

27. Agroalimentos

Rol de la alantoína en la regulación de los niveles de especies activas del oxígeno en plantas

Bogino, María Florencia¹; González, Claudio (orientador); Lescano, Ignacio (orientador)¹

florenciabogino@gmail.com; claudio9695@gmail.com; ignaciolescano@gmail.com

Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales

Universidad Nacional de Córdoba

¹Dirección actual: CiQuiBiC-CONICET. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba

Resumen

Las condiciones de estrés producen desbalances metabólicos que limitan el crecimiento de las plantas y disminuyen su rendimiento. Se conoce que diferentes tipos de estrés abiótico conducen al aumento de los niveles de especies activas del oxígeno (EAO) y de alantoína, un metabolito derivado de la degradación de las purinas. Ha sido propuesto que, en *Arabidopsis thaliana*, el transporte de alantoína a larga distancia, mediante el transportador Ureido Permeasa 5 (*AtUPS5*), podría estar implicado en dicha tolerancia al estrés. Por ello, el objetivo de este trabajo fue conocer si dicho transporte está vinculado con la regulación de los niveles de EAO.

En primer lugar, se caracterizó el transporte de alantoína en líneas WT, *knockout* y sobreexpresantes del transportador, mediante determinación colorimétrica del contenido de alantoína en parte aérea, encontrando diferencias significativas a las 3 horas de trasplante a medio suplementado con alantoína. Posteriormente, plantas tratadas con alantoína exógena por 3 y 24 horas fueron incubadas en soluciones de NBT (Nitrobluetetrazolium) y DAB (Diaminobencidina), a fin de estimar semi-cuantitativamente mediante análisis de imágenes los niveles de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 , respectivamente. Luego de 3 horas de tratamiento con alantoína exógena suministrada por raíz, las plantas *ups5* mostraron una disminución en sus niveles de $O_2^{\cdot-}$ foliares. Sin embargo, a las 24 horas de tratamiento, ambos genotipos presentaron un aumento en los niveles de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 . Estos resultados apoyan la hipótesis de que la alantoína tenga un rol en la modulación de las EAO en parte aérea, aunque probablemente existan otros transportadores que se activen bajo tratamientos mayores a 3 horas con alantoína exógena.

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

Introducción

Actualmente, gran parte del conocimiento que se genera en dentro de las Ciencias de la Vida se debe a la utilización de organismos modelo. La comunidad científica ha consensuado la necesidad de concentrar los esfuerzos en un único organismo, a fin de integrar los conocimientos provenientes de diferentes disciplinas clásicas, con los nuevos aportes de la genética y biología molecular (Koornneef & Meinke, 2010). Particularmente, dentro de la Fisiología Vegetal es ampliamente utilizada la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, debido a que su desarrollo rápido, pequeño tamaño, limitados requerimientos nutricionales, gran producción de semillas y capacidad de ser fácilmente transformada en forma estable la convierten una excelente herramienta para el trabajo en el laboratorio (Koornneef & Meinke, 2010). Además, su genoma ha sido completamente secuenciado, y se dispone de librerías de datos de transcriptómica y proteómica de esta planta en condiciones normales de crecimiento o bajo diversas situaciones de estrés. Estos conocimientos básicos, son de suma utilidad para posteriormente estudiar especies de interés agronómico, optimizando tiempos y evitando gastos innecesarios.

Se conoce como estrés vegetal a aquellas alteraciones en la homeostasis causadas

por condiciones de crecimiento desfavorables; que pueden ser factores abióticos, como la disponibilidad de agua y nutrientes, insolación, temperatura, salinidad y contaminación del suelo; o bióticos, como la herbivoría y el ataque por agentes patógenos como virus, bacterias y hongos.

Las plantas, al ser sésiles, han desarrollado diversos mecanismos que les permiten adecuarse fisiológicamente al nuevo estado ambiental a fin de tolerar al estrés (Taiz y Zeiger, 2006). Estos procesos involucran cambios metabólicos, en la expresión génica y en el balance hormonal que implican ajustes en los procesos de desarrollo (Rao, 2006). Se ha observado que distintos tipos de estrés promueven respuestas fisiológicas comunes, como por ejemplo, regulación de los niveles hormonales, disminución de la eficiencia fotosintética, alteraciones en la síntesis proteica y modificaciones en la biosíntesis de osmoprotectores, factores de transcripción, y secuestradores de especies activas del oxígeno (EAO) (Rao, 2006).

Tradicionalmente las EAO, tales como el oxígeno singulete (1O_2), el ión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot), fueron descritas como un producto tóxico del metabolismo aeróbico (Mittler, 2002). También, se

conoce que las condiciones de alta intensidad lumínica, sequía, salinidad, temperatura, presencia de metales pesados, radiación UV, déficit nutricional y contaminación ambiental promueven un desbalance entre la generación y la eliminación de las EAO (Reddy y Raghavendra, 2006).

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

Entre los metabolitos nitrogenados, cuya síntesis y degradación se encuentra alterada bajo situaciones de estrés, particularmente salino y osmótico, en los últimos años ha merecido especial atención la alantoína (Shestopalov y *Cols.*,

2006), un ureido generado en la vía de degradación de las purinas. Numerosos trabajos han descrito que distintas condiciones de estrés abiótico promueven la acumulación de alantoína en *Arabidopsis*, como la oscuridad prolongada (Brychkova y *Cols.*, 2008), estrés osmótico (Watanabe y *Cols.*, 2014), salino (Lescano y *Cols.*, 2016), estrés por contaminación con metales pesados (Nourimand y *Cols.*, 2016), sequía (Irani y Todd, 2016) y alta intensidad lumínica (Irani y *Cols.*, 2017).

Existen varias hipótesis sobre el rol de la alantoína en relación al estrés. Por un lado, podría ejercer protección oxidativa mediante el secuestro directo de EAO (Gus'kov y *Cols.*, 2002; Brychkova y *Cols.*, 2008). Por otro lado, se la ha vinculado con la señalización de respuestas de tolerancia al estrés, a través del ajuste de los niveles de hormonas tales como ABA y ácido Jasmónico (JA) (Watanabe y *Cols.*, 2014; Takagi y *Cols.*, 2016). Otros estudios sugieren que la acumulación de alantoína favorecería la tolerancia al estrés abiótico mediante la reducción del daño oxidativo, por inducción de las enzimas antioxidantes *AtSOD* y *AtAPX* (Nourimand y *Cols.*, 2016). En nuestro grupo de investigación se ha estudiado el transporte de alantoína en *Arabidopsis* desde hace varios años. En su Tesis Doctoral, Lescano (2017) observó que en condiciones de estrés salino, las concentraciones de alantoína en la parte aérea duplican a las de la raíz, sugiriendo

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

también se encontró en la red trans-Golgi. Estos resultados sugieren que estas variantes de *splicing* de *AtUPS5* estarían involucradas en la removilización y compartimentalización subcelular de la alantoína.

Objetivos:

Objetivo general:

Conocer si el transporte de alantoína desde la raíz a la parte aérea está vinculado con la regulación de los niveles de EAO.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar el transporte de alantoína desde la raíz a la parte aérea en plantas WT, mutantes *AtUPS5 knockout* y líneas sobreexpresantes de este transportador, mediante su aplicación en forma exógena.
2. Cuantificar la producción de EAO en parte aérea en plantas tratadas con alantoína exógena.

Materiales y métodos

Material vegetal:

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

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

- Línea de inserción de T-DNA en *AtUPS5* (*ups5.1*, Salk_044810); obtenida del *Arabidopsis Resource Center* (ARBC, Universidad del Estado de Ohio) y confirmadas por PCR y RT-PCR por Lescano y *Cols.*, (2016).
- Líneas pUBI10:UPS5L::eGFP4/*ups5.1* y pUBI10:UPS5s::mRFP/*ups5.1*: Líneas que expresan dos variantes de *splicing* de UPS5, UPS5L (forma larga) y UPS5s (forma corta), en las que se fusionaron las proteínas fluorescentes verde y roja, respectivamente, a sus *loop* centrales. Estas construcciones se expresaron bajo el control del promotor constitutivo pUBI10, en un *background ups5.1*.

Condiciones de crecimiento:

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

La siembra se realizó dicha campana utilizando palillos estériles y las placas fueron selladas. Se estratificaron en oscuridad durante 48-72 horas a 4°C. El objetivo de este paso es homogeneizar los tiempos de germinación de las semillas. Posteriormente, las placas fueron transferidas a una cámara de cultivo y colocadas en forma vertical (Figura 3) bajo las condiciones controladas: 80 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ PAR de intensidad lumínica, 22°C y fotoperíodo 16:8.

Cuantificación de alantoína.

Para determinar la concentración de alantoína, las muestras fueron hervidas en agua destilada durante 20 minutos, centrifugadas por 5 minutos a 14.000 RPM. Los sobrenadantes fueron rescatados y de cada uno se separaron tres extractos (A, B y C). En primer lugar, se realizó una hidrólisis básica en los tubos C con Na(OH) 0,5 N a 100°C durante 8 minutos y, posteriormente, una hidrólisis ácida con HCl (0,15 N para los tubos B y 0,65N para los tubos C) a 100°C durante 4 minutos. Luego, todos los tubos fueron enfriados en baño de hielo, y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente con buffer K_3PO_4 y fenilhidrazina. Por último, se realizó una incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente con HCl y $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e inmediatamente se midió la absorbancia a 520 nm. Se determinaron las absorbancias absolutas descontando

los valores de los diferentes tubos: A₅₂₀B-A₅₂₀A para ácido alantoico y A₅₂₀C-A₅₂₀B para alantoína, de acuerdo al protocolo propuesto por Vogels y Van der Drift (1970) y modificado por Lescano y *Co/s.* (2016).

Determinación de los niveles de EAO.

Se determinó el nivel de O₂⁻ mediante tinción con cloruro de nitrobluetetrazolium (NBT) de acuerdo al protocolo propuesto por Jabs y *Co/s.* (1996). Las muestras fueron lavadas y colocadas en NBT 0,01 %. Posteriormente, se infiltraron realizando vacío durante 2'30'' cortando cada 15'' y fueron incubadas a 28°C durante una hora. La determinación del nivel de H₂O₂ se realizó mediante incubación con diaminobencidina (DAB) 1mg/ml durante 24 horas a temperatura ambiente de acuerdo a lo propuesto por Brychkova y *Co/s.*, (2008).

Luego de la incubación, se extrajeron las clorofilas de las muestras con etanol 70% durante 5 minutos a 80 °C. Tanto el NBT como el DAB, al reaccionar con O₂⁻ y H₂O₂, respectivamente, forman un precipitado coloreado en el lugar donde se producen estas EAO. Por lo tanto, las tinciones fueron visualizadas con lupa, se obtuvieron imágenes que se analizaron utilizando el software ImageJ (Schindelin y *Co/s.*, 2012) y se estimaron los niveles de ambas EAO mediante la cuantificación de la intensidad de color.

Tratamiento de los datos y análisis estadístico:

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Infostat (Di Rienzo y *Co/s.*, 2013). En los experimentos en los que se estudió la translocación de alantoína y se determinó su contenido en parte aérea, se realizaron 4 réplicas estando cada una constituida por aproximadamente 20 mg de PF de material vegetal. Los valores absolutos fueron relativizados al PF de la réplica. Se utilizó el Test DGC, con p-valor<0,05. En los experimentos en los que se realizó una estimación semicuantitativa de los niveles de EAO mediante análisis de imágenes, cada hoja constituyó una réplica, teniendo 20 réplicas por cada tratamiento. Se utilizó el Test Duncan, con p-valor<0,05.

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

Resultados y Discusión

Para caracterizar la translocación de alantoína, se trasplantaron plántulas de 7 días de edad a medio MS 0,5X control o suplementado con alantoína 5 mM y se determinó el contenido de ureidos en la parte aérea luego de 3 y 6 horas de tratamiento (Figura 1, a). Se encontró que a las 3 horas de tratamiento el contenido de alantoína en la parte aérea de las plantas tratadas ya es de aproximadamente 5

veces el de las plantas control. Seguidamente, se comparó el transporte de alantoína entre líneas WT, *knockout* en *AtUPS5* (línea *ups5.1*) y dos líneas que

expresan las variantes de *splicing* corta y larga de este transportador (líneas pUBI10:UPS5s::mRFP/*ups5* y pUBI10:UPS5L::eGFP4/*ups5*; Figura 2, b).

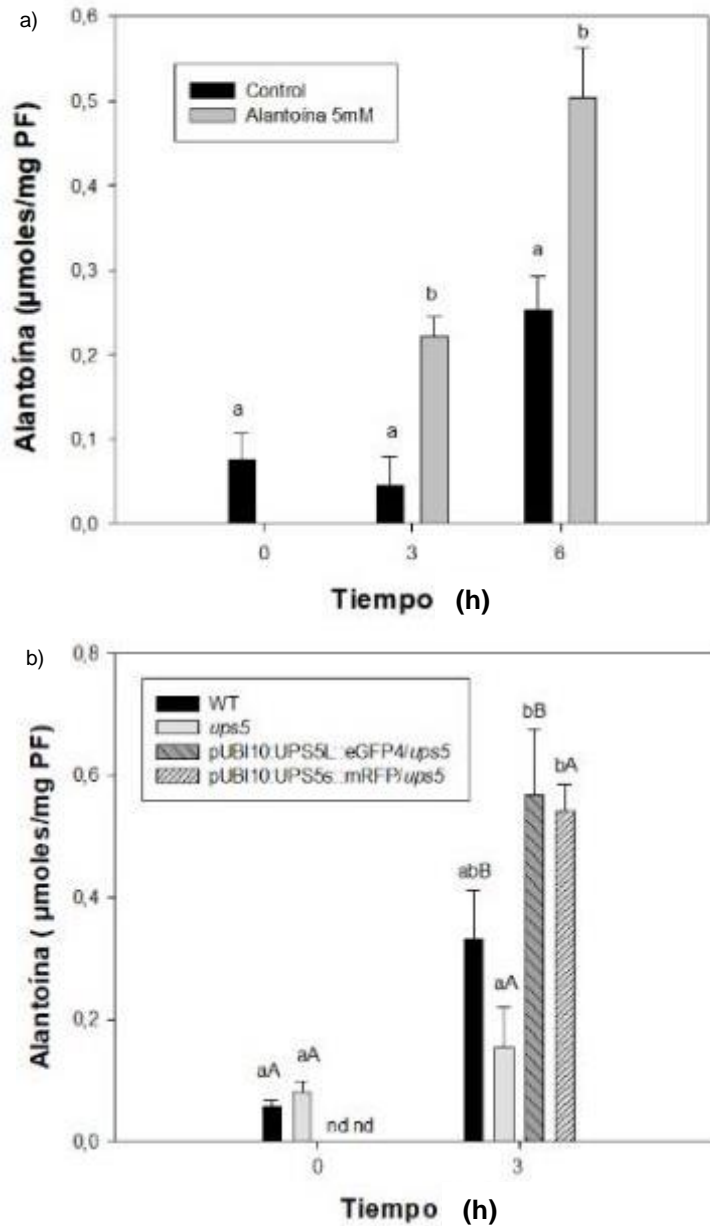


Figura 1: Estudio del transporte de alantoína de raíz a parte aérea. Determinación del contenido de alantoína en parte aérea de plantas a) WT tratadas por 3 y 6 horas y b) WT, *ups5*, pUBI10:UPS5L::eGFP4/*ups5* y pUBI10:UPS5s::mRFP/*ups5* tratadas por 3 horas; mediante trasplante a medio MS 0,5X suplementado con alantoína 5mM. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre genotipos para el mismo tiempo. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los distintos tiempos para el mismo genotipo. nd= no detectado (Test DGC, n=4, p-valor<0,05)

No se encontraron diferencias significativas entre los genotipos WT y *ups5* antes de realizar el trasplante al medio suplementado. El contenido de alantoína inicial de las líneas pUBI10:UPS5L::eGFP4/*ups5* y pUBI10:UPS5s::mRFP/*ups5* fue tan bajo que resultó indetectable mediante la técnica utilizada (Figura 1, b). En cambio, luego de 3 horas de tratamiento, todas las líneas, exceptuando *ups5*, reportaron un aumento estadísticamente significativo respecto a sus controles, en los niveles de alantoína en la parte aérea. Curiosamente, las líneas pUBI10:UPS5L::eGFP4/*ups5* y pUBI10:UPS5s::mRFP/*ups5* presentaron cerca del doble del contenido de alantoína en parte aérea respecto al genotipo silvestre; y triplicaron el de los mutantes *ups5* (Figura 1, b). Este resultado, indica que la expresión de *UPS5L* o *UPS5s* en *ups5* complementó el transporte de alantoína, coincidiendo con los experimentos de crecimiento de estas líneas utilizando alantoína como única fuente de nitrógeno realizados por Lescano (2017).

Estos resultados sugieren que *AtUPS5* está implicado en el transporte de alantoína de raíz a parte aérea y que ambas variantes de splicing son igualmente importantes en el mismo.

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

Habiendo caracterizado el transporte de alantoína mediado *AtUPS5*, en este trabajo resultó de interés conocer la relación de este proceso con la evolución del nivel de EAO en la parte aérea. Para ello, plántulas WT y *ups5* de 10 días de edad fueron trasplantadas a medio suplementado con alantoína 5 mM durante 3 y 24 horas e incubadas con Nitrobluetetrazolium (NBT) (Figura 2) y Diaminobencidina (DAB) (Figura 3). Adicionalmente, se realizaron controles, con trasplantes a medio no suplementado.

En general, el tratamiento con alantoína exógena indujo un aumento en los niveles de EAO foliares en el genotipo silvestre. Se encontró un aumento, aunque no estadísticamente significativo, en los niveles de $O_2^{\cdot-}$ tanto a las 3 como a las 24 horas de tratamiento (Figura 2). Si bien luego de 3 horas de incubación no se detectaron cambios en los niveles de H_2O_2 en la parte aérea de las plantas WT; luego de 24 horas de tratamiento, se observó un aumento significativo en esta EAO (Figura 3). Estos resultados sugieren que el aumento de la concentración de alantoína en parte aérea debido a su translocación promueve el aumento de los niveles de EAO foliares.

Por otro lado, luego de 3 horas de tratamiento con alantoína exógena, se observaron niveles menores de $O_2^{\cdot-}$ en las partes aéreas de los mutantes *ups5*, respecto a su control y al genotipo silvestre

(Figura 2). Consistentemente con lo anterior, este resultado sugiere que el transporte de alantoína ineficiente de los mutantes *ups5* (Figura 1, b), estaría relacionado con una menor producción de O_2^- en su parte aérea. En esta línea, al igual que en las plantas WT, no fueron

registradas diferencias en los niveles de H_2O_2 luego de 3 horas de tratamiento (Figura 3).

Curiosamente, ambos genotipos presentaron un aumento en O_2^- y H_2O_2 luego de 24 horas de tratamiento con alantoína exógena (Figuras 2 y 3). Si bien

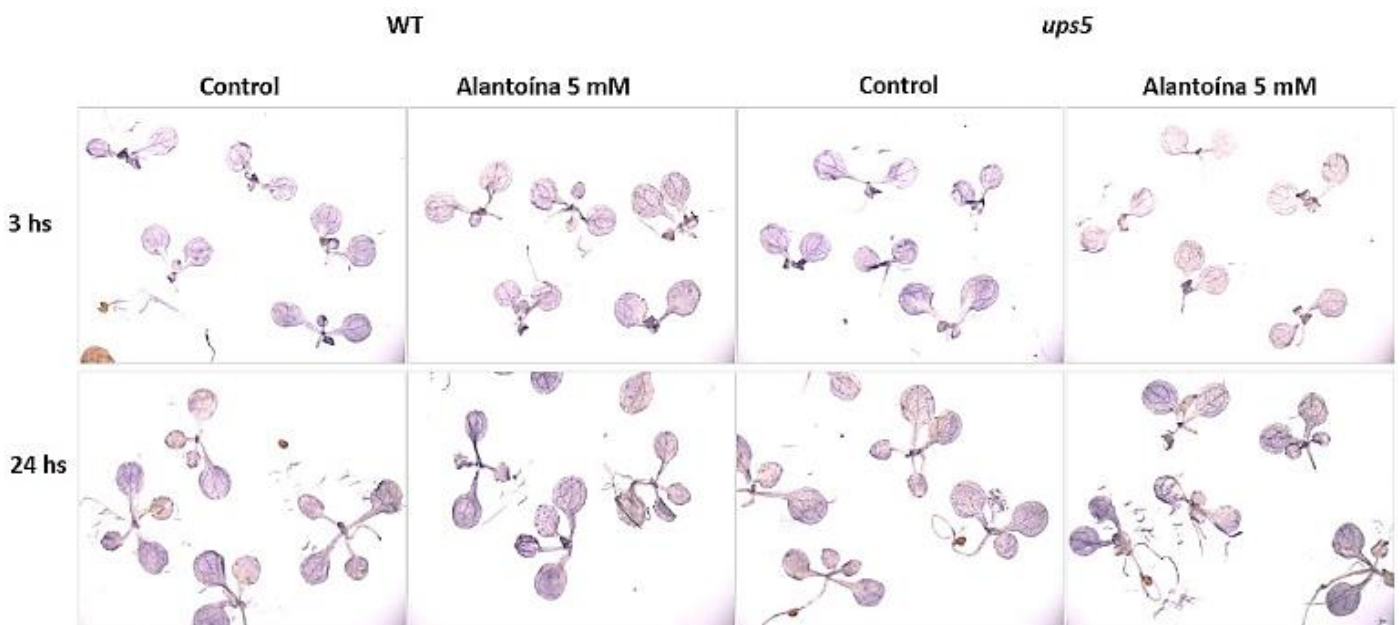
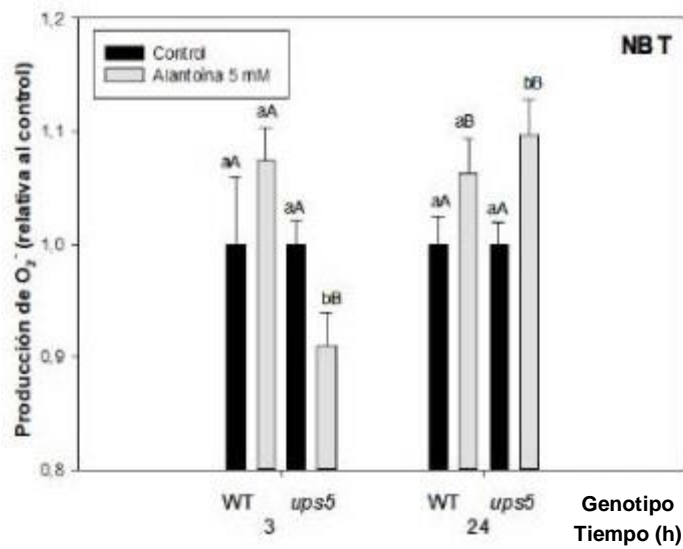


Figura 2: Determinación semicuantitativa de los niveles de O_2^- de plantas WT y *ups5* tratadas con alantoína 5 mM por 3 y 24 horas. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para el mismo genotipo y tiempo. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre genotipos para el mismo tratamiento y tiempo (Test Duncan, n=20; p-valor<0,05).

este resultado apoyaría la hipótesis de que la alantoína promueve el incremento en los niveles de EAO, sugiere que la translocación de alantoína en *Arabidopsis* no solamente está mediada por *AtUPS5*. Podría acontecer que bajo tratamientos mayores a 3 horas con alantoína exógena se active la expresión de otro transportador

de ureidos, o que aumente el transporte mediado por transportadores con menor afinidad a la misma. En relación a esto, se han descrito otros transportadores candidatos a transportar alantoína en *Arabidopsis* (Desimone y *Co/s.*, 2002). Particularmente, se ha observado que *AtUPS1* se expresa en mayor medida en

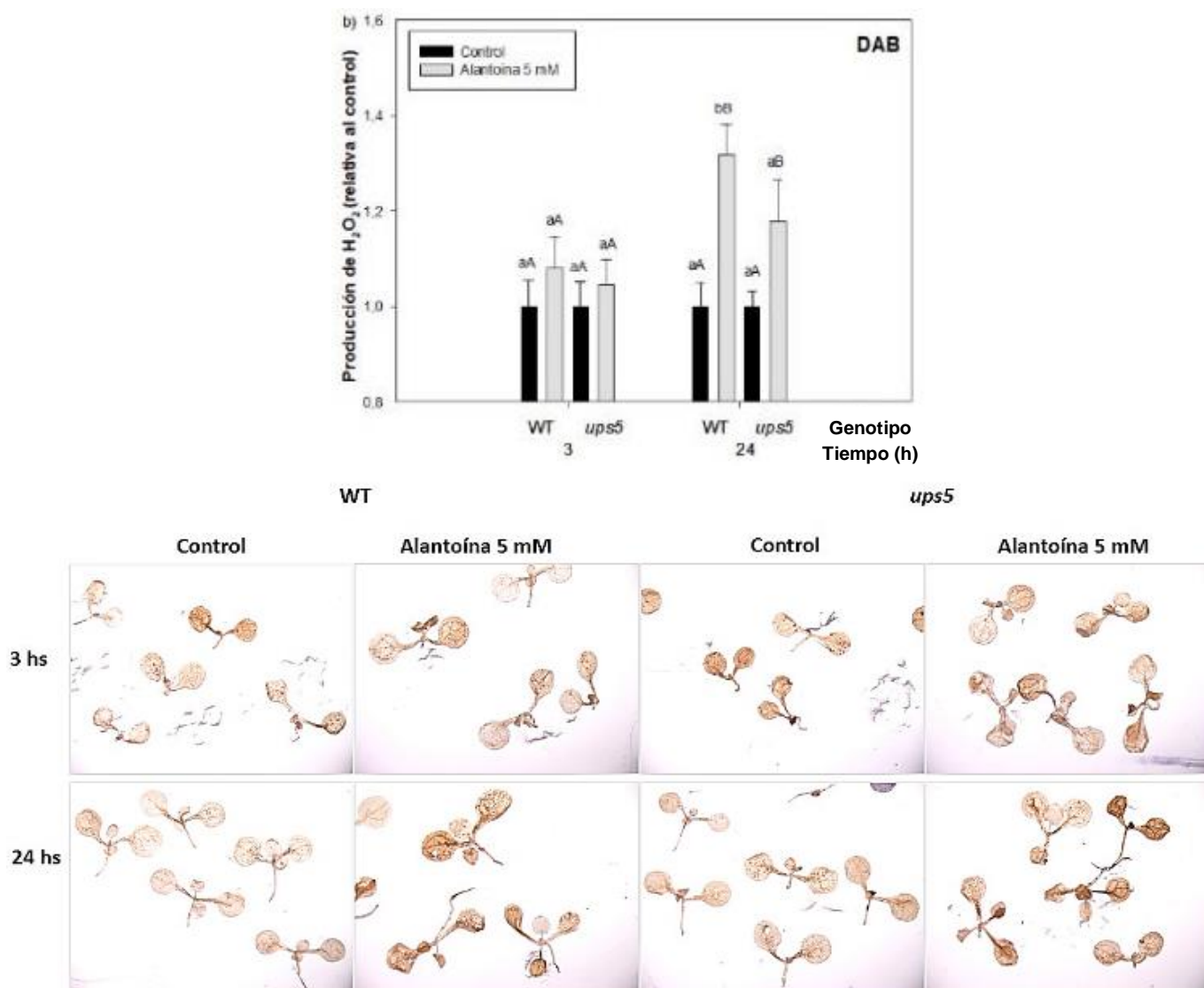


Figura 3: Determinación semicuantitativa de los niveles de H₂O₂ de plantas WT y *ups5* tratadas con alantoína 5 mM por 3 y 24 horas. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para el mismo genotipo y tiempo. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre genotipos para el mismo tratamiento y tiempo (Test Duncan, n=20; p-valor<0,05).

plantas que crecen en medio con alantoína como única fuente de nitrógeno en relación a aquellas crecidas con NH_4NO_3 (Desimone y *Cols.*, 2002); eventualmente *AtUPS1* también podría activarse en tratamiento con alantoína exógena como fuente adicional de nitrógeno. Por otro lado, UPS5 posee mayor afinidad a la alantoína que a otras nucleobases; mientras que UPS1 es más afín al uracilo (Schmidt y *Cols.*, 2004), lo que haría que el transporte de alantoína mediado por *AtUPS5* sea más rápido que aquel mediado por *AtUPS1*. Estudiar la expresión de otras Permeasas de Ureidos, como *AtUPS1*, en respuesta a tratamientos con alantoína exógena como fuente adicional de nitrógeno, permitiría desentrañar aún más el rol del transporte a larga distancia de alantoína en la modulación de las EAO.

Los resultados de este trabajo no apoyan la hipótesis de que la alantoína sea un secuestrador de EAO, ya que su aplicación en forma exógena condujo a un aumento en las EAO. En relación a esto, si bien se ha sugerido que la alantoína podría actuar como antioxidante directo, teniendo un efecto protector sobre la mutagénesis inducida por H_2O_2 en *E. Coli* (Gus'kov y *Cols.*, 2002); no se encontró actividad antioxidante *in vitro* mediante ensayos de secuestro de radicales libres, inhibición de la peroxidación del ácido linoleico y poder reductor (Wang y *Cols.*, 2012). Además, el

hecho de que los niveles de alantoína determinados en tejidos vegetales sea del orden micromolar (Figura 1), mientras que la de los antioxidantes no enzimáticos clásicos, Ascorbato y Glutación, es del orden milimolar, plantea aún más incertidumbres acerca de un efecto antioxidante directo de la misma. No obstante, se debe tener en cuenta que poco se conoce sobre la compartimentalización subcelular de la alantoína. Es probable que en algún compartimento, como el Peroxisoma o el Retículo Endoplasmático, donde se encuentran las enzimas para su síntesis y degradación respectivamente (Watanabe y *Cols.*, 2014), la alantoína alcance concentraciones mayores.

En cambio, el hecho de que la alantoína exógena moduló los niveles de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en la parte aérea de las plantas apoyaría la hipótesis sobre un rol señalizador de la misma. Al respecto, Watanabe y *Cols.* (2014) propone que la alantoína confiere tolerancia al estrés salino mediante la activación de genes de síntesis y desconjugación de ABA. Se conoce que el aumento en los niveles de esta hormona en situaciones de estrés deriva en la activación de otros sistemas hormonales y del sistema antioxidante enzimático (Taiz y Zeiger, 2006). En relación a esto, Takagi y *Cols.*, (2016) encuentra que los mutantes *aln-1* tienen activada constitutivamente la síntesis de JA, siendo este fenotipo

dependiente de ABA; y Nourimand y *Col.s.* (2016) describe que los mutantes *aln-3* poseen niveles elevados de varias enzimas del sistema antioxidante. Por otro lado, se conoce que las EAO cumplen un rol dual en la respuesta de las plantas al estrés, tanto como productos tóxicos del metabolismo o como moléculas de transducción de señales, para aclimatarse o activar respuestas de defensa (Miller y *Col.s.*, 2010). A raíz de los resultados de este trabajo, se propone que la

translocación de alantoína promueve la producción de EAO; que podrían señalar el aumento de los niveles de ABA, derivando en las respuesta de tolerancia al estrés ya descritas. En la figura 4 se propone un modelo que relaciona a la alantoína con la tolerancia al estrés abiótico.

Vale aclarar que poco es lo que se conoce acerca de la compartimentalización y removilización subcelular de alantoína. Lescano (2017), describió que UPS5s y

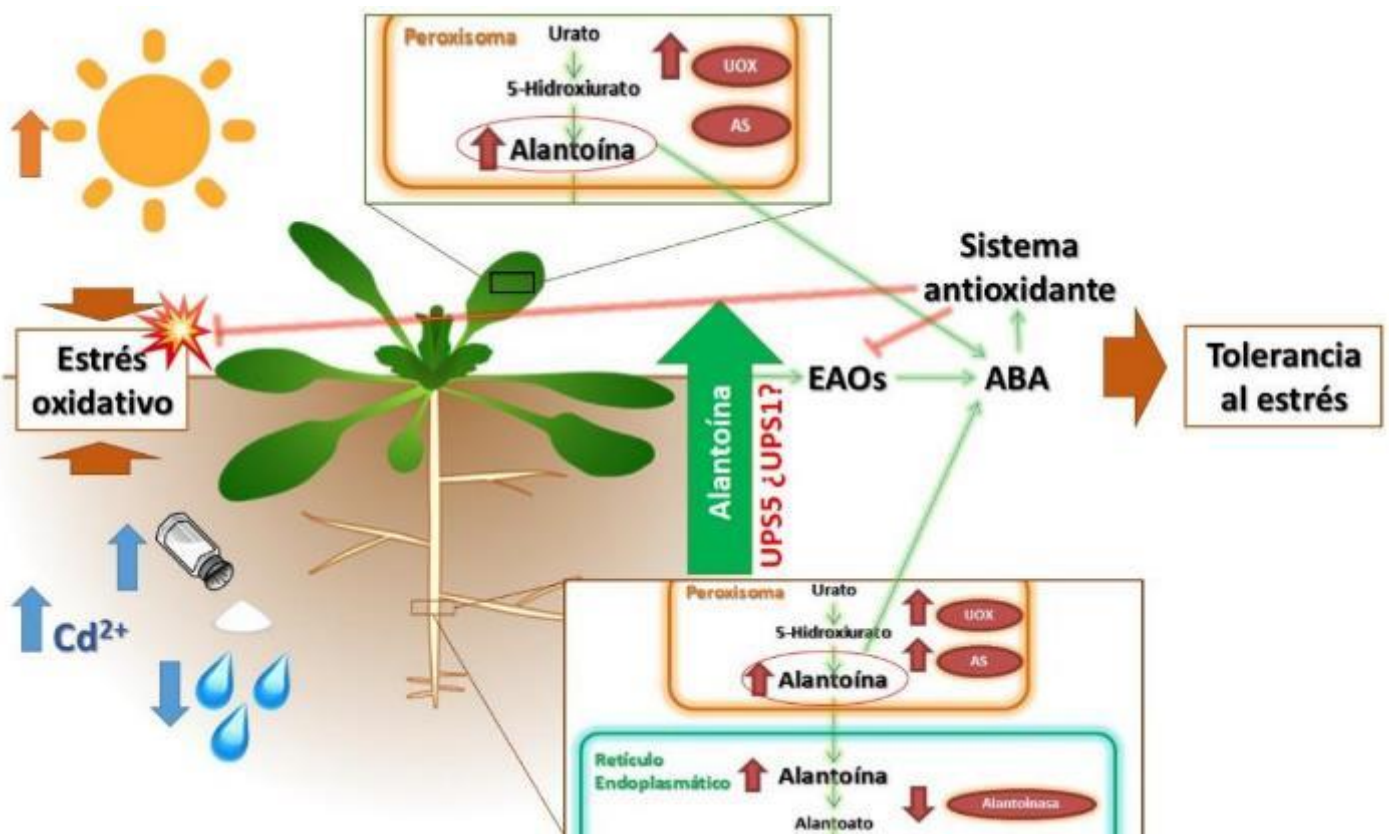


Figura 4: Rol de la alantoína en la tolerancia al estrés abiótico. Las condiciones de estrés abiótico, tales como la alta intensidad lumínica, el incremento en la salinidad del suelo, el déficit hídrico y la contaminación por metales pesados, conducen al estrés oxidativo y a la acumulación de alantoína. Esta acumulación se da en la raíz por un incremento en la expresión de las enzimas *AtUOX* y *AtAS* y una represión de la síntesis de *AtALN* (Lescano y *Col.s.*, 2016), y en la parte aérea por un incremento en la expresión de *AtUOX* (Irani y *Col.s.*, 2017), principalmente; promoviendo la síntesis y desconjugación de ABA. El transporte de alantoína de raíz a parte aérea, mediante *AtUPS5*, bajo tratamientos cortos con alantoína exógena, y otro transportador, probablemente *AtUPS1*, en tratamientos largos; está implicado en la modulación de las EAO en parte aérea, que también podrían señalar al incremento del ABA. El ABA induce al sistema antioxidante enzimático, lo que deriva en la disminución de los niveles de EAO y la consecuente tolerancia al estrés.

UPS5L se expresan en el RE y USP5L también en la red trans-Golgi; lo que sugiere que estas variantes de *AtUPS5* están implicadas en la compartimentalización de la alantoína. Por otro lado, experimentos de complementación de levaduras (Schmidt y *Col.s.*, 2006) y utilizando reporteros fluorescentes (Lescano, 2017) sugieren que estas dos variantes de *AtUPS5* presentarían diferente orientación en las membranas; indicando una función diferencial de las mismas en la removilización de la alantoína. Esto, sumado al hecho de que las líneas que expresan estas variantes muestran un transporte rápido de alantoína de raíz a parte aérea (Figura 1, b) las convierte en excelentes candidatas para continuar estudiando la compartimentalización de la alantoína y sus posibles implicancias en la regulación de las EAO.

Conclusiones

A partir de los resultados del presente trabajo se concluyó que, en primer lugar, el transportador *AtUPS5* está involucrado en la translocación de alantoína y que las variantes de *splicing* corta y larga del mismo son igualmente funcionales en este proceso. A su vez, se encontró que el transporte de alantoína a larga distancia promueve la producción de EAO en la parte aérea del genotipo silvestre. Sin embargo, también se produjo aumento en los niveles

de H₂O₂ en los mutantes *ups5* bajo tratamiento con alantoína exógena durante 24 horas, lo que sugiere que *AtUPS5* no es el único transportador involucrado en la translocación bajo tratamientos más largos.

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

Bibliografía:

- Brychkova, G., Alikulov, Z., Fluhr, R., & Sagi, M. (2008). A critical role for ureides in dark and senescence-induced purine remobilization is unmasked in the *Atxdh1* Arabidopsis mutant. *The Plant Journal*, 54(3), 496-509.
- Desimone, M., Catoni, E., Ludewig, U., Hilpert, M., Schneider, A., Kunze, R., ... & Schumacher, K. (2002). A novel superfamily of transporters for allantoin and other oxo derivatives of nitrogen heterocyclic compounds in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 14(4), 847-856.
- Dinneny, J. R., Long, T. a, Wang, J. Y., Jung, J. W., Mace, D., Pointer, S., Barron, C., Brady, S. M., Schiefelbein, J., Benfey, P. N. (2008). Cell identity mediates the response of Arabidopsis roots to abiotic stress. *Science*, 320(5878), 942–945.
- Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C (2013)

- InfoStat Versión 2013. Grupo InfoStat. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Foyer, C. H. (2002). The contribution of photosynthetic oxygen metabolism to oxidative stress in plants. In: *Oxidative stress in plants* (Inzé, D. and M. V. Montago eds.), New York, USA: Taylor and Francis Publishers, pp. 33-68.
- Gus' kov, E. P., Kletskii, M. E., Kornienko, I. V., Olekhovich, L. P., Chistyakov, V. A., Shkurat, T. P., Prokof'ev V.N., & Zhdanov, Y. A. (2002). Allantoin as a free-radical scavenger. In *Doklady Biochemistry and Biophysics* (Vol. 383, No. 1, pp. 105-108). MAIK Nauka/Interperiodica.
- Irani, S., & Todd, C. D. (2016). Ureide metabolism under abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of plant physiology*, 199, 87-95.
- Irani, S., Lobo, J. M., Gray, G. R., & Todd, C. D. (2017). Allantoin accumulation in response to increased growth irradiance in *Arabidopsis thaliana*. *Biologia Plantarum*, 1-7.
- Jabs, T., Dietrich, R. A., & Dangl, J. L. (1996). Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science-AAAS-Weekly Paper Edition*, 273(5283), 1853-1855.
- Koornneef, M., & Meinke, D. (2010). The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The Plant Journal*, 61(6), 909-921.
- Kwak, J. M., Mori, I. C., Pei, Z. M., Leonhardt, N., Torres, M. A., Dangl, J. L., ... & Schroeder, J. I. (2003). NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *The EMBO journal*, 22(11), 2623-2633.
- Lescano, C. I., Martini, C., González, C. A., & Desimone, M. (2016). Allantoin accumulation mediated by allantoinase downregulation and transport by Ureide Permease 5 confers salt stress tolerance to *Arabidopsis* plants. *Plant Molecular Biology*, 91(4-5), 581-595
- Lescano, C. I (2017) Función de la síntesis, acumulación y transporte de ureidos en *Arabidopsis thaliana* L. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Córdoba
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., & Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, cell & environment*, 33(4), 453-467.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*, 9(10), 490-498.
- Mittler, R., & Blumwald, E. (2015). The Roles of ROS and ABA in Systemic Acquired Acclimation. *The Plant Cell Online*, 27(1), 64-70.
- Nourimand, M., & Todd, C. D. (2016). Allantoin increases cadmium tolerance in

- Arabidopsis via activation of antioxidant mechanisms. *Plant and Cell Physiology*, 57(12), 2485-2496.
- Rao, K. M. (2006) Introduction. En Rao, K. M., Raghavendra, A. S., & Reddy, K. J. (Eds.). (2006). *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. Pp 1-14. Springer Science & Business Media.
- Reddy, K. J & Raghavendra, A. S. (2006). Photooxidative stress. En Rao, K. M., Raghavendra, A. S., & Reddy, K. J. (Eds.). (2006). *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. Pp 157- 186. Springer Science & Business Media.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... & Tinevez, J. Y. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676-682.
- Schmidt, A., Su, Y. H., Kunze, R., Warner, S., Hewitt, M., Slocum, R. D., ... & Desimone, M. (2004). UPS1 and UPS2 from Arabidopsis mediate high affinity transport of uracil and 5-fluorouracil. *Journal of Biological Chemistry*, 279(43), 44817-44824.
- Schmidt, A., Baumann, N., Schwarzkopf, A., Frommer, W. B., & Desimone, M. (2006). Comparative studies on Ureide Permeases in Arabidopsis thaliana and analysis of two alternative splice variants of AtUPS5. *Planta*, 224(6), 1329–1340.
- Shestopalov, A. V., Shkurat, T. P., Mikashinovich, Z. I., Kryzhanovskaya, I. O., Bogacheva, M. A., Lomteva, S. V., Prokof'eva, V.N., and Gus'kov, E. P. (2006). Biological functions of allantoin. *Biology Bulletin*, 33(5), 437–440.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal* (Vol. 10). Universitat Jaume I.
- Takagi, H., Ishiga, Y., Watanabe, S., Konishi, T., Egusa, M., Akiyoshi, N., ... Sakamoto, A. (2016). Allantoin, a stress-related purine metabolite, can activate jasmonate signaling in a MYC2-regulated and abscisic acid-dependent manner. *Journal of Experimental Botany*, 67(8), 2519–2532.
- Vogels, G. D., & Van der Drift, C. (1970). Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Analytical biochemistry*, 33(1), 143-157.
- Wang, P., Kong, C. H., Sun, B., & Xu, X. H. (2012). Distribution and function of allantoin (5-ureidohydantoin) in rice grains. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(11), 2793-2798.
- Watanabe, S., Matsumoto, M., Hakomori, Y., Takagi, H., Shimada, H., & Sakamoto, A. (2014). The purine metabolite allantoin enhances abiotic stress tolerance through synergistic activation of abscisic acid metabolism. *Plant, Cell and Environment*, 37(4), 1022–1036.

Financiamiento:

La autora del trabajo obtuvo una beca Estímulo a las Vocaciones Científicas (Consejo Interuniversitario Nacional) con el presente proyecto.