia de este nutriente.

2.2.2. Cámara de cultivo

Las semillas se germinaron sobre papel de filtro humedecido durante 48 horas a 25°C en oscuridad para promover el desarrollo de las raíces. Luego las plántulas fueron sembradas en macetas de 300 cm³ con vermiculita como sustrato inerte, a razón de cinco plántulas por maceta. Las plantas se cultivaron bajo condiciones controladas de luz y temperatura (16 h luz a 24°C / 8 h oscuridad a 18°C; irradiancia de 350 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; humedad relativa del 65%) y fueron regadas con solución nutritiva (Hoagland y Arnon, 1950 modificada; **Tabla 2.1**), alternando el riego con H₂O destilada una vez por semana. Para los distintos tratamientos se varió la dosis de S, suministrado como MgSO₄ y/o K₂SO₄ (ver tabla). La concentración de S aplicada en cada tratamiento y ensayo se detalla en los capítulos correspondientes (capítulos 4 y 5).

2.2.3. Invernáculo

Se trabajó en un invernáculo ubicado en el campus de la Facultad de Agronomía de la UBA con luz natural durante los meses de junio a noviembre. Las semillas fueron germinadas en las mismas condiciones que para los ensayos de cámara y las plantas fueron cultivadas hasta madurez fisiológica en macetas de 6 L con vermiculita/perlita (en una relación 1:1) como sustrato inerte, a razón de cinco plantas por maceta. La solución de riego

fue la misma que la utilizada en los ensayos de cámara de cultivo (Hoagland y Arnon, 1950 modificada; **Tabla 2.1**), alternando el riego con H₂O destilada una vez por semana. Para los distintos tratamientos se varió la dosis de S, suministrado como MgSO₄ y/o K₂SO₄. La concentración de S aplicada en cada tratamiento se detalla en el capítulo 6.

2.3. Diseño experimental y toma de muestras

El diseño experimental utilizado en cada ensayo se detalla en el capítulo correspondiente:

Ensayo de interacción NxS a campo: capítulo 3.

Ensayo de curva de S en cámara de cultivo: capítulo 4.

Ensayo de hambreado de S en cámara de cultivo: capítulo 4.

Ensayo de senescencia inducida en cámara de cultivo: capítulo 5.

Ensayo de senescencia natural en cámara de cultivo: capítulo 5.

Ensayo de hambreado de S en invernáculo: capítulo 6

En todos los casos se tomaron cuatro réplicas independientes por tratamiento. En el ensayo de “interacción NxS a campo” (capítulo 3) las muestras consistieron en un metro lineal por parcela de un mismo surco y a madurez (cosecha final) se recolectaron dos metros lineales. Para los ensayos en cámara de cultivo e invernáculo se consideró a cada maceta, conteniendo cinco plantas, como una unidad de muestreo.

Para las determinaciones bioquímicas y moleculares los tejidos fuente (hojas completamente desarrolladas) y destino (hojas en crecimiento o espigas/granos) fueron escindidos y pesados en balanza analítica, para determinar su peso fresco (PF), y posteriormente se congelaron en nitrógeno líquido y conservaron en freezer a -80°C.

2.4. Análisis del crecimiento y desarrollo de las plantas

2.4.1. Determinación de biomasa, rendimiento e índice de cosecha

Para la determinación de la biomasa a partir de los vástagos, así como para las determinaciones de rendimiento, contenido de N y de S en los granos y rastrojo, el material vegetal fue secado en estufas a 60°C hasta obtener un peso constante (al menos 48 h) y luego se pesaron en balanza analítica. En el caso de la cosecha final de los ensayos a campo e invernáculo, las muestras fueron trilladas manualmente para separar los granos, los cuales también se pesaron.

Los índices de cosecha (IC) a madurez se obtuvieron con los siguientes cálculos:

$$IC = \frac{\text{Peso seco (PS) de los granos}}{\text{PS de la biomasa total}}$$

$$\text{ICS} = \frac{\text{Contenido de S en los granos}}{\text{Contenido de S total}}$$

$$\text{ICN} = \frac{\text{Contenido de N en los granos}}{\text{Contenido de N total}}$$

Siendo el S o N total el contenido de cada uno presente en la biomasa aérea total (rastreo + grano).

2.4.2. Determinación del estadio de desarrollo de las espigas

Para el ensayo a campo la fecha de antesis se determinó utilizando un programa de predicción fenológica desarrollado en la Cátedra de Cereales de la Facultad de Agronomía ("Modelos Cronos"; <http://www.agro.uba.ar/catedras/cerealicultura/servicios>), el cual permite estimar el valor promedio más probable del día teórico de antesis teniendo en cuenta el sitio donde se realizó el ensayo, el cultivar y la fecha de siembra. Este dato se corroboró en forma visual en el campo.

Para el ensayo de invernáculo la fecha de antesis se determinó directamente en forma visual como el momento en el cual el 50% del total de las espigas comenzaron a presentar aristas por encima de la vaina de la hoja bandera. A partir de ese momento se comenzó a monitorear el estadio de desarrollo de las espigas según la escala Zadoks (Figura 2.1).



Figura 2.1. Esquema a modo ilustrativo de los distintos estadios de desarrollo de las espigas de cebada según la escala Zadoks. 4.9 = emergencia de las aristas (antesis); 5 = emergencia de la cabeza; 5.1 = primera espiguilla o cabeza visible; 5.3 = ¼ de cabeza emergida; 5.5 = ½ de la cabeza emergida; 5.7 = ¾ de la cabeza emergida; 5.9 = emergencia completa de la cabeza.

2.5. Extracción del exudado floemático

La colección del exudado floemático se llevó a cabo por la técnica de exudación facilitada (Caputo y Barneix, 1997). Se cortaron las espigas y/o la/s última/s hoja/s expandida/s de cada unidad de muestreo (**Figura 2.2**) y se las colocó en tubos conteniendo una solución de ácido etilen-di-amino-tetra-acético (EDTA), 20 mM (pH 8). Estos tejidos fueron pre-incubados por 15 min (paso de lavado) para eliminar los restos celulares remanentes del corte efectuado y para evitar contaminación con el exudado xilemático. Luego fueron transferidos a otro tubo conteniendo la misma solución de EDTA e incubados por 3 h. Tanto la pre-incubación como la incubación fueron realizadas en oscuridad para evitar que los tejidos transpiren y absorban solución por xilema.

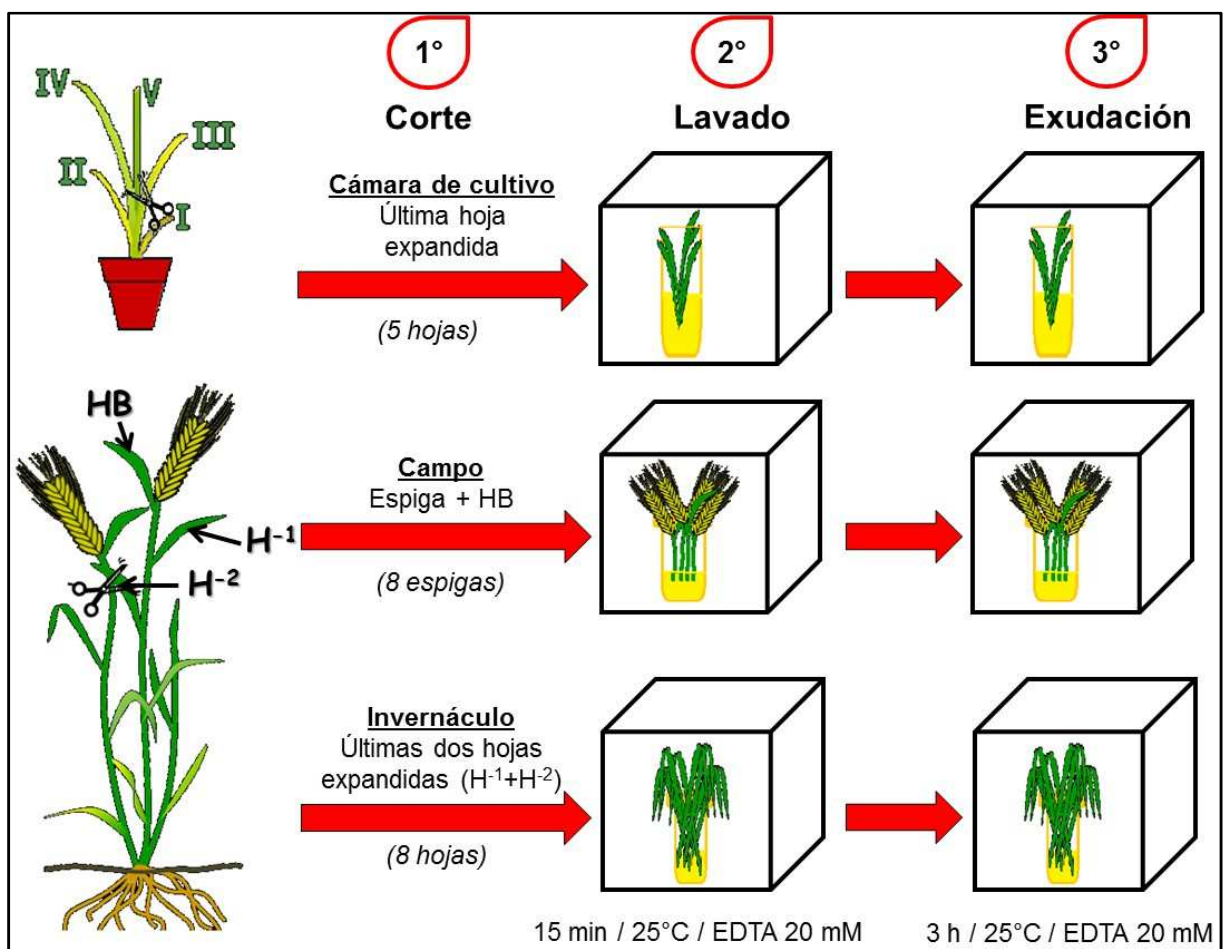


Figura 2.2. Esquema del método de obtención del exudado floemático a partir de las hojas o espigas de plantas de cebada cultivadas en cámara de cultivo, a campo e invernáculo mediante la técnica de exudación facilitada (Caputo y Barneix, 1997). Los números romanos indican el número de hoja de forma ascendente y consecutiva desde la hoja más vieja/senescente (estrato inferior de la planta) hacia las hojas más jóvenes (estrato superior de la planta). HB = hoja bandera; H⁻¹ = hoja por debajo de la HB; H⁻² = hoja por debajo de la H⁻¹. EDTA = ácido etilen-di-amino-tetra-acético.

2.6. Estimación del contenido de clorofila

La concentración de clorofila fue estimada mediante la determinación del índice de verdor de las hojas, con un equipo SPAD (del inglés “*Soil Plant Analysis Development*”) de MINOLTA. Este equipo calcula el valor numérico SPAD (índice de verdor) que es proporcional a la cantidad de clorofila presente en la hoja (medición de luz transmitida + pigmentos foliares). La medición se realizó *in vivo* directamente sobre el tejido expandido (técnica no invasiva) en la porción media de las hojas.

2.7. Preparación de los extractos

Para la preparación de los extractos las muestras se molieron en mortero con nitrógeno líquido. Se tomaron 250 mg del material vegetal pulverizado, se le agregó 1 mL de buffer de extracción (Tris-HCl 25 mM; pH 7,5) y polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v). Las muestras fueron mezcladas y centrifugadas a 10.000 xg, a 4°C por 20 min y los sobrenadantes fueron utilizados para las determinaciones bioquímicas.

2.8. Determinaciones bioquímicas

2.8.1. Determinación de proteínas solubles

La concentración de proteínas en los extractos se determinó por el método de Bradford (1976). Para ello se mezcló un volumen máximo de 15 µL del extracto con 1 mL del reactivo de Bradford (100 mg “Coomassie Brilliant Blue” G-250, 50 mL etanol absoluto, 100 mL ácido fosfórico 85% p/v, llevado a un volumen final de 1 L con H₂O destilada). Luego de incubar dicha mezcla durante 20 min a temperatura ambiente se registró la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteínas fue calculada a partir de una curva de calibración con seroalbúmina bovina (BSA) como estándar.

2.8.2. Determinación de aminoácidos libres

La concentración de aminoácidos libres tanto en los extractos como en los exudados floemáticos fue determinada mediante el método de ninhidrina (Yemm y Cocking, 1955), que consiste en incubar durante 15 min a 100°C una mezcla de un volumen máximo de 500 µL de muestra equilibrado con H₂O destilada, 0,25 mL de buffer citrato de sodio 0,2 M (pH 5), 0,1 mL de una solución de ninhidrina en éter monometílico del etilenglicol (metilcelosolve) 5% (p/v) y 0,5 mL de cianuro de potasio (KCN) 10 mM en metilcelosolve en una proporción 1:49 v/v, para luego dejar enfriar y leer la absorbancia a 570 nm. Para el cálculo de la concentración se realizó una curva de calibración utilizando glicina como patrón. En el caso particular de los extractos, previo a la determinación, se precipitaron las proteínas a fin de eliminar las interferencias de las mismas en la medición. Para ello se mezcló el extracto con

ácido tricloroacético (TCA) 5% (p/v) en una relación 1:5, estas muestras fueron incubadas en hielo por 10 min y centrifugadas a 10.000 xg por el mismo período de tiempo. Este sobrenadante fue el utilizado para las determinaciones de aminoácidos libres.

2.8.3. Determinación de nitrato

La concentración de nitrato en el extracto se determinó por el método de Cataldo *et al.* (1975). Para ello se utilizó como muestra el mismo sobrenadante obtenido a partir de la precipitación de proteínas con TCA mencionado en el ítem anterior. Se incubó durante 20 min a temperatura ambiente una mezcla de 0,12 mL de ácido salicílico 5% en H₂SO₄ concentrado (p/v) con un volumen máximo de 0,03 mL de muestra equilibrado con H₂O destilada. Luego se colocaron los tubos de reacción en hielo y se agregó lentamente 1,425 mL de NaOH 4 N para neutralizar la reacción. Finalmente se leyó la absorbancia a 410 nm. Para el cálculo de la concentración se realizó una curva de calibración utilizando KNO₃ como patrón.

2.8.4. Determinación de azúcares solubles

Para la determinación de la concentración de azúcares solubles, tanto en los extractos como en los exudados floemáticos, se utilizó el método de antrona (Yemm y Willis, 1954) que consiste en incubar a 100°C durante 10 min un volumen máximo de 200 µL de muestra equilibrado con H₂O destilada con 1 mL de una solución 0,2% (p/v) de antrona en H₂SO₄ 75%. Luego de enfriar se leyó la absorbancia a 630 nm. Para el cálculo de la concentración se realizó una curva de calibración utilizando sacarosa como patrón. En el caso de los extractos, previamente se debieron extraer los azúcares solubles hirviendo durante 10 min 0,05 mL del extracto para luego clarificarlos utilizando 0,075 mL de la solución Carrez I (150 g L⁻¹ K₄Fe(CN)₆ x 3 H₂O) y 0,075 mL de Carrez II (300 g L⁻¹ ZnSO₄). Seguidamente, se llevó a un volumen final de 1,5 mL con H₂O destilada y se centrifugó a 10.000 xg por 5 min. Los sobrenadantes obtenidos se utilizaron para la determinación de azúcares solubles.

2.8.5. Determinación de almidón

Para la determinación de la concentración de almidón en los granos se utilizó el método de McCready *et al.* (1950). Se comenzó por eliminar los azúcares solubles mezclando el pellet remanente del extracto de material pulverizado (descrito en el ítem 2.7) con etanol 80% (v/v) en una relación 1:6. Luego, el extracto fue centrifugado a 10.000 xg por 5 min y se descartó el sobrenadante. Esta operación fue repetida cuatro veces más a fin de lograr la completa eliminación de los azúcares solubles. Luego de secar el precipitado durante toda la noche al aire, se procedió con la digestión de los polisacáridos mediante el

agregado de 1 mL de HClO_4 35% (v/v) en hielo, seguido de agitación continua durante 1 h y posterior centrifugación a 10.000 xg por 5 min. Finalmente se procedió a determinar la concentración de los azúcares obtenidos luego de la digestión por el método de antrona ya descrito. Para el cálculo de la concentración se realizó una curva de calibración utilizando glucosa como patrón.

2.8.6. Determinación del contenido de S

El contenido de S en grano y rastrojo se determinó en base al método de San Martín *et al.* (1987). Para ello se molieron 10 g de material y se los secó a 60°C durante toda la noche. Posteriormente 500 mg del material ya seco fue incubado con 3 mL de HNO_3 concentrado nuevamente durante toda la noche. Luego de dicha incubación se digirió la mezcla a 120°C durante 1 h y 30 min. Finalizada esta primer digestión se dejó enfriar la mezcla y se le agregaron 2 mL de HClO_4 concentrado realizando una segunda digestión a 205°C durante 4 h. Pasada la segunda digestión se dejó enfriar la mezcla y se llevó el digesto a un volumen final de 50 mL con H_2O destilada. Finalmente se homogeneizó el digesto y se lo dejó reposar durante toda una noche previo a su utilización para la determinación de S. Dicha determinación se realizó agregando a 5 mL del digesto 1 mL del reactivo de turbidimetría (Tween 80 más solución de BaCl_2 al 10% (p/v) en una relación 1:4), se agitó la mezcla y se la incubó durante 15 min a temperatura ambiente para luego proceder a medir la absorbancia a 410 nm. La concentración fue calculada a partir de una curva de calibración con K_2SO_4 .

2.8.7. Determinación del contenido de N

El contenido de N en grano y rastrojo fue determinado por colorimetría en digestos Kjeldahl (Baethgen y Alley, 1989). Para ello se extrajo el N total mediante una digestión completa de 0,1 g de material seco con 2 mL de H_2SO_4 concentrado a 400°C y un posterior agregado de H_2O_2 100 vol. hasta total clarificación. Luego se diluyó la muestra llevándola a 15 mL finales. A 1 mL del digesto obtenido se le agregó 5,5 mL de solución "Buffer" (0,1 M Na_2HPO_4 ; 5% 0,18 M tartrato Na-K; 1,35 M NaOH; llevado a un volumen final de 1 L con H_2O destilada), 4 mL de una solución de salicilato de sodio 15% 0,94 M y nitroferrocianuro de sodio 0,03% y 2 mL de hipoclorito de sodio (diluido al 0,3%), luego de agitar se incubó a 37°C durante 15 min. Luego se leyó la absorbancia a 650 nm. La concentración fue calculada a partir de una curva de calibración con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

2.9. Determinaciones moleculares

2.9.1. Extracción del ARN total

El ARN total fue extraído a partir de 100 mg del tejido congelado y molido con 1 mL del reactivo TRIzol (Ambion, USA). Luego de mezclar se incubaron las muestras durante 5 min a temperatura ambiente para luego agregar 0,2 mL de cloroformo, agitar e incubar por otros 3 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo la mezcla fue centrifugada a 10.000 xg, a 4°C por 15 min. La fase superior acuosa obtenida (0,5 mL) fue transferida a un tubo limpio al cual se le agregó 0,5 mL de isopropanol, se mezcló y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente con una posterior centrifugación a 10.000 xg, a 4°C por otros 10 min. El sobrenadante fue descartado y se le agregó al pellet obtenido 1 mL de etanol 75%, se mezcló y se centrifugó a 10.000 xg, a 4°C por 5 min. Nuevamente se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet al aire durante 10 min. Finalmente, dicho pellet fue re-suspendido en 0,03 mL de H₂O libre de nucleasas mezclando vigorosamente.

Para el caso particular de la extracción de ARN total de las espigas y granos se realizó un paso extra de centrifugación a 10.000 xg durante 1 min a 4°C luego del agregado del TRIzol. El sobrenadante obtenido fue transferido a un tubo limpio (teniendo particular cuidado en no tomar parte de la interfase) y se le agregó el cloroformo. A partir de allí los pasos de extracción fueron iguales a los mencionados arriba.

La integridad del ARN obtenido fue evaluada en geles de agarosa por tinción con el colorante SYBRsafe (Invitrogen, USA) y posterior revelado bajo luz ultravioleta. Tanto la preparación del gel como la corrida del mismo fueron realizadas con el "Buffer" TBE (5,4 g Tris Base; 2,75 g ácido bórico y 2 mL EDTA 0,5 M, llevado a un volumen final de 1 L con H₂O destilada). La electroforesis se realizó a 90 V y 500 mA durante 20 min.

2.9.2. Síntesis de ADN copia (ADNc) a partir del ARN mensajero (ARNm)

Para la generación del ADNc se realizó una retrotranscripción del ARNm utilizando la enzima Retrotranscriptasa (RT) M-MLV (Promega, USA). Para ello se utilizó 1 µg de ARN tratado con la enzima desoxirribonucleasa (Promega, USA), a fin de eliminar contaminaciones con ADN genómico de las muestras de ARN, y se lo incubó con Oligo dT, con la enzima RT, una mezcla equitativa de los cuatro desoxirribonucleótidos (dNTPs) y un inhibidor de la enzima ribonucleasa a fin de evitar la degradación del ARN durante la retrotranscripción, según indicaciones del fabricante. Los tiempos y temperaturas de incubación fueron los siguientes: 70°C por 5 min, 42°C por 1 h y 70°C por 15 min.

2.9.3. Análisis semi-cuantitativo de los genes de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR semi-cuantitativa)

Se analizaron por PCR semi-cuantitativa la expresión de los genes de las proteínas mayoritarias de reserva del grano de cebada, Hordeínas B y C (*HvHordeína B* y *HvHordeína C*); de la enzima glutamina sintetasa plastídica (*HvGS2*) y las distintas isoformas de la glutamina sintetasa citosólica (*HvGS1_1* y *HvGS1_2*); de los transportadores de carga a floema de aminoácidos (*HvAAP2*, *HvAAP4*, *HvAAP6*, *HvAAP7*, *HvLHT2* y *HvProT1*); de las proteasas asociadas a senescencia foliar (*HvPAP*, *HvSAG12*, *HvALEU*, *HvLEGU*, *HvSUBT*, *HvCPMIII*, *HvCND41* y *HvLEU-AP*); y de los genes constitutivos de referencia (*HvActina* y *HvTEF*). Se utilizó la enzima Go-Taq (Invitrogen, USA) y los cebadores (“primers”) específicos detallados en la **Tabla 2.2** junto con la correspondiente temperatura de fusión o “melting” (T_m). Los cebadores de *HvALEU* y *HvLEGU* fueron sintetizados a partir de secuencias homólogas con otras especies con el programa Primer-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las muestras fueron desnaturalizadas inicialmente a 95°C por 2 min, seguido de 30-35 ciclos a 95°C por 30 s (desnaturalización), 57-68°C por 30 s (unión del cebador a la hebra de ADNc) y 72°C por 1 min (extensión) y un ciclo de extensión final a 72°C por 5 min. Los productos de PCR fueron sembrados en geles de agarosa, teñidos con el colorante SYBRsafe (Invitrogen, USA) y las bandas fueron reveladas bajo luz ultravioleta. El gel y la corrida del mismo fueron realizadas con el “Buffer” TBE detallado más arriba. El área de las bandas fue analizada utilizando el software ImageJ (<https://imagej.softonic.com>).

2.9.4. Análisis por PCR en tiempo real (qRT-PCR) de los genes de interés

Las muestras de ADNc fueron utilizadas como templados para el análisis cuantitativo por PCR en tiempo real (qRT-PCR) de la expresión de los genes mencionados en el punto anterior. Para ello se utilizó la mezcla de reacción FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche, Argentina), que incluye SYBRgreen para la cuantificación de ADN doble cadena y ROX como pigmento de referencia para el volumen. Los cebadores utilizados fueron los ya mencionados en el ítem anterior (**Tabla 2.2**). El ADNc fue desnaturalizado a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos (95°C por 15 s, 60-62°C por 30 s y 60°C por 1 min) y un ciclo final de disociación (95°C por 1 min, 55°C por 30 s y 95°C por 30 s). Los valores de fluorescencia obtenidos fueron analizados con el software provisto por Agilent Technologies junto con el equipo termociclador de Stratagene MX3000P qPCR Systems. Los valores de Ct obtenidos para cada muestra fueron normalizados contra los genes constitutivos de actina y elongation factor 1-alfa de cebada. Para la cuantificación relativa de la expresión de los genes se aplicó el método comparativo de Ct (del inglés “threshold cycles”, $\Delta\Delta Ct$) utilizando el software provisto por el equipo.

2.10. Análisis estadístico

Todas las mediciones se realizaron por duplicado sobre cuatro réplicas independientes por tratamiento para los análisis fisiológicos y bioquímicos y tres para los análisis moleculares. Cada ensayo fue repetido al menos dos veces.

Los datos fueron analizados mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) de uno, dos o tres factores dependiendo del parámetro analizado y del ensayo en particular. Además, se realizaron comparaciones múltiples post-análisis de las medias empleando el test de la mínima diferencia significativa (LSD, por sus siglas en inglés "*Least Significant Difference*") de Fisher. Los valores de significancia estadística (valor p) fueron considerados significativos cuando fueron menores o iguales a 0,05.

Además, se realizó una correlación de Pearson para analizar posibles correlaciones entre diferentes parámetros en estudio los cuales son detallados en los capítulos correspondientes.

Todos estos análisis se realizaron utilizando la versión libre del software estadístico InfoStat (www.infostat.com.ar).

Tabla 2.1. Composición de las soluciones nutritivas utilizadas en la tesis. La columna final (1,2 mM de S-SO₄⁻²) corresponde a la solución de Hoagland y Arnon (1950) modificada utilizada para el tratamiento control (o 100%) de los ensayos en cámara de cultivo e invernáculo.

	CONCENTRACIÓN FINAL				
	1,25 µM de S-SO ₄ ⁻² (0,1%)	12 µM de S-SO ₄ ⁻² (1%)	120 µM de S-SO ₄ ⁻² (10%)	300 µM de S-SO ₄ ⁻² (25%)	1,2 mM de S-SO ₄ ⁻² (100%)
K₂SO₄	–	–	–	0,1 mM	1 mM
MgSO₄.7H₂O	–	12 µM	0,12 mM	0,2 mM	0,2 mM
CaCl₂.2H₂O	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
KH₂PO₄	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
KNO₃	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
EDTA.Na	0,08%	0,08%	0,08%	0,08%	0,08%
FeCl₃.6H₂O	0,03%	0,03%	0,03%	0,03%	0,03%
H₃BO₃	3 µM	3 µM	3 µM	3 µM	3 µM
Na₂MoO₄.2H₂O	0,03 µM	0,03 µM	0,03 µM	0,03 µM	0,03 µM
ZnSO₄.7H₂O	0,75 µM	0,75 µM	0,75 µM	0,75 µM	0,75 µM
MnSO₄.H₂O	0,1 µM	0,1 µM	0,1 µM	0,1 µM	0,1 µM
CuSO₄.5H₂O	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM
CoSO₄.7H₂O	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM
KCl	1 mM	1 mM	1 mM	0,9 mM	–
MgCl₂.6H₂O	0,2 mM	0,18 mM	0,08 mM	–	–

Tabla 2.2. Lista de cebadores (“primers”) utilizados. Se detalla la cita del trabajo donde se obtuvieron las secuencias y la temperatura de fusión (Tm) utilizada para la amplificación de cada gen. F = secuencia “Forward”; R = secuencia “Reverse”.

Gen	Tm (°C)	Forward (5' a 3')	Reverse (5' a 3')	Cita
<i>Hv.TEF1-alfa</i>	60-62	AGGTCACCAACCTTGACTG	CAACAGGCACAGTTCCAATG	Nielsen et al., 1997
<i>Hv.Actina</i>	60-62	GTATGGAACATCGTGCTCAGTGG	CTTGATCTTCATGCTGCTCGGA	Hansen et al., 2009
<i>Hv.Hordeína B</i>	60	GCAAGGTAATCCCTCCAGCAGC	TAAGTTGTGGCAATCCGCACG	Hansen et al., 2009
<i>Hv.Hordeína C</i>	60	ATAATTCCTCCAGCAACCTCA	GATGGTGCACATCATTTATTCA	Hansen et al., 2009
<i>Hv.GS1_1</i>	62	GGACCGTCGGTGATGGGG	AAGACGAAACGAGAAAGAGACCAGAC	Goodall et al., 2013
<i>Hv.GS1_2</i>	62	CACITTTGGCAGGCTCTCGTCTC	CAGACTAGACCTTGCAATTGCAAAAAGAAAC	Goodall et al., 2013
<i>Hv.GS2</i>	62	AAGCTGGCGCTGAAGGTATGAAGG	GACGGAACCCACAGGATCAACAAAGAATG	Goodall et al., 2013
<i>Hv.AAP2</i>	62	TCGGGCCATCGGGTTCT	CGGCGCAGCAATGGTGA	Kohl et al., 2012
<i>Hv.AAP4</i>	62	TTTGGCCGCTCACCCGTCTACTT	GAGCCCTGCACCCGAACCA	Kohl et al., 2012
<i>Hv.AAP6</i>	62	TCGGCAACGTGGTGGGACTT	GCCGGCTGCCCTGATGTA	Kohl et al., 2012
<i>Hv.AAP7</i>	62	CAGGGGTCAATCAGCCAGAAGC	ATGCTCCCCGATCGCTCTAAAC	Kohl et al., 2012
<i>Hv.LHT2</i>	62	ATCATGCGCCCTGCTACTTCC	TCAAACACCCGGCATCGCATAAA	Kohl et al., 2012
<i>Hv.ProT1</i>	62	GGCGCTCAGCACATTCCTCTC	GCGGCGATAGCAGCGGGTAT	Kohl et al., 2012
<i>Hv.PAP</i>	60	AAAGGTGGCAAGGATTAATGG	TGCCACAGATACCCTGACGAT	Parrott et al., 2007
<i>Hv.SAG12</i>	60	ACGAGGAGCGAGCTATCATT	GACCATGTATACACGCCCATTC	Parrott et al., 2007
<i>Hv.ALEU</i>	62	CAACAGCTGGTTGACTGTGC	AAGGATAGGACTCCTCCGGTG	Esta tesis
<i>Hv.LEGU</i>	62	TCATGAAGAAGGGCCGGGTTG	TGTTGGTGTTCACGTCCGCC	Esta tesis
<i>Hv.SUBT</i>	60	CAGAAAACGCAGGAGTACGT	ATCGACCCGAAACGGTACTT	Parrott et al., 2007
<i>Hv.CPMIII</i>	60	CCAAGCAATGCTCACAGACT	GAGTGGACCCACCCTTGAGTT	Parrott et al., 2007
<i>Hv.CND41</i>	60	TCTTCGGGTTCAAGTCCAA	CCTAGCTAGCCACCCTTCAT	Parrott et al., 2007
<i>Hv.LEU-AP</i>	60	TACCAGCGTCGCTATTGTTT	TCGACTCAGCCCTTGAATCTG	Parrott et al., 2007

Capítulo 3

Resultados y Discusión

“La tasa de exportación de azúcares y aminoácidos por floema regularía la expresión de las hordeínas B y C en plantas de cebada cultivadas a campo”

Capítulo 3

La tasa de exportación de azúcares y aminoácidos por floema regularía la expresión de las hordeínas B y C en plantas de cebada cultivadas a campo

En los cereales, la removilización de aminoácidos y azúcares vía floema desde las hojas desarrolladas es una fuente importante de N, S y C para los órganos en desarrollo, principalmente cuando su disponibilidad en el suelo es baja (Hirel *et al.*, 2007). Asimismo, la fertilización con N y S repercute sobre la cantidad final de las distintas fracciones de hordeínas, impactando a su vez sobre la calidad de la malta (Howard *et al.*, 1996; Molina Cano *et al.*, 2000; Simic *et al.*, 2007). Sin embargo, todavía es poco lo que se conoce sobre la regulación tanto de la removilización como de la acumulación de hordeínas en los granos, por lo que en este capítulo nos propusimos analizar el efecto de la fertilización con N y S sobre la removilización de asimilados y su posible repercusión sobre el patrón de expresión de los genes de las hordeínas B y C en plantas de cebada cultivadas a campo.

3.1. Diseño experimental y toma de muestras

El experimento se organizó con un diseño de bloques completamente aleatorizados, definiéndose los siguientes tratamientos: plantas N0S0 (sin fertilizar), plantas N0S1 (fertilizadas con 10 kg.ha⁻¹ de S), plantas N1S0 (fertilizadas con 60 kg.ha⁻¹ de N) y plantas N1S1 (fertilizadas con 60 kg.ha⁻¹ de N y 10 kg.ha⁻¹ de S). Se tomaron muestras post-antesis durante el llenado de los granos a los 115, 128, 136, 145 y 157 días después de siembra (DDS) equivalentes a 4, 17, 25, 34 y 46 días después de antesis (DDA), respectivamente. Se cosechó la parte aérea para la determinación del peso seco (PS) en todos los tiempos mencionados. A los 17, 25 y 34 DDA se muestrearon las últimas dos hojas expandidas por debajo de la hoja bandera (tejido fuente, TF) y las espigas (tejido destino, TD) de ocho plantas por tratamiento. Los exudados floemáticos se obtuvieron a partir de muestras de espiga más hoja bandera (8 espigas por muestra).

3.2. Crecimiento y desarrollo

El aumento de la biomasa aérea de las plantas (peso seco, PS) en función del tiempo fue similar para todos los tratamientos (**Figura 3.1A**). La fertilización con N produjo un incremento en el PS de las plantas N1S1 y N1S0, pero no modificó los valores de rendimiento (**Figura 3.1B**). Por su parte, la fertilización con S no produjo cambios en la biomasa aérea ni en el rendimiento (**Figuras 3.1A y B**).

Por otro lado, el contenido de N en grano aumentó con la fertilización nitrogenada (**Figura 3.1C**) mientras que el de S lo hizo con la fertilización azufrada (**Figura 3.1D**).

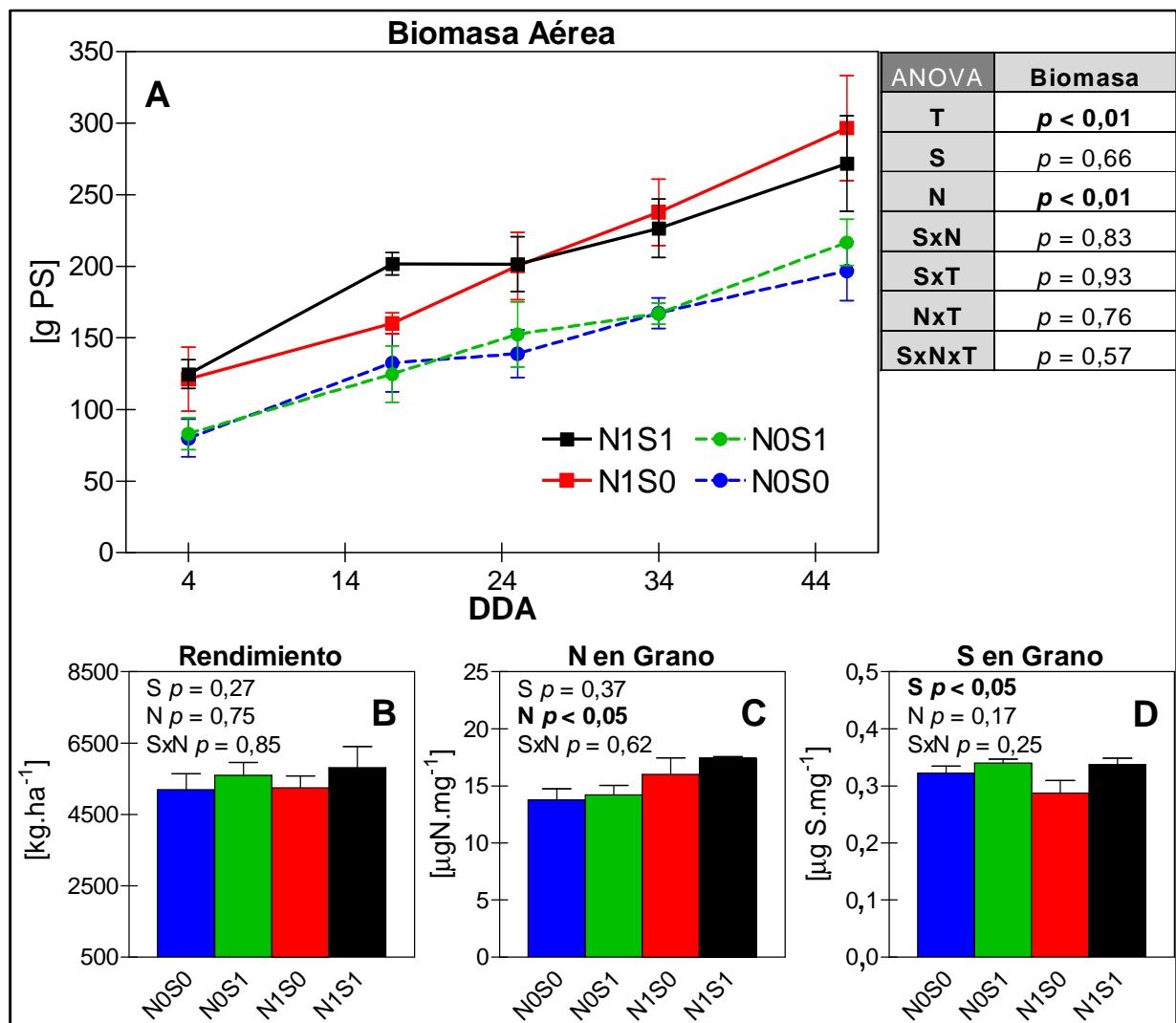


Figura 3.1. (A) Biomasa aérea durante el llenado de los granos. (B) Rendimiento y contenido de (C) N y (D) S en el grano a madurez (46 DDA). Tratamientos: N1S1 (negro), N1S0 (rojo), N0S1 (verde) y N0S0 (azul). La línea continua indica fertilización con N y la punteada sin N. Los datos representan la media \pm el error estándar ($n=4$). Los valores de p indican los niveles de significancia del efecto del Tiempo (T), S, N y sus interacciones calculados mediante un ANOVA de tres factores para Biomasa Aérea y de dos factores para Rendimiento, N y S en grano. Los valores que dieron significativos ($p \leq 0,05$) se resaltan en negrita. DDA = días después de antesis.

3.3. Determinaciones bioquímicas en el tejido fuente

El contenido de proteínas en las hojas (tejido fuente, TF) fertilizadas con N se mantuvo constante entre los 17 y 25 DDA, y fue mayor en las plantas fertilizadas con S en el primer muestreo (N1S1; ANOVA de dos factores a los 17 DDA S $p < 0,05$). Luego de los 25 DDA el contenido de proteínas tanto de las plantas N1S1 como el de las N1S0 decayeron al mismo nivel (**Figura 3.2A**). En las plantas no fertilizadas con N, el contenido de proteínas decayó constantemente en las plantas fertilizadas con S (N0S1) mientras que cuando no se incorporó S (N0S0) dicho contenido se incrementó entre los 17 y 25 DDA antes de caer a niveles similares a los de las plantas fertilizadas con ambos nutrientes (**Figura 3.2A**).

Del mismo modo, el contenido de aminoácidos decayó a lo largo del tiempo a partir de los 25 DDA en todos los tratamientos con excepción de las plantas N0S1 que mostraron una caída desde el primer muestreo (**Figura 3.2B**). Además, a los 25 DDA, las hojas de las plantas fertilizadas con S tenían un menor contenido de aminoácidos en relación con las no fertilizadas (ANOVA de dos factores a los 25 DDA S $p < 0,05$; **Figura 3.2B**).

Por otra parte, el contenido de nitrato disminuyó con el tiempo y no fue afectado por la fertilización con ninguno de los nutrientes (**Figura 3.2C**).

Finalmente, el contenido de azúcares solubles se mantuvo constante a lo largo del llenado de los granos en todos los tratamientos, pero a los 17 DDA se evidenció un mayor contenido en las plantas no fertilizadas con N (N0S1 y N0S0; ANOVA de dos factores a los 17 DDA N $p < 0,01$; **Figura 3.2D**).

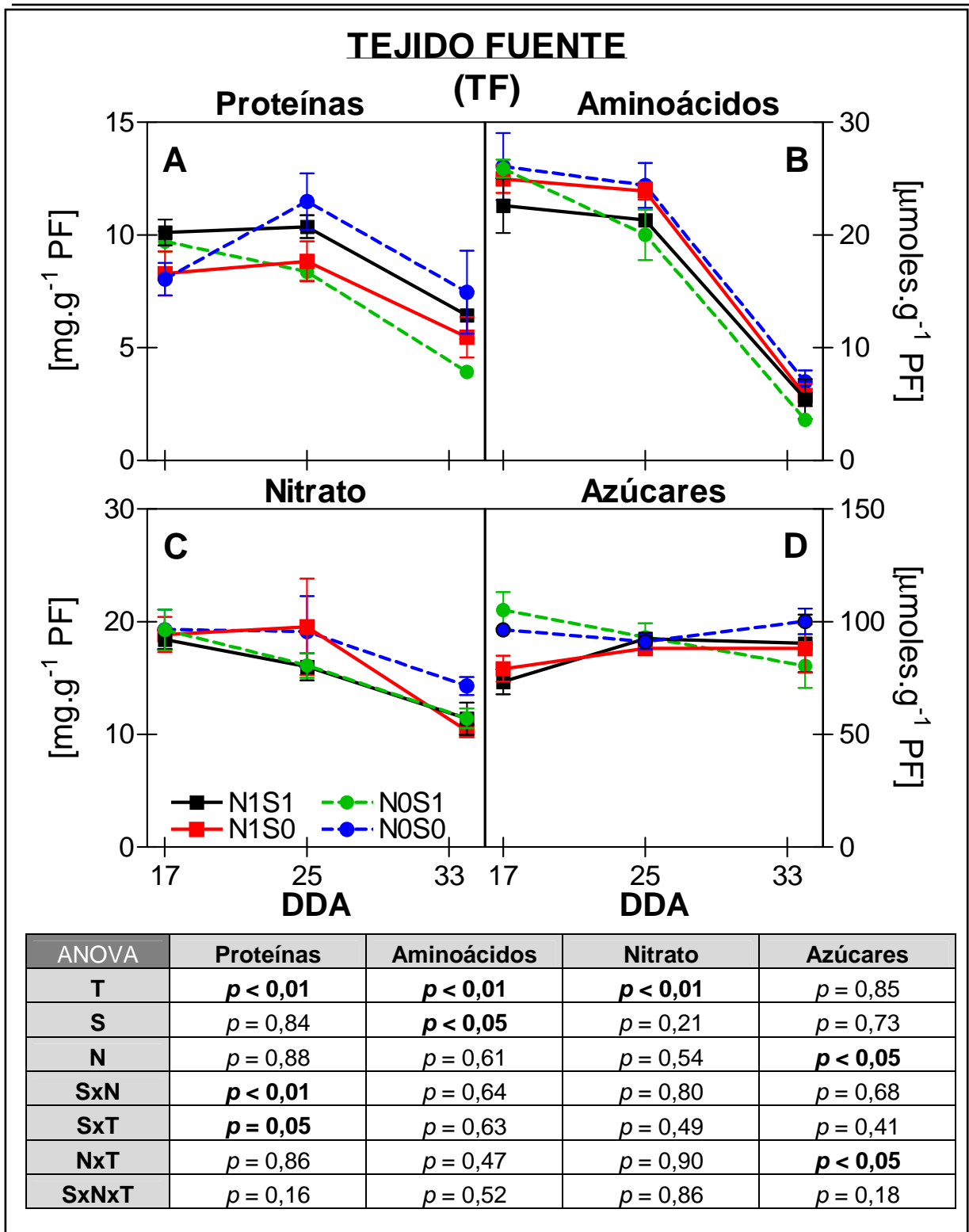


Figura 3.2. Contenido de (A) proteínas solubles, (B) aminoácidos libres, (C) nitrato y (D) azúcares solubles en el tejido fuente durante el llenado de los granos de los tratamientos N1S1 (negro), N1S0 (rojo), NOS1 (verde) y NOS0 (azul). La línea continua indica fertilización con N y la punteada sin N. Los datos representan la media \pm el error estándar (n=4). Los valores de p indican los niveles de significancia del efecto del Tiempo (T), S, N y sus interacciones calculados mediante un ANOVA de tres factores. Los valores que dieron significativos ($p \leq 0,05$) se resaltan en negrita. DDA = días después de antesis; PF = peso fresco.

3.4. Aminoácidos y azúcares en el exudado floemático

La fertilización con N (plantas N1S1 y N1S0) generó una exportación de aminoácidos vía floema constante en el tiempo, mientras que las plantas no fertilizadas con ese nutriente (N0S1 y N0S0) mostraron una tasa de exportación mayor al comienzo del llenado de los granos respecto de sus correspondientes controles (N1S1 vs N0S1 y N1S0 vs N0S0). A su vez, las plantas N0S1 evidenciaron una caída en la exportación de aminoácidos desde el primer muestreo mientras que las N0S0 lo hicieron a partir de los 25 DDA, alcanzando ambos valores finales de exudación similares e inferiores a los alcanzados por las plantas fertilizadas con ambos nutrientes (N1S1; **Figura 3.3A**).

En cambio, las plantas fertilizadas con S mostraron una tasa de exportación de aminoácidos mayor que las no fertilizadas con este nutriente durante todo el ensayo en las plantas N1S1 con respecto a las N1S0 y sólo en el primer muestreo en las N0S1 con respecto a las N0S0 (**Figura 3.3A**).

La exportación de azúcares se incrementó conforme avanzaba el llenado de los granos en todos los tratamientos (**Figura 3.3B**). A su vez, fue mayor en las plantas fertilizadas con S en todos los tiempos para aquellas que también se encontraban fertilizadas con N (N1S1) y sólo al comienzo para las no fertilizadas (N0S1). La fertilización con N generó una exportación de azúcares diferencial en función de la disponibilidad de S, con valores inferiores en las plantas N1S0 y mayores en las plantas N1S1, las cuales alcanzaron a los 34 DDA la tasa de exudación máxima del ensayo (**Figura 3.3B**).

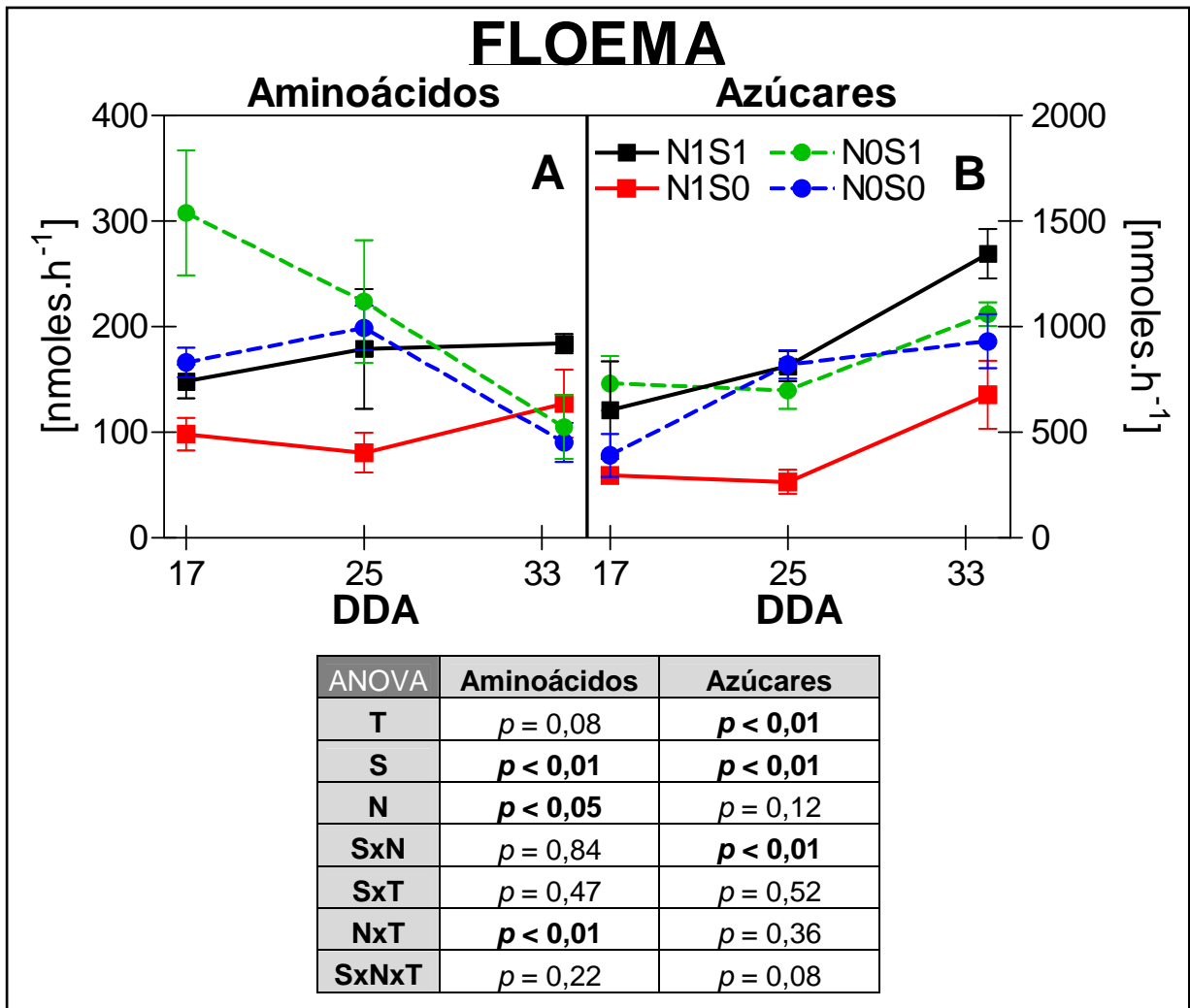


Figura 3.3. Contenido de (A) aminoácidos libres y (B) azúcares solubles en el exudado floemático de las espigas durante el llenado de los granos de los tratamientos N1S1 (negro), N1S0 (rojo), NOS1 (verde) y NOS0 (azul). La línea continua indica fertilización con N y la punteada sin N. Los datos representan la media ± el error estándar (n=4). Los valores de *p* indican los niveles de significancia del efecto del Tiempo (T), S, N y sus interacciones calculados mediante un ANOVA de tres factores. Los valores que dieron significativos ($p \leq 0,05$) se resaltan en negrita. DDA = días después de antesis.

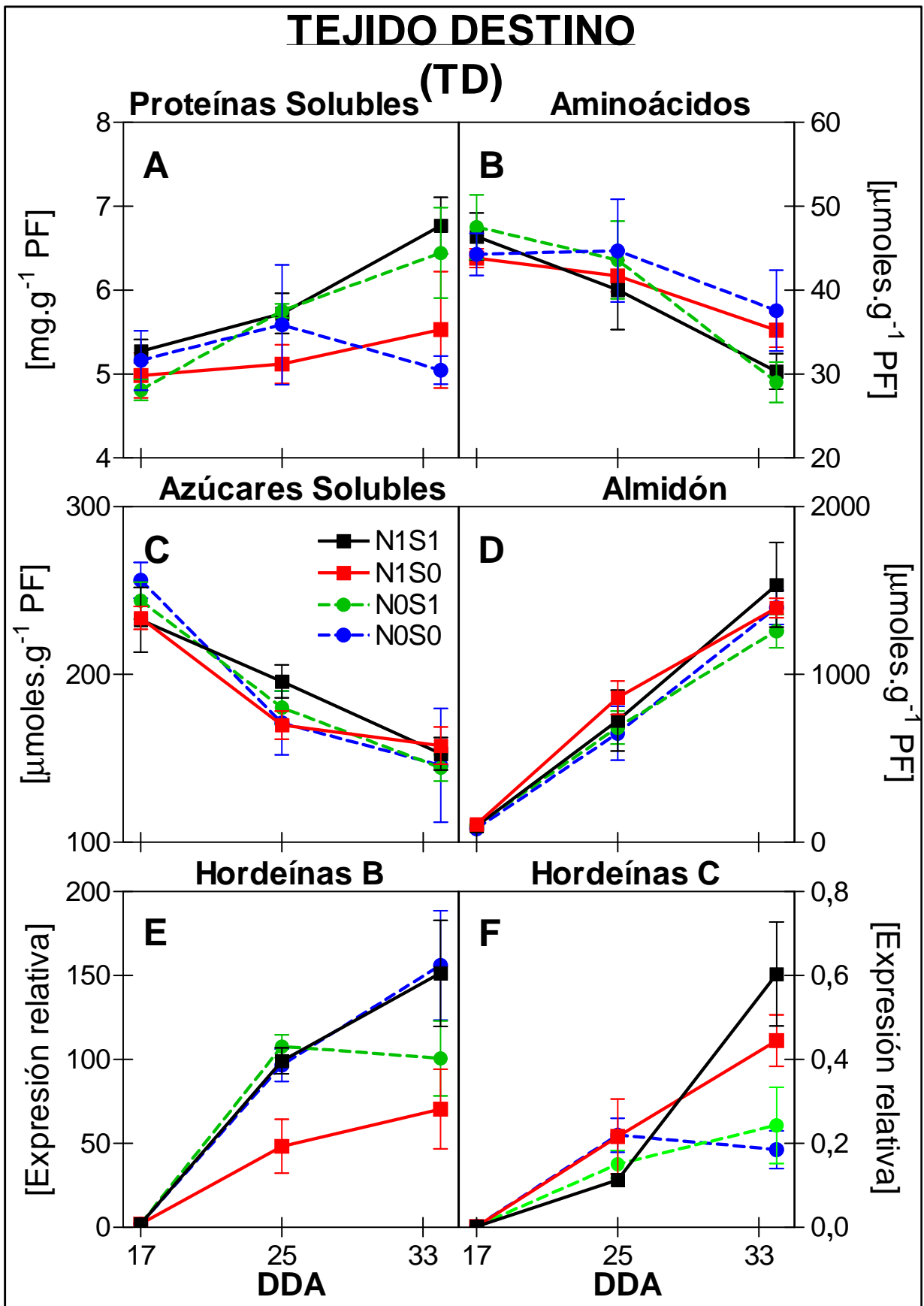
3.5. Determinaciones bioquímicas y moleculares en el tejido destino

El contenido de proteínas solubles en las espigas (tejido destino, TD) se incrementó a lo largo del tiempo en las plantas N1S1 y N0S1 mientras que en las N1S0 y N0S0 se mantuvo constante (**Figura 3.4A**).

A su vez, el contenido de aminoácidos libres disminuyó en el tiempo sin encontrarse diferencias significativas entre tratamientos, si bien al final del periodo de llenado de los granos se observó una tendencia en las plantas sin fertilizar con S (N1S0 y N0S0) a acumular mayor cantidad de aminoácidos (**Figura 3.4B**).

El contenido de azúcares solubles disminuyó (**Figura 3.4C**) mientras que el de almidón aumentó (**Figura 3.4D**) a lo largo del tiempo, sin encontrarse diferencias entre tratamientos para ambos casos.

Finalmente, se encontró una interacción entre la fertilización con N/S y el patrón de expresión de los genes de hordeínas B, el cual fue similar en las plantas N0S0 y N1S1. Sin embargo, las plantas que no fueron fertilizadas con S pero sí con N (N1S0) mostraron en general una expresión más baja que el resto de los tratamientos, excepto por las plantas N0S1 en el último muestreo (**Figura 3.4E**). Contrariamente, las plantas fertilizadas con N (N1S1 y N1S0) fueron las que alcanzaron el mayor nivel de expresión de los genes de hordeínas C, independientemente de la disponibilidad de S con la que contaban (**Figura 3.4F**).



ANOVA	Proteínas	Aminoácidos	Azúcares	Almidón	Hord. B	Hord. C
T	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p = 0,07$	$p < 0,01$
S	$p < 0,05$	$p = 0,41$	$p = 0,87$	$p = 0,69$	$p = 0,19$	$p = 0,84$
N	$p = 0,65$	$p = 0,47$	$p = 0,91$	$p = 0,39$	$p = 0,18$	$p < 0,05$
SxN	$p = 0,49$	$p = 0,85$	$p = 0,55$	$p = 0,39$	$p < 0,05$	$p = 0,76$
SxT	$p = 0,05$	$p = 0,19$	$p = 0,41$	$p = 0,55$	$p = 0,57$	$p = 0,10$
NxT	$p = 0,48$	$p = 0,83$	$p = 0,30$	$p = 0,40$	$p = 0,73$	$p < 0,05$
SxNxT	$p = 0,75$	$p = 0,89$	$p = 0,85$	$p = 0,66$	$p = 0,16$	$p = 0,55$

Figura 3.4. Contenido de (A) proteínas solubles, (B) aminoácidos libres, (C) azúcares solubles y (D) almidón y expresión relativa determinada por qRT-PCR de los genes de hordeínas (E) B y (F) C en el tejido destino durante el llenado de los granos de los tratamientos N1S1 (negro), N1S0 (rojo), N0S1 (verde) y N0S0 (azul). La línea continua indica fertilización con N y la punteada sin N. Los datos representan la media \pm el error estándar ($n=4$ para A-D y $n=3$ para E y F). Los valores de p indican los niveles de significancia del efecto del Tiempo (T), S, N y sus interacciones calculados mediante un ANOVA de tres factores. Para el caso de la expresión de las hordeínas B y C los valores del primer muestreo no fueron considerados para el ANOVA debido a su heterogeneidad respecto al resto de los muestreos. Los valores que dieron significativos ($p \leq 0,05$) se resaltan en negrita. DDA = días después de antesis; PF = peso fresco.

3.6. Discusión

En cuanto al crecimiento de las plantas, podemos inferir que las disponibilidades de N y S que había en el suelo fueron suficientes para no limitar el rendimiento del cultivo (**Figura 3.1B**). Sin embargo, el incremento en la biomasa aérea a causa de la fertilización con N (**Figura 3.1A**) estaría indicando cierto grado de deficiencia de este nutriente.

Al analizar los parámetros bioquímicos en el TF pudimos observar una dinámica de degradación de proteínas diferente para cada tratamiento (**Figura 3.2A**). De este modo, se encontró una aceleración en el proceso de senescencia debido a la deficiencia de N, como ya ha sido observado previamente por Criado *et al.* (2007) en plantas de trigo. Sin embargo, este fenómeno sólo ocurrió en las plantas fertilizadas con S, sugiriendo que existe un requerimiento de este nutriente para que ocurra la degradación proteica asociada a la deficiencia de N. La caída en el contenido de aminoácidos del TF a lo largo del llenado de los granos en las plantas N0S1 (**Figura 3.2B**) también sugiere una aceleración del proceso de senescencia debido a la deficiencia de N sólo cuando existe una buena disponibilidad de S. A su vez, el incremento del contenido de proteínas debido a la fertilización azufrada que se observó a los 17 DDA (**Figura 3.2A**) sugeriría que dicha fertilización permite un mayor almacenamiento de N y S por parte de las plantas dentro de las estructuras proteicas del TF antes del comienzo de la senescencia foliar.

Por otra parte, la menor acumulación de aminoácidos en el TF de las plantas fertilizadas con S (N1S1 y N0S1, **Figura 3.2B**) concuerda con la bibliografía que reporta que frente a bajas disponibilidades de este nutriente la reducción en la síntesis proteica es acompañada por una acumulación de aminoácidos no azufrados (Hesse *et al.*, 2004). A su

vez, esta menor acumulación de aminoácidos en las hojas junto con la mayor tasa de exportación de aminoácidos vía floema observada en las plantas fertilizadas con S (**Figura 3.3A**) sugieren que dicha exportación estaría siendo promovida por la fertilización azufrada, independientemente de la cantidad de aminoácidos presentes en el TF.

La mayor exportación de aminoácidos al comienzo del llenado de los granos en las plantas sin fertilizar con N (**Figura 3.3A**) concuerda con reportes previos que indican una inducción de la removilización de N en condiciones de deficiencia de este nutriente, en distintas especies de plantas (Dalling, 1985; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008; 2010), confirmando la aceleración del proceso de senescencia foliar ante dicha deficiencia. Sin embargo, aún bajo las condiciones moderadas de deficiencia de N que se presentaron en este ensayo, las plantas que no fueron fertilizadas con este nutriente no lograron mantener una alta tasa de exportación de aminoácidos a lo largo de todo el periodo de llenado de los granos (**Figura 3.3A**).

El patrón de exportación de azúcares también fluctuó en respuesta a la disponibilidad de N y S (**Figura 3.3B**), y lo hizo en forma diferente al de aminoácidos, por lo que se sugiere que la exportación de ambos procede en forma independiente uno de otro, tal como había sido reportado previamente en plantas de trigo por Caputo y Barneix (1999).

Por lo tanto, con los resultados hasta aquí mencionados rechazamos parcialmente la **hipótesis 1a** planteada en esta tesis que sostiene que *la tasa de exportación de aminoácidos y azúcares vía floema desde los tejidos fuente aumenta ante una baja disponibilidad tanto de N como de S en el suelo, por lo que las plantas deficientes de ambos nutrientes son las de mayor tasa de exportación*, ya que solamente se observó un aumento de la exportación de aminoácidos al inicio del llenado de los granos en las plantas NOS1, mientras que en el resto de los tratamientos la exportación de aminoácidos y de azúcares disminuyó respecto de las plantas N1S1.

A su vez, el incremento en el contenido de proteínas solubles en el TD de las plantas fertilizadas con S (**Figura 3.4A**) pone de manifiesto la importancia de una adecuada disponibilidad de dicho nutriente para la síntesis de proteínas solubles en el grano que luego impactarán sobre la calidad de la malta. Se ha descrito que las fracciones de albúminas y globulinas se encuentran correlacionadas positivamente con el poder diastático (Wang *et al.*, 2007), el cual a su vez está estrechamente relacionado con la actividad de la β -amilasa (Georg-Kraemer *et al.*, 2001), una de las enzimas más importantes en la degradación del almidón de los cereales. Además, se ha demostrado que el poder diastático se incrementa en respuesta a la fertilización con S en suelos altamente deficientes (Zhao *et al.*, 2006).

En las plantas sin fertilizar con S observamos una tendencia a acumular aminoácidos libres en las espigas al final del llenado de los granos (**Figura 3.4B**) probablemente reflejando la acumulación de aminoácidos no azufrados tales como la asparagina cuya

acumulación ya ha sido reportada en granos de trigo bajo deficiencia de S (Shewry *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos a nivel molecular sugieren que, al menos bajo las condiciones ensayadas en este trabajo, no sería sólo la disponibilidad de cada nutriente sino la relación N:S la que estaría siendo censada por la planta para regular la expresión de los genes de hordeínas B (**Figura 3.4E**). Contrariamente, la fluctuación en el patrón de expresión de las hordeínas C frente a la fertilización con N y no frente a la fertilización con S (**Figura 3.4F**) indican una regulación de la expresión de estos genes por el estado nutricional sólo de N de la planta, en concordancia con lo reportado por Giese y Hopp (1984) y Qi *et al.* (2006). Estos resultados nos permiten aceptar parcialmente la **hipótesis 1c** que sostiene que *la acumulación de transcritos de hordeínas B aumenta con la disponibilidad de S mientras que la de las hordeínas C lo hace con la de N*.

Los cambios producidos en la tasa de exportación de aminoácidos (**Figura 3.3A**) y azúcares (**Figura 3.3B**) vía floema no parecieran correlacionarse con el contenido de ambos metabolitos en las hojas (**Figura 3.2B y D**), sugiriendo que la disponibilidad de cada metabolito en el TF no sería un factor determinante de la tasa de exportación. Además, la cantidad de aminoácidos y azúcares exportados vía floema tampoco estaría regulando el contenido de estos metabolitos en las espigas, ni el de las proteínas solubles (**Figura 3.4A - D**). A partir de estas observaciones, y visto que la expresión de los genes de hordeínas B y C fluctuó en relación a la disponibilidad de N y S (**Figura 3.4E y F**), al igual que la tasa de exportación de aminoácidos (**Figura 3.3A**), pareciera ser más probable que la exportación de aminoácidos esté siendo utilizada por las espigas para la síntesis de proteínas de reserva del grano. De manera diferente, la exportación de azúcares pareciera no contribuir en gran medida a la síntesis de almidón ya que el patrón de acumulación de este metabolito en el grano (**Figura 3.4D**) no refleja los cambios ocurridos en dicha exportación (**Figura 3.3B**). Esta observación concuerda con lo reportado por Weichert *et al.* (2010) quienes al sobre-expresar un transportador de sacarosa (*HvSUT1*) no observaron cambios en la concentración de almidón en los granos de trigo en respuesta a una mayor absorción del azúcar.

Al analizar la potencial relación entre la expresión de los genes de hordeínas y la tasa de exportación de asimilados que llegan a las espigas vía floema, encontramos que la expresión de los genes de hordeínas B se correlacionó de manera lineal y positiva con la tasa de exportación de azúcares que llegaban a la espiga (**Figura 3.5B**). Por su parte, la expresión de los genes de hordeínas C se correlacionó de manera curvilínea a los 25 DDA y de manera lineal y positiva a los 34 DDA con la tasa de exportación de aminoácidos (**Figura 3.5C**). Por otra parte, no se encontraron correlaciones entre la expresión de hordeínas B y la tasa de exportación de aminoácidos (**Figura 3.5A**) así como tampoco entre la expresión de

hordeínas C y la tasa de exportación de azúcares vía floema (**Figura 3.5D**). Estos resultados coinciden con Bottacin *et al.* (1985) quienes reportaron que el suministro exógeno de glutamina o cisteína a un cultivo líquido de espigas no generó incrementos en la cantidad de hordeínas B, pero sí que la expresión de los genes de hordeínas C fue estimulada por el aumento en la concentración de aminoácidos en el medio. La correlación entre la expresión de los genes de hordeínas B y la exportación de azúcares vía floema (**Figura 3.5B**) resulta en concordancia con las observaciones de Weichert *et al.* (2010) quienes reportaron un aumento en la fracción de prolaminas en granos de trigo como consecuencia de una mayor absorción de sacarosa. Dado el rol atribuido a los azúcares como moléculas señal y reguladores de la expresión génica (Rolland *et al.*, 2002; Rosa *et al.*, 2009; Eveland y Jackson, 2012), es posible atribuir a los azúcares del floema un rol en la regulación de la expresión de los genes de hordeínas B en función de la disponibilidad de nutrientes. De esta forma rechazamos parcialmente la **hipótesis 1b** que sostiene que *las variaciones en la exportación de aminoácidos y azúcares desde los tejidos fuente impactan sobre la dinámica de la acumulación de metabolitos nitrogenados y carbonados en los granos (tejidos destino)*, ya que sólo el patrón de expresión de las hordeínas B y C fluctuó en relación a la tasa de exportación de asimilados.

En base a los resultados obtenidos en este capítulo, podemos concluir que una adecuada disponibilidad de N y S es esencial para promover la exportación de azúcares y aminoácidos vía floema. A su vez, encontramos que la disponibilidad de azúcares y aminoácidos en el TF no sería un factor determinante de la tasa de exportación de ambos compuestos y que esta tasa tampoco regularía el contenido de metabolitos nitrogenados y carbonados, en su totalidad, que se acumulan en el TD, al menos bajo las condiciones de trabajo empleadas en esta tesis. Finalmente, encontramos que la tasa de exportación de azúcares y aminoácidos serían potenciales intermediarios en la regulación de la expresión de los genes de hordeínas B y C, respectivamente, modulando así el contenido y composición de prolaminas del grano. Sabiendo que las prolaminas (componentes principales de la matriz proteica del endosperma) afectan varios aspectos de la calidad maltera tales como la modificación del endosperma durante el malteado (Shewry *et al.*, 2001) y la actividad de la β -amilasa (Qi *et al.*, 2006), ahondar en el conocimiento de la regulación del transporte de asimilados vía floema resulta imprescindible para poder contribuir al desarrollo de nuevas estrategias para mejorar la calidad de los granos de cebada destinados a la industria maltera.

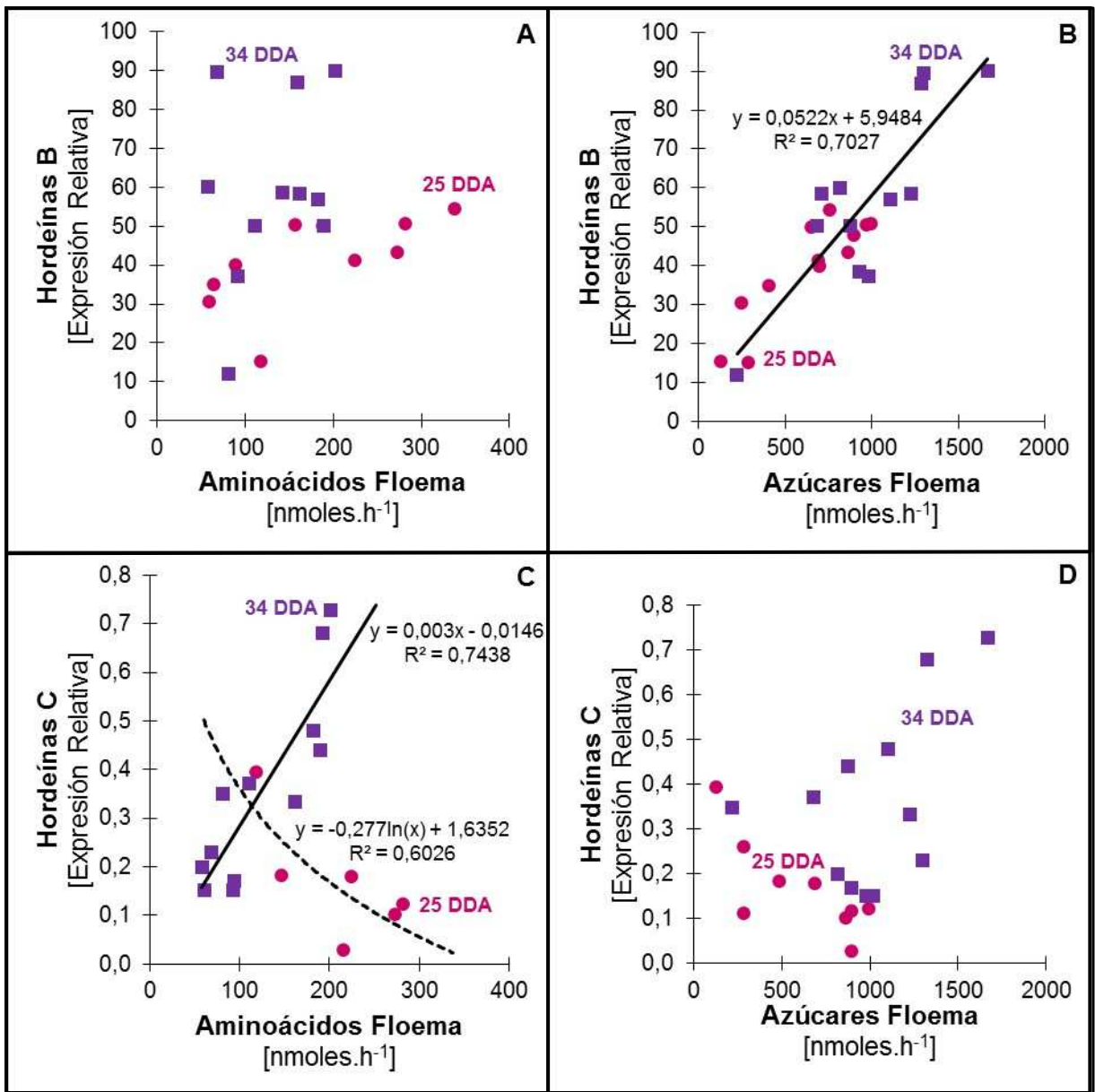


Figura 3.5. Correlación entre la expresión relativa de los genes de hordeínas B y la tasa de exportación vía floema de **(A)** aminoácidos y **(B)** azúcares y de los genes de hordeínas C y la exportación vía floema de **(C)** aminoácidos y **(D)** azúcares. DDA = días después de antesis. Las ecuaciones corresponden a las funciones de las regresiones obtenidas para cada correlación.

Capítulo 4

Resultados y Discusión

“La deficiencia de azufre inhibe la asimilación y transporte de nitrógeno modulando la expresión de la glutamina sintetasa y de ciertos transportadores de aminoácidos”

Capítulo 4

La deficiencia de azufre inhibe la asimilación y transporte de nitrógeno modulando la expresión de la glutamina sintetasa y de ciertos transportadores de aminoácidos

Dado que en el capítulo anterior observamos que aún en condiciones no limitantes de S en el suelo, la fertilización azufrada promovió la exportación de asimilados vía floema, en este capítulo nos propusimos evaluar el efecto de distintas disponibilidades de S sobre la regulación del transporte de aminoácidos por floema bajo condiciones controladas.

Tanto la generación de aminoácidos destinados al transporte (pool de exportación) como el mecanismo de carga de estos al floema son procesos complejos que contribuyen y determinan la eficiencia de la removilización de N. Un punto importante de control de la redistribución de los aminoácidos entre tejidos fuente y destinos pareciera radicar en la actividad de la isoforma citosólica de la glutamina sintetasa (GS1) (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Bernard y Habash, 2009, Goodall *et al.*, 2013). Diversos estudios realizados en maíz, arroz y trigo muestran que esta enzima se encuentra involucrada en la regulación del crecimiento y llenado de los granos (Tabuchi *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2006; Bernard y Habash, 2009; Kant *et al.*, 2011). Sin embargo, el estudio de su regulación por la disponibilidad de S y la relación de tal regulación con la removilización de aminoácidos no ha sido abordado aún.

Por otro lado, dado que la carga apoplástica de los aminoácidos al floema requiere de la actividad de TAA, la proporción en la que se encuentren estos transportadores en un tejido y momento dado afectará la eficiencia de la removilización. Sin embargo, la información existente hasta la fecha sobre la regulación de la expresión y actividad de TAA en cebada es escasa, ya que tan sólo unos pocos de ellos han sido completamente caracterizados y evaluados bajo estreses abióticos y/o bióticos (Pratelli y Pilot, 2014). Más aún, ninguno de los estudios previos hace referencia al efecto de la disponibilidad de S.

Por lo tanto, en este capítulo, también decidimos estudiar el efecto de la deficiencia de S sobre la expresión de las distintas isoformas de la GS y de aquellos TAA que presentaron un alto nivel de expresión en el tejido fuente de plantas de cebada durante el llenado de los granos (Kohl *et al.*, 2012).

4.1. Ensayo de curva de S

4.1.1. Diseño experimental y toma de muestras

Las plantas fueron cultivadas en cámara de crecimiento desde la siembra con diferentes concentraciones de $S-SO_4^{-2}$: 1,25 μM (0,1%), 12 μM (1%), 120 μM (10%) y 1,2 mM (100%). A los 22 DDS, cuando la segunda hoja estaba completamente expandida, se tomaron muestras de dichas hojas (tejido fuente; TF), de sus exudados floemáticos y del tejido por encima de dicha hoja (tejido destino; TD), así como también de toda la parte aérea a partir de otro grupo de plantas.

4.1.2. Crecimiento y desarrollo

Las plantas cultivadas con suministros de $S-SO_4^{-2}$ del 0,1% y 1% mostraron una biomasa aérea menor que aquellas cultivadas con el 10% y 100% de $S-SO_4^{-2}$, las cuales a su vez no mostraron diferencias significativas entre ellas (**Figura 4.1A**). Además, se observó una caída en el número de hojas que las plantas desarrollaron al limitar la disponibilidad de S, siendo cinco hojas las producidas por los tratamientos de 10% y 100%, cuatro por el tratamiento de 1% y tan sólo tres por el tratamiento de 0,1% (**Figura 4.1D**).

Al mismo tiempo, el contenido de clorofila (estimado mediante el índice de verdor) tanto en el TF (**Figura 4.1B**) como en el TD (**Figura 4.1C**) de los tratamientos 0,1% y 1% fue menor que el medido en los tejidos de las plantas sometidas a los tratamientos 10% y 100% los cuales no evidenciaron diferencias significativas entre ellos.

Es preciso destacar que pese a la caída en la biomasa aérea total de las plantas deficientes de S (**Figura 4.1A**), el peso fresco (PF) del TF utilizado para las determinaciones bioquímicas y moleculares no varió significativamente entre tratamientos (ANOVA de un factor: S $p = 0,32$), indicando que los efectos observados en este tejido con respecto a estas determinaciones son independientes del factor del peso de la hoja y pueden ser explicados como consecuencia de la disponibilidad de S.

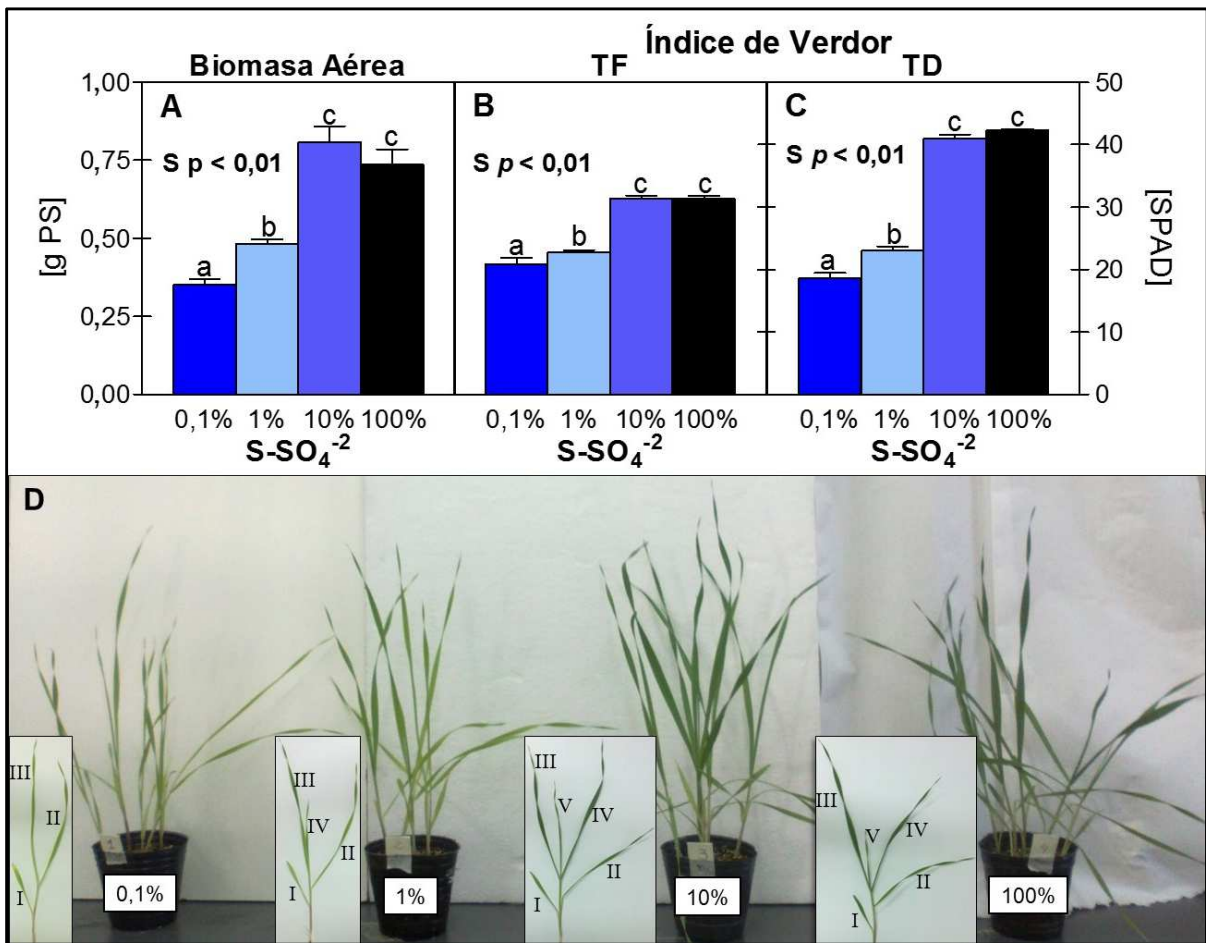


Figura 4.1. (A) Biomasa aérea, índice de verdor del (B) tejido fuente y (C) tejido destino y (D) fotografías tomadas al momento del muestreo (22 DDS) de las macetas y plantas cultivadas con diferente disponibilidad de S. El número de hoja es indicado en números romanos. Los datos representan la media \pm el error estándar ($n=4$). Los valores de p indican los niveles de significancia del efecto del S calculado mediante un ANOVA de un factor. Las letras representan las diferencias significativas calculadas mediante un análisis LSD post hoc entre tratamientos. PS = peso seco; TD = tejido destino; TF = tejido fuente.

4.1.3. Determinaciones bioquímicas

En el TF de todos los tratamientos, el contenido de proteínas fue significativamente menor al del tratamiento 100% (**Figura 4.2A**). Contrariamente, sólo el tratamiento 0,1% mostró un contenido significativamente mayor de aminoácidos con respecto al resto de los tratamientos, los cuales exhibieron valores similares (**Figura 4.2B**). El contenido de nitrato fue mayor en el tratamiento 0,1% seguido por el tratamiento 1%, con respecto a los tratamientos 10% y 100% que mostraron contenidos similares entre ambos (**Figura 4.2C**). Finalmente, el contenido de azúcares fue superior en el tratamiento 1% seguido por el tratamiento 0,1% con respecto a los tratamientos 10% y 100%, cuyos contenidos fueron similares (**Figura 4.2D**).

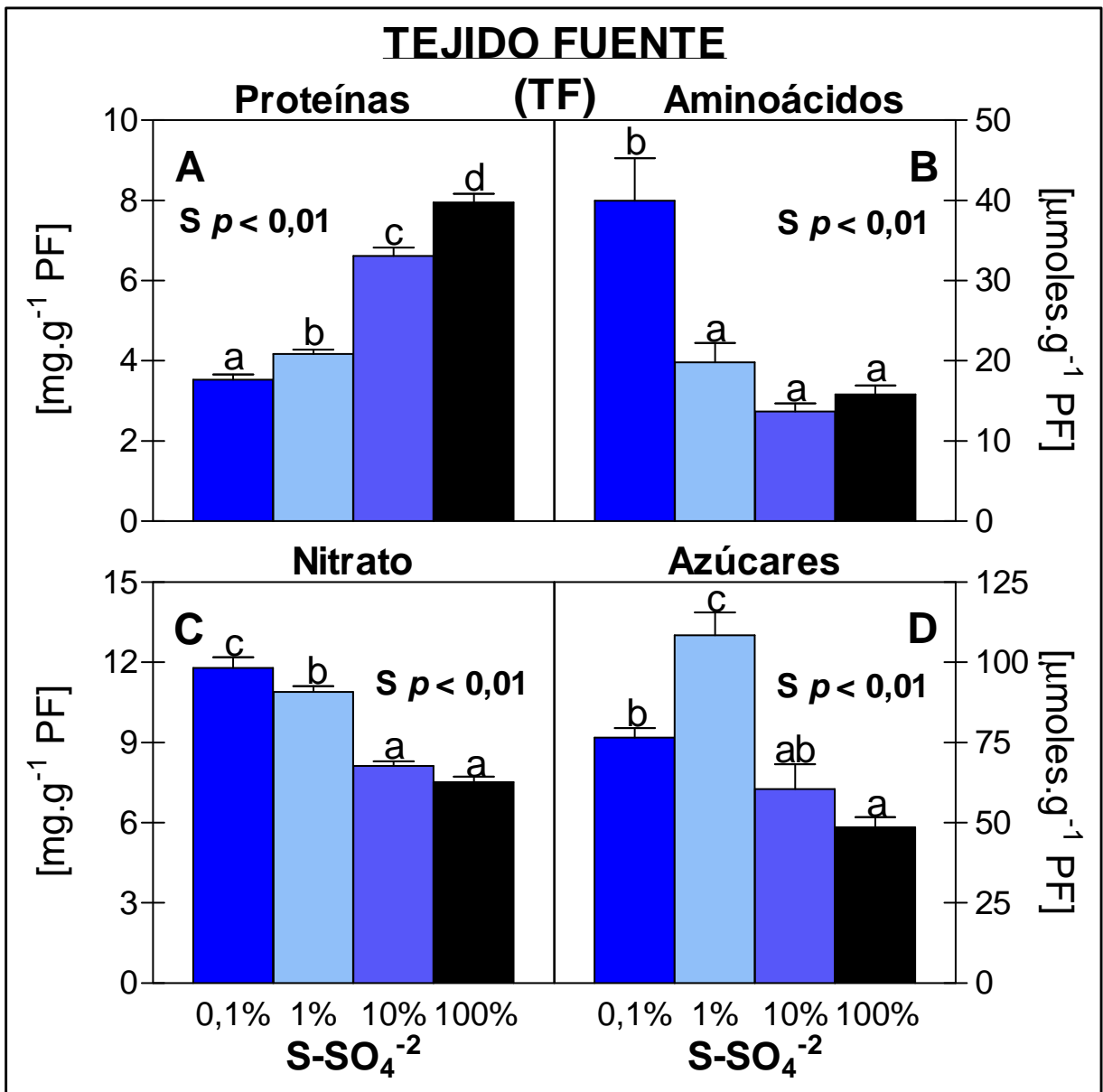


Figura 4.2. Contenido de (A) proteínas solubles, (B) aminoácidos libres, (C) nitrato y (D) azúcares solubles en el tejido fuente de las plantas cultivadas con diferente disponibilidad de S. Los datos representan la media ± el error estándar (n=4). Los valores de *p* indican los niveles de significancia del efecto del S calculado mediante un ANOVA de un factor. Las letras representan las diferencias significativas calculadas mediante un análisis LSD post hoc entre tratamientos. PF = peso fresco.

Los tratamientos de 0,1% y 1% mostraron una tasa de exportación de aminoácidos vía floema similar entre ellos y significativamente menor que la de los tratamientos 10% y 100%, cuyos valores de exportación fueron similares (**Figura 4.3A**). A su vez, la tasa de exportación de azúcares vía floema sólo fue menor en el tratamiento 0,1% con respecto a los tres tratamientos restantes, los cuales no mostraron variaciones significativas entre ellos (**Figura 4.3B**).

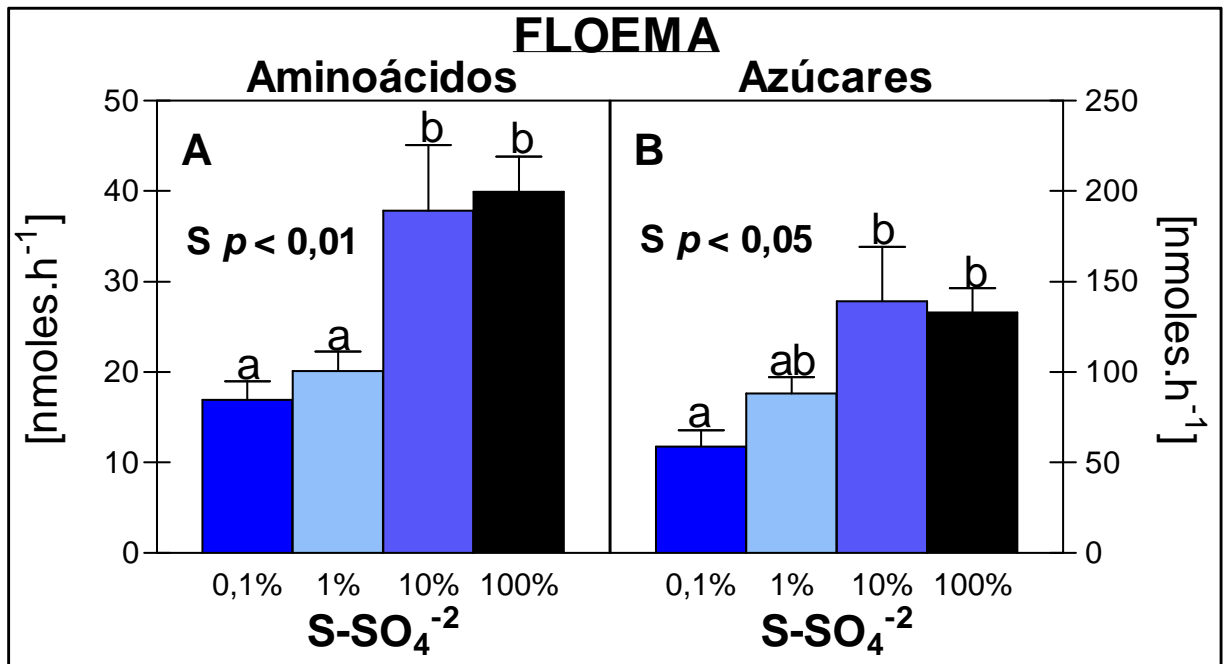


Figura 4.3. Contenido de (A) aminoácidos y (B) azúcares presentes en el exudado floemático del tejido fuente de las plantas cultivadas con diferente disponibilidad de S. Los datos representan la media ± el error estándar (n=4). Los valores de p indican los niveles de significancia del efecto del S calculado mediante un ANOVA de un factor. Las letras representan las diferencias significativas calculadas mediante un análisis LSD post hoc entre tratamientos.

En el TD el contenido de proteínas cayó significativamente en todos los tratamientos con respecto al control, mostrando los tratamientos 0,1% y 1% los menores contenidos proteicos y siendo similares entre ellos (**Figura 4.4A**).

Por otro lado, los tratamientos 0,1% y 1% produjeron una mayor acumulación de aminoácidos en comparación con los tratamientos 10% y 100% (**Figura 4.4B**).

El contenido de nitrato aumentó a medida que la disponibilidad de S disminuyó, mostrando los tratamientos 0,1% y 1% los mayores contenidos de nitrato y siendo similares entre ellos (**Figura 4.4C**).

Finalmente, el contenido de azúcares solubles fue superior en los tratamientos 1% y 10% con respecto al control (**Figura 4.4D**).

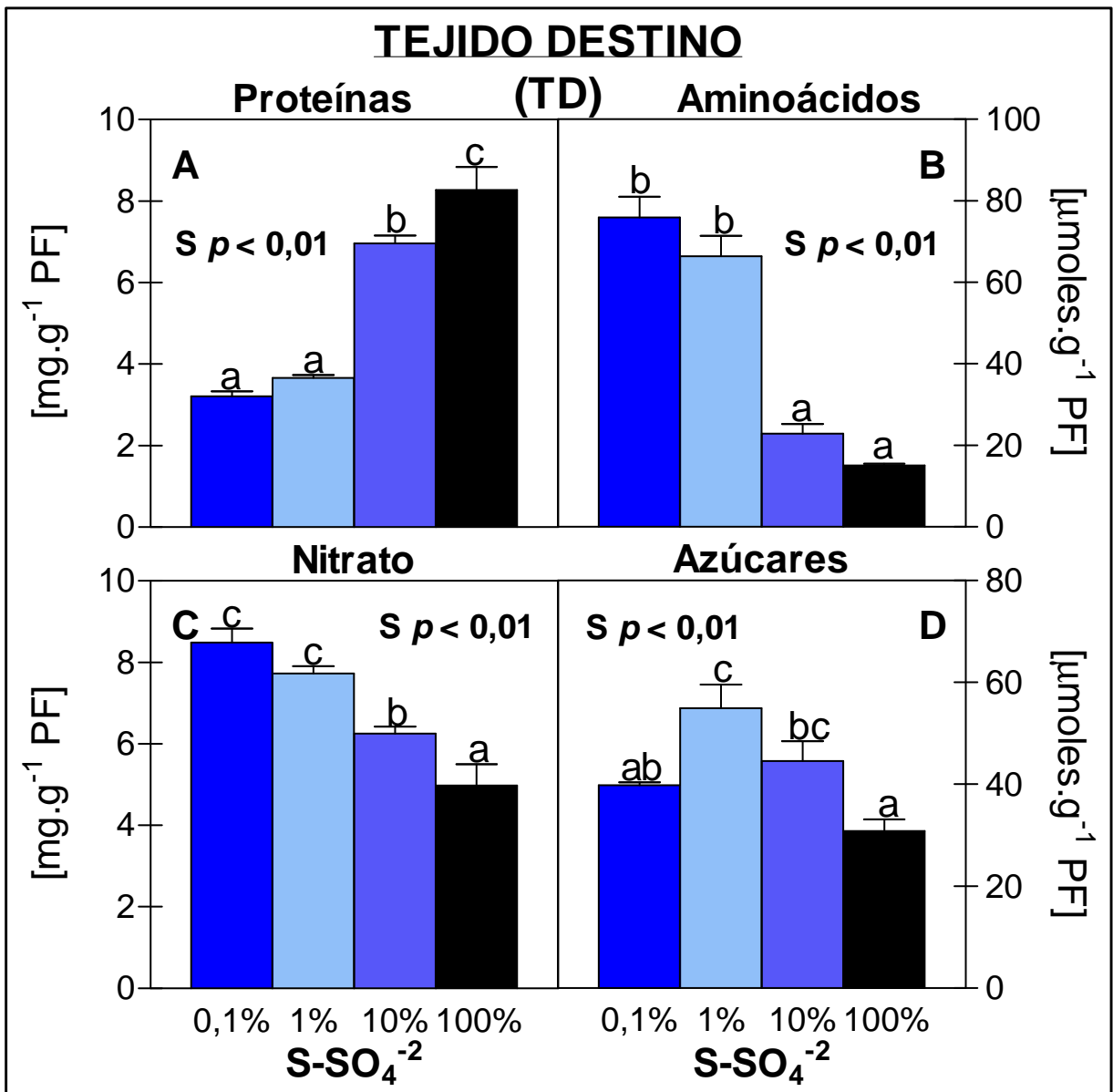


Figura 4.4. Contenido de (A) proteínas solubles, (B) aminoácidos libres, (C) nitrato y (D) azúcares solubles en los tejidos destino de las plantas cultivadas con diferente disponibilidad de S. Los datos representan la media ± el error estándar (n=4). Los valores de *p* indican los niveles de significancia del efecto del S calculado mediante un ANOVA de un factor. Las letras representan las diferencias significativas calculadas mediante un análisis LSD post hoc entre tratamientos. PF = peso fresco.

4.1.4. Determinaciones moleculares

En función de los resultados obtenidos, a partir de aquí decidimos trabajar con los tratamientos 0,1% (baja disponibilidad de S; BS) y 100% (control; C), para realizar los análisis moleculares que se describen a continuación.

Los niveles de expresión de las diferentes isoformas del gen de *HvGS* en las plantas control fueron variables entre cada una de las isoformas, siendo la *HvGS2* (**Figura 4.5C**) la isoforma de mayor expresión, seguida por la *HvGS1_1* (**Figura 4.5A**) y finalmente por la *HvGS1_2* (**Figura 4.5B**), tanto en el TF como en el TD. Sin embargo, en el caso de *HvGS1_1* (**Figura 4.5A**) y *HvGS2* (**Figura 4.5C**) sus expresiones fueron aún mayores en el TD con respecto al TF.

Tanto en el TF como en el TD la deficiencia de S redujo significativamente la expresión de las tres isoformas (**Figura 4.5**). Puntualmente, en el TF de las plantas BS la expresión de *HvGS1_1* se redujo en un 42%, la de *HvGS1_2* en un 82% y la de *HvGS2* en un 43% con respecto a las plantas control. Asimismo, en el TD de las plantas BS la expresión de *HvGS1_1* se redujo en un 63%, la de *HvGS1_2* en un 90% y la de *HvGS2* en un 91% con respecto a las plantas control.

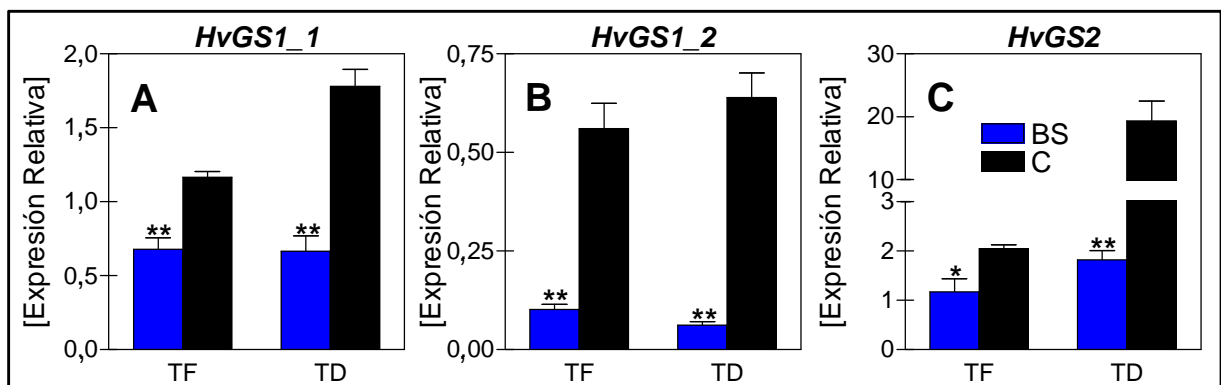


Figura 4.5. Expresión relativa determinada por qRT-PCR de los genes de **(A)** *HvGS1_1*, **(B)** *HvGS1_2* y **(C)** *HvGS2* en el tejido fuente y tejido destino de las plantas con baja disponibilidad de S (BS, azul) y plantas control (C, negro). Los datos representan la media ± el error estándar (n=3). Los asteriscos indican diferencias significativas del efecto del S calculado mediante un ANOVA de un factor para cada tipo de tejido con $p < 0,01$ (**) y $p < 0,05$ (*). TD = tejido destino; TF = tejido fuente.

Finalmente, en el TF de las plantas control se encontró que *HvAAP4*, *HvAAP6*, *HvAAP7* y *HvProT1* fueron los transportadores que tuvieron mayores niveles de expresión, seguidos de *HvLHT2* y *HvAAP2* (**Figura 4.6**).

La deficiencia de S inhibió de manera significativa la expresión de *HvAAP2*, *HvAAP6* y *HvProT1*, pero no generó ningún efecto sobre la expresión de los genes de *HvAAP4*, *HvAAP7* y *HvLHT2* (**Figura 4.6**).

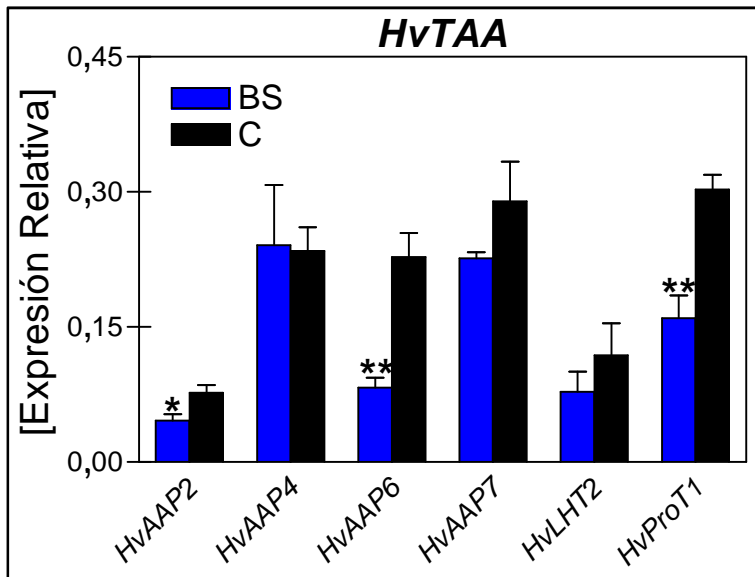


Figura 4.6. Expresión relativa determinada por qRT-PCR de los genes de seis transportadores de aminoácidos de cebada (*HvTAA*) en el tejido fuente de las plantas con baja disponibilidad de S (BS, azul) y plantas control (C, negro). Los datos representan la media \pm el error estándar ($n=3$). Los asteriscos indican diferencias significativas del efecto del S calculado mediante un ANOVA de un factor para cada gen con $p < 0,01$ (**) y $p < 0,05$ (*).

4.2. Ensayo de hambreado de S

4.2.1. Diseño experimental y toma de muestras

Las plantas fueron cultivadas en cámara de crecimiento con una buena disponibilidad de S ($300 \mu\text{M}$ de S-SO_4^{-2}) hasta la aparición de la tercera hoja (10 DDS = 0 días de hambreado, DDH), momento en el cual todas las macetas fueron lavadas con H_2O destilada para eliminar el S remanente. A partir de ese momento las plantas fueron divididas en dos grupos: plantas hambreadas de S (HS; suplementadas con $1,25 \mu\text{M}$ de S-SO_4^{-2} , equivalente al tratamiento 0,1% del ensayo anterior) y plantas control (C; suplementadas con $1,2 \text{ mM}$ de S-SO_4^{-2} , equivalente al tratamiento 100% del ensayo anterior). A los 11, 14, 21, 28 y 32 DDH (21, 24, 31, 38 y 42 DDS) se tomaron muestras de la tercera hoja (tejido fuente, TF), sus exudados floemáticos y el tejido por encima de ésta (tejido destino, TD), así como también de toda la parte aérea a partir de otro grupo de plantas.

4.2.2. Crecimiento y desarrollo

La biomasa aérea de las plantas aumentó con el tiempo de manera similar en ambos tratamientos hasta los 21 DDH. A partir de ese momento, el PS de las plantas HS fue significativamente menor que el de las plantas control (**Figura 4.7A**).

Por otro lado, el índice de verdor del TF cayó a lo largo del tiempo en ambos tratamientos, mostrando una abrupta caída entre los 21 y 28 DDH en las plantas control, mientras que las plantas HS evidenciaron un índice de verdor mayor (**Figura 4.7B**). Esto puso de manifiesto la mayor duración de la vida del TF de las plantas HS ya que a los 28 DDH la tercera hoja de las plantas control se encontraba en un avanzado estado de senescencia, mientras que la misma hoja de las plantas HS no mostraba signos de senescencia (**Figura 4.7C**). Incluso en un muestreo posterior (32 DDH), la tercera hoja de

las plantas HS mostraba un aspecto relativamente normal manteniendo su contenido de clorofila, mientras que la de las plantas control ya había sufrido abscisión.

Si bien el desarrollo foliar (número de hojas por planta) fue igual en ambos tratamientos, las plantas HS presentaron menos signos de senescencia que las plantas control (**Figura 4.7C**). A su vez, en dos de las hojas más jóvenes (n°IV y n°V) de las plantas HS se registró un índice de verdor menor con respecto a las plantas control (Gráfico inserto en la **Figura 4.7B**).

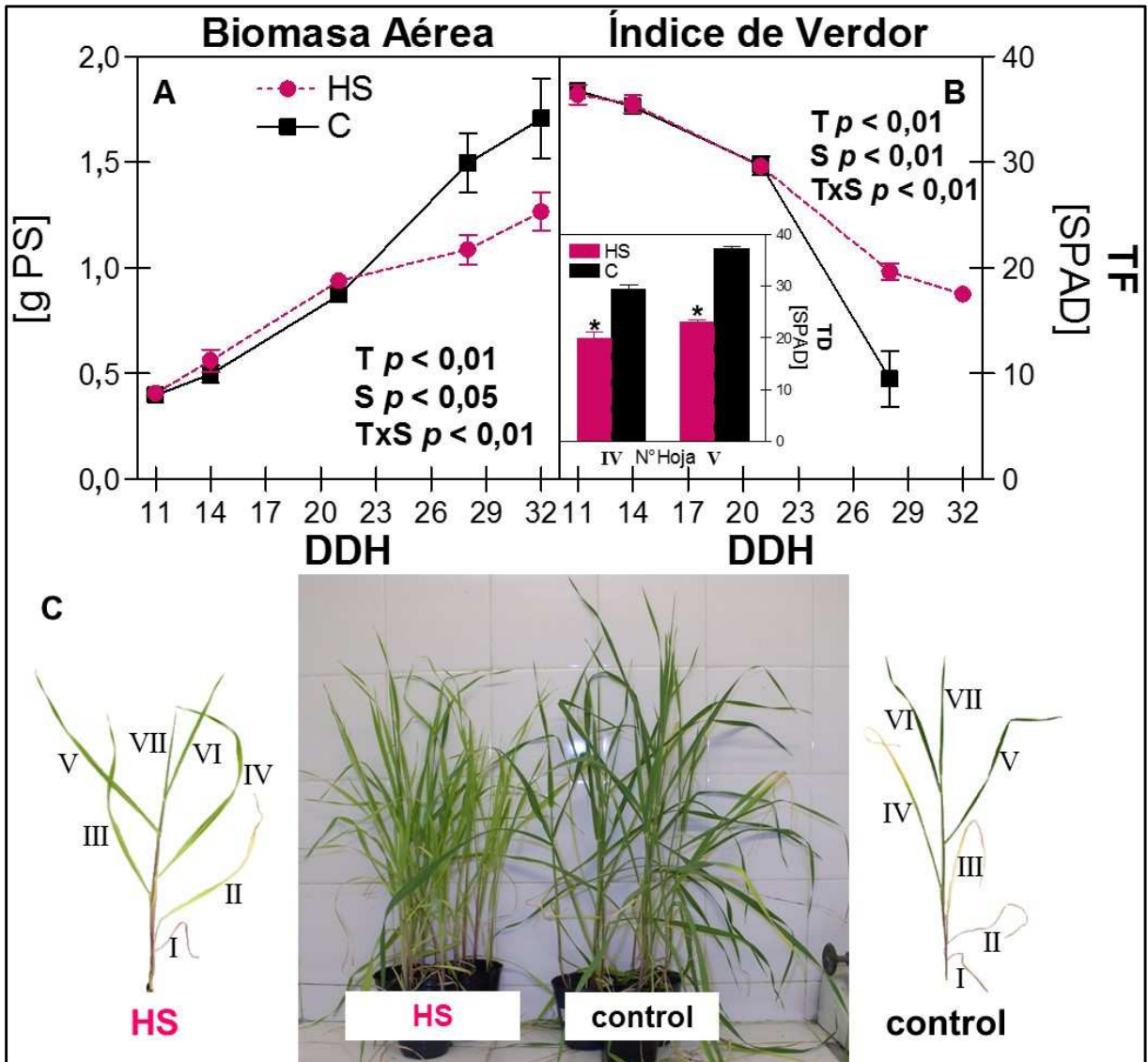


Figura 4.7. (A) Biomasa aérea, (B) índice de verdor del tejido fuente a lo largo del tiempo y del tejido destino (gráfico inserto en la figura 4.7B) a los 28 DDH y (C) fotografías tomadas a los 28 DDH de las macetas y plantas de los tratamientos de hambreado de S (HS; rosa, línea punteada) y del control (C; negro, línea continua). El número de hoja es indicado en números romanos. Los datos representan la media \pm el error estándar ($n=4$). Los valores de p indican los niveles de significancia del efecto del Tiempo (T), S y sus interacciones calculados mediante un ANOVA de dos factores. Los valores que dieron significativos ($p \leq 0,05$) se resaltan en negrita. El asterisco (*) indica diferencias significativas del efecto del S calculado mediante un ANOVA de un factor para cada hoja con $p < 0,01$. DDH = días de hambreado; PS = peso seco; TD = tejido destino; TF = tejido fuente.

4.2.3. Determinaciones bioquímicas

El contenido de proteínas solubles en el TF cayó a lo largo del tiempo en ambos tratamientos, siendo siempre menor en las plantas HS salvo a los 11 DDH, en las cuales dicha caída comenzó en forma más temprana (**Figura 4.8A**).

Por otro lado, el contenido de aminoácidos libres en el TF de las plantas control se mantuvo constante durante todo el experimento, mientras que cayó en las plantas HS a los 14 y 28 DDH respecto a las plantas control (**Figura 4.8B**).

El contenido de nitrato se mantuvo constante y con valores superiores en las plantas HS con respecto al control y a su vez en estas últimas se observó una caída importante a los 28 DDH (**Figura 4.8C**).

Finalmente, el contenido de azúcares solubles no sufrió alteraciones significativas por efecto del tiempo ni de la disponibilidad de S (**Figuras 4.8D**).

La tasa de exportación de aminoácidos vía floema se mantuvo constante hasta los 21 DDH y se incrementó abruptamente en el último muestreo (28 DDH) en las plantas control (**Figura 4.9A**), cuando la tercera hoja mostró un avanzado estado de senescencia (**Figura 4.7C**). Las plantas HS mostraron una menor tasa de exportación de aminoácidos a partir de los 21 DDH con respecto al control, sin registrarse el pico de exportación observado a los 28 DDH en estas últimas (**Figura 4.9A**).

De forma similar, la tasa de exportación de los azúcares de las plantas control fue constante a lo largo del tiempo hasta los 21 DDH y mostró un pico máximo a los 28 DDH, mientras que la exportación de este metabolito en las plantas HS fue menor al control en dicho punto y tampoco se registró el pico de exportación observado en las plantas control (**Figura 4.9B**).

En el TD el contenido de proteínas solubles cayó a lo largo del tiempo en ambos tratamientos y, al igual que lo ocurrido en el TF, las plantas HS mostraron una caída más temprana y contenidos menores que los de las plantas control a lo largo de todo el ensayo (**Figura 4.10A**).

El contenido de aminoácidos libres se mantuvo constante a lo largo del tiempo en ambos tratamientos, pero las plantas HS mostraron valores significativamente superiores a los de las plantas control (**Figura 4.10B**).

De igual modo, el contenido de nitrato se mantuvo constante en ambos tratamientos, y con valores superiores en las plantas HS con respecto a las control (**Figura 4.10C**).

El contenido de azúcares solubles nuevamente no se vio alterado por la disponibilidad de S ni por el momento de muestreo (**Figura 4.10D**).

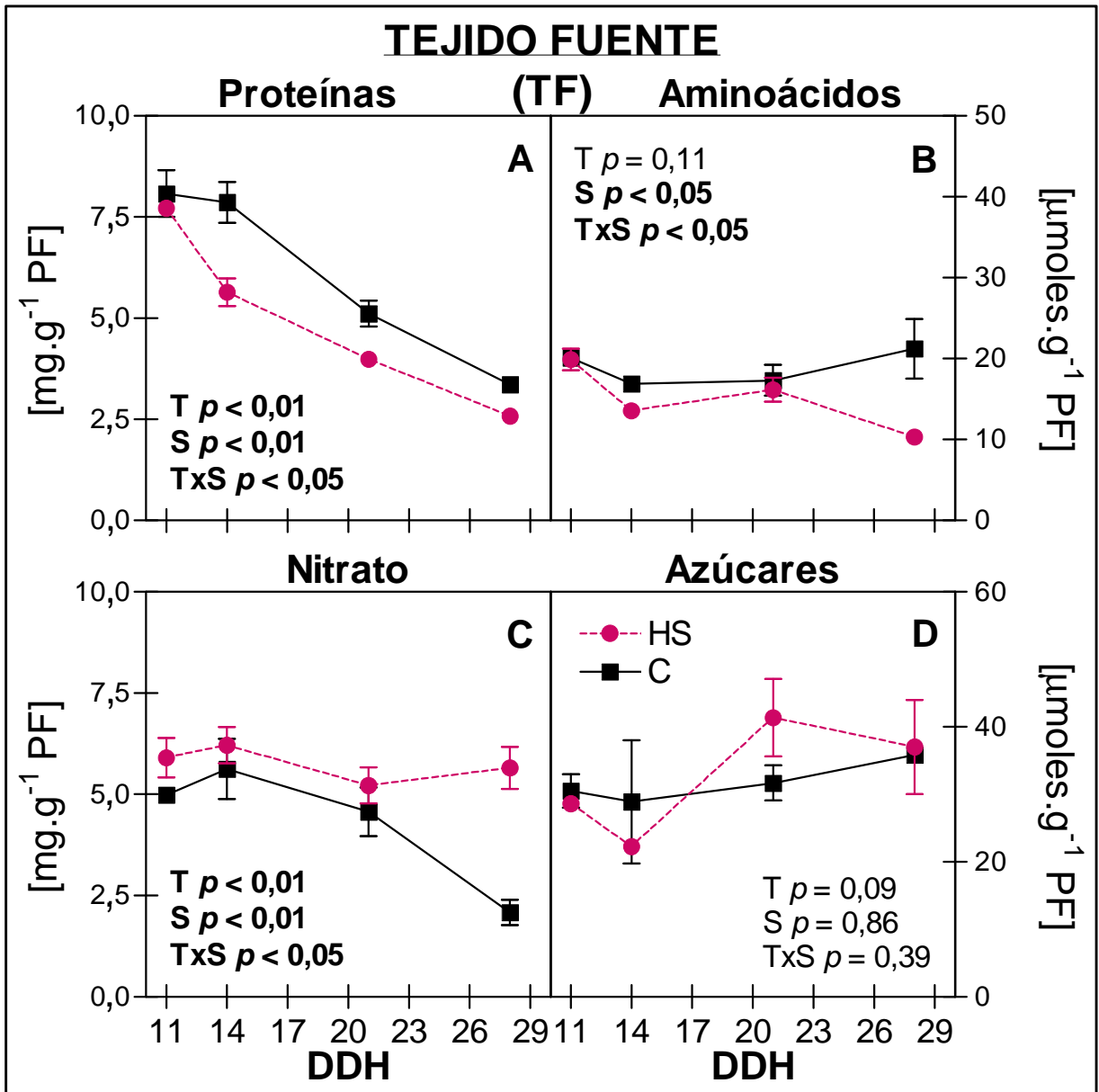


Figura 4.8. Contenido de (A) proteínas solubles, (B) aminoácidos libres, (C) nitrato y (D) azúcares solubles en el tejido fuente de las plantas hambreadas de S (HS; rosa, línea punteada) y de las plantas control (C; negro, línea continua). Los datos representan la media \pm el error estándar ($n=4$). Los valores de p indican los niveles de significancia del efecto del Tiempo (T), S y sus interacciones calculados mediante un ANOVA de dos factores. Los valores que dieron significativos ($p \leq 0,05$) se resaltan en negrita. DDH = días de hambreado; PF = peso fresco.

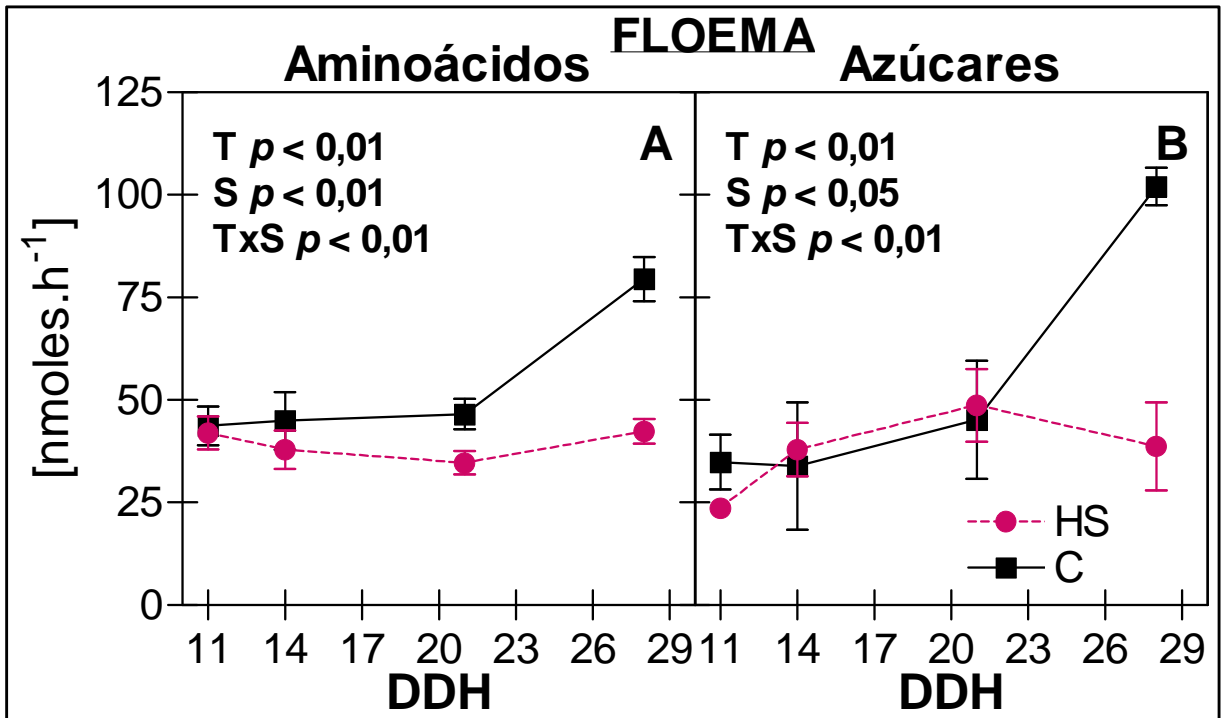


Figura 4.9. Contenido de (A) aminoácidos y (B) azúcares presentes en el exudado floemático del tejido fuente de las plantas hambreadas de S (HS; rosa, línea punteada) y de las plantas control (C; negro, línea continua). Los datos representan la media \pm el error estándar ($n=4$). Los valores de p indican los niveles de significancia del efecto del Tiempo (T), S y sus interacciones calculados mediante un ANOVA de dos factores. Los valores que dieron significativos ($p \leq 0,05$) se resaltan en negra. DDH = días de hambre.

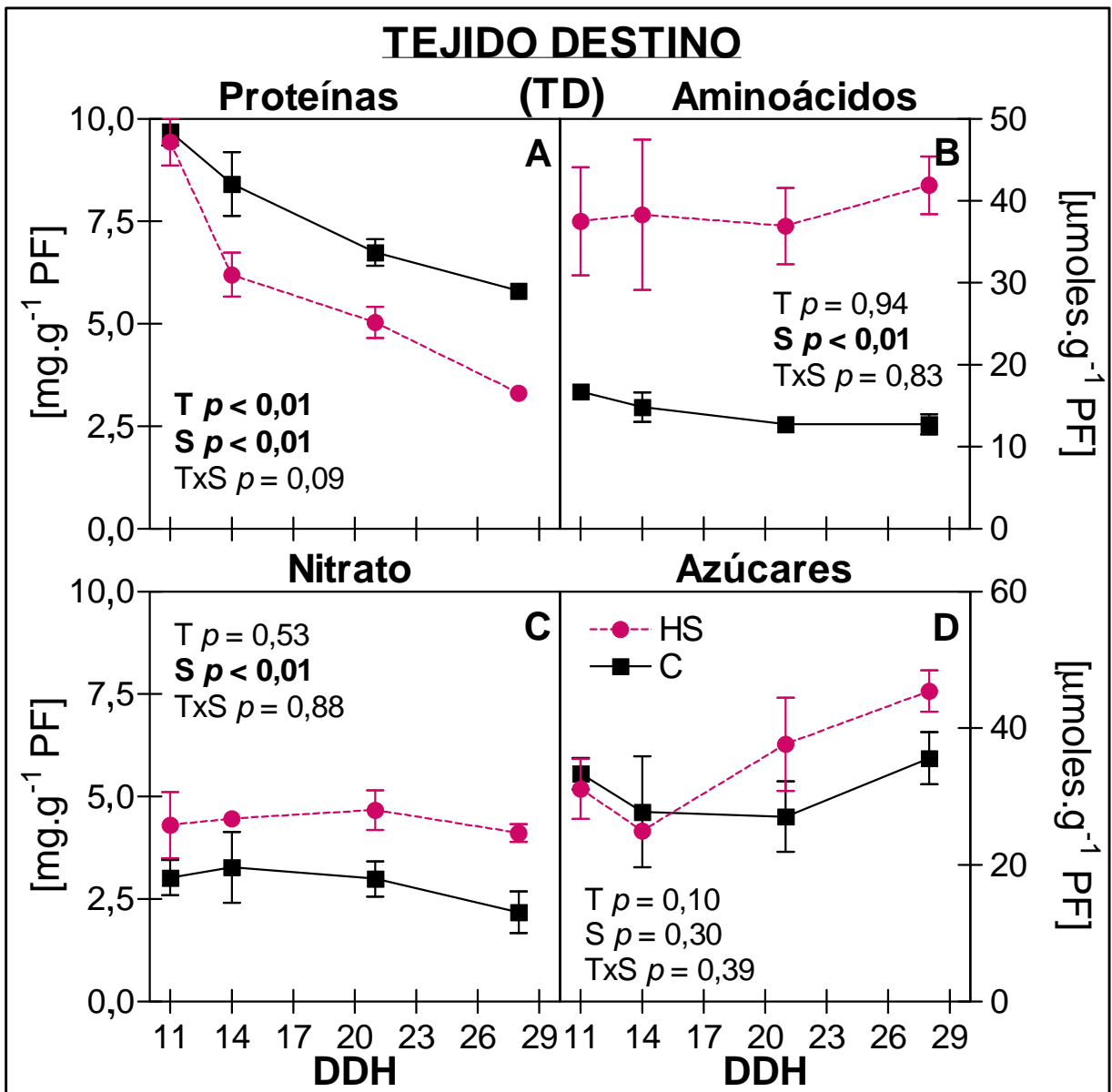


Figura 4.10. Contenido de (A) proteínas solubles, (B) aminoácidos libres, (C) nitrato y (D) azúcares solubles en el tejido destino de las plantas hambreadas de S (HS; rosa, línea punteada) y de las plantas control (C; negro, línea continua). Los datos representan la media \pm el error estándar (n=4). Los valores de p indican los niveles de significancia del efecto del Tiempo (T), S y sus interacciones calculados mediante un ANOVA de dos factores. Los valores que dieron significativos ($p \leq 0,05$) se resaltan en negrita. DDH = días de hambreado; PF = peso fresco.

4.2.4. Determinaciones moleculares

En el TF de las plantas control la expresión de *HvGS1_1* aumentó a lo largo del tiempo (**Figura 4.11A**) mientras que la de *HvGS1_2* aumentó abruptamente a los 28 DDH (**Figura 4.11B**) y la de *HvGS2* cayó a lo largo del tiempo (**Figura 4.11C**).

El hambreado de S alteró el patrón de expresión de las tres isoformas analizadas ya que generó una abrupta caída de *HvGS1_1* en el último muestreo (**Figura 4.11A**) y menores niveles de expresión tanto en *HvGS1_2* (**Figura 4.11B**) como en *HvGS2* (**Figura 4.11C**) a lo largo de todo el ensayo en comparación con las plantas control.

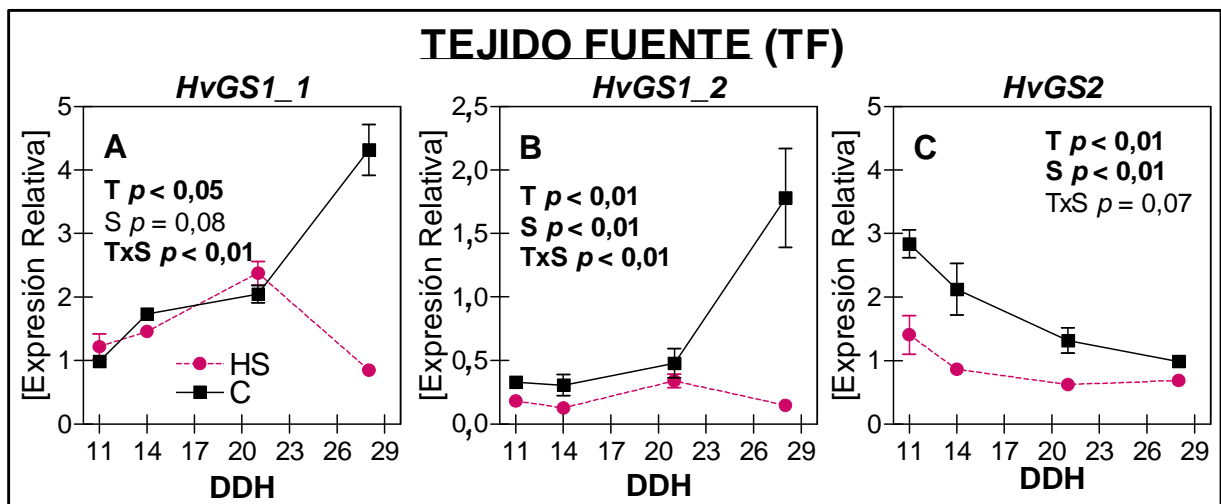


Figura 4.11. Expresión relativa determinada por qRT-PCR de los genes de (A) *HvGS1_1*, (B) *HvGS1_2* y (C) *HvGS2* en el tejido fuente de las plantas hambreadas de S (HS; rosa, línea punteada) y de las plantas control (C; negro, línea continua). Los datos representan la media \pm el error estándar (n=3). Los valores de p indican los niveles de significancia del efecto del Tiempo (T), S y sus interacciones calculados mediante un ANOVA de dos factores. Los valores que dieron significativos ($p \leq 0,05$) se resaltan en negrita. DDH = días de hambreado.

El análisis de la expresión de las tres isoformas de *HvGS* en el TD (**Figura 4.12**) fue realizado únicamente a los 11 y 14 DDH, cuando las hojas en desarrollo que se encontraban inmediatamente por encima de la tercera hoja (tejido fuente, TF) aún no se hallaban en total expansión, ya que posterior a este muestreo no podrían ser considerados inequívocamente como destinos.

Así encontramos que la expresión de *HvGS1_1* (**Figura 4.12A**) y *HvGS1_2* (**Figura 4.12B**) fue significativamente menor en las plantas HS sin variar en el tiempo. Mientras que la expresión de *HvGS2* (**Figura 4.12C**) mostró una leve caída en el tiempo, en ambos tratamientos, y un menor nivel de expresión en las plantas HS con respecto a las control en ambos muestreos.

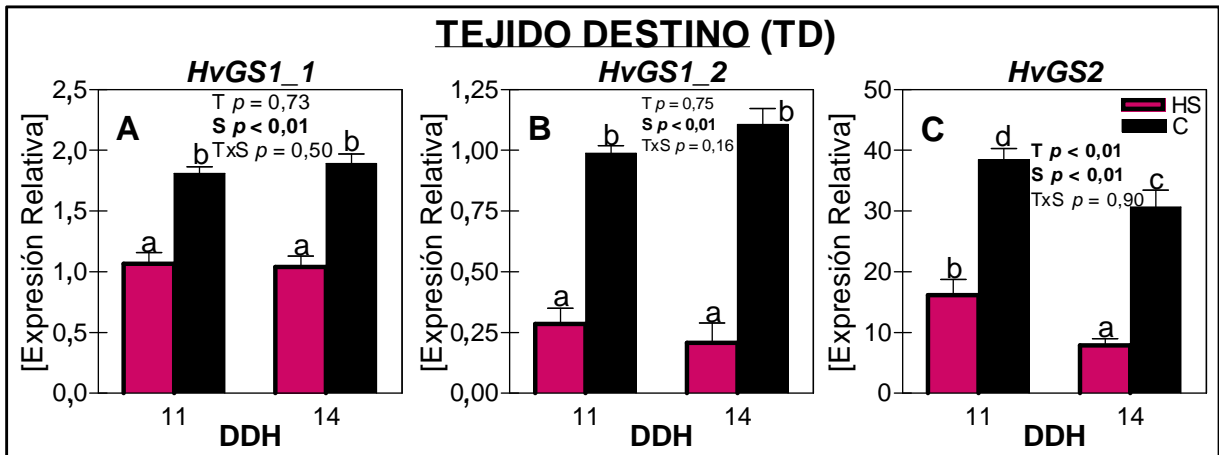


Figura 4.12. Expresión relativa determinada por qRT-PCR de los genes de (A) *HvGS1_1*, (B) *HvGS1_2* y (C) *HvGS2* en el tejido destino de las plantas hambreadas de S (HS, rosa) y de las plantas control (C, negro) a los 11 y 14 DDH. Los datos representan la media \pm el error estándar ($n=3$). Los valores de p indican los niveles de significancia del efecto del Tiempo (T), S y sus interacciones calculados mediante un ANOVA de dos factores. Los valores que dieron significativos ($p \leq 0,05$) se resaltan en negrita. Las letras representan las diferencias significativas calculadas mediante un análisis LSD post hoc. DDH = días de hambreado.

Por otra parte, en el TF de las plantas control se observaron distintos patrones de expresión a lo largo del tiempo para cada gen de TAA analizado. En estas plantas la expresión de *HvAAP2* cayó a lo largo del tiempo (Figura 4.13A), mientras que la de *HvAAP4* inicialmente mostró un incremento a los 14 DDH previo a su caída (Figura 4.13B). Contrariamente, las expresiones de *HvAAP7* (Figura 4.13D) y *HvProT1* (Figura 4.13F) se incrementaron con el tiempo mientras que los niveles de expresión de *HvAAP6* (Figura 4.13C) y *HvLHT2* (Figura 4.13E) se mantuvieron constantes durante todo el experimento.

A su vez las plantas HS mostraron niveles de expresión más bajos de *HvAAP4* (Figura 4.13B), *HvAAP7* (Figura 4.13D) y *HvProT1* (Figura 4.13F) con respecto a las plantas control. Además, la expresión de *HvAAP6* se mantuvo constante en las plantas HS hasta los 21 DDH y luego cayó significativamente (Figura 4.13C) mientras que el incremento a lo largo del tiempo en la expresión de *HvProT1* observado en las plantas control no se encontró en las HS (Figura 4.13F).

Sobre el patrón de expresión de *HvAAP2* (Figura 4.13A) y *HvLHT2* (Figura 4.13E) no se encontraron efectos significativos de la disponibilidad de S.

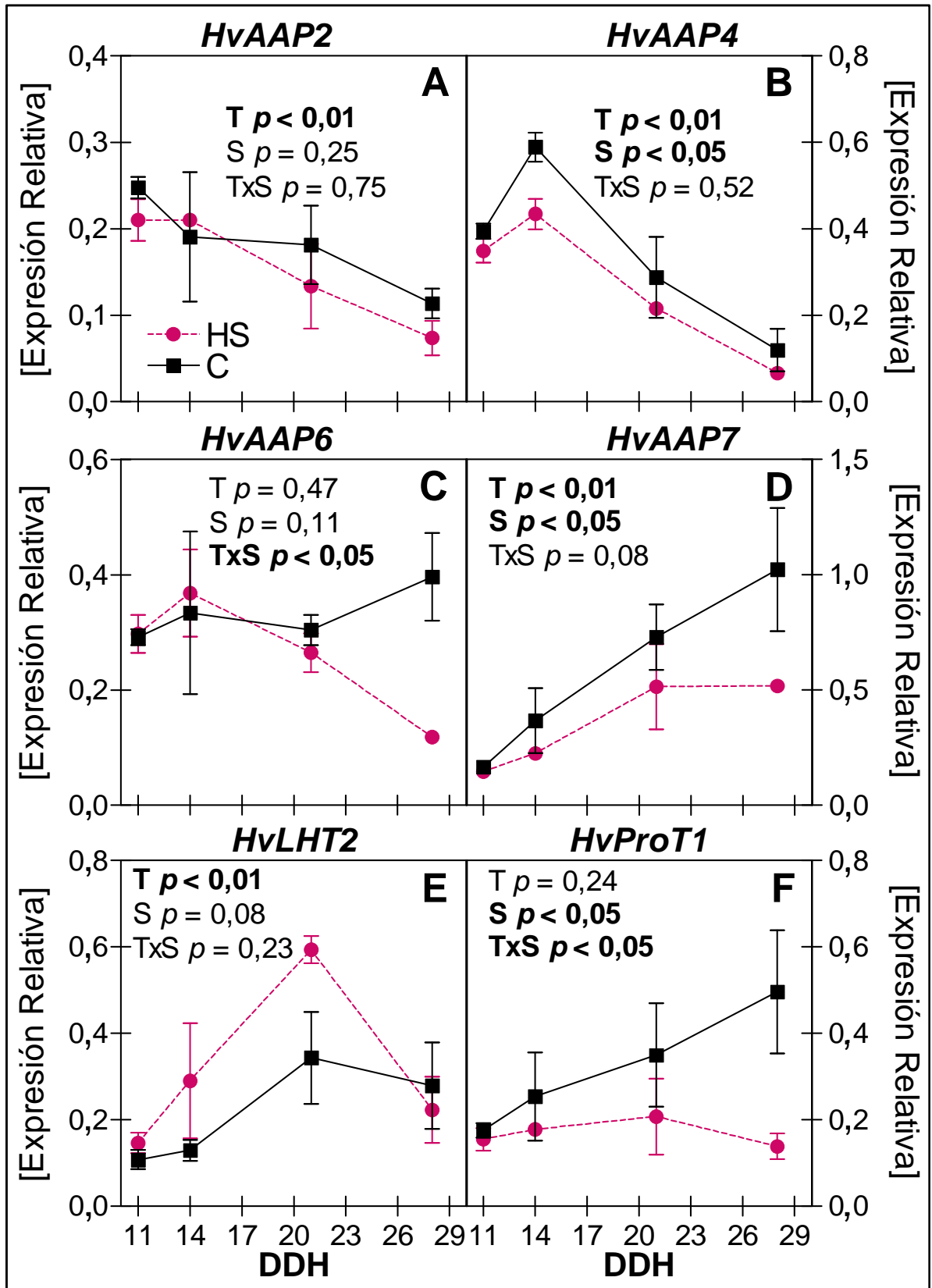


Figura 4.13. Expresión relativa determinada por qRT-PCR de (A) *HvAAP2*, (B) *HvAAP4*, (C) *HvAAP6*, (D) *HvAAP7*, (E) *HvLHT2* y (F) *HvProT1* en el tejido fuente de las plantas hambreadas de S (HS; rosa, línea punteada) y de las plantas control (C; negro, línea continua). Los datos representan la media \pm el error estándar (n=3). Los valores de p indican los niveles de significancia del efecto del Tiempo (T), S y sus interacciones calculados mediante un ANOVA de dos factores. Los valores que dieron significativos ($p \leq 0,05$) se resaltan en negra. DDH = días de hambreado.

Finalmente, con el fin de revelar posibles interacciones entre la expresión de los genes de *HvGS* y *HvTAA* analizados y la tasa de exportación de aminoácidos a través del floema, realizamos un análisis de correlación de Pearson con los resultados de este ensayo, encontrando una fuerte correlación entre la tasa de exportación de aminoácidos y la expresión de los genes de *HvGS1_1*, *HvGS1_2*, *HvAAP7* y *HvProT1* (**Tabla 4.1**).

Tabla 4.1. Valores obtenidos a partir de la correlación de Pearson entre la tasa de exportación de aminoácidos vía floema (AA Floema) y la expresión de los genes de *HvGS1* y *HvTAA*. Los asteriscos muestran diferencias significativas con $p < 0,01$ (**) y $p < 0,05$ (*), los cuales se resaltan en negrita.

	<i>HvGS1_1</i>	<i>HvGS1_2</i>	<i>HvAAP2</i>	<i>HvAAP4</i>	<i>HvAAP6</i>	<i>HvAAP7</i>	<i>HvLHT2</i>	<i>HvProt1</i>
AA Floema	0,5346**	0,7573**	-0,2646	-0,1818	0,3374	0,6940**	-0,0552	0,7277**

4.3. Discusión

Dentro de las características que indican una condición de deficiencia nutricional se encuentra la caída en la biomasa de la planta y/o el lento crecimiento inicial de la misma (www.ipni.net). Esta condición se manifestó claramente en las plantas 0,1% y 1% del ensayo de curva de S en donde la caída en la biomasa aérea fue del 50 y del 35%, respectivamente, con respecto al tratamiento control (100%), hecho que no ocurrió con las plantas 10% (**Figura 4.1A**). Del mismo modo, el establecimiento de una menor cantidad de hojas en las plantas 0,1% y 1% indican una disminución en la tasa de crecimiento de las mismas (**Figura 4.1D**). Por otro lado, y acorde a lo esperado, en el ensayo de hambreado de S no encontramos efectos en el tamaño de las plantas (PS y número de hojas, **Figuras 4.7A y C**) al inicio de los muestreos permitiendo así el seguimiento del desarrollo de la tercera hoja como TF en ambos tratamientos. Recién a partir de los 28 DDH se comenzaron a observar los efectos causados por una deficiencia severa de S en cuanto a la caída en la biomasa (**Figura 4.7A**).

Al mismo tiempo los menores niveles de clorofila encontrados en las plantas 0,1% y 1% tanto en el TF como en el TD (**Figura 4.1B y C**) así como en el TD de las plantas HS (gráfico inserto en la figura **4.7B**) concuerdan con los reportes bibliográficos que indican que deficiencias severas de S no sólo afectan notoriamente el crecimiento y desarrollo de las plantas, sino que también generan una marcada reducción del aparato fotosintético, provocando la aparición de hojas uniformemente amarillas o verdes pálidas en distintas especies de plantas (Gilbert *et al.*, 1997; Nikiforova *et al.*, 2004, 2005; Ferraris, 2007; Lunde *et al.*, 2008).

Cabe aclarar que al analizar globalmente los resultados obtenidos a nivel fisiológico y bioquímico en el ensayo de curva de S, determinamos que la visualización de los efectos

por deficiencia se registraron mayormente a partir de una reducción del 99% en la concentración de S respecto de la solución nutritiva estándar (plantas 0,1% y 1%), mientras que una reducción del 90% no generó mayores diferencias con las plantas control (100%), lo cual sugiere que una disponibilidad de $120 \mu\text{M}$ de S-SO_4^{-2} sería suficiente para que se dé un adecuado desarrollo de la planta a estadios tempranos del crecimiento y al menos bajo las condiciones de cultivo en las que trabajamos aquí.

La disminución en el contenido proteico y la acumulación de aminoácidos y nitrato tanto en el TF (**Figuras 4.2A – C y 4.8A y C**) como en el TD (**Figuras 4.4A – C y 4.10A – C**) de las plantas deficientes de S concuerda con la bibliografía que reporta una disrupción significativa del metabolismo del N en respuesta a la deficiencia de S con la consecuente restricción en la síntesis proteica y acumulación de metabolitos nitrogenados no azufrados (Hesse *et al.*, 2004; Nikiforova *et al.* 2004, 2005; De Bona *et al.* 2011).

La acumulación de azúcares en el TF y TD de las plantas 1% del ensayo de curva de S (**Figuras 4.2D y 4.4D**) sugiere que la tasa fotosintética de estas plantas es superior a la requerida para mantener el ritmo de crecimiento impuesto por la limitación de S. Por otra parte, al aumentar la restricción de este nutriente (plantas 0,1%) la fotosíntesis pudo verse afectada negativamente, como ya fue reportado por Gilbert *et al.* (1997) y Lunde *et al.* (2008) para restricciones severas de S, disminuyendo la síntesis de azúcares y por ende limitando su acumulación en el TF (**Figura 4.2D**) e impidiendo directamente su acumulación en el TD (**Figura 4.4D**). Esto no ocurrió en el TF de las plantas HS (**Figura 4.8D**) y sólo se observó una tendencia a acumular azúcares en el TD de estas plantas al final del ensayo (**Figura 4.10D**), indicando que la nutrición azufrada suministrada hasta la aparición de la tercera hoja fue suficiente para lograr una correcta asimilación del C en las plantas HS.

En cuanto a la exportación de aminoácidos y azúcares vía floema (**Figuras 4.3 y 4.9**) con estos resultados corroboramos el efecto positivo del S sobre la tasa de exportación de ambos metabolitos que se observó en el capítulo anterior (capítulo 3), comprobando que una baja disponibilidad de S inhibe el transporte por floema de ambos compuestos, no sólo durante la removilización asociada a la senescencia monocárpica sino también la movilización que se da durante el estadio vegetativo como parte del ciclado de nutrientes dentro de la planta.

A su vez, en el ensayo de hambreado de S observamos que el contenido de clorofila (**Figura 4.7B**) y proteínas (**Figura 4.8A**) en el TF de las plantas control disminuyó con el tiempo, como era esperable, ya que el inicio de la senescencia foliar marca el comienzo de una caída gradual en los contenidos de estos metabolitos (Osborne, 1962; Cohen *et al.*, 1979; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Avila-Ospina *et al.*, 2015). Sin embargo, la tasa de exportación de aminoácidos y azúcares vía floema observada en las plantas control fue constante durante todo el ensayo con un marcado pico de exudación sólo a los 28 DDH

(Figura 4.9), al momento de un avanzado estado de senescencia (Figura 4.7C). Esto sugiere que la exportación de N y C desde las hojas maduras no se incrementa gradualmente con el tiempo, a pesar de que estas hojas posean cantidades considerables de aminoácidos y azúcares disponibles para ser transportados. Por otra parte, la ausencia en las plantas HS de los picos de exportación encontrados en las plantas control a los 28 DDH (Figura 4.9) y el mayor tiempo de sobrevivencia de las hojas de las plantas HS (Figura 4.7B y C) sugieren un retraso en el proceso de senescencia gatillado por la deficiencia de S, efecto que ya ha sido previamente reportado en plantas de colza (Dubousset *et al.*, 2009; Abdallah *et al.*, 2011) y que hemos determinado, en cierto modo, en el ensayo a campo del capítulo 3 en donde la aceleración en el proceso de senescencia gatillada por una deficiencia de N sólo fue posible cuando el cultivo contaba con una buena disponibilidad de S (plantas sin fertilizar con N pero fertilizadas con S; Figura 3.2A).

Al mismo tiempo, la dinámica de expresión de las distintas isoformas de *HvGS* en el TF de las plantas control que se observó en el ensayo de hambreado de S conforme avanzaba la senescencia de la hoja (Figura 4.11), concuerda con resultados previos que demuestran que la abundancia del ARNm de la isoforma citosólica (GS1) se incrementa mientras que la de la isoforma plastídica (GS2) decae en las hojas senescentes (Bernard y Habash, 2009). Por otra parte, los tres patrones distintos de expresión de los genes de *HvTAA* observados en este ensayo a lo largo de la senescencia del TF en las plantas control (Figura 4.13) proveen información sobre los posibles roles de estos transportadores durante el desarrollo de la hoja y señalan a los genes de *HvAAP7* y *HvProT1* como aquellos TAA potencialmente implicados en la removilización de aminoácidos durante la senescencia, dado que su expresión aumentó conforme avanzaba la misma (Figura 4.13D y F). Además, se demostró que una reducción en la disponibilidad de S conlleva a niveles de expresión significativamente más bajos de todos los genes de *HvGS* (Figuras 4.5, 4.11 y 4.12) y de cinco de los seis *HvTAA* analizados (Figuras 4.6 y 4.13). Con estos resultados rechazamos la **hipótesis 2a** que sostiene que *la deficiencia de S induce la expresión de los genes de GS1 y ciertos TAA involucrados en la carga de los aminoácidos al floema en el tejido fuente*, como era esperable a la luz del hallazgo que la deficiencia de S no induce, sino que inhibe la exportación de aminoácidos por floema. Asimismo, las diferencias encontradas entre ambos ensayos de este capítulo respecto al efecto de la deficiencia de S sobre cada tipo de TAA, sugerirían roles y vías regulatorias diferenciales para los seis TAA aquí analizados.

La regulación negativa de los genes de *HvGS* (Figura 4.11), el menor contenido de aminoácidos libres (Figura 4.8B) y el mayor contenido de nitrato (Figura 4.8C) en el TF de las plantas HS estarían indicando una inhibición de la asimilación del N bajo condiciones de deficiencia de S en un posible intento de prevenir la acumulación de aminoácidos no azufrados en este tejido (Wallsgrave *et al.*, 1987; Cren y Hirel, 1999; Mifflin y Habash, 2002;

Goodall *et al.*, 2013; Yamaya y Kusano, 2014). Sin embargo, también es posible que la acumulación de aminoácidos (**Figuras 4.4B y 4.10B**) y nitrato (**Figuras 4.4C y 4.10C**) observada en el TD de las plantas deficientes de S actúen como una señal negativa a fin de inhibir tanto la expresión de los genes de *HvGS* en el TF (**Figuras 4.5 y 4.11**) y TD (**Figuras 4.5 y 4.12**) como la exportación de aminoácidos desde el TF (**Figuras 4.3A y 4.9A**), ya que los metabolismos de ambos tejidos se encuentran estrechamente coordinados para mantener el balance entre el crecimiento de la planta y la disponibilidad de nutrientes con que ésta cuenta. Esta hipótesis se encuentra a su vez reforzada por varios trabajos que demuestran que una baja disponibilidad de S reduce de manera significativa la absorción de nitrato, la actividad de la nitrato reductasa y la actividad de los transportadores de nitrato de las raíces, como consecuencia de una retroalimentación negativa sobre la absorción del nitrato debido a la acumulación de aminoácidos no azufrados en los tejidos (Abdallah *et al.*, 2011; De Bona *et al.*, 2011; Sorin *et al.*, 2015).

La caída en la expresión de *HvGS2* debido a la deficiencia de S (**Figuras 4.5C, 4.11C y 4.12C**) podría estar asociada con cambios en la tasa de fotorrespiración, ya que se ha demostrado que esta isoforma se encuentra transcripcionalmente regulada por este camino metabólico (Edwards y Coruzzi, 1989). A su vez, hay reportes que indican que la deficiencia de S repercute sobre la fotorrespiración, aunque existen ciertas discrepancias ya que Chen y Wang (2006) mostraron que bajo deficiencia de S la tasa de fotorrespiración de hojas de *Citrus sinensis* decayó marcadamente mientras que Nikiforova *et al.* (2005) propusieron que una baja disponibilidad de S produciría un incremento en la fotorrespiración.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de correlación de Pearson mostraron una fuerte correlación entre la exportación de aminoácidos vía floema y la expresión de los genes de ambas isoformas citosólicas de GS (*HvGS1*; **Tabla 4.1**), lo cual no sólo refuerza la hipótesis del rol clave que cumpliría la GS1 en la removilización del N (Mifflin y Habash, 2002; Tabuchi *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2006; Bernard y Habash, 2009; Caputo *et al.*, 2009; Goodall *et al.*, 2013; Avila-Ospina *et al.*, 2015) sino que además demuestra la importancia de una adecuada nutrición azufrada para un normal desarrollo del proceso de removilización. Por ende, la inhibición de *HvGS1* en las plantas deficientes de S (**Figuras 4.5A y B y 4.11A y B**) podría explicar, al menos en parte, la baja tasa de exportación de aminoácidos observada desde el TF de las plantas BS y HS (**Figuras 4.3A y 4.9A**). Sumado a esto, el incremento de la expresión de *HvAAP7* a lo largo del tiempo en las plantas control (**Figura 4.13D**) y la alta correlación encontrada entre la exportación de aminoácidos y la expresión de dicho gen (**Tabla 4.1**), proveen nuevas evidencias sobre el rol significativo que jugaría este TAA en particular en la removilización del N durante la senescencia, pese a que aún no se han encontrado secuencias homólogas para *HvAAP7* con TAA conocidos (Kohl *et*

al., 2012). A su vez, la falta de inducción de dicho gen luego de los 21 DDH en las plantas HS (**Figura 4.13D**) podría también explicar la inhibición de la exportación de aminoácidos vía floema observada (**Figura 4.9A**). Por otro lado, la correlación encontrada entre *HvProT1* y la tasa de exportación de aminoácidos (**Tabla 4.1**) resulta llamativa, dado que se asume que este transportador es específico de prolina, un aminoácido que se encuentra normalmente en muy bajas cantidades en el floema de varias especies de plantas, incluyendo cebada (Weibull *et al.*, 1990; Winter *et al.*, 1992; Caputo *et al.*, 2001, 2009). Sin embargo, la expresión de *HvProT1* también se correlacionó fuertemente con la expresión de los genes de *HvGS1* (correlación de Pearson entre *HvProT1* y *HvGS1_1*: 0,8237**; y entre *HvProT1* y *HvGS1_2*: 0,8805**), lo cual concuerda con reportes previos de Larher *et al.* (1998) y Brugière *et al.* (1999) quienes sugirieron un rol de GS1 en la regulación de ProT1. Estos autores observaron que la aplicación de un inhibidor de GS sobre discos de hojas de colza prevenía la conversión de los aminoácidos a prolina, así como también, que la inhibición de GS1 en el floema de plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* producía una caída en las cantidades de prolina presentes tanto en tallos y raíces como en los tejidos vasculares (xilema y floema) de estas plantas. Asimismo, una regulación positiva de *HvProT1* en las plantas deficientes de S resultaba esperable, ya que existen reportes que indican que el aminoácido prolina se acumula frente a distintos tipos de estreses (Claussen, 2002, 2005; Ashraf y Harris, 2004). Sin embargo, en los dos ensayos analizados en este capítulo se observó una inhibición de *HvProT1* en las plantas BS y HS (**Figuras 4.6 y 4.13F**), indicando que la prolina no sería un buen indicador de estrés por deficiencia de S.

Con los resultados hasta aquí obtenidos especulamos que la inhibición de la exportación de aminoácidos a través del floema en plantas deficientes de S estaría relacionada con los menores niveles de expresión de *HvGS1_1* y *HvGS1_2* pero también con la regulación negativa de *HvAAP7* y *HvProT1*. No obstante, si bien la expresión de *HvAAP6* no correlacionó con la exportación de aminoácidos vía floema (**Tabla 4.1**), su participación en la removilización de N no puede ser totalmente descartada. La secuencia del gen de *HvAAP6* se encuentra estrechamente relacionada con las de *AtAAP2* y *AtAAP5* de *Arabidopsis* (Kohl *et al.*, 2012), ambos asociados con la carga de aminoácidos (especialmente glutamina) al floema (Tegeder y Rentsch, 2010). De hecho, la expresión constante de *HvAAP6* a lo largo del tiempo en las plantas control y su caída significativa a los 28 DDH en las plantas HS (**Figura 4.13C**), sumado a su inhibición en las plantas BS (**Figura 4.6**), sugieren un rol importante del S en la regulación de su expresión génica y una posible función de este gen en la carga de aminoácidos al floema. De esta forma, en conjunto, los resultados presentados nos permiten aceptar la **hipótesis 2b** que sostiene que *la tasa de exportación de aminoácidos varía de acuerdo con los cambios en la expresión de GS1* y TAA.

Capítulo 5

Resultados y Discusión

“La deficiencia de azufre retrasa la inducción de proteasas asociadas a senescencia”

Capítulo 5

La deficiencia de azufre retrasa la inducción de proteasas asociadas a senescencia

El proceso de senescencia foliar es clave para que se produzca el reciclado de nutrientes dentro de la planta. Durante este proceso la enzima Rubisco, considerada una fuente importante de reserva de N y S en las hojas (Hirel *et al.*, 2007; Avice y Etienne, 2014), es degradada junto con otras proteínas mediante la acción de proteasas para dar aminoácidos libres capaces de suplir la demanda de los tejidos en desarrollo. Por ello, uno de los modos que existe de evaluar el avance de la senescencia es a través del monitoreo de cambios en los contenidos proteicos y/o de clorofila en las hojas, así como el consecuente amarillamiento de las mismas, además del análisis de la expresión de genes codificantes para proteasas asociadas a esta etapa (Avice y Etienne, 2014).

En los capítulos anteriores observamos que la deficiencia de S produjo un retraso en el proceso de senescencia de las hojas. Este hecho fue inicialmente sugerido por la observación de que el cultivo requería una buena disponibilidad de S para que se produjera la aceleración del proceso de senescencia gatillado por la deficiencia de N (**Figura 3.2A**) y posteriormente evidenciado por el mayor tiempo de sobrevida (**Figura 4.7C**) y la menor caída en el contenido de clorofila de la tercera hoja de las plantas HS (**Figura 4.7B**). Sumado a esto, los picos de exportación tanto de aminoácidos como de azúcares observados en la tercera hoja de las plantas control en avanzado estado de senescencia no se verificaron en las plantas deficientes de S (**Figura 4.9**).

Por ello, en este capítulo estudiamos el efecto de la deficiencia de S sobre la expresión de los genes que codifican para proteasas de distintos grupos catalíticos que han sido fuertemente asociadas al proceso de senescencia foliar en diversas especies de plantas, incluyendo cebada (Parrott *et al.*, 2007; Roberts *et al.*, 2012).

5.1. Ensayo de hambreado de S

5.1.1. Diseño experimental y toma de muestras

Para los análisis se utilizó la tercera hoja (tejido fuente; TF) de las plantas hambreadas de S (HS) y control (C) del ensayo de hambreado de S del capítulo 4. El diseño experimental y toma de muestras se detallan en el ítem 4.2.1.

5.1.2. Determinaciones moleculares

Inicialmente se realizó un análisis por RT-PCR semicuantitativa de la expresión del gen de *HvSAG12* (comúnmente utilizado como marcador molecular de senescencia; Avice y Etienne, 2014) en el TF de las plantas control a los 11, 14, 21 y 28 DDH. Así, se observó un aumento progresivo de la expresión de este gen a lo largo del tiempo, encontrándose una inducción del 273% entre los 11 y los 28 DDH (**Figura 5.1**), momento en el cual la tercera hoja de las plantas control presentaba un avanzado estado de senescencia (**Figura 5.2**).

En base a este resultado decidimos cuantificar la expresión por PCR en tiempo real (qRT-PCR) de las proteasas en estudio en el TF a los 11 DDH (tejido no senescente) y a los 28 DDH (tejido senescente) (**Figura 5.2**).

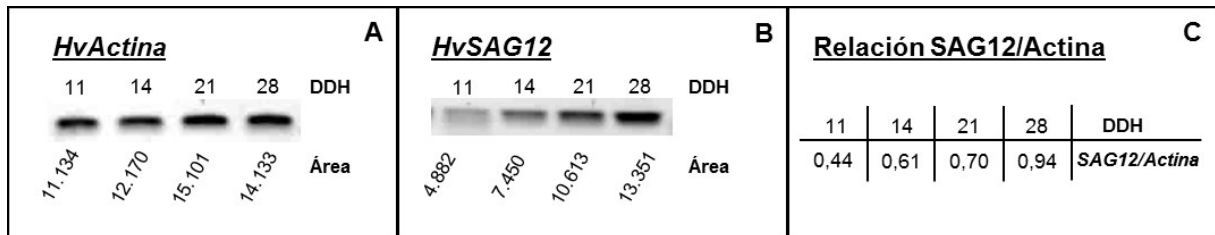


Figura 5.1. Electroforesis en geles de agarosa de los productos de PCR de **(A)** *HvActina* y **(B)** *HvSAG12* del tejido fuente de las plantas control a lo largo del tiempo del ensayo de hambreado de S. **(C)** Relación entre las áreas de las bandas de *HvSAG12* y *HvActina*. El área de las bandas fue calculada con el Software ImageJ. Los valores de área corresponden al promedio de 3 réplicas independientes. Se muestra sólo una imagen a modo ilustrativo. DDH = días de hambreado.

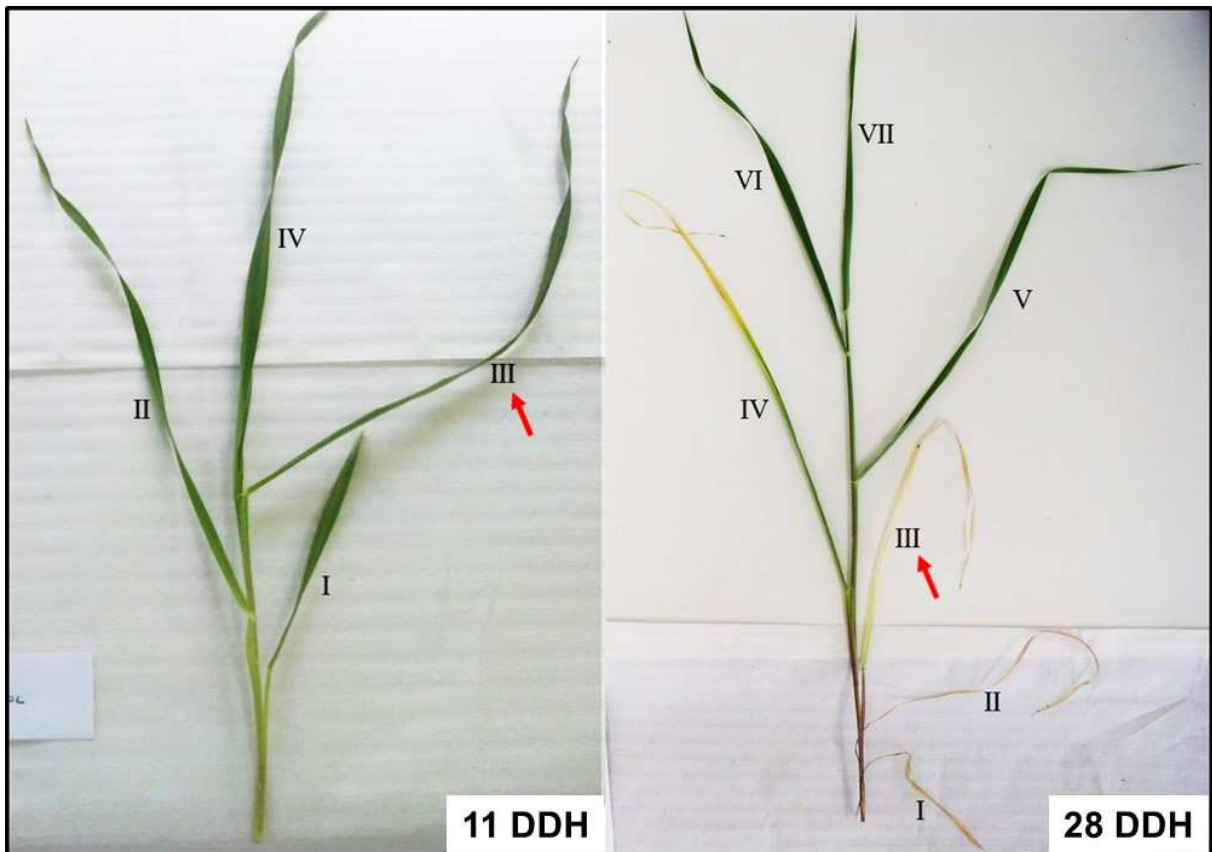


Figura 5.2. Fotografía de plantas control del ensayo de hambreado de S a los 11 y 28 DDH. Los números romanos indican el número de hoja. La flecha roja indica la tercera hoja seleccionada como tejido fuente. DDH = días de hambreado.

El nivel de expresión de las diferentes proteasas analizadas en las plantas control fue variable, siendo el gen de *HvALEU* (**Figura 5.3C**) el que mostró la mayor expresión, seguido por los genes *HvPAP* (**Figura 5.3A**), *HvCPMIII* (**Figura 5.3F**), *HvLEGU* (**Figura 5.3D**), *HvCND41* (**Figura 5.3G**) y *HvSAG12* (**Figura 5.3B**). *HvLEU-AP* (**Figura 5.7H**) y *HvSUBT* (**Figura 5.3E**) mostraron niveles de expresión marcadamente inferiores al resto de las proteasas. A su vez, en estas plantas se observó que *HvCND41* fue el único gen cuya expresión disminuyó en el tiempo (**Figura 5.3G**), mientras que el resto de los genes aumentaron su expresión (**Figuras 5.3A – F y H**).

Por otro lado, en las plantas HS la expresión de *HvSAG12*, *HvALEU* y *HvLEGU* aumentó en el tiempo, aunque en menor medida respecto de las plantas control (**Figuras 5.3B – D**). En cambio, la expresión de *HvPAP*, *HvSUBT*, *HvCPMIII* y *HvLEU-AP* se mantuvo constante (**Figuras 5.3A, E, F y H**) y la de *HvCND41* se vio reprimida, al igual que en las plantas control (**Figura 5.3G**). De esta forma, todos los genes analizados, exceptuando *HvCDN41*, presentaron una disminución significativa de su expresión en las plantas HS con respecto a las plantas control a los 28 DDH, mientras que a los 11 DDH no se observaron efectos del S (**Figuras 5.3A – F y H**).

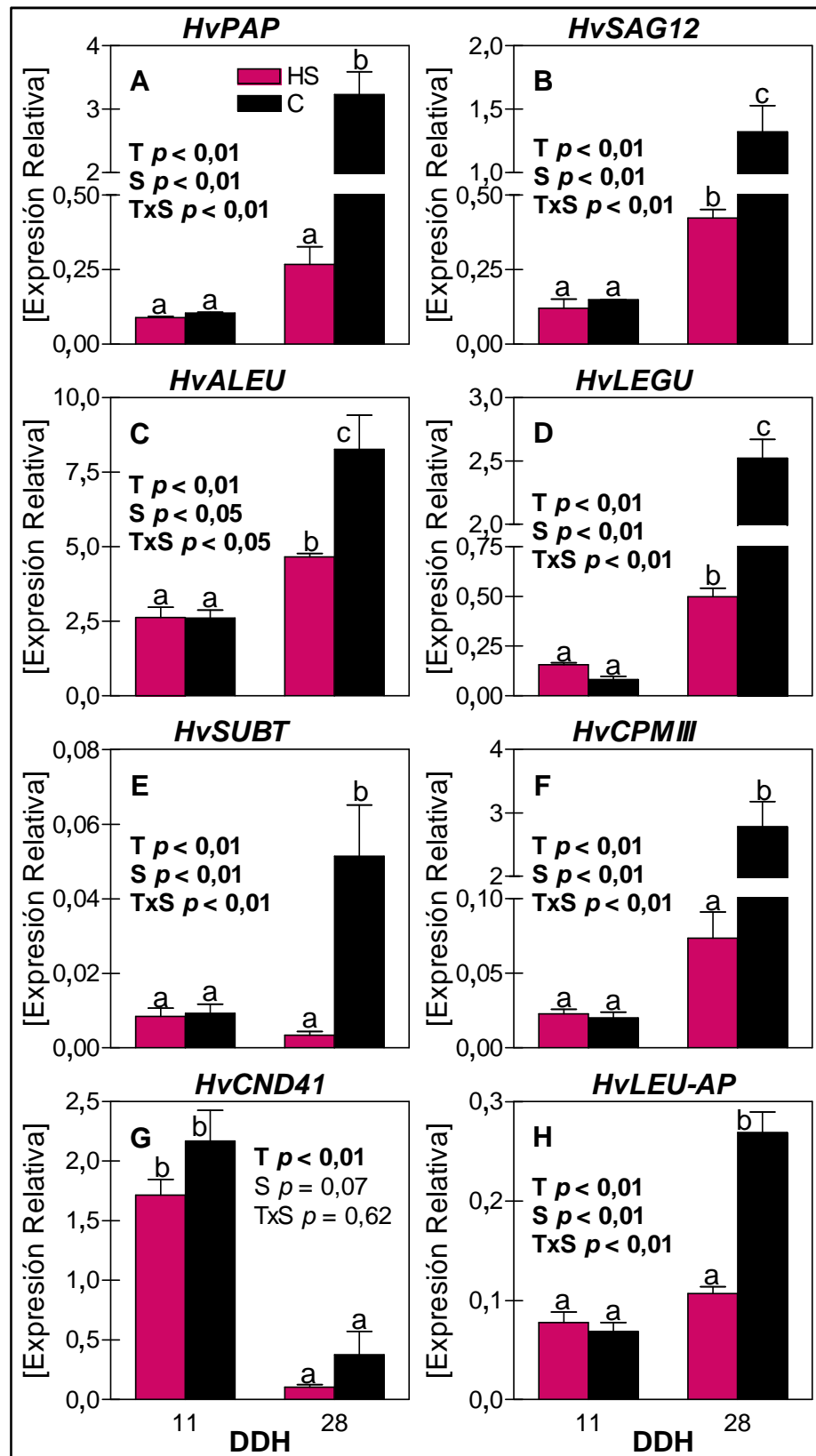


Figura 5.3. Expresión relativa determinada por qRT-PCR de (A) *HvPAP*, (B) *HvSAG12*, (C) *HvALEU*, (D) *HvLEGU*, (E) *HvSUBT*, (F) *HvCPMIII*, (G) *HvCND41* y (H) *HvLEU-AP* en el tejido fuente de plantas hambreadas de S (HS, rosa) y plantas control (C, negro). Los datos representan la media \pm el error estándar ($n=3$). Los valores de p indican los niveles de significancia del efecto del Tiempo (T), S y sus interacciones calculados mediante un ANOVA de dos factores. Los valores que dieron significativos ($p \leq 0,05$) se resaltan en negrita. Las letras representan las diferencias significativas calculadas mediante un análisis LSD post hoc. DDH = días de hambreado.

5.2. Senescencia inducida por metil-jasmonato

Los resultados del punto anterior mostraron que la inducción en el tiempo de las proteasas analizadas fue menor en las plantas HS que en las plantas control (**Figuras 5.3B – D**), e incluso en algunos casos no hubo inducción alguna (**Figuras 5.3A, E, F y H**). A partir de esta observación es posible plantear al menos dos alternativas: o la deficiencia de S impide la normal expresión de las proteasas asociadas a senescencia o solamente la retrasa. Con el fin de indagar en esta cuestión, decidimos estudiar si bajo la acción de un inductor de senescencia las plantas HS lograban alcanzar valores de expresión de las proteasas similares a los de las plantas control.

La senescencia foliar puede ser inducida tanto por factores externos (luz, temperatura, disponibilidad de nutrientes, entre otros) como internos (balance hormonal, relación fuente-destino, entre otros) (Feller y Fischer, 1994; Diaz-Mendoza *et al.*, 2016). Entre estos últimos, el metil-jasmonato (MJ), una hormona que se encuentra de manera natural en plantas superiores y que regula su crecimiento (Parthier, 1990; Creelman *et al.*, 1992; Wasternack, 2007), acelera marcadamente la senescencia de hojas escindidas de diversas especies, como avena y cebada, al aplicarse exógenamente (Ueda y Kato, 1980; Weidhase *et al.*, 1987; Parthier, 1990; Smart, 1994). Por ello, en este ensayo decidimos aplicar MJ a fin de inducir la senescencia de las hojas de ambos tratamientos.

5.2.1. Diseño experimental y toma de muestras

Las plantas fueron cultivadas, en cámara de crecimiento, con una buena disponibilidad de S desde la siembra ($300 \mu\text{M}$ de S-SO_4^{-2}) hasta la aparición de la tercera hoja (11 DDS = 0 DDH), momento en el cual todas las macetas fueron lavadas con H_2O destilada para eliminar remanentes de S en el sustrato. Luego, las plantas fueron divididas en dos grupos: plantas hambreadas de S (HS; suplementadas con $1,25 \mu\text{M}$ de S-SO_4^{-2}) y plantas control (C; suplementadas con $1,2 \text{ mM}$ de S-SO_4^{-2}). A los 15 DDH (26 DDS) se cortó la tercera hoja de cada planta y se la incubó en presencia de MJ $100 \mu\text{M}$, en oscuridad durante 0, 2 y 3 días (d). Al cabo de cada período de incubación se obtuvieron los exudados floemáticos de las hojas y posteriormente se las congeló en N_2 líquido.

5.2.2. Determinaciones bioquímicas

Al momento del inicio del tratamiento con MJ (15 DDH), las plantas HS presentaban cinco hojas mientras que las control seis. A su vez, las plantas HS mostraban un color verde más claro de manera uniforme y menos signos de senescencia con respecto a las plantas control (**Figura 5.4**).

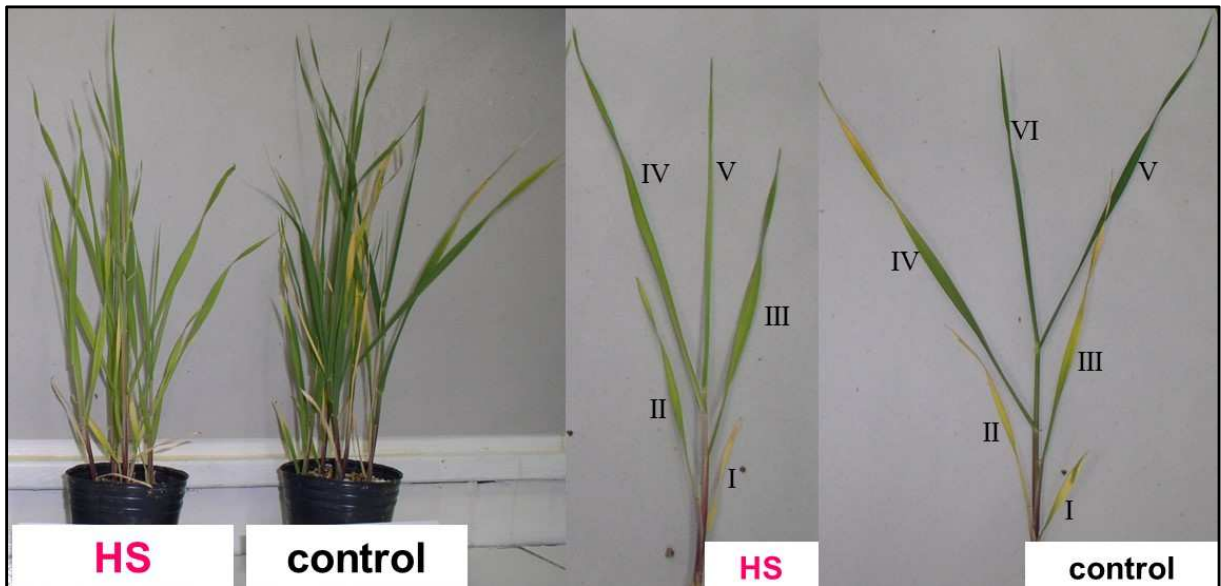


Figura 5.4. Fotografías tomadas previo al tratamiento con metil-jasmonato (MJ; 0d) de las macetas y plantas de los tratamientos de hambreado de S (HS) y control. El número de hoja es indicado en números romanos.

El índice de verdor de la tercera hoja de las plantas HS determinado a los 0d fue significativamente superior al de las plantas control y conforme avanzaron los días de incubación disminuyó en ambos tratamientos, manteniéndose a niveles mayores en las plantas HS (**Figura 5.5A**). Recién a los 3d, cuando las hojas control se encontraban completamente senescentes y no pudieron ser muestreadas, las plantas HS alcanzaron un índice de verdor similar al de las plantas control a los 2d (ANOVA de un factor entre control a los 2d y HS a los 3d: $S p = 0,25$; **Figura 5.5A**).

Por otra parte, la exportación de aminoácidos vía floema aumentó con el tiempo en ambos tratamientos, pero de forma más lenta en las plantas HS, las cuales recién a los 3d alcanzaron tasas de exudación similares a las registradas a los 2d en las plantas control (ANOVA de un factor entre control a los 2d y HS a los 3d: $S p = 0,93$; **Figura 5.5B**).

Al mismo tiempo, el contenido de proteínas disminuyó (**Figura 5.5C**) y el de aminoácidos aumentó (**Figura 5.5D**) en ambos tratamientos a medida que avanzaba el tiempo. Las plantas HS mostraron menor contenido de ambos metabolitos (**Figura 5.5C y D**) al inicio del ensayo, y a los 3d el contenido de proteínas alcanzó niveles inferiores a los obtenidos a los 2d en el control (**Figura 5.5C**; ANOVA de un factor entre control a los 2d y HS a los 3d: $S p < 0,01$). Además, si bien el contenido de aminoácidos en las plantas HS aumentó levemente entre los 2d y los 3d, dicho aumento no alcanzó los valores obtenidos en las plantas control a los 2d (**Figura 5.5D**; ANOVA de un factor entre control a los 2d y HS a los 3d: $S p < 0,01$).

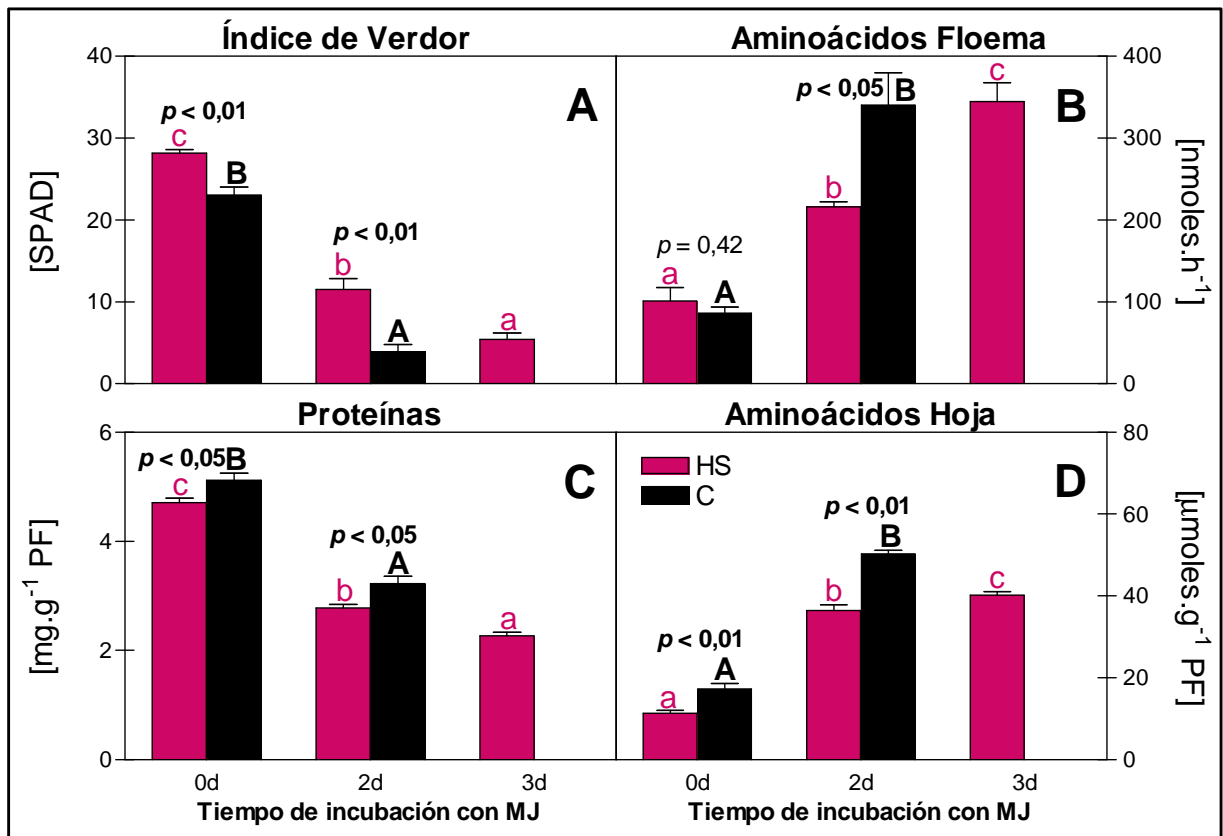


Figura 5.5. (A) Índice de verdor, contenido de (B) aminoácidos en el exudado floemático, (C) proteínas solubles y (D) aminoácidos libres en las hojas de las plantas hambreadas de S (HS, rosa) y control (C, negro). Los datos representan la media \pm el error estándar ($n=4$). Los valores de p indican los niveles de significancia del efecto de la disponibilidad de S para cada tiempo de incubación calculados mediante un ANOVA de un factor. Los valores que dieron significativos ($p \leq 0,05$) se resaltan en negrita. Las letras indican diferencias significativas con un $p < 0,05$ calculadas mediante un análisis LSD post hoc entre los distintos tiempos para cada tratamiento (letras minúsculas en rosa para el tratamiento HS y letras mayúsculas en negrita para el tratamiento control). d = días de incubación con metil-jasmonato (MJ).

5.2.3. Determinaciones moleculares

En general, en las plantas control las proteasas aumentaron su expresión entre los 0d y 2d (Figuras 5.6A, D – G), salvo por los genes de *HvSAG12* (Figura 5.6B) y *HvALEU* (Figura 5.6C) que permanecieron constantes.

Por otro lado, en las plantas HS todas las proteasas analizadas evidenciaron una inducción en el tiempo, aunque de manera variable para cada proteasa en particular (Figura 5.6A – G). De este modo, los niveles de expresión de *HvPAP* y *HvALEU* se mantuvieron constantes entre los 0d y 2d y aumentaron sólo a los 3d (Figuras 5.6A y C). Los niveles de expresión de *HvSAG12*, *HvLEGU*, *HvSUBT* y *HvCPMIII* aumentaron durante todo el ensayo (Figuras 5.6B, D – F), mientras que *HvLEU-AP* aumentó entre los 0d y 2d y luego se mantuvo constante (Figura 5.6G).

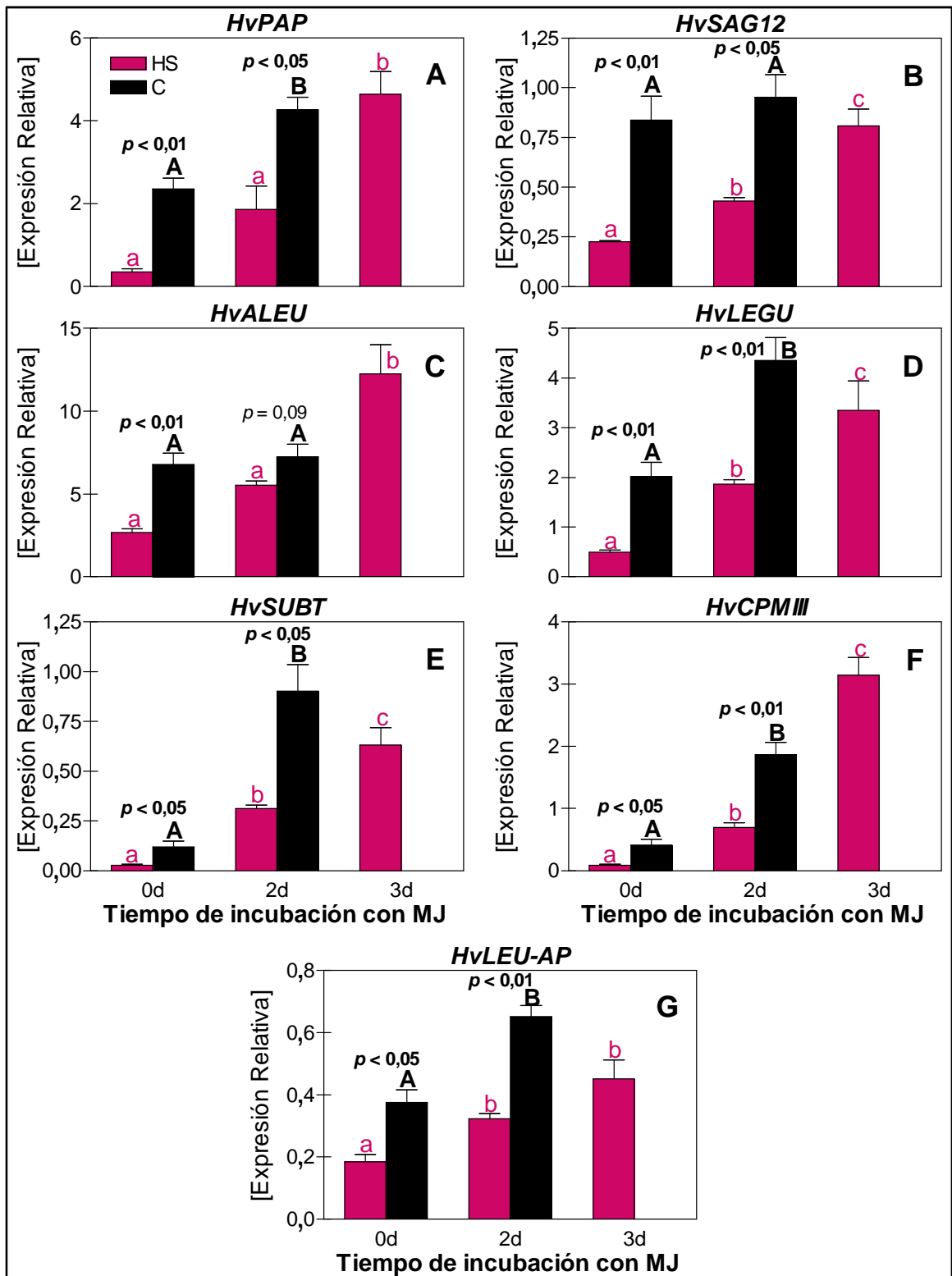


Figura 5.6. Expresión relativa determinada por qRT-PCR de los genes de (A) *HvPAP*, (B) *HvSAG12*, (C) *HvALEU*, (D) *HvLEGU*, (E) *HvSUBT*, (F) *HvCPMIII* y (G) *HvLEU-AP* en las hojas de plantas hambreadas de S (HS, rosa) y de plantas control (C, negro). Los datos representan la media \pm el error estándar ($n=3$). Los valores de p indican los niveles de significancia del efecto de la disponibilidad de S para cada tiempo de incubación calculados mediante un ANOVA de un factor. Los valores que dieron significativos ($p \leq 0,05$) se resaltan en negrita. Las letras indican diferencias significativas con un $p < 0,05$ calculadas mediante un análisis LSD post hoc entre los distintos tiempos para cada tratamiento (letras minúsculas en rosa para el tratamiento HS y letras mayúsculas en negrita para el tratamiento control). d = días de incubación con metil-jasmonato (MJ).

Al día 0, la expresión de todas las proteasas fue inferior en las plantas HS respecto al control (**Figura 5.6**). Al día 2, se registró un comportamiento similar, salvo para *HvALEU* cuyos niveles de expresión fueron similares al control (**Figura 5.6C**). Sin embargo, a los 3d *HvPAP*, *HvSAG12*, *HvLEGU* y *HvSUBT* alcanzaron niveles similares, *HvALEU* y *HvCPMIII* niveles superiores y *HvLEU-AP* niveles inferiores a los obtenidos en el control a los 2d (**Figura 5.6; Tabla 5.1**).

Gen	C a los 2d vs HS a los 3d
<i>HvPAP</i>	= ($p = 0,58$)
<i>HvSAG12</i>	= ($p = 0,36$)
<i>HvALEU</i>	↑ ($p = 0,05$)
<i>HvLEGU</i>	= ($p = 0,24$)
<i>HvSUBT</i>	= ($p = 0,16$)
<i>HvCPMIII</i>	↑ ($p < 0,05$)
<i>HvLEU-AP</i>	↓ ($p < 0,05$)

Tabla 5.1. Efecto de la deficiencia de S sobre la expresión de las proteasas en estudio. Se indican los valores de p obtenidos a partir de un ANOVA de un factor entre los valores de expresión de cada gen en las plantas control (C) a los 2d y las plantas hambreadas de S (HS) a los 3d (días de incubación con metil-jasmonato). Los valores de p que dieron significativos ($p \leq 0,05$) se resaltan en negrita. Flecha azul indica inducción, flecha roja indica represión, el signo igual indica que no hubo cambios significativos.

5.3. Ensayo de curva de S

Si bien no se registraron efectos de la deficiencia de S sobre la expresión de las proteasas analizadas en las hojas no senescentes del ensayo de hambreado (a los 11 DDH, **Figura 5.3**), no podemos descartar que la ausencia de efecto se deba al limitado tiempo de exposición al estrés nutricional. Por ello decidimos analizar el patrón de expresión de las proteasas en plantas sometidas a una baja disponibilidad de S desde su siembra a fin de evaluar el efecto de la deficiencia de S en el tejido no senescente.

5.3.1. Diseño experimental y toma de muestras

Para los análisis se utilizó la segunda hoja (tejido fuente; TF) de las plantas 0,1% (bajo S; BS) y 100% (control; C) del ensayo de curva de S del capítulo 4. El diseño experimental y toma de muestras se detallan en el ítem 4.1.1.

5.3.2. Determinaciones moleculares

La deficiencia de S generó un aumento de la expresión de *HvLEGU* (**Figura 5.7D**) y *HvSUBT* (**Figura 5.7E**), una disminución de la expresión de *HvPAP* (**Figura 5.7A**) y una tendencia a disminuir la expresión de *HvCND41* (**Figura 5.7G**) con respecto a las plantas bien provistas de S. Para el resto de los genes (*HvSAG12*, *HvALEU*, *HvCPMIII* y *HvLEU-AP*; **Figuras 5.7B, C, F y H**) no se observaron efectos significativos.

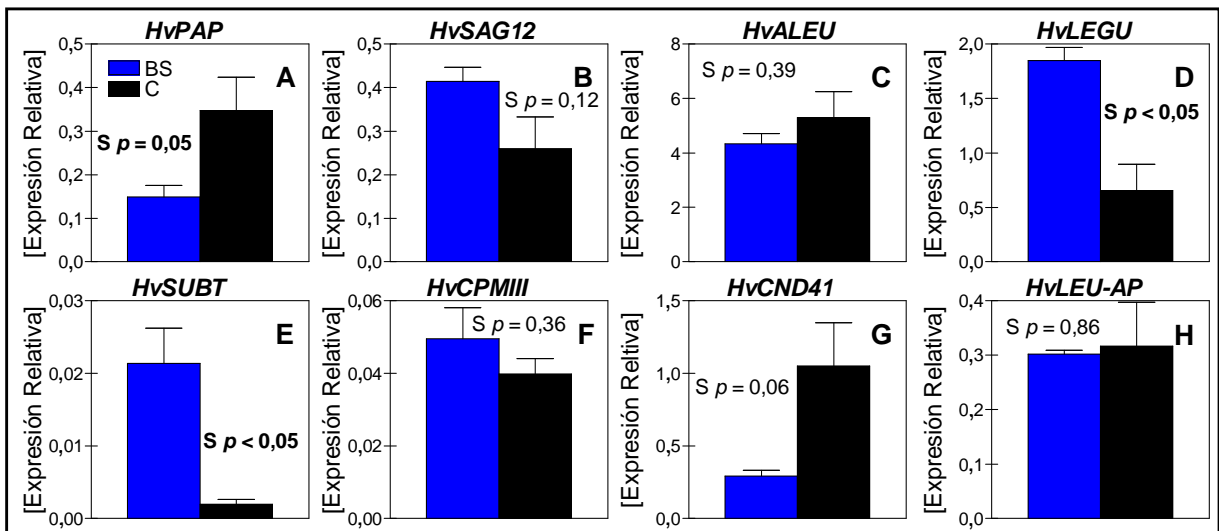


Figura 5.7. Expresión relativa determinada por qRT-PCR de los genes de (A) *HvPAP*, (B) *HvSAG12*, (C) *HvALEU*, (D) *HvLEGU*, (E) *HvSUBT*, (F) *HvCPMIII*, (G) *HvCND41* y (H) *HvLEU-AP* en el tejido fuente de plantas sometidas a baja disponibilidad de S (BS, azul) y plantas control (C, negro). Los datos representan la media \pm el error estándar ($n=3$). Los valores de p indican los niveles de significancia del efecto del S calculado mediante un ANOVA de un factor. Los valores que dieron significativos ($p \leq 0,05$) se resaltan en negrita.

5.4. Senescencia natural

Dado que en las plantas BS del punto anterior observamos una inducción de *HvLEGU* y *HvSUBT* respecto al control en las hojas no senescentes (Figura 5.7D y E) pero en las plantas HS del punto 5.1 se observó una represión de ambos genes a los 28 DDH, cuando las hojas estaban senescentes (Figura 5.3D y E), decidimos realizar un ensayo de deficiencia de S desde la siembra monitoreando la expresión de estos genes desde la completa expansión de la segunda hoja y hasta su completa senescencia, a fin de evaluar si las diferencias observadas en cuanto al efecto del S se debían al estado de desarrollo de las hojas. Además, se analizó la expresión de *HvSAG12* como control positivo del avance natural de la senescencia en ambos tratamientos.

5.4.1. Diseño experimental y toma de muestras

Las plantas fueron cultivadas en cámara de crecimiento aplicando desde la siembra $1,25 \mu\text{M}$ (bajo S; BS) ó $1,2 \text{ mM}$ (control; C) de S-SO_4^{-2} . A los 16, 28 y 35 DDS se tomaron muestras de la última hoja completamente expandida (segunda hoja), así como también de la planta entera.

5.4.2. Crecimiento y desarrollo

El PS de las plantas aumentó en ambos tratamientos con el tiempo, sin embargo, las plantas BS mostraron una menor biomasa aérea y número de hojas desde el inicio del ensayo y la diferencia en el crecimiento se fue incrementando con el tiempo (Figura 5.8A, C

y D). De este modo las plantas BS mostraron una disminución de PS del 39% a los 16 DDS, del 64% a los 28 DDS y del 72% a los 35 DDS respecto al control.

Asimismo, el índice de verdor disminuyó con el tiempo en ambos tratamientos, pero la caída fue mayor en las plantas control (**Figura 5.8B**). En estas últimas la caída del verdor fue del 82% entre los 16 y 28 DDS mientras que en las plantas BS la caída fue del 67% entre los 16 y 28 DDS y del 77% entre los 28 y 35 DDS. Si bien el índice de verdor de las plantas BS fue menor que el del control a los 16 DDS (**Figura 5.8B**), éstas mostraron menos signos de senescencia en todas sus hojas (**Figura 5.8D**). De hecho, a los 35 DDS la segunda hoja de las plantas control ya había sufrido abscisión.

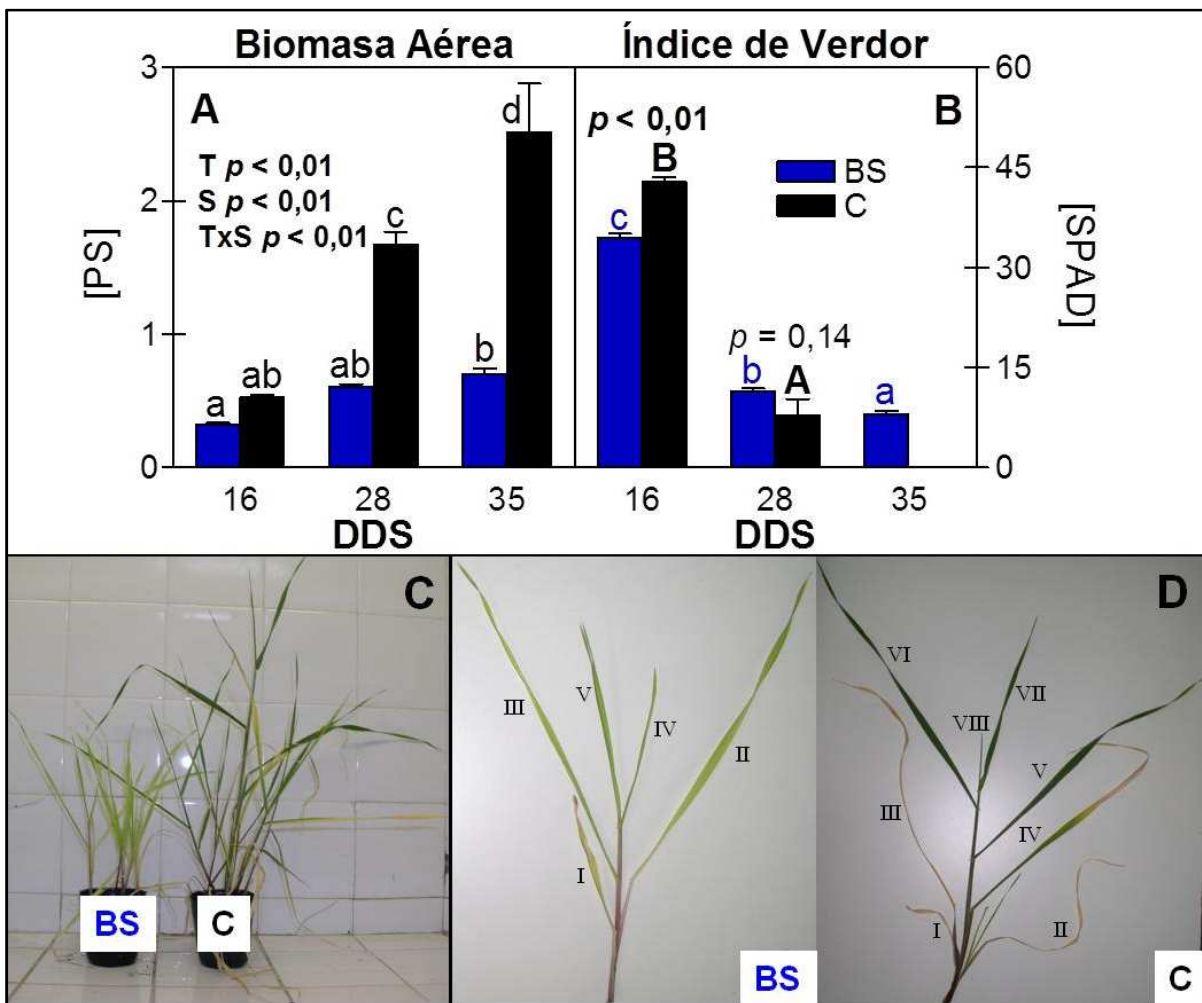


Figura 5.8. (A) Biomasa aérea, **(B)** índice de verdor de la hoja a lo largo del tiempo y fotografías tomadas a los 35 DDS de **(C)** las macetas y de **(D)** las plantas de los tratamientos de baja disponibilidad de S (BS, azul) y control (C, negro). El número de hojas es indicado en números romanos. Los datos representan la media \pm el error estándar ($n=4$). Los valores de p indican los niveles de significancia del efecto del Tiempo (T), de la disponibilidad de S y sus interacciones calculados mediante un ANOVA de dos factores para **(A)** y de la disponibilidad de S para cada tiempo calculados mediante un ANOVA de un factor para **(B)**. Los valores de p que dieron significativos ($p \leq 0,05$) se resaltan en negrita. Las letras indican diferencias significativas con un $p < 0,05$ calculadas mediante un análisis LSD post hoc entre los distintos tiempos para cada tratamiento (letras minúsculas en azul para el tratamiento BS y letras mayúsculas en negrita para el tratamiento control). DDS = días después de siembra; PS = peso seco.

5.4.3. Determinaciones moleculares

Al analizar la expresión de *HvSAG12* como control del avance de la senescencia, observamos un aumento en su nivel de expresión en ambos tratamientos, pero el aumento en el tiempo resultó ser significativamente menor en las plantas BS (1,6 veces) que en las control (35 veces; **Figura 5.9A**). No obstante, en el primer muestreo las plantas BS evidenciaron una mayor expresión de *HvSAG12* que las plantas control (**Figura 5.9A**).

La expresión de los genes *HvLEGU* (**Figura 5.9B**) y *HvSUBT* (**Figura 5.9C**) también aumentó en el tiempo en ambos tratamientos, aunque alcanzando valores inferiores en las plantas HS, tanto a los 28 como a los 35 DDS. Asimismo, a los 16 DDS la expresión de ambos genes fue superior en las plantas HS respecto de las control.

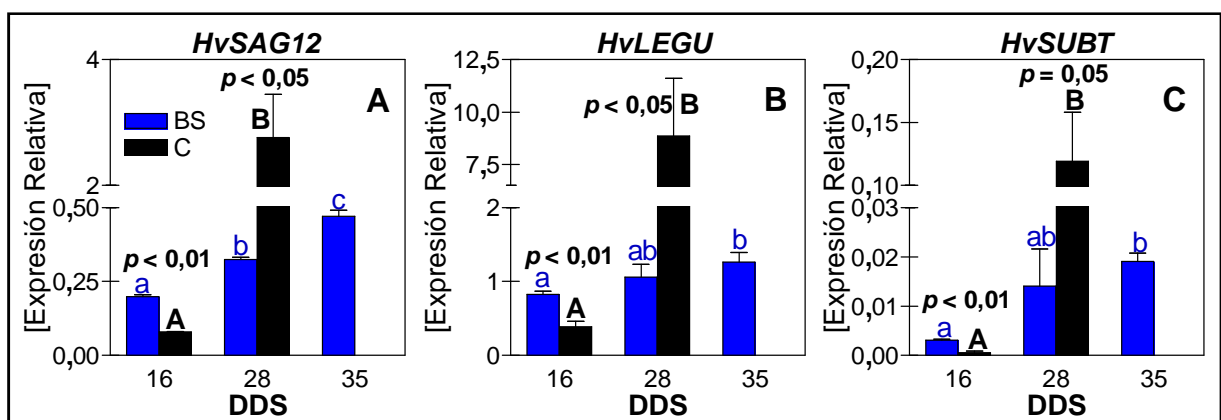


Figura 5.9. Expresión relativa determinada por qRT-PCR de (A) *HvSAG12*, (B) *HvLEGU* y (C) *HvSUBT* en las hojas de las plantas sometidas a baja disponibilidad de S (BS, azul) y plantas control (C, negro). Los datos representan la media \pm el error estándar ($n=3$). Los valores de p indican los niveles de significancia del efecto de la disponibilidad de S para cada tiempo calculados mediante un ANOVA de un factor. Los valores de p que dieron significativos ($p \leq 0,05$) se resaltan en negrita. Las letras indican diferencias significativas con un $p < 0,05$ calculadas mediante un análisis LSD post hoc entre los distintos tiempos para cada tratamiento (letras minúsculas en azul para el tratamiento BS y letras mayúsculas en negra para el tratamiento control). DDS = días después de siembra.

5.5. Discusión

Las proteasas analizadas en este trabajo fueron seleccionadas a partir de la bibliografía por estar asociadas positivamente al proceso de senescencia foliar (Roberts *et al.*, 2012). En las hojas control del ensayo de hambreado de S pudimos corroborar el aumento en la expresión génica de siete de las ocho proteasas analizadas (**Figuras 5.3A– F y H**) en las hojas senescentes (28 DDH) con respecto a la hoja expandida (11 DDH; tejido no senescente; **Figura 5.2**). Sin embargo, tanto en las plantas control como en las HS se observó una caída en la expresión de *HvCND41* en el tiempo (**Figura 5.3G**). Esta proteasa aspártica ha sido asociada positivamente a la senescencia en especies tales como *Arabidopsis* (Diaz *et al.*, 2008) y tabaco (Nakano *et al.*, 2003; Kato *et al.*, 2004; 2005). En cebada se reportó un aumento en la expresión de *HvCND41* durante la senescencia

inducida por acumulación de azúcares en las hojas (Parrott *et al.*, 2007). Sin embargo, en plantas de cebada senesciendo en forma natural durante el llenado de los granos se observó una disminución de la expresión de este gen en las hojas a lo largo del tiempo (Parrott *et al.*, 2007; Jukanti y Fischer, 2008), en coincidencia con los resultados presentados en esta tesis. Esto demuestra que *HvCND41* no se encuentra asociada al proceso de senescencia natural de las hojas en cebada, ya sea en estado reproductivo como vegetativo.

Excepto por *HvCND41* (**Figura 5.3G**), la deficiencia de S condujo a la represión del resto de las proteasas analizadas en comparación con el control a los 28 DDH (**Figura 5.3A – F y H**). Sin embargo, en presencia de un inductor de senescencia como el MJ, la expresión de la mayoría de estas proteasas alcanzó niveles similares al control, aunque retrasado en el tiempo (**Figura 5.6; Tabla 5.1**), lo que permitió la caída en el contenido de clorofila (**Figura 5.5A**) y proteínas (**Figura 5.5C**) y el aumento en el contenido de aminoácidos, tanto en floema (**Figura 5.5B**) como en hojas (**Figura 5.5D**), que se da durante el avance de la senescencia. Este resultado avala la hipótesis de que la deficiencia de S provoca un retraso de la senescencia (Dubousset *et al.*, 2009; Abdallah *et al.*, 2011) y confirma que la restricción en la disponibilidad de S no impide *per se* el inicio del programa de senescencia foliar, sino que ocasiona una demora en su progreso, la cual podría explicarse al menos en parte por una menor expresión de diferentes proteasas necesarias para el normal desarrollo de la senescencia. De este modo, aceptamos la **hipótesis 3a** que sostiene que *la deficiencia de S retrasa el normal desarrollo de la senescencia de las hojas, influyendo negativamente sobre la expresión de ciertas proteasas asociadas a este proceso, afectando así la dinámica de degradación de las proteínas y el metabolismo del N en general.*

A su vez, en este trabajo demostramos que la deficiencia de S no sólo afecta la expresión de las proteasas en estudio durante la senescencia sino también en el tejido no senescente, pero para que esto ocurra se requiere un tiempo mínimo de restricción de este nutriente. De este modo, se registró en las plantas BS una disminución en el nivel de expresión de *HvPAP* (**Figura 5.7A**) en el ensayo de curva de S y un aumento en los niveles de expresión de *HvLEGU* y *HvSUBT* tanto en el ensayo de curva como a los 16 DDS del ensayo de senescencia natural (**Figuras 5.7D y E y 5.9B y C**). Estos resultados junto con los menores niveles de expresión de las proteasas debido a la deficiencia de S en el tejido senescente (**Figuras 5.3, 5.6 y 5.9**) demuestran que la escasez del S no ejerce el mismo efecto sobre todas las proteasas analizadas, aún dentro de un mismo grupo catalítico. A su vez, sugieren mecanismos diferenciales de regulación para cada proteasa según el estadio de desarrollo de los tejidos y el tiempo de exposición al estrés nutricional, posiblemente

asociados a distintas funciones biológicas a lo largo de todo el ciclo de vida de la planta (Schaller, 2004; Van der Hoor, 2008).

En cuanto a *HvSAG12*, los reportes existentes indican que este gen es específicamente activado durante las últimas etapas de la senescencia vegetal, momento en el cual alcanza altos niveles de expresión (Gan y Amasino, 1997; Noh y Amasino, 1999; Gregersen *et al.*, 2013; Avice y Etienne, 2014) e incluso en algunos casos su expresión no es detectable en los tejidos no senescentes (Lohman *et al.*, 1994; Noh y Amasino, 1999). Sin embargo, en este capítulo observamos niveles de expresión detectables de *HvSAG12* tanto en el tejido no senescente de plantas bien provistas de S como deficientes (**Figuras 5.1B, 5.3B, 5.7B y 5.9A**) e, interesantemente, observamos la inducción de dicho gen frente a una deficiencia de S (**Figura 5.9A**). Estos resultados podrían indicar que *HvSAG12* posee funciones diferentes además de aquellas asociadas a la hidrólisis masiva durante la senescencia, función ampliamente atribuida a esta proteasa (Lohman *et al.*, 1994; Weaver *et al.*, 1998; Avice y Etienne, 2014).

Asimismo, se observó una inducción de la expresión de *HvLEGU* y *HvSUBT*, al igual que lo observado con *HvSAG12*, en el tejido no senescente de las plantas deficientes de S respecto al control (**Figuras 5.9 y 5.7D y E**). Esto podría relacionarse con funciones de “remoción” de proteínas anormales o no funcionales (Grudkowska y Zagdańska, 2004; Schaller, 2004). Esta hipótesis radica en el hecho que el S posee un rol clave en la formación y mantenimiento de las estructuras y funcionalidad proteica (Haneklaus *et al.*, 2007), con lo cual es factible suponer que deficiencias de S darán como resultado proteínas anormales. Sin embargo, tampoco se puede descartar que las proteasas inducidas estén involucradas en el reciclado de proteínas, asociado con la necesidad de obtener aminoácidos azufrados libres dada su escasez en las plantas deficientes de S (Hesse *et al.*, 2004; Nikiforova *et al.*, 2004).

HvLEGU (legumaína) codifica para una enzima de procesamiento vacuolar (VPE, por sus siglas en inglés “*Vacuolar processing enzyme*”) cuyas funciones no sólo están vinculadas con la maduración o activación de ciertas proteínas vacuolares asociadas a la muerte celular programada sino también con la defensa de la planta ante respuestas de hipersensibilidad (Hara-Nishimura *et al.*, 1993; Hara-Nishimura *et al.*, 2005; Sanmartín *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010). Sin embargo, para *HvALEU*, perteneciente también al grupo de las enzimas vacuolares, no se observó una inducción debido a la deficiencia de S (**Figura 5.7C**), indicando funciones diferenciales para ambas proteasas. Asimismo, las subtilisinas o subtilasas (SUBT) no sólo contribuyen con las necesidades de degradación masiva de proteínas durante la senescencia, sino que también están involucradas en funciones regulatorias y de señalización a través del procesamiento de proteínas precursoras, regulando así el crecimiento y desarrollo de la planta (Schaller, 2004;

Rautengarten *et al.*, 2005; Vartapetian *et al.*, 2011). De todos modos, para determinar las funciones específicas de cada una de las proteasas analizadas bajo las condiciones evaluadas, serían necesarios otros estudios que exceden el alcance de esta tesis.

Es importante remarcar que, si bien la caída en el contenido de proteínas y el aumento en el de aminoácidos en el TF durante la senescencia ocurrió en ambos tratamientos del ensayo de senescencia inducida (**Figura 5.5C y D**), las plantas HS acumularon menos aminoácidos libres a los 3d que las plantas control a los 2d (**Figura 5.5D**), coincidiendo con lo observado en el TF de las plantas HS del ensayo de hambreado de S del capítulo anterior (**Figura 4.8B**). Este resultado en conjunto con el hecho de que la tasa de exportación de aminoácidos sí se equiparó en ambos tratamientos (**Figura 5.5B**) sugiere una priorización de este proceso a la acumulación de aminoácidos en el TF de plantas de cebada, como ya ha sido reportado en plantas de trigo (Caputo y Barneix, 1997).

Con los resultados obtenidos en este capítulo podemos confirmar que el retraso de la senescencia foliar causado por la deficiencia de S es acompañado por un retraso en la inducción de las proteasas aquí estudiadas, pertenecientes a tres grupos catalíticos diferentes (cisteín proteasas: *HvPAP*, *HvSAG12*, *HvALEU* y *HvLEGU*; serín-proteasas: *HvSUBT* y *HvCPMIII*; metalo-proteasa: *HvLEU-AP*). Sin embargo, el retraso en la inducción de dichas proteasas no sería el factor desencadenante del retraso en la senescencia, ya que tanto la expresión de las proteasas como el progreso de la senescencia pudieron ser inducidos por un estímulo hormonal (MJ) aún en ausencia de S. Además, encontramos que la deficiencia de S no ejerce el mismo efecto sobre todas las proteasas y que dicho efecto, a su vez, varía dependiendo del estado de desarrollo del tejido. Los resultados obtenidos aumentan el volumen de conocimiento sobre la regulación de la expresión de las proteasas analizadas, de las cuales aún falta mucho por estudiar para comprender mejor sus funciones en el metabolismo celular.

Capítulo 6

Resultados y Discusión

“La deficiencia de S inhibe la expresión de los genes potencialmente involucrados en la removilización de aminoácidos durante la floración”

Capítulo 6

La deficiencia de S inhibe la expresión de los genes potencialmente involucrados en la removilización de aminoácidos durante la floración

A fin de evaluar los efectos del hambre de S durante la etapa de llenado de los granos sobre el patrón de expresión de las isoformas citosólicas de la GS (*HvGS1_1* y *HvGS1_2*) y de los dos TAA (*HvAAP6* y *HvAAP7*) potencialmente relacionados con la removilización de aminoácidos vía floema (capítulo 4), llevamos a cabo un ensayo en invernáculo hasta madurez fisiológica. Al mismo tiempo estudiamos la expresión de las proteasas *HvSAG12* y *HvSUBT*, pertenecientes a los dos grupos catalíticos mayormente involucrados con el proceso de senescencia, las cuales fueron reguladas diferencialmente por el S en función del tejido analizado (**Figura 5.9**). Además, analizamos diversos parámetros relacionados con el metabolismo del N desde anthesis hasta madurez, para reafirmar lo encontrado en plantas jóvenes sobre la importancia del S en la asimilación y redistribución del N.

6.1. Diseño experimental y toma de muestras

El experimento se organizó con un diseño de bloques completamente aleatorizados. Desde el comienzo del ensayo todas las plantas fueron cultivadas con una buena disponibilidad de S (1,2 mM de S-SO₄⁻²) hasta la aparición de los primeros macollos (a los 51 DDS), momento en el cual todas las macetas fueron lavadas con H₂O destilada para eliminar el S remanente. A partir de ese momento las plantas fueron divididas en dos grupos: plantas control (C; suplementadas con 1,2 mM de S-SO₄⁻²) y plantas hambreadas de S (HS; suplementadas con 12 μM de S-SO₄⁻² hasta los 98 DDS y con 1,25 μM de S-SO₄⁻² a partir de esa fecha en adelante). A los 106, 120, 129 y 135 DDS (0, 14, 23 y 29 DDA) se tomaron muestras de las últimas dos hojas expandidas por debajo de la hoja bandera (H¹+H² = tejido fuente, TF; **Figura 6.5A**), sus exudados floemáticos y de los granos (tejido destino, TD). A partir de otro grupo de plantas, se tomaron muestras de toda la parte aérea en los mismos períodos y además a madurez (175 DDS = 69 DDA).

6.2. Crecimiento y desarrollo

En ambos tratamientos la biomasa aérea de las plantas se incrementó hasta los 135 DDS para luego caer levemente a los 175 DDS (**Figura 6.1A**). Sin embargo, las plantas HS mostraron menor biomasa respecto de las plantas control (**Figura 6.1A**). A su vez, a madurez fisiológica (175 DDS) el PS de los granos no se vio afectado por el tratamiento, pero sí lo hizo el PS del rastrojo que fue menor en las plantas HS (**Figura 6.1B**). El IC no varió entre tratamientos (**Figura 6.1C**).

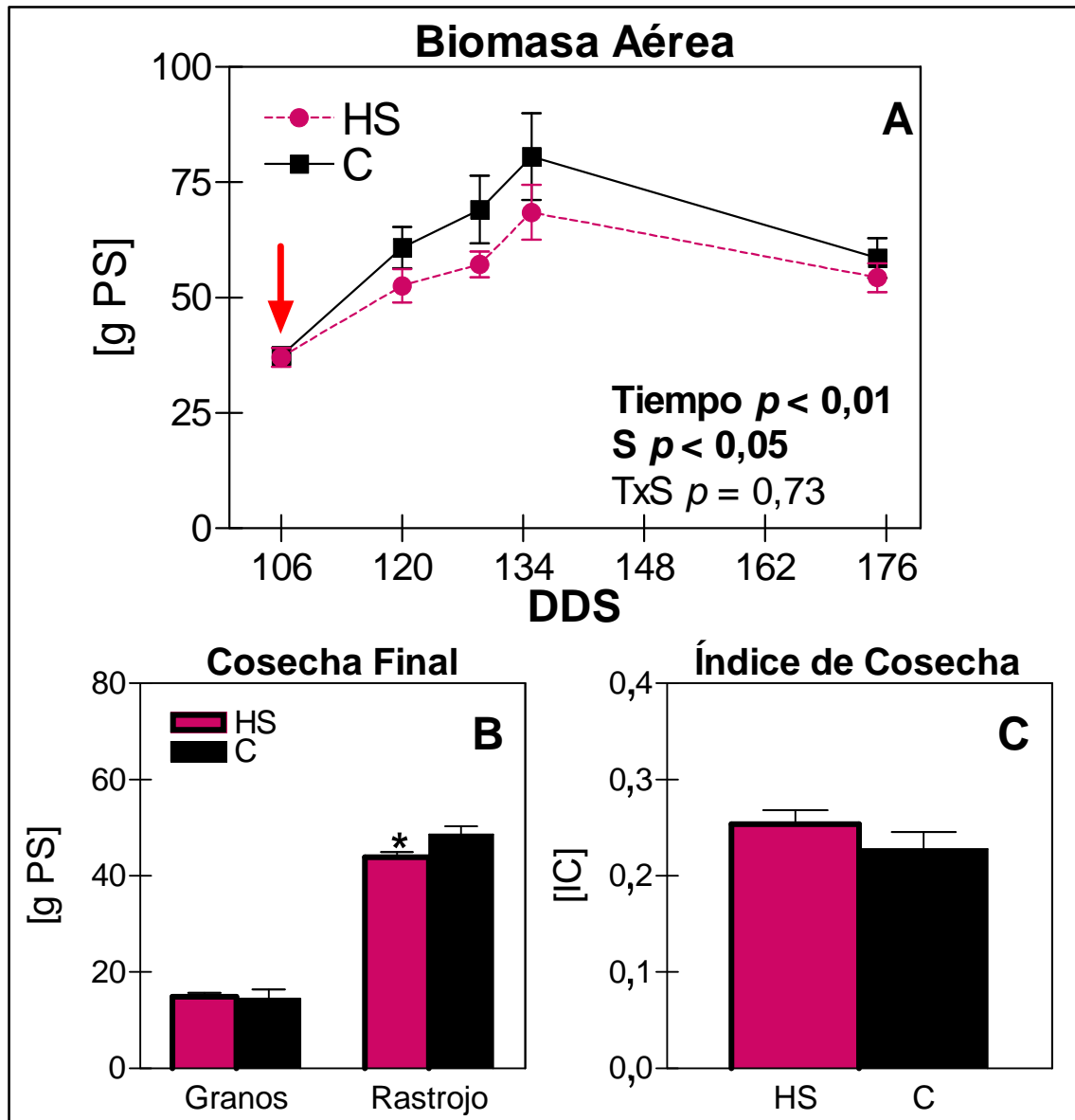


Figura 6.1. (A) Biomasa aérea a lo largo del llenado de los granos. (B) PS de granos y rastrojo e (C) IC a los 175 DDS de las plantas hambreadas de S (HS; rosa, línea punteada) y control (C; negro, línea continua). Los datos representan la media \pm el error estándar ($n=4$). Los valores de p indican los niveles de significancia del efecto del Tiempo (T), S y sus interacciones calculados mediante un ANOVA de dos factores. Los valores que dieron significativos ($p \leq 0,05$) se resaltan en negrita. El asterisco (*) indica diferencias significativas del efecto del S calculado mediante un ANOVA de un factor con $p \leq 0,05$. La flecha roja señala el comienzo de la antesis para ambos tratamientos. DDS = días después de siembra; IC = índice de cosecha; PS = peso seco.

A madurez fisiológica (175 DDS), las plantas control mostraron igual contenido de S tanto en granos como en rastrojo. Por su parte, las plantas HS mostraron mayor contenido de S en los granos respecto al rastrojo y en ambos casos fue significativamente inferior a los valores obtenidos en el control (**Figura 6.2A**).

Tanto en las plantas control como en las HS el contenido de N fue superior en granos respecto al rastrojo, sin encontrarse diferencias significativas entre ambos tratamientos (**Figura 6.2B**).

El ICS fue significativamente mayor en las plantas HS respecto a las control mientras que el ICN no se vio alterado por el tratamiento (**Figura 6.2C**).

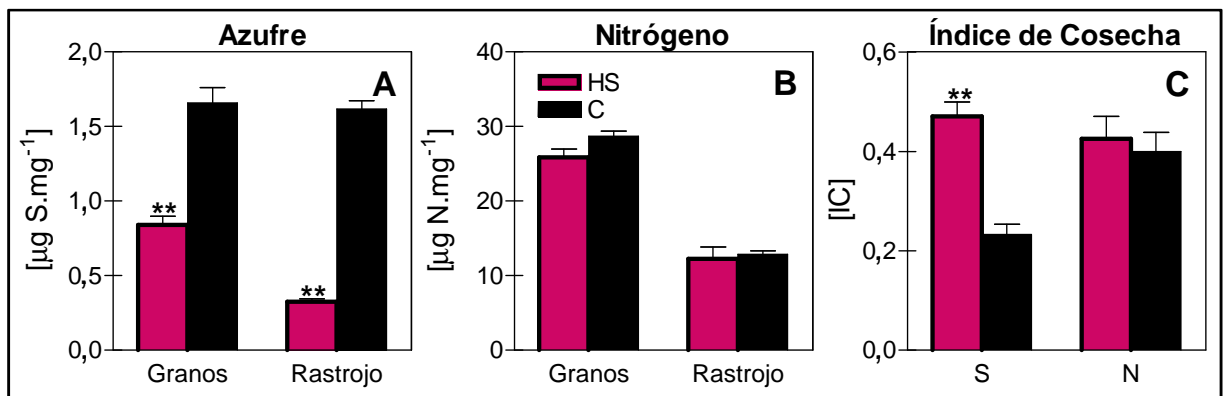


Figura 6.2. Contenido de (A) S y de (B) N en los granos y el rastrojo e (C) índice de cosecha de S y de N a madurez (175 DDS) de las plantas hambreadas de S (HS; rosa) y control (C; negro). Los datos representan la media \pm el error estándar ($n=4$). Los asteriscos indican diferencias significativas del efecto del S calculado mediante un ANOVA de un factor con $p < 0,01$ (**).

A los 106 DDS, momento en que se produjo la antesis, se observó un alto porcentaje de espigas en el estadio 4.9, sin diferencias significativas entre tratamientos (**Figura 6.3A**). Conforme avanzaba el llenado de los granos las plantas control alcanzaron niveles más avanzados de espigazón con respecto a las plantas HS, manteniéndose los mayores porcentajes de espigas en los estadios 5.3 y 5.5 para el tratamiento control e inferiores a los 5.3 para las HS (**Figuras 6.3B-D**).

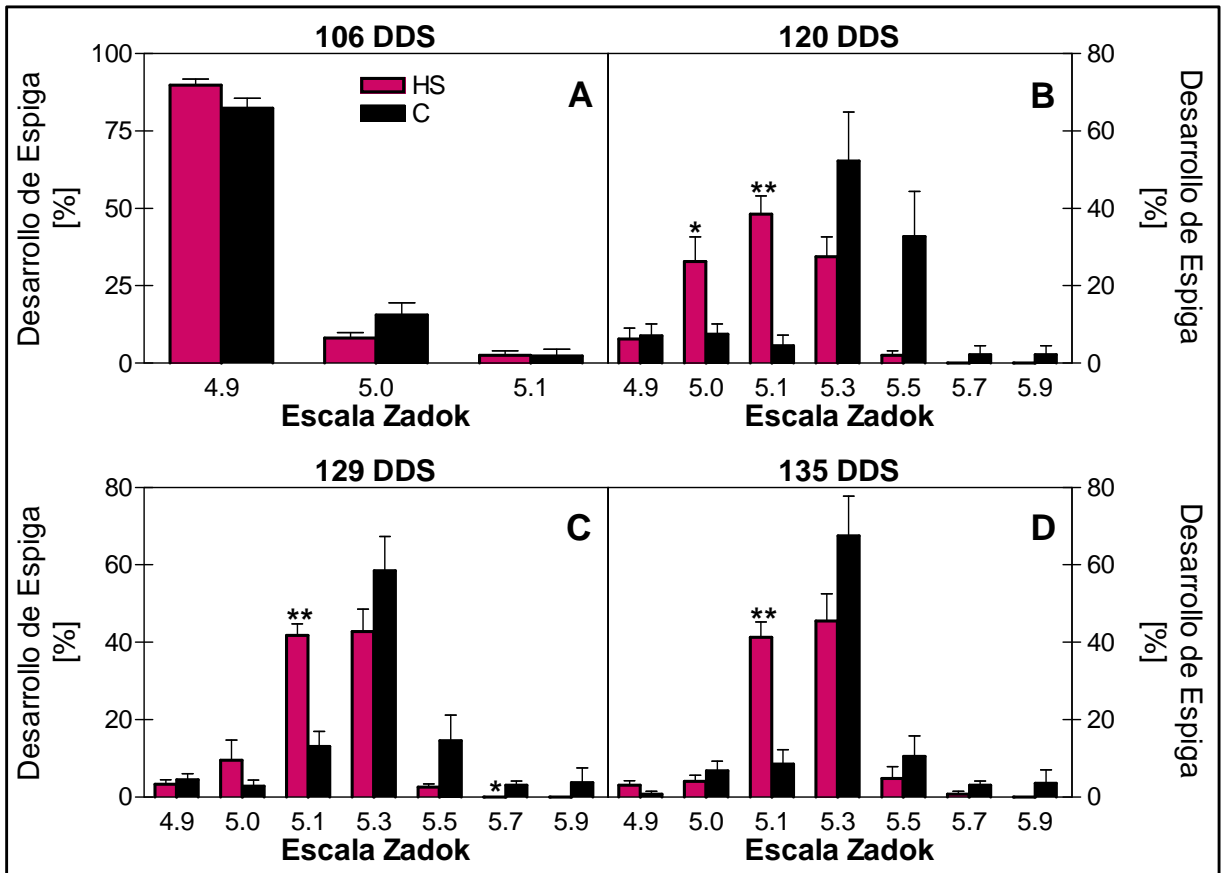


Figura 6.3. Porcentaje de desarrollo de las espigas (%) a los (A) 106, (B) 120, (C) 129 y (D) 135 DDS, según la escala Zadoks, de las plantas hambreadas de S (HS; rosa) y control (C; negro). Los datos representan la media \pm el error estándar ($n=4$). El 100% equivale al total de espigas analizadas por cada unidad de muestreo y tratamiento. Los asteriscos indican diferencias significativas con un $p < 0,01$ (**) y $p \leq 0,05$ (*) calculados mediante un ANOVA de un factor para cada estadio. DDS = días después de siembra.

En las plantas control el índice de verdor de la H^{-1} disminuyó a partir de los 120 DDS mientras que el de la H^{-2} lo hizo desde los 106 DDS, siendo menos pronunciada la caída en la H^{-1} (Figura 6.4A y B). En las plantas HS la caída a lo largo del tiempo fue menos pronunciada que la del control en ambos tipos de hojas. A su vez, estas plantas mostraron un menor índice de verdor en la H^{-1} a los 106 y 120 DDS, pero mayor a los 135 DDS, mientras que en la H^{-2} fue mayor a los 129 y 135 DDS, respecto al control (Figura 6.4B).

En el último muestreo se observó que las plantas HS no sólo poseían un menor tamaño con respecto a las plantas control, sino que además mostraron en forma global menores signos de senescencia (Figura 6.4C), que se tradujo en los mayores índices de verdor de las plantas HS a los 135 DDS mencionados en el párrafo anterior (Figura 6.4B).

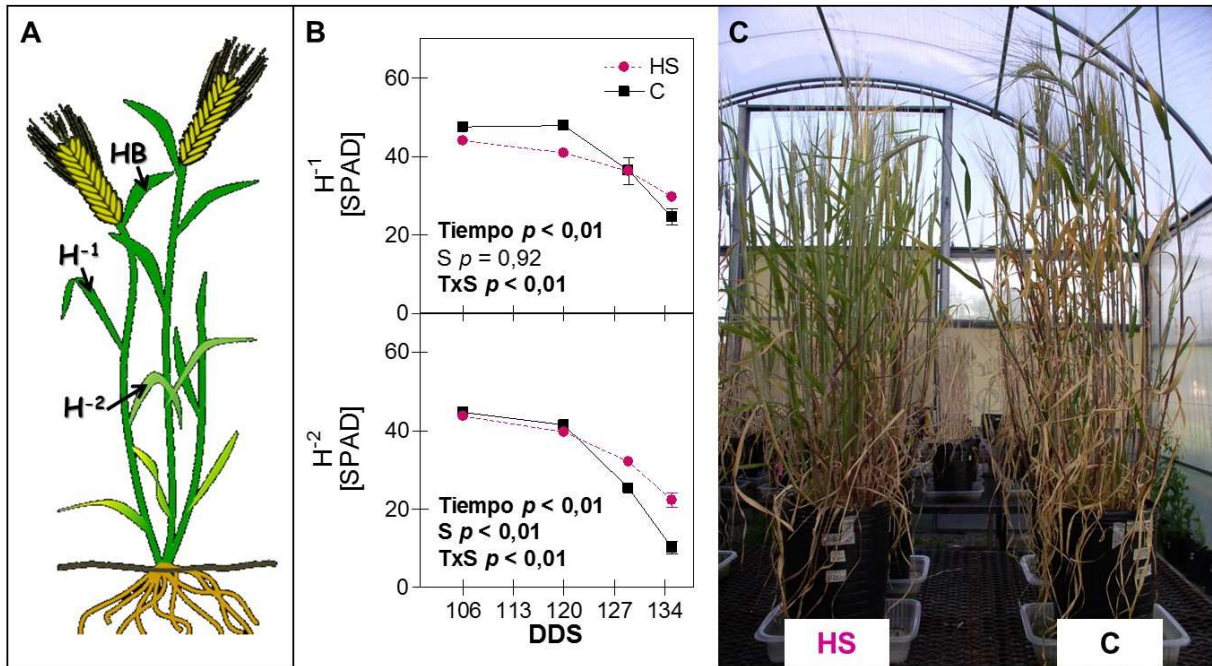


Figura 6.4. (A) Esquema de la numeración de las hojas del tallo principal de la planta de cebada. (B) Índice de verdor de la hoja H⁻¹ (más joven) y de la hoja H⁻² (más vieja) a lo largo del tiempo de las plantas hambreadas de S (HS; rosa, línea punteada) y control (C; negro, línea continua). (C) Fotografía de las plantas HS y C tomada a los 135 DDS. Los datos representan la media ± el error estándar (n=4). Los valores de *p* indican los niveles de significancia del efecto del Tiempo (T), S y sus interacciones calculados mediante un ANOVA de dos factores. Los valores que dieron significativos ($p \leq 0,05$) se resaltan en negrita. DDS = días después de siembra.

6.3. Determinaciones bioquímicas

En las hojas (tejido fuente, TF) el contenido de proteínas solubles disminuyó en función del tiempo tanto en las plantas control como en las HS, ambas mostrando un patrón de caída similar (**Figura 6.5A**). Sin embargo, dicho contenido fue inferior en las plantas HS con respecto al control durante todo el ensayo, salvo a los 135 DDS donde se equiparó en ambos tratamientos (ANOVA de un factor a los 135 DDS S $p = 0,30$).

El contenido de aminoácidos en las plantas control se mantuvo constante a lo largo del tiempo mientras que en las plantas HS cayó a partir de los 120 DDS, evidenciando un menor contenido tanto a los 129 como a los 135 DDS respecto al control (**Figura 6.5B**).

De igual modo, el contenido de nitrato en las plantas control se mantuvo constante durante todo el ensayo, pero en las plantas HS se registraron mayores contenidos a los 120 y 135 DDS respecto al control (**Figura 6.5C**).

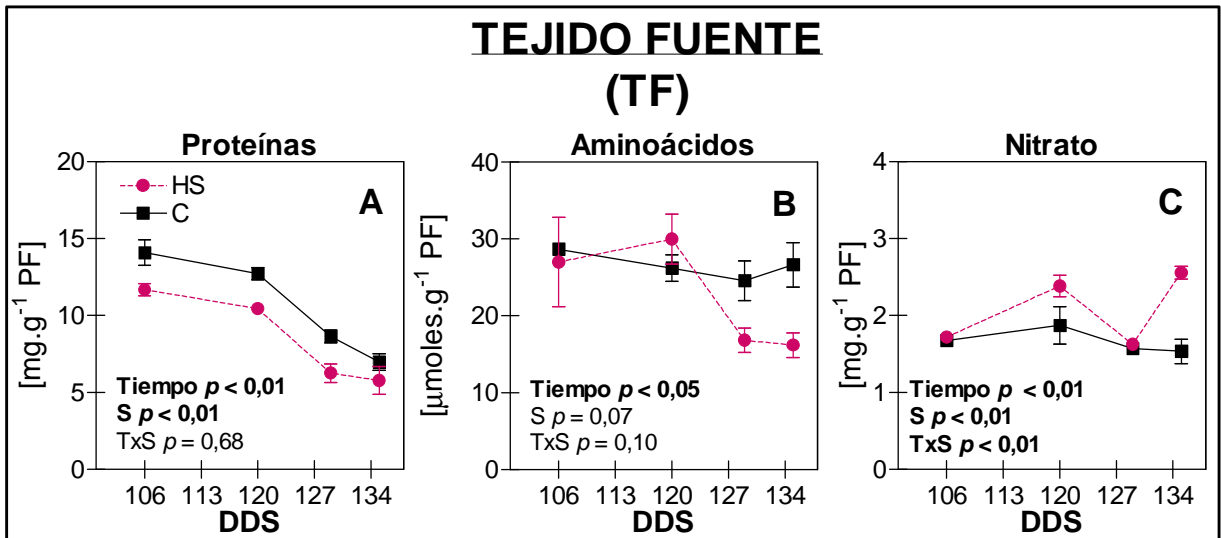


Figura 6.5. Contenido de (A) proteínas solubles, (B) aminoácidos libres y (C) nitrato en el tejido fuente de las plantas hambreadas de S (HS; rosa, línea punteada) y de las plantas control (C; negro, línea continua). Los datos representan la media ± el error estándar (n=4). Los valores de *p* indican los niveles de significancia del efecto del Tiempo (T), S y sus interacciones calculados mediante un ANOVA de dos factores. Los valores que dieron significativos ($p \leq 0,05$) se resaltan en negrita. DDS = días después de siembra; PF = peso fresco.

La exportación de aminoácidos desde el TF de las plantas control aumentó gradualmente a lo largo del llenado de los granos, mostrando a los 135 DDS el mayor nivel de exportación de todos los muestreos (**Figura 6.6**). En las plantas HS la exportación fue constante y con valores inferiores al de las plantas control a lo largo de todo el ensayo, salvo en el primer muestreo en donde ambos tratamientos no tuvieron diferencias significativas (ANOVA de un factor a los 106 DDS S $p = 0,22$; **Figura 6.6**).

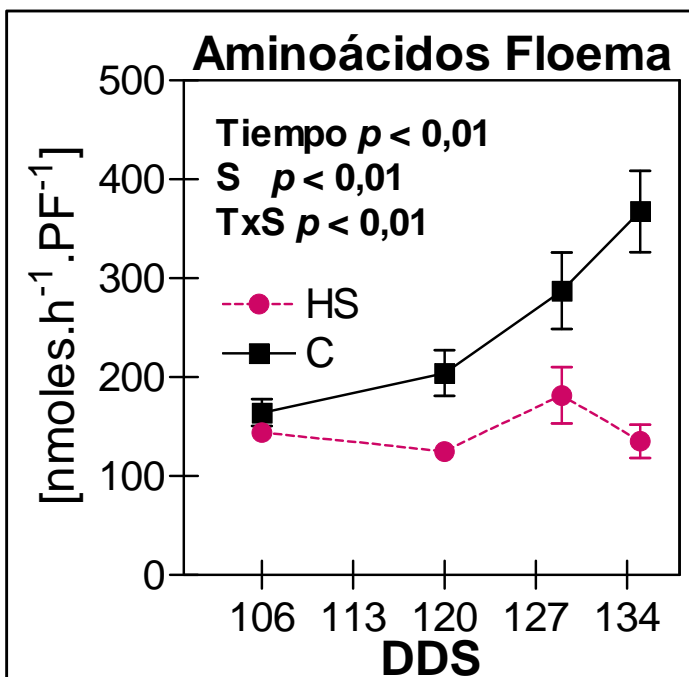


Figura 6.6. Contenido de aminoácidos en el exudado floemático del tejido fuente de las plantas hambreadas de S (HS; rosa, línea punteada) y de las plantas control (C; negro, línea continua). Los datos representan la media ± el error estándar (n=4). Los valores de *p* indican los niveles de significancia del efecto del Tiempo (T), S y sus interacciones calculados mediante un ANOVA de dos factores. Los valores que dieron significativos ($p \leq 0,05$) se resaltan en negrita. DDS = días después de siembra; PF = peso fresco.

En los granos (tejido destino, TD) el contenido de proteínas solubles de las plantas control aumentó entre los 106 y 120 DDS para luego mantenerse constante durante el resto del llenado de los granos (**Figura 6.7A**). En cambio, en las plantas HS dicho contenido se mantuvo constante durante todo el ensayo y con valores inferiores al control salvo en el primer muestreo (ANOVA de un factor a los 106 DDS $S p = 0,84$; **Figura 6.7A**).

El contenido de aminoácidos aumentó entre los 106 y 120 DDS para luego mantenerse constante en ambos tratamientos, aunque este aumento fue más marcado en las plantas control (**Figura 6.7B**). A su vez, en las plantas HS el contenido de aminoácidos fue significativamente superior al de las plantas control sólo a los 106 DDS (ANOVA de un factor a los 106 DDS $S p < 0,05$; **Figura 6.7B**).

El contenido de nitrato disminuyó a partir de los 120 DDS en las plantas control mientras que en las HS aumentó entre los 106 y 120 DDS para luego decaer a niveles similares a los del primer muestreo (**Figura 6.7C**). Al mismo tiempo, el contenido de nitrato fue inferior a los 106 DDS y superior a los 120 DDS en las plantas HS (ANOVA de un factor a los 106 y 120 DDS $S p < 0,05$; **Figura 6.7C**).

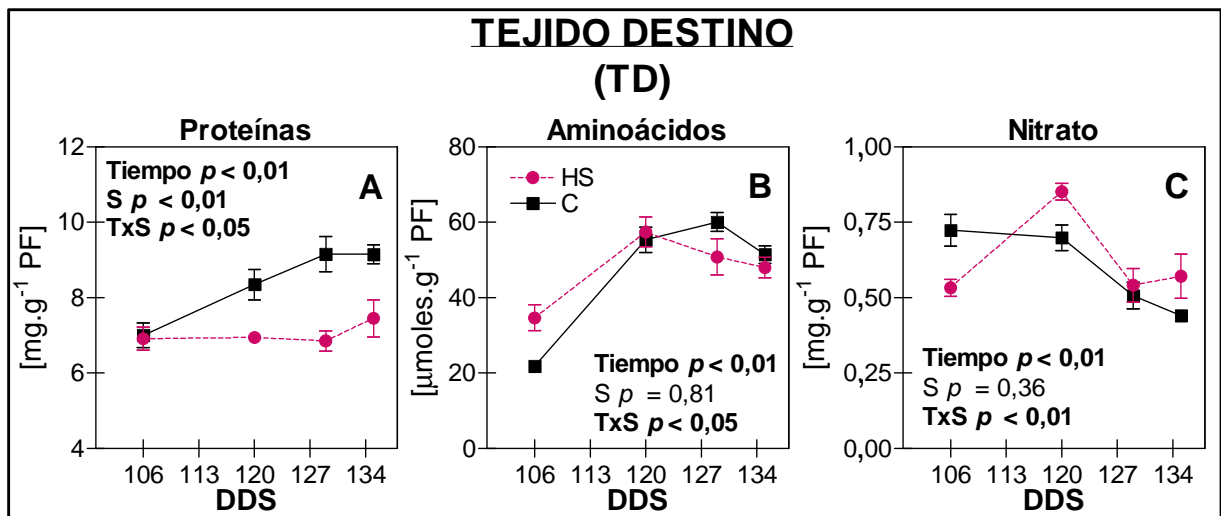


Figura 6.7. Contenido de (A) proteínas solubles, (B) aminoácidos libres y (C) nitrato en el tejido destino de las plantas hambreadas de S (HS; rosa, línea punteada) y de las plantas control (C; negro, línea continua). Los datos representan la media \pm el error estándar ($n=4$). Los valores de p indican los niveles de significancia del efecto del Tiempo (T), S y sus interacciones calculados mediante un ANOVA de dos factores. Los valores que dieron significativos ($p \leq 0,05$) se resaltan en negrita. DDS = días después de siembra; PF = peso fresco.

6.4. Determinaciones moleculares

En el TF de las plantas control la expresión de *HvGS1_1* (**Figura 6.8A**) y *HvGS1_2* (**Figura 6.8B**) se mantuvo constante hasta los 135 DDS, momento en el cual ambos genes se indujeron de manera abrupta. En las plantas HS, la expresión de *HvGS1_1* fue relativamente constante a lo largo de todo el ensayo, sin observarse el pico de inducción obtenido en las plantas control a los 135 DDS (**Figura 6.8A**). La expresión de *HvGS1_2* fue marcadamente superior a los 106 DDS en las plantas HS, cayendo abruptamente a los 120 DDS para luego mantenerse constante (**Figura 6.8B**). Nuevamente tampoco se registró el pico de inducción de *HvGS1_2* obtenido en las plantas control a los 135 DDS (**Figura 6.8B**).

La expresión de *HvAAP6* cayó entre los 106 y 120 DDS en ambos tratamientos, sin registrarse efectos a causa del hambreado de S (**Figura 6.8C**). Sin embargo, a partir de los 129 DDS su expresión aumentó en las plantas control mientras que disminuyó en las plantas HS, generando en estas últimas niveles significativamente inferiores a los 135 DDS (**Figura 6.8C**). Por otra parte, en las plantas control *HvAAP7* tuvo dos picos de inducción a los 120 y 135 DDS (**Figura 6.8D**). En las plantas HS *HvAAP7* se indujo entre los 106 y 120 DDS para luego mantenerse constante y sin registrarse los picos de inducción observados a los 120 y 135 DDS en las plantas control (**Figura 6.8D**).

Tanto la expresión de *HvSAG12* como la de *HvSUBT* aumentaron gradualmente hasta las 129 DDS para luego inducirse significativamente a los 135 DDS en las plantas control (**Figura 6.8E y F**). En el caso de las plantas HS, ambos genes aumentaron gradualmente a lo largo del tiempo, aunque el aumento en *HvSAG12* no fue suficiente para alcanzar los niveles de expresión obtenidos a los 135 DDS en las plantas control (**Figura 6.8E**). En cambio, tanto el patrón como los niveles de expresión de *HvSUBT* obtenidos en las plantas HS fueron similares a los obtenidos en las plantas control, salvo a los 129 DDS en donde su expresión fue superior en las plantas HS (ANOVA de un factor a los 129 DDS $p < 0,05$; **Figura 6.8F**).

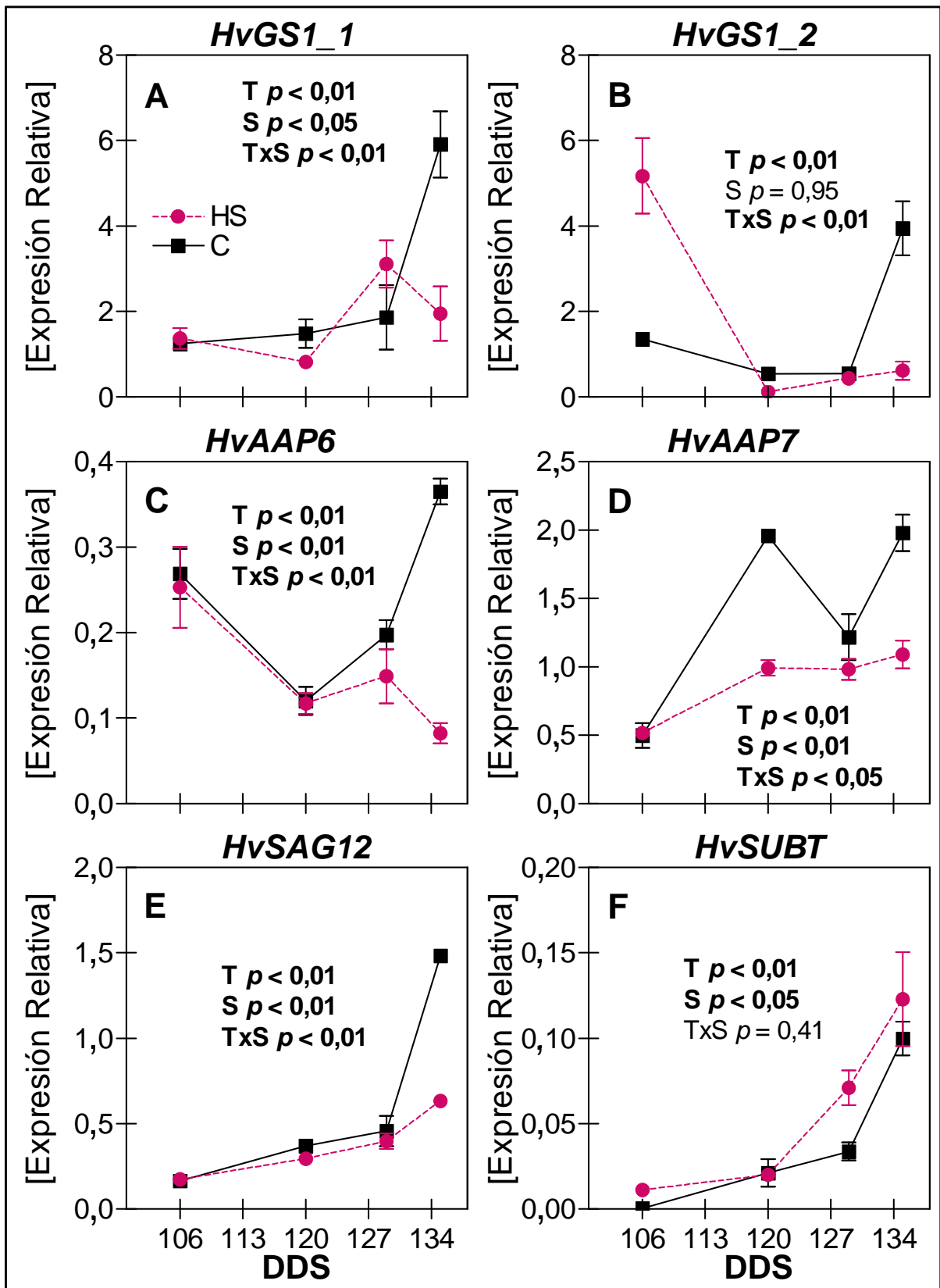


Figura 6.8. Expresión relativa determinada por qRT-PCR de (A) *HvGS1_1*, (B) *HvGS1_2*, (C) *HvAAP6*, (D) *HvAAP7*, (E) *HvSAG12* y (F) *HvSUBT* en el tejido fuente de las plantas hambreadas de S (HS; rosa, línea punteada) y de las plantas control (C; negro, línea continua). Los datos representan la media \pm el error estándar ($n=3$). Los valores de p indican los niveles de significancia del efecto del Tiempo (T), S y sus interacciones calculados mediante un ANOVA de dos factores. Los valores que dieron significativos ($p \leq 0,05$) se resaltan en negra. DDS = días después de siembra.

Finalmente, para corroborar las interacciones que observamos en el capítulo 4 entre la expresión de los genes de *HvGS* y *HvTAA* y la tasa de exportación de aminoácidos a través del floema, así como también poder revelar posibles interacciones con la expresión de las dos proteasas aquí analizadas, realizamos un análisis de correlación de Pearson con los resultados de este ensayo. De este modo encontramos una fuerte correlación entre la tasa de exportación de aminoácidos y la expresión de los genes de *HvGS1_1*, *HvAAP6*, *HvAAP7* y *HvSAG12* (**Tabla 6.1**).

Tabla 6.1. Valores obtenidos a partir de la correlación de Pearson entre la tasa de exportación de aminoácidos vía floema (AA Floema) y la expresión de los genes de *HvGS1*, dos *HvTAA* y dos proteasas. Los asteriscos muestran diferencias significativas con $p < 0,01$ (**) y $p < 0,05$ (*), los cuales se resaltan en negrita.

	<i>HvGS1_1</i>	<i>HvGS1_2</i>	<i>HvAAP6</i>	<i>HvAAP7</i>	<i>HvSAG12</i>	<i>HvSUBT</i>
AA Floema	0,7792**	0,3417	0,5068*	0,6818**	0,8213**	0,3408

6.5. Discusión

Los resultados observados en cuanto al crecimiento de las plantas nos permiten inferir que la disponibilidad de S con la que contaron las mismas fue suficiente para no limitar el PS de los granos (**Figura 6.1B**). No obstante, la disminución en la biomasa aérea de las plantas HS (**Figuras 6.1A**) estaría indicando una deficiencia de este nutriente, que a su vez disminuyó el contenido de S tanto en granos como en rastrojo (**Figura 6.2A**).

El aumento en el ICS que observamos en las plantas HS (**Figura 6.2C**) indicaría una acumulación del S preferentemente en los granos en detrimento del rastrojo, como ya fue reportado en plantas de trigo (Shinmachi *et al.*, 2010). Sin embargo, con este dato no podemos discriminar si el aumento en la proporción de S de los granos con respecto al rastrojo se debe a la absorción directa post anthesis de este nutriente por parte de las raíces o a la removilización del S presente en los tejidos vegetativos. Respecto a la eficiencia de la redistribución del S existen ciertas discrepancias en la bibliografía sobre este tema. Algunos registros indican que, si bien tanto los pools de SO_4^{2-} vacuolar como los de S reducido (glutación, proteínas, entre otros) pueden ser removilizados bajo condiciones de deficiencia de S desde las hojas maduras hacia las hojas más jóvenes, la eficiencia de dicha removilización es baja debido a la naturaleza poco móvil del S, especialmente la del SO_4^{2-} secuestrado en las vacuolas (Hawkesford, 2000; Prosser *et al.*, 2001). Incluso se ha reportado que la redistribución del S desde las proteínas no ocurriría ante una deficiencia de S a menos que también la planta sufra de deficiencia de N (Sunarpi y Anderson, 1997; Hawkesford y De Kok, 2006).

Por otro lado, y en concordancia con los resultados obtenidos en los capítulos anteriores, observamos una disrupción en el metabolismo del N a causa de la deficiencia de S. Ésta se vio reflejada en un menor contenido de proteínas solubles tanto en el TF (**Figura 6.5A**) como en el TD (**Figura 6.7A**), una acumulación de nitrato a los 120 y 135 DDS en ambos tejidos (**Figuras 6.5C y 6.7C**) y un menor contenido de aminoácidos al final del llenado de los granos en el TF (**Figura 6.5B**) junto con una acumulación de los mismos al comienzo del llenado de los granos en el TD (**Figura 6.7B**) de las plantas HS. Sin embargo, esta deficiencia no impactó en el contenido de N en granos ni en rastrojo (**Figura 6.2B**), así como tampoco lo hizo en el ICN (**Figura 6.2C**). Este resultado en conjunto con la menor tasa de exportación de aminoácidos vía floema que observamos en las plantas HS (**Figura 6.6**) indicarían que la deficiencia de S no estaría afectando la absorción del N, pero sí su asimilación y redistribución en su forma orgánica (aminoácidos). En este sentido es importante recordar que, pese a que la deficiencia de S no generó impactos negativos sobre el rendimiento ni sobre el contenido de N total en los granos, esto no implicaría necesariamente que los mismos cuenten con las características requeridas por la industria cervecera. De hecho, al igual que lo observado en el capítulo 3, la deficiencia de S generó menores contenidos de proteínas solubles en el TD (**Figura 6.7A**), lo cual, como ya se mencionó, tendría un impacto sobre la calidad de la malta ya que se sabe que estas fracciones proteicas se correlacionan positivamente con el poder diastático (Wang *et al.*, 2007) el cual está estrechamente relacionado con la actividad de la β -amilasa, una enzima clave en la degradación del almidón (Georg-Kraemer *et al.*, 2001) para dar lugar a azúcares fermentables utilizados por las levaduras para la producción de alcohol.

Mediante el análisis del test de Pearson encontramos una fuerte correlación entre la expresión de *HvGS1_1*, *HvAAP6* y *HvAAP7* y la exportación de aminoácidos vía floema (**Tabla 6.1**), confirmando que estos cumplirían roles claves en el transporte de aminoácidos a larga distancia. Esto a su vez se sustenta en el hecho de que los tres genes mostraron un pico de expresión a los 135 DDS (**Figura 6.8A, C y D**) el cual coincidió con el mayor punto de exudación de aminoácidos en las plantas control (**Figura 6.6**), estando ausente tanto el pico de expresión de los tres genes como el de exportación de aminoácidos en las plantas HS (**Figuras 6.8A, C y D y 6.6**).

Respecto a *HvGS1_2*, si bien no se estableció una correlación positiva entre la tasa de removilización y los niveles de expresión de este gen (**Tabla 6.1**), la cual sí fue encontrada en el capítulo 4, en las plantas control encontramos un pico máximo de expresión de *HvGS1_2* a los 135 DDS que estuvo ausente en las plantas HS en ese punto (**Figura 6.8B**), coincidiendo con el máximo de removilización de aminoácidos (**Figura 6.6**) y reforzando el rol de esta isoforma en dicho proceso. Por otro lado, en las plantas HS se produjo una inducción de *HvGS1_2* a los 106 DDS (**Figura 6.8B**), momento en el cual los

niveles de aminoácidos y nitrato en el TF de estas plantas eran similares a los del control (**Figura 6.5B y C**). Basándonos en el rol que se le atribuye a esta isoforma sobre la asimilación primaria del N (Goodall *et al.*, 2013), es factible suponer que las plantas HS estarían regulando positivamente este gen para sintetizar glutamina a fin de contrarrestar la acumulación de NH_4^+ que se da ante una deficiencia severa de S y que conlleva a una intoxicación (Hesse *et al.*, 2004; Nikiforova *et al.*, 2004); aunque de existir dicho mecanismo sólo se observó a los 106 DDS y no pudo ser sostenido en el tiempo.

A su vez, y en concordancia con los resultados obtenidos en el capítulo anterior, la expresión de *HvSAG12* en las plantas control se incrementó levemente en el tiempo mostrando un marcado pico de inducción recién a los 135 DDS (**Figura 6.8E**), momento en el cual las hojas de estas plantas se encontraban en un avanzado estado de senescencia (**Figura 6.9**). Asimismo, encontramos una fuerte correlación entre los niveles de expresión de este gen y la tasa de exportación de aminoácidos (**Tabla 6.1**), remarcando la importancia de esta proteasa no sólo en el proceso de senescencia foliar sino también en el proceso de removilización.



Figura 6.9. Fotografía de las hojas utilizadas como tejido fuente (TF = $\text{H}^{-1} + \text{H}^{-2}$) de las plantas hambreadas de S (HS) y de las plantas control a los 135 DDS.

En el caso de las plantas HS, los menores niveles de inducción de *HvSAG12* (**Figura 6.8E**) junto con los menores signos de senescencia (**Figuras 6.4C y 6.9**) y los mayores contenidos de clorofila en sus hojas más viejas (**Figura 6.4B**) ponen de manifiesto el retraso de la senescencia frente a la deficiencia de S, que ya ha sido ampliamente corroborado en los capítulos previos. Este retraso, de alguna manera, podría estar afectando el desarrollo de las espigas ya que las plantas HS mostraron estadios de espigazón menos avanzados que el control (**Figura 6.3**), impidiendo la completa emergencia de las mismas. Según nuestro conocimiento, no existen hasta la fecha reportes sobre el efecto de la deficiencia de

S sobre la fenología de las plantas. De hecho, sólo encontramos un trabajo en donde observaron un retraso en la floración de una leguminosa forrajera frente a una deficiencia combinada de S y P (Robinson y Jones, 1972), pero dado que en dicho trabajo no se evaluó el efecto de la deficiencia de S en forma individual y que es bien sabido que el P retrasa la floración (Rossiter, 1978; Shepherd *et al.*, 1987; Chauhan *et al.*, 1992; Marschner, 1995; Rodríguez *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 2002; Nord y Lynch, 2008), dicho efecto no puede ser atribuido al S.

En cuanto a *HvSUBT*, el hecho de que su expresión aumentara con el avance de la senescencia de igual modo para ambos tratamientos (**Figura 6.8F**) evidencia que el S no estaría regulando negativamente la inducción asociada a senescencia de esta proteasa. Sin embargo, no se puede descartar que esta inducción esté ocurriendo por una vía alternativa vinculada a cubrir otras necesidades proteolíticas no asociadas a la senescencia, como ya se hizo mención en el capítulo anterior. A su vez, refuerza lo observado en el capítulo 5 sobre la regulación diferencial de *HvSUBT* por S en función no sólo del estado de desarrollo de la hoja sino también de la planta. De este modo, en plantas en estado vegetativo este gen se induce ante una deficiencia de S en hojas no senescentes (**Figuras 5.7E y 5.9C**) pero se reprime en hojas senescentes (**Figuras 5.3E y 5.9C**); mientras que en estado reproductivo no se reprime en senescencia e incluso presenta un aumento de su expresión a los 129 DDS (**Figura 6.9F**).

En conclusión, los resultados recopilados en este capítulo refuerzan la hipótesis de que *HvGS1_1*, *HvGS1_2*, *HvAAP6*, *HvAAP7* y *HvSAG12* cumplirían con roles claves en el proceso de removilización de aminoácidos a través del floema y que la disponibilidad de S jugaría un rol esencial en la regulación de los mismos.

Capítulo 7

Conclusiones y Perspectivas

Capítulo 7

Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta tesis nos permiten concluir que:

La deficiencia de S,

- * Inhibe la exportación de aminoácidos y azúcares vía floema, independientemente del estadio de desarrollo de las plantas.
- * Genera una disrupción significativa del metabolismo del N, disminuyendo los niveles de proteínas y aumentando los niveles de aminoácidos libres y nitrato tanto en el tejido fuente como en el destino.
- * Inhibe la expresión de las tres isoformas de *HvGS* afectando la asimilación y transporte del N.
- * Inhibe la expresión de cinco de los seis transportadores de aminoácidos analizados en este trabajo (*HvAAP2*, *HvAAP4*, *HvAAP6*, *HvAAP7* y *HvProT1*).
- * Retrasa la senescencia foliar y la inducción de los genes de las proteasas *HvPAP*, *HvSAG12*, *HvALEU*, *HvLEGU*, *HvSUBT*, *HvCPMIII* y *HvLEU-AP*, asociadas a este proceso.
- * Induce la expresión de *HvSAG12*, *HvLEGU* y *HvSUBT* en el tejido no senescente, sugiriendo roles diferentes además de la proteólisis asociada a la senescencia.
- * Inhibe la expresión de las hordeínas B en forma diferencial según el estado nutricional de N de las plantas.

Asimismo,

- * Los diferentes patrones de expresión observados durante el avance de la senescencia para los genes de *HvTAA* analizados (*HvAAP2* y *HvAAP4* que caen; *HvAAP7* y *HvProT1* que aumentan y *HvAAP6* y *HvLHT2* que se mantienen constantes) indican roles diferenciales de estos transportadores a lo largo del ciclo de la vida de la hoja.
- * El transporte de aminoácidos por floema estaría regulado por cambios en la expresión de los genes de *HvGS1_1*, *HvGS1_2*, *HvAAP6* y *HvAAP7* en el tejido fuente.
- * Los aminoácidos y azúcares transportados por floema regularían la expresión de las hordeínas C y B, respectivamente.

- * La expresión de *HvCND41* no se correlaciona con el avance de la senescencia natural de plantas de cebada en estado vegetativo.

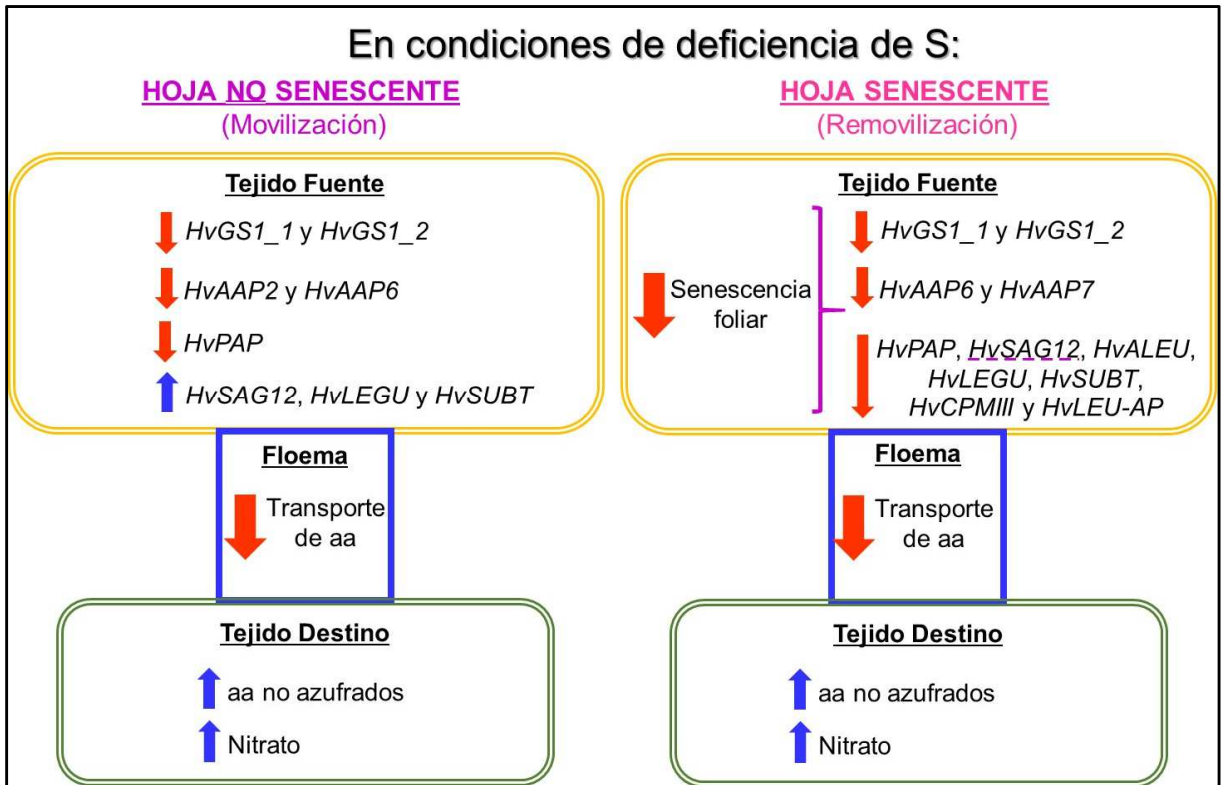


Figura 7.1. Esquema de las posibles vías regulatorias para la inhibición del transporte de aminoácidos por floema frente a la deficiencia de S según el tipo de tejido analizado. aa = aminoácidos. La flecha roja indica represión/disminución y la azul inducción/aumento.

Perspectivas

A corto plazo,

- ❖ Analizar el patrón de expresión de las proteasas *HvPAP*, *HvALEU*, *HvLEGU*, *HvCPMIII* y *HvLEU-AP* frente al hambreado de S durante la senescencia monocárpica de plantas cultivadas en invernáculo (condiciones mencionadas en el capítulo 6 de esta tesis).
- ❖ Determinar el efecto de la deficiencia de S sobre el filocrono (intervalo de tiempo entre la aparición de hojas sucesivas) de plantas en distintos estadios fenológicos.
- ❖ Estudiar el efecto de la deficiencia de S sobre el patrón de expresión de los transportadores de sacarosa (*HvSUT1* y *HvSUT2*) en el tejido fuente de plantas en estado vegetativo y reproductivo.

A mediano y largo plazo,

Conocer más a fondo cómo se regula la removilización de asimilados vía floema podría contribuir al desarrollo de nuevas estrategias para mejorar la calidad de los granos de cebada según los requisitos de la industria maltera. El desarrollo de herramientas que permitan manipular la calidad de los granos sin necesidad de aplicar mayor cantidad de fertilizantes a los cultivos no sólo tendrá un impacto en la economía de los productores, sino que a su vez permitirá reducir la contaminación ambiental provocada por la fertilización excesiva y la consecuente lixiviación de nutrientes a las aguas subterráneas.

La correlación positiva encontrada entre la tasa de exportación de aminoácidos por floema y la expresión de *HvGS1_1*, *HvGS1_2*, *HvAAP6* y *HvAAP7* indica que sería prometedor avanzar en el estudio de la regulación de estos genes y las proteínas que codifican con el fin de verificar su participación en la regulación de la removilización de aminoácidos y de esta forma utilizar este conocimiento en planes de mejoramiento genético dando lugar a líneas con mejorada eficiencia de removilización.

Bibliografía

Bibliografía

- Abdallah M., Etienne P., Ourry A., Meuriot F.** (2011). Do initial S reserves and mineral S availability alter leaf S-N mobilization and leaf senescence in oilseed rape? *Plant Science* 180: 511 – 520.
- Adesemoye A.O., Kloepper J.W.** (2009). Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 1 – 12.
- Ashraf M., Harris P.J.C.** (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166: 3 – 16.
- Atlas de histología vegetal y animal.** https://mmegias.webs.uvigo.es/1-vegetal/guiada_v_conductores.php.
- Avice J-C., Etienne P.** (2014). Leaf senescence and nitrogen remobilization efficiency in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Experimental Botany* 65: 3813 – 3824.
- Avila-Ospina L., Marmagne A., Talbotec J., Krupinska K., Masclaux-Daubresse C.** (2015). The identification of new cytosolic glutamine synthetase and asparagine synthetase genes in barley (*Hordeum vulgare* L.), and their expression during leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 66: 2013 – 2026.
- Baethgen W.E., Alley M.M.** (1989). A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digest. *Communication in Soil Science and Plant Analysis* 20: 961 – 969.
- Baxter E.D., Wainwright T.** (1979). Hordein and malting quality. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 37: 8 – 12.
- Baxter E.D.** (1981). Hordein in barley and malt – A review. *Journal of the Institute of Brewing* 87: 173 – 176.
- Benavides A.** (1998). El azufre en las plantas. Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México DF.
- Bernard S.M., Habash, D.Z.** (2009). The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytologist* 182: 608 – 620.
- Bolan N.S., Adriano D.C., Curtin D.** (2003). Soil acidification and liming interactions with nutrient and heavy metal transformation and bioavailability. *Advances in Agronomy* 78: 215 – 272.
- Bottacin A., Smith K., Mifflin B.J., Shewry P.R., Bright S.W.J.** (1985). Regulation of storage protein synthesis by sulphur and nitrogen nutrition in cultured immature caryopses of barley. *Journal of Experimental Botany* 36: 140 – 148.
- Bourgis F., Roje S., Nuccio M.L., Fisher D.B., Tarczynski M.C., Li C., Herschbach C., Rennenberg H., Pimenta M.J., Shen T-L., Gage D.A., Hanson A.D.** (1999). S-

-
- Methylmethionine Plays a Major Role in Phloem Sulfur Transport and Is Synthesized by a Novel Type of Methyltransferase. *The Plant Cell* 11: 1485 – 1497.
- Bradford M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248 – 254.
- Briggs D.E., Boulton C.A., Brookes P.A., Stevens R.** (2004). Brewing. Science and practice. *Woodhead Publishing Limited*, Cambridge, England and *CRC Press LLC*, Boca Raton, USA.
- Brugière N., Dubois F., Limami A.M., Lelandais M., Roux Y., Sangwan R.S., Hirel B.** (1999). Glutamine Synthetase in the Phloem Plays a Major Role in Controlling Proline Production. *The Plant Cell* 11: 1995 – 2011.
- Buchanan-Wollaston V.** (1997). The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 48: 181 – 199.
- Buchanan-Wollaston V., Earl S., Harrison E., Mathas E., Navabpour S., Page T, Pink D.** (2003). The molecular analysis of leaf senescence – a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal* 1: 3 – 22.
- Caputo C., Barneix A.J.** (1997). Export of amino acids to the phloem in relation to N supply in wheat. *Physiologia Plantarum* 101: 853 – 860.
- Caputo C., Barneix A.J.** (1999). The relationship between sugar and amino acid export to the phloem in young wheat plants. *Annals of Botany* 84: 33 – 38.
- Caputo C., Fatta N., Barneix A.J.** (2001). The amino acid export to the phloem is altered in wheat plants lacking the short arm of chromosome 7B. *Journal of Experimental Botany* 52: 1761 – 1768.
- Caputo C., Criado M.V., Roberts I.N., Gelso M.A., Barneix A.J.** (2009). Regulation of glutamine synthetase 1 and amino acids transport in the phloem of young wheat plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 335–342.
- Cataldo D.A., Haroon M., Schrader L.E., Youngs V.L.** (1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 6: 71 – 80.
- Chauhan Y.S., Johansen C., Venkataratnam N.** (1992). Effects of phosphorus deficiency on phenology and yield components of short-duration pigeon pea. *Tropical Agriculture* 69: 235 – 238.
- Chen P., Wang L.** (2006). Effects of sulfur deficiency on photosynthesis and chlorophyll fluorescence of *Citrus sinensis* Osbeck leaves. *Chinese Journal of Ecology* 05.
- Claussen W.** (2002). Growth, water use efficiency, and proline content of hydroponically grown tomato plants as affected by nitrogen source and nutrient concentration. *Plant and Soil* 247: 199 – 209.
-

-
- Claussen W.** (2005). Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Science* 168: 241 – 248.
- Cohen A.S., Popovic R.B., Zalik S.** (1979). Effects of Polyamines on Chlorophyll and Protein Content, Photochemical Activity, and Chloroplast Ultrastructure of Barley Leaf Discs during Senescence. *Plant Physiology* 64: 717 – 720.
- Colgrave M.L., Goswami H., Howitt C.A., Tanner G.** (2011). What is in a Beer? Proteomic Characterization and Relative Quantification of Hordein (Gluten) in Beer. *Journal of proteome research*. 11: 386 – 396.
- Cowan A.K., Freeman M., Björkman P-O., Nicander B., Sitbon F., Tillberg E.** (2005). Effects of senescence-induced alteration in cytokinin metabolism on source–sink relationships and ontogenic and stress-induced transitions in tobacco. *Planta* 221: 801 – 814.
- Creelman R.A., Tierney M.L., Mullet J.E.** (1992). Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 4938 – 4941.
- Cren M., Hirel B.** (1999). Glutamine synthetase in higher plants: regulation of gene and protein expression from the organ to the cell. *Plant and Cell Physiology* 40: 1187 – 193.
- Criado M.V., Roberts I.N., Echeverria M., Barneix A.J.** (2007). Plant growth regulators and induction of leaf senescence in nitrogen-deprived wheat plants. *Journal of Plant Growth Regulation* 26: 301 – 307.
- Dalling M.J.** (1985). The physiological basis of nitrogen redistribution during grain filling in cereals. In: *Exploitation of physiology and genetic variability to enhance crop productivity*. 55 – 71. Ed: Harper J.E., Schrader L.E., Howell R.W. Waverly Press, Baltimore.
- De Bona F.D., Fedoseyenko D., von Wirén N., Monteiro F.A.** (2011). Nitrogen utilization by sulfur-deficient barley plants depends on the nitrogen form. *Environmental and Experimental Botany* 74: 237 – 244.
- Diaz C., Lemaître T., Christ A., Azzopardi M., Kato Y., Sato F., Morot-Gaudry J-F., Le Dily F., Masclaux-Daubresse C.** (2008). Nitrogen Recycling and Remobilization Are Differentially Controlled by Leaf Senescence and Development Stage in Arabidopsis under Low Nitrogen Nutrition. *Plant Physiology* 147: 1437 – 1449.
- Diaz-Mendoza M., Velasco-Arroyo B., Santamaria M.E., González-Melendi P., Martinez M., Diaz I.** (2016). Plant senescence and proteolysis: two processes with one destiny. *Genetics and Molecular Biology* 39: 329 – 338.

-
- Dostálová Y., Hřivna L., Kotková B., Burešová I., Janečková M., Šottníková V.** (2015). Effect of nitrogen and sulphur fertilization on the quality of barley protein. *Plant, Soil and Environment* 9: 399 – 404.
- Dubousset L., Abdallah M., Desfeux A.S., Etienne P., Meuriot F., Hawkesford M.J., Gombert J., Ségura R., Bataillé M-P., Rezé S., Bonnefoy J., Ameline A.F., Ourry A., Le Dily F., Avice J.C.** (2009). Remobilization of leaf S compounds and senescence in response to restricted sulphate supply during the vegetative stage of oilseed rape are affected by mineral N availability. *Journal of Experimental Botany* 60: 3239 – 3253.
- Edwards J.W., Coruzzi G.W.** (1989). Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. *Plant Cell* 1: 241 – 248.
- Ercoli L., Lulli L., Mariotti M., Masoni A., Arduini I.** (2008). Post-anthesis dry matter and nitrogen dynamics in durum wheat as affected by nitrogen supply and soil water availability. *European Journal of Agronomy* 28: 138 – 147.
- Eveland A.L., Jackson D.P.** (2012). Sugars signalling and plant development. *Journal of Experimental Botany* 63: 3367 – 3377.
- Feller U., Fischer A.** (1994). Nitrogen Metabolism in Senescing Leaves. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13: 241 – 273.
- Ferraris G.** (2007). Nitrógeno y azufre en trigo. Un caso particular de interacción entre nutrientes. INTA. Información técnica de trigo y otros cultivos de invierno, campaña 2007. Publicación miscelánea N° 107.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO** (2009). Agribusiness handbook, Barley Malt Beer; Rome, Italy.
- Gan S., Amasino R.M.** (1997). Making Sense of Senescence. Molecular Genetic Regulation and Manipulation of Leaf Senescence. *Plant Physiology* 113: 313 – 319.
- García del Moral L.F., Sopena A., Montoya J.L., Polo P., Voltas J., Codesal P., Ramos J.M., Molina-Cano J.L.** (1998). Image Analysis of Grain and Chemical Composition of the Barley Plant as Predictors of Malting Quality in Mediterranean Environments. *Cereal Chemistry Journal* 75: 755 – 761.
- Georg-Kraemer J.E., Mundstock E.C., Cavalli-Molina S.** (2001). Developmental expression of amylases during barley malting. *Journal of Cereal Science* 33: 279 – 288.
- Giese H., Hopp H.E.** (1984). Influence of Nitrogen Nutrition on the Amount of Hordein, Protein Z and b-Amylase Messenger RNA in Developing Endosperms of Barley. *Carlsberg Research Communications* 49: 365 – 383.
-

-
- Gilbert S.M., Clarkson D.T., Cambridge M., Lambers H., Hawkesford M.J.** (1997). SO_4^{2-} Deprivation Has an Early Effect on the Content of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase and Photosynthesis in Young Leaves of Wheat. *Plant Physiology* 115: 1231 – 1239.
- Jiménez F., Tomaso J.C.** (2008). Evaluación de cultivares de cebada cervecera en Balcarce. Revista Visión Rural. Mejoramiento Genético de Cebada Cervecera INTA EEA Bordenave.
- Goodall A.J., Kumar P., Tobin A.K.** (2013). Identification and expression analyses of cytosolic glutamine synthetase genes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant and Cell Physiology* 54: 492 – 505.
- Gregersen P.L., Holm P.B., Krupinska K.** (2008). Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. *Plant Biology* 10: 37 – 49.
- Gregersen P.L., Culetic A., Boschian L., Krupinska K.** (2013). Plant senescence and crop productivity. *Plant Molecular Biology* 82: 603 – 622.
- Grudkowska M., Zagdańska B.** (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica* 51: 609 – 624.
- Grupta V.V.S.R., Lawrence J.R., Germida J.J.** (1988). Impact of elemental sulfur fertilization on agricultural soils. I. Effects on microbial biomass and enzyme activities. *Canadian Journal of Soil Science* 68: 463 – 473.
- Gubatz S., Shewry P.R.** (2011). The Development, Structure, and Composition of the Barley Grain. In: *Barley: Production, Improvement and Uses*, 391 – 448. Ed: Ullrich S.E. Wiley-Blackwell, A John Wiley & Sons, Inc., Publication; West Sussex, UK.
- Guo B., Luan H., Lin S., Lv C., Zhang X., Xu R.** (2016). Comparative Proteomic Analysis of Two Barley Cultivars (*Hordeum vulgare* L.) with Contrasting Grain Protein Content. *Frontiers in Plant Science* 7: 542.
- Gutiérrez Boem F.H., Prystupa P., Ferraris G.** (2007). Seed number and yield determination in sulfur deficient soybean crops. *Journal of Plant Nutrition* 30: 93 – 104.
- Haneklaus S., Bloem E., Schnug E., de Kok L.J., Stulen I.** (2007). Sulfur. In: *Handbook of Plant Nutrition*, 183 – 238. Ed: Barker A.V., Pilbeam D.J. CRC Press, Taylor & Francis Group; Boca Raton, USA.
- Hansen M., Friis C., Bowra S., Holm P.B., Vincze E.** (2009). A pathway-specific microarray analysis highlights the complex and co-ordinated transcriptional networks of the developing grain of field-grown barley. *Journal of Experimental Botany* 60: 153 – 167.
- Hara-Nishimura I., Takeuchi Y., Nishimura M.** (1993). Molecular Characterization of a Vacuolar Processing Enzyme Related to a Putative Cysteine Proteinase of *Schistosoma mansoni*. *The Plant Cell* 5: 1651 – 1659.
-

-
- Hara-Nishimura I., Hatsugai N., Nakaune S., Kuroyanagi M., Nishimura M.** (2005). Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 404 – 408.
- Hawkesford M.J.** (2000). Plant responses to sulphur deficiency and the genetic manipulation of sulphate transporters to improve S-utilization efficiency. *Journal of Experimental Botany* 51: 131 – 138.
- Hawkesford M.J., De Kok L.J.** (2006). Managing sulphur metabolism in plants. *Plant, Cell and Environment* 29: 382 – 395.
- Hesse H., Nikiforova V., Gakière B., Hoefgen R.** (2004). Molecular analysis and control of cysteine biosynthesis: integration of nitrogen and sulphur metabolism. *Journal of Experimental Botany* 55: 1283 – 1292.
- Hirel B., Le Gouis J., Ney B., Gallais A.** (2007). The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany* 58: 2369 – 2387.
- Hoagland D.R., Arnon D.I.** (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California Agricultural Experimental Station* 347: 1 – 32.
- Holopainen U.R.M., Rajala A., Jauhainen L., Wilhelmson A., Home A., Kauppila R., Peltonen-Sainio P.** (2015). Influence of sulphur application on hordein composition and malting quality of barley (*Hordeum vulgare* L.) in northern European growing conditions. *Journal of Cereal Science* 62: 151-158.
- Howard K.A., Gayler K.R., Eagles H.A., Halloran G.M.** (1996). The Relationship Between D Hordein and Malting Quality in Barley. *Journal of Cereal Science* 24: 47-53.
- International Plant Nutrition Institute.** <http://www.ipni.net>.
- Jones B.L.** (2005) Review: Endoproteases of barley and malt. *Journal of Cereal Science* 42: 139-156.
- Jordi W., Schapendonk A., Davelaar E., Stoopen G.M., Pot C.S., de Visser R., van Rhijn J.A., Gan S., Amasino R.M.** (2000). Increased cytokinin levels in transgenic P_{SAG12}-IPT tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. *Plant Cell and Environment* 23: 279 – 289.
- Jukanti A.K., Fischer A.M.** (2008). A high-grain protein content locus on barley (*Hordeum vulgare*) chromosome 6 is associated with increased flag leaf proteolysis and nitrogen remobilization. *Physiologia Plantarum* 132: 426 – 439.
- Kant S., Bi Y-M., Rothstein S.J.** (2011). Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany* 62: 1499 – 1509.
-

-
- Kato Y., Murakami S., Yamamoto Y., Chatani H., Kondo Y., Nakano T., Yokota A., Sato F.** (2004). The DNA-binding protease, CND41, and the degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in senescent leaves of tobacco. *Planta* 220: 97 – 104.
- Kato Y., Yamamoto Y., Murakami S., Sato F.** (2005). Post-translational regulation of CND41 protease activity in senescent tobacco leaves. *Planta* 222: 643 – 651.
- Kohl S., Hollmann J., Blattner F.R., Radchuk V., Andersch F., Steuernagel B., Schmutzer T., Scholz U., Krupinska K., Weber H., Weschke W.** (2012). A putative role for amino acid permeases in sink-source communication of barley tissues uncovered by RNA-seq. *BMC Plant Biology* 12: 154.
- Lapitan N.L.V., Hess A., Cooper B., Botha A-M., Badillo D., Iyer H., Menert J., Close T., Wright L., Hanning G., Tahir M., Lawrence C.** (2009). Differentially expressed genes during malting and correlation with malting quality phenotypes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 118: 937 – 952.
- Larher F., Aziz A., Deleu C., Lemesle P., Ghaffar A., Bouchard F., Plasman M.** (1998). Suppression of the osmoinduced proline response of rapeseed leaf discs by polyamines. *Physiologia Plantarum* 102: 139 – 147.
- Lewandowska M. Sirko, A.** (2008). Recent advances in understanding plant response to sulfur-deficiency stress. *Acta Biochimica polonica* 55: 457 – 471.
- Lohman K.N, Gan S., John M.C., Amasino R.M.** (1994). Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 92: 322 – 328.
- Lunde C., Zygadlo A., Simonsen H.T., Nielsen P.L., Blennow A., Haldrup A.** (2008). Sulfur starvation in rice: the effect on photosynthesis, carbohydrate metabolism, and oxidative stress protective pathways. *Physiologia Plantarum* 134: 508 – 521.
- Ma Q.F., Longnecker N., Atkins C.** (2002). Varying phosphorus supply and development, growth and seed yield in narrow-leafed lupin. *Plant and Soil* 239: 79 – 85.
- Marinissen A., Lauric A., Torres Carbonell C.** (2009). Hoja informativa de cebada cervecera julio 2009. Agencias de Extensión INTA Bahía Blanca y Coronel Rosales. INTA EEA Bordenave.
- Marschner H.** (1995). Mineral Nutrition of Higher Plants, 2nd edn. Academic Press, London, UK.
- Martin A., Lee J., Kichey T., Gerentes D., Zivy M., Tatout C., Dubois F., Balliau T., Valot B., Davanture M., Tercé-Laforgue T., Quilleré I., Coque M., Gallais A., Gonzales-Moro M-B., Bethencourt L., Habash D.Z., Lea P.J., Charcosset A., Perez P., Murigneux A., Sakakibara H., Edwards K.J., Hirel B.** (2006). Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. *The Plant Cell* 18: 3252 – 3274.
-

-
- Martínez D.E., Costa M.L., Guamet J.J.** (2008). Senescence-associated degradation of chloroplast proteins inside and outside the organelle. *Plant Biology* 10: 15 – 22.
- Masclaux-Daubresse C., Reisdorf-Cren M., Orsel M.** (2008). Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. *Plant Biology* 10: 23-36.
- Masclaux-Daubresse C., Daniel-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.
- McCready R.M., Guggolz J., Silveira V., Owens H.S.** (1950). Determination of Starch and Amylose in Vegetables. Application to peas. *Analytical Chemistry* 22: 1156 – 1158.
- Mifflin B.J., Habash D.Z.** (2002). The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *Journal of Experimental Botany* (Inorganic Nitrogen Assimilation Special Issue) 53: 979 – 987.
- Ministerio de Agroindustria de la Nación Argentina** (2015). http://www.minagri.gob.ar/dimeagro/newsletters/nro81/nl_cebada.php. De Bernardi L. La cebada. Gacetilla informativa del sector agrícola. Newsletter Nro. 81. Dirección de Mercados Agrícolas. Ministerio de Agroindustria, Argentina.
- Miziorko H.M., Lorimer G.H.** (1983). Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Annual Reviews Biochemistry* 52: 507 – 535.
- Molina-Cano J.L., Polo J.P., Sopena A., Voltas J., Pérez-Vendrell A.M., Romagosa I.** (2000). Mechanisms of malt extract development in barleys from different european regions: II. Effect of barley hordein fractions on malt extract yield. *Journal of the Institute of Brewing* 106: 117 – 123.
- Molina-Cano J.L., Romera E., Aikasalo R., Pérez-Vendrell A.M., Larsen J., Rubió A.** (2002). A Reappraisal of the Differences Between Scandinavian and Spanish Barleys: Effect of β -Glucan Content and Degradation on Malt Extract Yield in the cv. *Scarlett*. *Journal of the Institute of Brewing* 108: 221 – 226.
- Nabors M.W.** (2006). Introducción a la botánica. Pearson educación, S. A., Madrid.
- Nakano T., Nagata N., Kimura T., Sekimoto M., Kawaide H., Murakami S., Kaneko Y., Matsushima H., Kamiya Y., Sato F., Yoshida S.** (2003). CND41, a chloroplast nucleoid protein that regulates plastid development, causes reduced gibberellin content and dwarfism in tobacco. *Physiologia Plantarum* 117: 130 – 136.
- Nielsen P.S., Kleinhofs A., Olsen O-A.** (1997). Barley elongation factor 1 alpha: genomic organization, DNA sequence, and phylogenetic implications. *Genome* 40: 559 – 565.
- Nikiforova V.J., Gakie`re B., Kempa S., Adamik M., Willmitzer L., Hesse H., Hoefgen R.** (2004). Towards dissecting nutrient metabolism in plants: a systems biology case
-

-
- study on sulphur metabolism. *Journal of Experimental Botany* (Sulphur Metabolism in Plants Special Issue) 55: 1861 – 1870.
- Nikiforova V.J., Kopka J., Tolstikov V., Fiehn O., Hopkins L., Hawkesford M.J., Hesse H., Hoefgen R.** (2005). Systems rebalancing of metabolism in response to sulfur deprivation, as revealed by metabolome analysis of *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology* 138: 304 – 318.
- Noh Y-S., Amasino R.M.** (1999). Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of *SAG12*. *Plant Molecular Biology* 41: 181 – 194.
- Nord E.A., Lynch J.P.** (2008). Delayed reproduction in *Arabidopsis thaliana* improves fitness in soil with suboptimal phosphorus availability. *Plant, Cell and Environment* 31: 1432 – 1441.
- Osborne D.J.** (1962). Effect of Kinetin on Protein & Nucleic Acid Metabolism in Xanthium Leaves During Senescence. *Plant Physiology* 595 – 602.
- Parrott D.L., McInnerney K., Feller U., Fischer A.M.** (2007). Steam-girdling of barley (*Hordeum vulgare*) leaves leads to carbohydrate accumulation and accelerated leaf senescence, facilitating transcriptomic analysis of senescence-associated genes. *New Phytologist* 176: 56 – 69.
- Parrott D.L., Martin J.M., Fischer A.M.** (2010). Analysis of barley (*Hordeum vulgare*) leaf senescence and protease gene expression: a family C1A cysteine protease is specifically induced under conditions characterized by high carbohydrate, but low to moderate nitrogen levels. *New Phytologist* 187: 313 – 331.
- Parthier B.** (1990). Jasmonates: Hormonal Regulators or Stress Factors in Leaf Senescence? *Journal of Plant Growth Regulation* 9: 57 – 63.
- Peltonen J., Rita H., Aikasalo R., Home S.** (1994). Hordein and malting quality in northern barleys. *Hereditas* 120: 231–239.
- Pratelli R., Pilot G.** (2014). Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. *Journal of Experimental Botany* 65: 5535 – 5556.
- Prosser I.M., Purves J.V., Saker L.R., Clarkson D.T.** (2001). Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate. *Journal of Experimental Botany* 52: 113 – 121.
- Prystupa P., Slafer G.A., Savin R.** (2003). Leaf appearance, tillering and their coordination in response to N x P fertilization in barley. *Plant and Soil* 255: 587 – 594.
- Qi J-c., Chen J-x., Wang J-m., Wu F-b., Cao L-p., Zhang G-p.** (2005). Protein and hordein fraction content in barley seeds as affected by sowing date and their relations to malting quality. *Journal of Zhejiang University SCIENCE* 6B:1069 – 1075.
-

-
- Qi J.C., Zhang G.P., Zhou M.X.** (2006). Protein and hordein content in barley seeds as affected by nitrogen level and their relationship to beta-amylase activity. *Journal of Cereal Science* 43: 102 – 107.
- Rautergarten C., Steinhauser D., Büssis D., Stintzi A., Schaller A., Kopka J., Altmann T.** (2005). Inferring hypothesis on functional relationships of genes: analysis of the *Arabidopsis thaliana* subtilase gene family. *PLOS Computational Biology* 1: 297 – 312.
- Raymond E.T., Hanson A.D.** (1979). Amino Acids Translocated from Turgid and Water-stressed Barley Leaves. *Plant Physiology* 64: 460 – 466.
- Rennenberg H., Schmitz K., Bergmann L.** (1979). Long-distance transport of sulfur in *Nicotiana tabacum*. *Planta* 147: 57 – 62.
- Rennenberg H.** (1984). The fate of excess sulfur in higher plants. *Annual Reviews Plant Physiology* 35: 121 – 153.
- Roberts I.N., Caputo C., Criado M.V., Funk C.** (2012). Senescence-associated proteases in plants. *Physiologia Plantarum* 145: 130 – 139.
- Robinson P.J., Jones R.K.** (1972). The effect of phosphorus and sulphur fertilization on the growth and distribution of dry matter, nitrogen, phosphorus, and sulphur in townsville stylo (*Stylosanthes humzlis*). *Australian Journal of Agricultural Research* 23: 633 – 640.
- Rodriguez D., Pomar M.C., Goudriaan J.** (1998) Leaf primordia initiation, leaf emergence and tillering in wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under low-phosphorus conditions. *Plant and Soil* 202: 149 – 157.
- Rolland F., Moore B., Sheen J.** (2002). Sugar Sensing and Signaling in Plants. *The Plant Cell* 185 – 205.
- Rosa M., Prado C., Podazza G., Interdonato R., González J.A., Hilal M., Prado F.E.** (2009). Soluble sugars—Metabolism, sensing and abiotic stress. A complex network in the life of plants. *Plant Signaling & Behavior* 4: 388 – 393.
- Rossiter R.C.** (1978) Phosphorus deficiency and flowering time in subterranean clover *Trifolium subterraneum*. *Annals of Botany London* 42: 325 – 330.
- San Martín N., Navarro C., Echeverría H.** (1987). Determinación de azufre total en material vegetal. *IDIA* 457 – 462: 40 – 45.
- Sanmartín M., Jaroszewski L., Raikhel N.V., Rojo E.** (2005). Caspases. Regulating Death Since the Origin of Life. *Plant Physiology* 137: 841 – 847.
- Savin R., Prystupa P., Araus J.L.** (2006). Hordein composition as affected by post-anthesis source–sink ratio under different nitrogen availabilities. *Journal of Cereal Science* 44: 113 – 116.
-

-
- Schaller A.** (2004). A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220: 183 – 197.
- Scherer, H.W.** (2001). Sulphur in crop production. *European Journal of Agronomy* 14: 81 – 111.
- Schnug E., Haneklaus S.** (1998). Diagnosis of sulphur nutrition. In *Sulphur in agriculture*. Ed. E. Schnug 1 – 38. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Scott T., Eagleson M.** (1988). Concise Encyclopedia of Biochemistry. Walter de Gruyter & Co., Berlin.
- Shepherd K.D., Cooper P.J.M., Allan A.Y., Drennan D.S.H., Keatinge J.D.H.** (1987) Growth, water-use and yield of barley in Mediterranean-type environments. *Journal of Agricultural Science-Zeitschrift Fur Acker Und Pflanzenbau* 108: 365 – 378.
- Shewry P.R., Franklin J., Parmar S., Smith S.J., Mifflin B.J.** (1983). The Effects of Sulphur Starvation on the Amino Acid and Protein Compositions of Barley Grain. *Journal of Cereal Science* 1: 21 – 31.
- Shewry P.R., Tatham A.S.** (1990). The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochemical Journal* 267: 1 – 12.
- Shewry P.R., Tatham A., Halford N.** (2001). Nutritional control of storage protein synthesis in developing grain of wheat and barley. *Plant Growth Regulation* 34: 105 – 111.
- Shewry P.R., Zhao F., Gowa G., Hawkins N., Ward J., Beale M., Halford N., Parry M., Abécassis J.** (2009). Sulphur nutrition differentially affects the distribution of asparagine in wheat grain. *Journal of Cereal Science* 50: 407 – 409.
- Shinmachi F., Buchner P., Stroud J.L., Parmar S., Zhao F-J, McGrath S.P., Hawkesford M.J.** (2010). Influence of Sulfur Deficiency on the Expression of Specific Sulfate Transporters and the Distribution of Sulfur, Selenium, and Molybdenum in Wheat. *Plant Physiology* 153: 327 – 336.
- Simic G., Sudar R., Lalic A., Jurkovic Z., Horvat D., Babic D.** (2007). Relationship Between Hordein Proteins and Malt Quality in Barley Cultivars Grown in Croatia. *Cereal Research Communications* 35: 1487 – 1496.
- Slack P.T., Baxter E.D., Wainwright T.** (1979). Inhibition by hordein of starch degradation. *Journal of the Institute of Brewing* 85: 112 – 114.
- Smart C.M.** (1994). Tansley Review No. 64 Gene expression during leaf senescence. *New Phytology* 126: 419 – 448.
- Smith D.B., Lister P.R.** (1983). Gel forming proteins in barley grain and their relationship with malting quality. *Journal of Cereal Science* 1: 229 – 239.
- Sorin E., Etienne P., Maillard A., Zamarreño A-M., Garcia-Mina J-M., Arkoun M., Jamois F., Cruz F., Yvin J-C., Ourry A.** (2015). Effect of sulphur deprivation on osmotic

- potential components and nitrogen metabolism in oilseed rape leaves: identification of a new early indicator. *Journal of Experimental Botany* 66: 6175 – 6189.
- Sunarpi, Anderson J.W.** (1997). Effect of nitrogen nutrition on remobilization of protein sulphur in the leaves of vegetative soybean and associated changes in soluble sulphur metabolites. *Plant Physiology* 115: 1671–1680.
- Tabuchi M., Sugiyama K., Ishiyama K., Inoue E., Sato T., Takahashi H., Yamaya T.** (2005). Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking OsGS1; 1, a cytosolic glutamine synthetase1; 1. *Plant Journal* 42: 641 – 651.
- Tegeder M., Rentsch D.** (2010). Uptake and partitioning of amino acids and peptide. *Molecular Plant* 3: 997 – 1011.
- Tegeder M.** (2012). Transporters for amino acids in plant cells: some functions and many unknowns. *Current Opinion in Plant Biology* 15: 315 – 321.
- Tegeder M., Ward J.M.** (2012). Molecular evolution of plant AAP and LHT amino acid transporters. *Frontiers in Plant Science* 3: 1 – 11.
- Thomsen H.C., Eriksson D., Møller I.S., Schjoerring J.K.** (2014). Cytosolic glutamine synthetase: a target for improvement of crop nitrogen use efficiency? *Trends in Plant Science* 1 – 8.
- Tisdale S.L., Nelson W.L., Beaton J.D.** (1990). Soil Fertility and Fertilizers. Macmillan Publishing Company, New York.
- Tofiño A., Romero H.M., Ceballos H.** (2007). Efectos del estrés abiótico sobre la síntesis y degradación de almidón. Una revisión. *Agronomía Colombiana* 25: 245 – 254.
- Ueda J., Kato J.** (1980). Isolation and Identification of a Senescence-promoting Substance from Wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Physiology* 66: 246 – 249.
- van der Hoorn R.A.L.** (2008). Plant Proteases: From Phenotypes to Molecular Mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 59: 191 – 223.
- Wainwright M.** (1984). Sulfur oxidation in soils. *Advances in Agronomy*. 37: 349 – 396.
- Wallsgrave R.M., Turner J.C., Hall N.P., Kendall A.C., Bright S.W.** (1987). Barley Mutants Lacking Chloroplast Glutamine Synthetase – Biochemical and Genetic Analysis. *Plant Physiology* 83: 155 – 158.
- Wang J.M., Chen J.X., Dai F., Wu F.B., Yang J.M., Zhang G.P.** (2007). Protein Fractions in Barley Grains as Affected by Some Agronomic Factors and Their Relationships to Malt Quality. *Cereal Research Communications* 35: 129 – 140.
- Wasternack C.** (2007). Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Annals of Botany* 100: 681 – 697.

-
- Weaver L.M., Gan S., Quirino B., Amasino R.M.** (1998) A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatments. *Plant Molecular Biology* 37: 455 – 469.
- Weibull J., Ronquist F., Brishammar S.** (1980). Free Amino Acid Composition of Leaf Exudates and Phloem Sap. A Comparative Study in Oats and Barley. *Plant Physiology* 92: 222 – 226.
- Weichert N., Saalbach I., Weichert H., Kohl S., Erban A., Kopka J., Hause B., Varshney A., Sreenivasulu N., Strickert M., Kumlehn J., Weschke W., Weber H.** (2010). Increasing sucrose uptake capacity of wheat grains stimulates storage protein synthesis. *Plant Physiology* 152: 698 – 710.
- Weidhase R.A., Kramell H-M., Lehmann J., Liebisch H-W., Lerbs W., Parthier B.** (1987). Methyljasmonate-induced changes in the polypeptide pattern of senescing barley leaf segments. *Plant Science* 51: 177 – 186.
- Winter H., Lohaus G., Heldt H.W.** (1992). Phloem Transport of Amino Acids in Relation to their Cytosolic Levels in Barley Leaves. *Plant Physiology* 99: 996 – 1004.
- Yamaya T., Kusano M.** (2014). Evidence supporting distinct functions of three cytosolic glutamine synthetases and two NADH-glutamate synthases in rice. *Journal of Experimental Botany* 65: 5519 – 5525.
- Yemm E.W., Willis A.J.** (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *The Biochemical Journal* 57: 508 – 514.
- Yemm E.W., Cocking E.C.** (1955). The determination of amino-acids with ninhydrin. *The Analyst* 80: 209 – 213.
- Zhang H., Dong S., Wang M., Wang W., Song W., Dou X., Zheng X., Zhang Z.** (2010). The role of vacuolar processing enzyme (VPE) from *Nicotiana benthamiana* in the elicitor-triggered hypersensitive response and stomatal closure. *Journal of Experimental Botany* 61: 3799 – 3812.
- Zhao F.J., Fortune S., Barbosa V.L., McGrath S.P., Stobart R., Bilsborrow P.E., Booth E.J., Brown A., Robson P.** (2006). Effects of sulphur on yield and malting quality of barley. *Journal of Cereal Science* 43: 369 – 377.