



UNIVERSIDAD DE JAÉN
FACULTAD DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
EXPERIMENTAL

TESIS DOCTORAL

**FUNCIÓN DE LAS ESPECIES DE NITRÓGENO
REACTIVO EN LA MODULACIÓN DE LA
RESPUESTA DE PLÁNTULAS DE GIRASOL
(HELIANTHUS ANNUUS L.) FRENTE A
PROCESOS DE ESTRÉS BIÓTICO Y
ABIÓTICO**

**PRESENTADA POR:
MOUNIRA CHAKI**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. JUAN BAUTISTA BARROSO ALBARRACÍN
DR. D. ALFONSO CARRERAS EGAÑA**

JAÉN, 11 DE DICIEMBRE DE 2007

**ISBN 978-84-8439-655-0
DEPÓSITO LEGAL J-1185-2012**



ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA EXPERIMENTAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FUNCIÓN DE LAS ESPECIES DE NITRÓGENO REACTIVO EN LA
MODULACIÓN DE LA RESPUESTA DE PLÁNTULAS DE GIRASOL
(*Helianthus annuus* L.) FRENTE A PROCESOS DE ESTRÉS
BIÓTICO Y ABIÓTICO**

Mounira Chaki

TESIS DOCTORAL

2007

**FUNCIÓN DE LAS ESPECIES DE NITRÓGENO REACTIVO EN LA
MODULACIÓN DE LA RESPUESTA DE PLÁNTULAS DE GIRASOL
(*Helianthus annuus* L.) FRENTE A PROCESOS DE ESTRÉS
BIÓTICO Y ABIÓTICO**

Memoria que presenta la Licenciada en Biología
Mounira Chaki para optar al grado de **Doctorado Europeo**

Fdo. **Mounira Chaki**

V^oB^o

LOS DIRECTORES DEL TRABAJO

Fdo. Dr. Juan Bautista Barroso Albarracín
Profesor Titular de la Universidad de Jaén

Fdo. Dr. Alfonso Carreras Egaña
Profesor Titular de la Universidad de Jaén

Jaén, Diciembre de 2007

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos y reuniones científicas:

➤ Implicación de las especies de nitrógeno reactivo durante el proceso de estrés biótico en la interacción girasol-mildiu. XXVI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. A Coruña, 2003.

➤ Implication of reactive nitrogen species in the biotic stress of sunflower plants by downy mildew. XIIth Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International. Buenos Aires (Argentina), 2004.

➤ Estrés biótico y abiótico en girasol: Implicación de la S-Nitrosoglutation reductasa (GSNOR). VIII Reunión de Biología Molecular de Plantas. Pamplona, 2006.

➤ Función de la S-nitrosoglutation reductasa durante el proceso de estrés biótico en girasol. VIII Reunión del grupo español de radicales libres. Valencia, 2007.

➤ Induction of nitrosothiols content as mechanism of response against abiotic stress conditions in sunflower hypocotyls. A SFFR Plant Oxygen Group meeting. Ghent (Bélgica), 2007.

➤ Identification of two new genes of manganese-superoxide dismutase in sunflower hypocotyls and functional analysis under biotic and abiotic stress conditions. 6 Plant Genomics European Meeting. Tenerife, 2007.

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones:

➤ **Chaki M.**, Carreras A., Valderrama R., Esteban F.J., Gómez-Rodríguez M.V., Pedrajas J.R., Fernández-Ocaña A., Barroso J.B. Estudio de las especies de nitrógeno reactivo en plantas durante el proceso de estrés biótico en la interacción girasol-mildiu. *Revista electrónica*. Universidad de Jaén, 2006.

➤ **Chaki M.**, Carreras A., Valderrama R., Esteban F.J., Fernández-Ocaña A., Gómez-Rodríguez M.V., Luque F., Corpas F.J., Barroso J.B. S-Nitrosoglutathione protects against nitrosative stress in the plant-pathogen interaction. *Plant Physiology*. Sometido a publicación.

➤ Corpas F.J., Carreras A., Valderrama R., **Chaki M.**, Palma J.M., del Río L.A., Barroso J.B. (2007) Reactive Nitrogen Species and Nitrosative Stress in Plants. *Plant Stress* 1: 37-41.

➤ Corpas F.J., Carreras A., Esteban F.J., **Chaki M.**, Valderrama R., del Río L.A., Barroso J.B. (2008) Localization of S-Nitrosothiols and assay of Nitric Oxide synthase and S-Nitrosoglutathione Reductase Activity in plants. *Methods in Enzymology* 437, DOI: 10.1016/S0076-6879(07)37028-6.

➤ Rodríguez-Serrano M., Fernández-Ocaña A., Gómez-Rodríguez M.V., **Chaki M.**, Luque F., Valderrama R., Carreras A., Barroso J.B., Sandalio L.M., del Río L.A., Corpas F.J. *Helianthus annuus* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase mRNA, partial cds. (AY941250). Differential expression of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase in response to biotic stress induced during the interaction sunflower-downy mildew, bases 1 hasta 302. Sometido a publicación.

➤ Fernández-Ocaña A., **Chaki M.**, Colmenero-Varea P., Corpas F.J., Carreras A., Gómez-Rodríguez M.V., del Río L.A., Barroso J.B., Luque F. *Helianthus annuus* Mn-superoxide dismutase I mRNA, partial cds.(DQ812551). Two new isoforms of Mn-superoxide dismutase in sunflower hypocotyls, bases 1 hasta 391. Sometido a publicación.

➤ Fernández-Ocaña A., **Chaki M.**, Colmenero-Varea P., Corpas F.J., Carreras A., Gómez-Rodríguez M.V., del Río L.A., Barroso J.B., Luque F. *Helianthus annuus* Mn-superoxide dismutase I mRNA, partial cds.(DQ812552). Two new isoforms of Mn-superoxide dismutase in sunflower hypocotyls, bases 1 hasta 391. Sometido a publicación.

Agradecimientos

Esta etapa de mi vida ha llegado a su fin. Es difícil resumir todas las vivencias, sensaciones y sentimientos que me han acompañado durante estos años. Durante la elaboración de este trabajo, he tenido la suerte de estar rodeada de muchas personas, que de una forma u otra han colaborado en su realización y otras muchas que lo han sufrido. A todas ellas mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de Tesis: el Dr. Juan Bautista Barroso Albarracín y el Dr. Alfonso Carreras Egaña, por su confianza, su orientación científica y por su continuo aporte de ideas que nos ha llevado por nuevos y diversos campos en la realización de esta Tesis.

A mis compañeros del laboratorio Raquel, Pili, Juan Carlos y José Rafa por todos esos buenos momentos que hemos pasado juntos, por la ayuda en el trabajo y el apoyo moral en los momentos difíciles.

A María Victoria por ser una gran fisióloga, por su trabajo con las plantas y Ana por su ayuda prestada en todo momento en la biología molecular y con la que he podido contar en todo momento.

Al Dr. Francisco Luque por su ayuda y asesoramiento siempre que lo he necesitado.

Al Dr. Francisco Esteban por la ayuda prestada en todo momento durante la realización de esta Tesis.

A todo el grupo de la Estación Experimental del Zaidín del profesor Luís Alfonso del Río, y en especial al Dr. Francisco Javier Corpas por su apoyo en todo momento.

Al Dr Alain Puppo y toda la gente de su grupo, en especial al Dr. Nicolas Paully, por todo lo que aprendí y disfruté durante mi estancia en Niza.

A todos mis compañeros de sala de becarios, Mapi, Ana, Paquito, Carmen, Mamen, David, Meriem, Houria, Lourdes, Rubén, Alma, Estefanía, Ángel, Nuria y Cecilia por todos los momentos buenos y menos buenos que hemos compartido.

A mis amigos Hikmate y Nabil de los que siempre he recibido buenos consejos y mucho ánimo.

Por último quiero agradecer mi familia, a pesar de estar lejos, tan presente en mi corazón. A mis padres que me han apoyado de forma incondicional en todas mis decisiones, a mi hermano y mis hermanas por su apoyo y su consejo en todo momento.

Y por supuesto, a Azzadin, que ha compartido conmigo todos estos años por su incondicional apoyo moral, su paciencia y su comprensión hasta el momento.

A mis padres y hermanos

A Azzadin

Abreviaturas

ADPRc: Adenosina difosfato ribosa cíclica

APX: Ascorbato peroxidasa

ATP: Adenosina trifosfato

BH₄: tetrahidro-L-biopterina, dihidroclorido

BSA: Abúmina sérica bovina

CaM: Calmodulina

CAP: Proteínas de aclimatación al frío

CAPS: Ácido-3-[ciclohexilamino]-1-propanosulfónico

Cat: Catalasa

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

CFA: adyuvante de Freund completo.

CHAPS: Ácido 3-[(3-colamidopropil) dimetil-amonio]-1- propanosulfónico

COR: proteínas reguladas por el frío

cPTIO: Carboxy-2-fenil-5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido

Cu/Zn-SOD: Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc

DAF: 4,5-Diaminofluoresceína

DAF-2 DA: Diacetato de 4,5-diaminofluoresceína

DCF-2T : Triazol de DAF-2

DCFDA: Fluoróforo carboxi-diclorofluoresceína diacetato

DEPC: Dietil pirocarbonato

DHAR: Deshidroascorbato reductasa

DHE: Dihidroetidio

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxinucleótido trifosfato

DTPA: N,N-bis[2-(bis[carboximetil]amino)etil]glicina

DTT: 1,4-Ditiotreitol

EDTA: Ácido etilén-diamino-tetraacético

EEM: Error estándar de la media

EGTA: Ácido etilén glicol-bis (β -aminoetil)-N-N-N'-N'-tetraacético

EM-NADP: Enzima málico dependiente de NADP

FAD: Flavín adenin dinucleótido

FALDH: Formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión

Fe-SOD: Superóxido dismutasa dependiente de hierro

FMN: Flavin mononucleótido

G6PDH-NADP: Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GR: Glutation reductasa

GSH: Glutation reducido (γ -glutamil-L-cisteinil-glicina reducida)

GSNO: S-nitrosoglutation

GSNOR: S-nitrosoglutation reductasa

GSSG: Glutation oxidado (γ -glutamil-L-cisteinil-glicina oxidado)

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

Hepes: Ácido N-[2-hidroxietil] piperacina-N'-[2-etanosulfónico]

HO[•]: Radical hidroxilo

HRP: Peroxidasa de rábano

HSE: elemento de choque térmico

HSP: proteína de choque térmico

ICDH-NADP: Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP

IFA: adyuvante de Freund incompleto

IgG: Inmunoglobulina G

IPTG: 1-isopropil-b-D-1-tiogalactopiranosido

KCN: Cianuro de potasio

LAR: Resistencia local adquirida

L-arg: L-arginina

LB: Medio de cultivo de Luria-Bertani

Leu-AP: Leucina aminopeptidasa

L-NMMA: N^w-monometil-L-arginina

Luminol: Lumigen PS-3 acridinio (5-Amino-2,3-dihidro-1,4-phthalazinadiona)

MAPK: Proteína quinasa mitogénicamente activa

MBS: Éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida

MDAR: Monodeshidroascorbato reductasa

Mn-SOD: Superóxido dismutasa dependiente de manganeso

MTV: Virus del mosaico del tabaco

NADP: Nicotinamín adenin dinucleótido fosfato oxidado

NADPH: Nicotinamín adenin dinucleótido reducido

NaIO₄: Peryodato sódico

NEM: N-etil-maleimida

Ni-NOR: Nitrito NO-reductasa

NO: Óxido nítrico

NOA: Autoanalizador de óxido nítrico
NOHA: N-hidroxiarginina
NOS: Óxido nítrico sintasa
NR: Nitrato reductasa
n-Tyr: 3-nitrotirosina
O₂·⁻: Radical superóxido
O₃: Ozono
ONOO⁻: Peroxinitrito
Pal: Fenilalanina amonía liasa
PB: Tampón fosfato
PBS: Tampón fosfato salino
PCD: Muerte celular programada
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PEP: fosfoenolpiruvato
PMSF: Fluoruro de fenil metil sulfonilo
PR: Proteínas relacionadas con patogénesis
Prx: Peroxirredoxina
PSAM: Persulfato amónico
PVDF: Difluoruro de polivinilo
PVPP: Polivinil polipirrolidona
RACE 5' / 3': Reacción de amplificación de los extremos 5' y 3' de cDNA
RFU: unidades relativas de fluorescencia
RH: Respuesta hipersensible
RNA: Ácido ribonucleico
RNA_m: Ácido ribonucleico mensajero
RNS: Especies de nitrógeno reactivo
ROS: Especies de oxígeno reactivo
RSNO: S-nitrosotiol
SA: Ácido salicílico
SAR: Resistencia sistémica adquirida
SDS: Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
S-GAL: 3,4-ciclohexenoesculetina-β-D-galactopiranosido
SOD: Superóxido dismutasa
t-BuOOH: *tert*-Butil hidroperóxido
TEMED: N,N,N',N'-Tetrametil-etilén-diamina

Abreviaturas

TMP: Tetrametilpiperidina

TMV: Virus del mosaico del tabaco

Tris: Tris-hidroximetilaminometano

UV: Radiación ultravioleta

Índice

Summary and Conclusions	1
Summary	3
Conclusions	5
1. Introducción	7
1.1. La planta de girasol	9
1.2. Origen botánico	9
1.3. El estrés en plantas	9
1.3.1. El estrés biótico	9
1.3.1.1. El hongo biotrofo <i>Plasmopara halstedii</i>	10
1.3.1.2. Interacción girasol-mildiu	11
1.3.1.3. Mecanismos de defensa de las plantas frente a patógenos	12
1.3.2. El estrés abiótico	16
1.3.2.1. Estrés inducido por temperaturas anómalas	16
1.3.2.1.1. Estrés inducido por alta temperatura	17
1.3.2.1.2. Estrés inducido por baja temperatura	17
1.3.2.2. Estrés inducido por daño mecánico	18
1.3.2.3. Estrés inducido por alta intensidad luminosa	18
1.3.2.4. Estrés inducido por luz continua	18
1.3.2.5. Estrés inducido por oscuridad	19
1.3.2.6. Mecanismos de respuesta al estrés	19
1.4. Estrés oxidativo	20
1.4.1. La molécula de oxígeno (O_2)	21
1.4.2. Especies de oxígeno reactivo (ROS)	21
1.4.2.1. El oxígeno singlete (1O_2)	24
1.4.2.2. El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	24
1.4.2.3. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	24
1.4.2.4. El radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$)	26
1.5. Mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo	26
1.5.1. Antioxidantes no enzimáticos	27
1.5.1.1. El ascorbato	27
1.5.1.2. El glutatión	27
1.5.1.3. Los tocoferoles	28
1.5.1.4. Los carotenoides	29
1.5.1.5. Los flavonoides	29
1.5.2. Antioxidantes enzimáticos	29

1.5.2.1. Superóxido dismutasas (SODs, EC 1.15.1.1) -----	29
1.5.2.2. Catalasa (Cat; EC 1.11.1.6) -----	30
1.5.2.3. Enzimas del ciclo ascorbato-glutation -----	31
1.5.2.3.1. Ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11) -----	32
1.5.2.3.2. Monodeshidroascorbato reductasa (MDAR; EC 1.6.5.4) -----	32
1.5.2.3.3. Deshidroascorbato reductasa (DHAR, EC 1.8.5.1) -----	32
1.5.2.3.4. Glutation reductasa (GR, EC 1.6.4.2) -----	33
1.5.2.4. Peroxirredoxina (Prx, EC 1.11.1.15) -----	33
1.5.2.5. Deshidrogenasas dependientes de NADP -----	33
1.5.2.5.1. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP (G6PDH-NADP; EC 1.1.1.49) -----	33
1.5.2.5.2. Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP (ICDH-NADP, EC 1.1.1.42) -----	34
1.5.2.5.3. Enzima málico dependiente de NADP (EM-NADP, EC 1.1.1.40) -----	35
1.6. Leucina aminopeptidasa (Leu-AP, EC 3.4.11.1) -----	36
1.7. El óxido nítrico en plantas -----	36
1.7.1. Especies de nitrógeno reactivo (RNSs) -----	36
1.7.1.1. El óxido nítrico (NO) -----	36
1.7.1.2. Funciones fisiológicas de óxido nítrico en plantas -----	37
1.7.1.3. Actividad óxido nítrico sintasa en plantas -----	38
1.7.1.4. Sistemas generadores de NO en plantas -----	39
1.7.1.5. Implicación de NO en la señalización celular -----	40
1.7.1.6. Peroxinitrito -----	41
1.7.2. Nitración de proteínas -----	42
1.7.3. S-nitrosilación de proteínas -----	45
1.7.3.1. Efecto de la S-nitrosilación de proteínas -----	47
1.7.4. S-nitrosotioles -----	47
1.7.4.1. S-nitrosotioles en los procesos de señalización celular -----	50
1.7.5. Actividad S-nitrosoglutation reductasa en plantas (GSNOR, EC 1.2.1.1) ---	51
1.8. La relación entre especies de oxígeno y nitrógeno reactivo en plantas -----	52
2. Objetivos -----	55
3. Material y métodos -----	59
3.1. Material vegetal -----	61
3.2. Cultivo del girasol <i>Helianthus annuus</i> L -----	61
3.3. Cultivo del hongo <i>Plasmopara halstedii</i> -----	61

3.4. Tratamiento de plántulas de girasol con distintas situaciones de estrés -----	63
3.4.1. Estrés biótico -----	63
3.4.1.1. Tratamiento de plántulas de girasol con <i>P. halstedii</i> -----	63
3.4.2. Estrés abiótico -----	63
3.4.2.1. Alta temperatura -----	63
3.4.2.2. Baja temperatura -----	63
3.4.2.3. Daño mecánico -----	63
3.4.2.4. Alta intensidad luminosa -----	64
3.4.2.5. Luz continua -----	64
3.4.2.6. Oscuridad -----	64
3.5. Tratamiento con cPTIO (secuestrador de NO) -----	64
3.6. Obtención de las muestras tras el estrés -----	65
3.7. Obtención de los homogeneizados -----	65
3.8. Determinación de la concentración de proteínas -----	66
3.9. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) -----	66
3.9.1. Tinción de proteínas con azul Coomassie -----	68
3.10. Transferencia semiseca de proteínas y detección inmunológica (western blot) -----	69
3.10.1. Transferencia semiseca -----	69
3.10.2. Bloqueo e inmunodetección por quimioluminiscencia -----	69
3.11. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas -----	72
3.11.1. Actividad S-nitrosoglutation reductasa (GSNOR) en geles nativos -----	73
3.12. Electroforesis bidimensional -----	74
3.13. Obtención, caracterización y purificación de antisuero de la S-nitrosoglutation reductasa (GSNOR) -----	76
3.13.1. Obtención de la fracción de anti-GSNOR a partir del antisuero -----	77
3.14. Determinación de peróxido de hidrógeno por espectrofluorimetría -----	77
3.15. Determinación de hidroperóxidos lipídicos -----	78
3.16. Determinación de la actividad GSNOR mediante espectrofotometría -----	79
3.17. Determinación de óxido nítrico mediante quimioluminiscencia de ozono -----	80
3.18. Determinación de S-nitrosotioles totales mediante quimioluminiscencia de ozono -----	82
3.19. Microscopía de fluorescencia y microscopía láser confocal -----	83
3.19.1. Detecciones inmunológicas mediante microscopía de fluorescencia y microscopía láser confocal -----	83

3.19.2. Detección de óxido nítrico, S-nitrosotioles totales, anión superóxido y especies de oxígeno reactivo mediante microscopía láser confocal-----	85
3.19.2.1. Detección de óxido nítrico (NO) -----	85
3.19.2.2. Detección de S-nitrosotioles totales (RSNOs)-----	86
3.19.2.3. Detección del anion superóxido (O ₂ ⁻) -----	87
3.19.2.4. Detección de las especies de oxígeno reactivo (ROS)-----	88
3.20. Microscopía electrónica -----	89
3.20.1. Preparación de muestras -----	89
3.20.2. Inmunolocalización subcelular de proteínas -----	89
3.21. Extracción, cuantificación y prueba de integridad del RNA total -----	90
3.21.1. Aislamiento del RNA total-----	90
3.21.2. Cuantificación del RNA total -----	91
3.21.3. Prueba de integridad del RNA total -----	91
3.22. Obtención del DNA complementario (cDNA) -----	92
3.23. Diseño y síntesis de cebadores para la obtención de cDNA-----	92
3.23.1. Diseño de cebadores degenerados para GSNOR y Mn-SOD-----	92
3.23.2. Amplificación mediante PCR-----	93
3.23.3. Purificación de los fragmentos de DNA -----	93
3.23.4. Reacción de ligación-----	94
3.23.5. Transformación de bacterias competentes-----	94
3.23.6. Aislamiento de plásmidos recombinantes -----	94
3.24. Diseño de cebadores específicos para la PCR a tiempo real-----	95
3.24.1. Amplificación mediante PCR a tiempo real-----	96
3.25. Reacción de amplificación de los extremos	
5' y 3' del cDNA (race 5' / 3') de la Mn-SOD -----	98
3.25.1. Diseño de cebadores para la amplificación de los extremos 5' y 3' de las dos isoformas de la Mn-SOD-----	98
3.25.2. Reacción de amplificación del extremo 5' -----	99
3.25.3. Reacción de amplificación del extremo 3' -----	101
3.25.4. Reacción de ligación-----	101
3.25.5. Transformación de bacterias competentes-----	102
3.25.6. Aislamiento de plásmidos recombinantes -----	102
4.Resultados -----	103
4.1. Efecto de la inoculación por <i>Plasmopara halstedii</i> sobre el crecimiento de plántulas de girasol-----	105
4.2. Efecto del hongo <i>P. halstedii</i> sobre el patrón electroforético de proteínas-----	106

4.3. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i>	
sobre la expresión de genes de defensa-----	106
4.4. Antioxidantes enzimáticos -----	107
4.4.1. Caracterización mediante inmunoblot de enzimas	
antioxidantes en hipocótilos de girasol-----	107
4.4.2. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i>	
sobre las enzimas antioxidantes-----	108
4.4.2.1. Superóxido dismutasa (SOD)-----	108
4.4.2.1.1. Manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD)-----	108
4.4.2.1.1.1. Características moleculares de la	
Mn-SOD1 y la Mn-SOD2 de girasol -----	109
4.4.2.1.1.2. Secuencias de la Mn-SOD1 y Mn-SOD2 de girasol----	110
4.4.2.1.1.3. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i> sobre	
el contenido en RNA mensajero de la manganeso	
superóxido dismutasa (<i>Mn-SOD</i>) -----	111
4.4.2.1.2. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i> sobre el contenido	
en Cu/Zn-superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD) -----	111
4.4.2.2. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i>	
sobre el contenido en catalasa -----	112
4.4.2.3. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i> sobre las enzimas	
del ciclo ascorbato-glutation APX, MDHAR y GR-----	112
4.4.2.4. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i> sobre las	
deshidrogenasas dependientes de NADP, G6PDH-NADP,	
EM-NADP e ICDH-NADP -----	114
4.4.2.5. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i> sobre	
el contenido en peroxirredoxina (Prx)-----	116
4.5. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i> sobre el contenido	
en proteína leucina aminopeptidasa (Leu-AP)-----	117
4.6. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i> sobre	
el contenido en peróxido de hidrógeno -----	117
4.7. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i> sobre la producción	
del anión superóxido y de especies de oxígeno reactivo -----	118
4.7.1. Detección del anión superóxido -----	118
4.7.2. Detección de especies de oxígeno reactivo -----	119
4.8. Metabolismo de las especies de nitrógeno reactivo en hipocótilos de girasol --	119
4.8.1. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i>	

sobre la producción de óxido nítrico -----	119
4.8.1.1. Caracterización de la actividad NOS dependiente de L-arginina mediante quimioluminiscencia de ozono -----	119
4.8.1.2. Detección de NO mediante quimioluminiscencia de ozono -----	122
4.8.1.3. Detección de óxido nítrico mediante microscopía láser confocal----	123
4.8.2. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i> sobre la producción de S-nitrosotioles-----	123
4.8.2.1. Detección de S-nitrosotioles totales mediante quimioluminiscencia de ozono -----	123
4.8.2.2. Detección de S-nitrosotioles mediante microscopía láser confocal-	125
4.8.3. Detección de S-nitrosoglutation en diferentes secciones de hipocótilos mediante microscopía de fluorescencia-----	126
4.8.4. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i> sobre la S-nitrosoglutation reductasa (GSNOR)-----	181
4.8.4.1. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i> sobre el contenido en RNA mensajero de la GSNOR -----	131
4.8.4.2. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i> sobre la actividad S-nitrosoglutation reductasa -----	131
4.8.4.2.1. Determinación de la actividad GSNOR por espectrofotometría-----	131
4.8.4.2.2. Determinación de la actividad GSNOR en geles de poliacrilamida -----	132
4.8.4.3. Inmunolocalización de la GSNOR mediante microscopía láser confocal-----	133
4.8.5. Nitración de proteínas en hipocótilos de girasol-----	134
4.8.5.1. El patrón de nitración de proteínas -----	134
4.8.5.2. Análisis de la nitración de proteínas mediante electroforesis bidimensional -----	135
4.8.5.3. Inmunolocalización de 3-nitrotirosina mediante microscopía láser confocal-----	137
4.9. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre las enzimas antioxidantes-----	139
4.9.1. Superóxido dismutasa (SOD) -----	139
4.9.1.1. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en RNA mensajero de la manganeso superóxido dismutasa (<i>Mn-SOD</i>)-----	139

4.9.1.2. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en Cu/Zn-superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD)-----	140
4.9.2. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en catalasa-----	142
4.9.3. Efecto de distintas condiciones de estrés abiótico sobre las enzimas del ciclo ascorbato-glutation -----	144
4.9.3.1. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína ascorbato peroxidasa (APX) -----	144
4.9.3.2. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína monodeshidroascorbato reductasa (MDAR)	145
4.9.3.3. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína glutacion reductasa (GR) -----	147
4.9.4. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre las deshidrogenasas dependientes de NADP, G6PDH-NADP, EM-NADP e ICDH-NADP -----	148
4.9.4.1. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en glucosa 6-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP (G6PDH-NADP)-----	148
4.9.4.2. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína enzima málico dependiente de NADP (EM-NADP) -----	149
4.9.4.3. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP (ICDH-NADP)-----	151
4.9.5. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína peroxirredoxina (Prx) -----	152
4.10. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína leucina-aminopeptidasa (Leu-AP) -----	154
4.11. Contenido en hidroperóxidos lipídicos en hipocótilos de plántulas de girasol sometidas a diferentes condiciones de estrés abiótico-----	156
4.12. Metabolismo de las especies de nitrógeno reactivo en hipocótilos de girasol sometidos a distintas condiciones de estrés abiótico-----	157
4.12.1. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre la producción de óxido nítrico -----	157
4.12.1.1. Detección de óxido nítrico mediante quimioluminiscencia de ozono -----	157

4.12.1.2. Detección de óxido nítrico mediante microscopía láser confocal --	159
4.12.2. Efecto de diferentes condiciones de estrés	
abiótico sobre el contenido de S-nitrosotioles -----	162
4.12.2.1. Detección de S-nitrosotioles totales	
mediante quimioluminiscencia de ozono -----	162
4.12.3. Inmunolocalización de S-nitrosoglutation -----	164
4.12.4. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico	
sobre la S-nitrosoglutation reductasa (GSNOR) -----	164
4.12.4.1 Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico	
sobre el contenido en RNAm de <i>GSNOR</i> -----	164
4.12.4.2. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico	
sobre la actividad S-nitrosoglutation reductasa (GSNOR) -----	166
4.12.4.2.1. Determinación de la actividad	
GSNOR por espectrofotometría -----	166
4.12.4.2.2. Determinación de la actividad	
GSNOR en geles de poliacrilamida -----	168
4.12.4.3. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre	
el contenido en proteína S-nitrosoglutation reductasa -----	169
4.12.4.4. Detección de la GSNOR mediante microscopía láser confocal ----	171
4.12.5. Efecto de cPTIO sobre el contenido	
en RNAm de <i>GSNOR</i> y <i>Ha-PR5</i> -----	171
4.12.6. Detección de 3-nitrotirosina mediante microscopía láser confocal -----	171
4.12.7. Inmunolocalización subcelular mediante microscopía electrónica de	
transmisión de S-nitrosoglutation y S-nitrosoglutation reductasa -----	173
4.12.7.1. Inmunolocalización de S-nitrosoglutation -----	173
4.12.7.2. Inmunolocalización de S-nitrosoglutation reductasa -----	173
5. Discusión -----	177
• Estudio de la interacción girasol-mildiu -----	179
• Inducción de genes de defensa frente a <i>P. halstedii</i> -----	180
• Inducción de estrés oxidativo en plántulas de girasol	
sometidas a situaciones de estrés biótico y abiótico -----	181
• La inoculación con el hongo biotrofo <i>Plasmopara halstedii</i> provoca	
alteraciones en la defensa antioxidante de hipocótilos de plántulas de girasol --	182
• Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el	
contenido en proteína Cu/Zn-SOD y expresión de la Mn-SOD -----	185

• Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína catalasa -----	187
• Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína del ciclo ascorbato-glutation-----	187
• Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína peroxirredoxina-----	190
• Las deshidrogenasas dependientes de NADP presentan un comportamiento diferencial frente a distintas condiciones de estrés abiótico ----	191
• Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína leucina aminopeptidasa-----	192
• Producción de óxido nítrico a partir de L-arginina en hipocótilos de plántulas de girasol -----	193
• La expresión de la S-nitrosoglutation reductasa, el contenido en S-nitrosotioles, y S-nitrosoglutation confiere protección frente al estrés nitrosativo durante la interacción planta-patógeno -----	194
• El S-nitrosoglutation es requerido en el proceso de resistencia mediado por genes <i>R</i> -----	197
• Generación de estrés nitrosativo durante la interacción compatible planta-patógeno -----	197
• Estrés abiótico y óxido nítrico -----	200
• La inducción de S-nitrosoglutation y del contenido de S-nitrosotioles totales participa en el proceso de estrés nitrosativo generado por distintas condiciones de estrés abiótico en hipocótilos de girasol-----	201
• Los estreses abióticos por alta temperatura y daño mecánico inducen estrés nitrosativo en hipocótilos de plántulas pertenecientes a la línea HA89 -----	202
6. Conclusiones-----	205
7. Bibliografía-----	209
8. Anexo I -----	255
9. Anexo II-----	259

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama del haustorio del hongo -----	10
Figura 2. Respuesta hipersensible de una célula epidérmica al ataque del patógeno -----	12
Figura 3. Representación esquemática de la respuesta de la planta al ataque de un patógeno -----	13
Figura 4. Modelo de interacción “gen a gen” -----	14
Figura 5. Resistencia sistémica adquirida (SAR)-----	15
Figura 6. Respuesta de las plantas al estrés abiótico -----	16
Figura 7. Mecanismos de respuesta al estrés abiótico -----	19
Figura 8. Factores ambientales que aumentan la concentración de especies de oxígeno reactivo -----	20
Figura 9. Formación de las especies de oxígeno reactivo -----	22
Figura 10. Producción de ROS y su funciones en la respuesta a patógenos -----	23
Figura 11. Papel del peróxido de hidrogeno (H_2O_2), óxido nítrico (NO) y ácido salicílico (SA) en la activación y coordinación de las reacciones de defensa en plantas -----	25
Figura 12. Reacción catalizada por la superóxido dismutasa-----	29
Figura 13. Reacción catalizada por la Catalasa -----	31
Figura 14. Reducción de H_2O_2 por el ciclo del Ascorbato-Glutation o de Foyer-Halliwell-Asada-----	31
Figura 15. Reacción catalizada por la G6PDH-NADP -----	34
Figura 16. Reacción catalizada por la ICDH-NADP -----	34
Figura 17. Reacción catalizada por la EM-NADP -----	35
Figura 18. Proceso de señalización mediado por NO en la defensa frente al patógeno--	41
Figura 19. Formación de peroxinitrito a partir de óxido nítrico y anión superóxido -----	42
Figura 20. Nitración de proteínas en tirosina-----	43
Figura 21. Nitración de tirosina dependiendo del grado del estrés oxidativo-----	45
Figura 22. S-nitrosilación de proteínas -----	46
Figura 23. Formación de S-nitrosotioles en función de los diferentes estados redox de NO -----	48
Figura 24. Señalización redox relacionada con NO-----	50
Figura 25. Modelo hipotético de la participación de NO en la respuesta de defensa de la planta -----	51
Figura 26. La S-nitrosoglutation reductasa cataliza la reducción de GSNO dependiente de NADH a glutation oxidado (GSSG) y amoníaco (NH_3) -----	52

Figura 27. Impacto del estrés oxidativo y nitrosativo en la función de las proteínas-----	53
Figura 28. Protocolo para el cultivo de <i>Plasmopara halstedii</i> sobre plántulas de la variedad Peredovik -----	62
Figura 29. Plántulas de girasol sometidas a alta intensidad luminosa -----	64
Figura 30. Corte transversal del hipocótilo de girasol -----	65
Figura 31. Proceso de SDS-PAGE y Western-blot-----	70
Figura 32. Inmunodetección mediante quimioluminiscencia-----	72
Figura 33. Muestra conteniendo 20 µg de proteínas se sometió a SDS-PAGE, se transfirió a membrana de PVDF y se incubó con un anticuerpo policlonal frente a la GSNOR diluido 1/50 -----	77
Figura 34. Autoanalizador de óxido nítrico (Sievers NOA 2801)-----	80
Figura 35. Reacción entre el óxido nítrico y el ozono -----	80
Figura 36. Formación de DAF-2T a partir de DAF-2 en presencia de NO y O ₂ -----	85
Figura 37. Reacción de Alexa fluor 488 Hg-link con S-nitrosotioles -----	86
Figura 38. Diagrama de emisión de fluorescencia con respecto al ciclo de reacción -----	96
Figura 39. Plántulas de girasol sensibles (HA89) y resistentes (X55) de nueve días de edad, control e inoculadas por <i>P. halstedii</i> -----	105
Figura 40. Patrón de bandas observadas en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55, control e inoculados por <i>P. halstedii</i> -----	106
Figura 41. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i> sobre el contenido en RNAm de <i>Ha-PR5</i> y de quitinasa en hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55-----	107
Figura 42. Caracterización mediante western blot de antioxidantes enzimáticos en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol (<i>Helianthus annuus</i> L.) pertenecientes a la línea X55-----	108
Figura 43. Análisis mediante PCR a tiempo real de la amplificación de la <i>Mn-SOD1</i> y <i>Mn-SOD2</i> con los oligonucleótidos discriminantes-----	109
Figura 44. Cladograma de la Mn-SOD de varias plantas demostrando la relación evolutiva entre ellas-----	110
Figura 45. Dominios de unión de Mn-SODs -----	110
Figura 46. Alineamiento entre las secuencias de la Mn-SOD1 y la Mn-SOD2 de girasol -----	111
Figura 47. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i> sobre los niveles de RNAm de la <i>Mn-SOD1</i> y la <i>Mn-SOD2</i> en hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55-----	112

Figura 48. Efecto de la inoculación por el hongo biotrofo <i>P. halstedii</i> sobre el contenido en proteína Cu/Zn-SOD en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55-----	112
Figura 49. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i> sobre el contenido en proteína catalasa en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55-----	113
Figura 50. Efecto de la inoculación por el hongo <i>P. halstedii</i> sobre las enzimas del ciclo ascorbato-glutation en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la variedad sensible (HA89) -----	114
Figura 51. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i> sobre las enzimas del ciclo ascorbato-glutation en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la variedad resistente (X55) -----	115
Figura 52. Efecto de la inoculación por el hongo <i>P. halstedii</i> sobre las deshidrogenasas dependientes de NADP en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la variedad sensible (HA89) -----	115
Figura 53. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i> sobre las deshidrogenasas dependientes de NADP en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la variedad resistente (X55)-----	116
Figura 54. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i> sobre el contenido en proteína Prx en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55-----	117
Figura 55. Efecto de la inoculación por el hongo <i>P. halstedii</i> sobre el contenido en proteína Leu-AP en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55-----	118
Figura 56. Detección del $O_2^{\cdot -}$ en cortes de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55-----	120
Figura 57. Detección de ROS en cortes de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55-----	121
Figura 58. Caracterización de la actividad NOS dependiente de L-arginina en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea HA89 mediante quimioluminiscencia de ozono -----	122
Figura 59. Efecto de la inoculación por el hongo biotrofo <i>P. halstedii</i> sobre la producción de óxido nítrico a partir de L-arginina en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las variedades sensible (HA89) y resistente (X55)-----	122
Figura 60. Detección de $^{\cdot}NO$ en secciones de hipocótilos de	

girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55 -----	124
Figura 61. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i> sobre la producción de S-nitrosotioles totales en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55 -----	125
Figura 62. Detección de RSNOs totales en cortes de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55 -----	126
Figura 63. Secciones de los hipocótilos de plántulas de girasol -----	127
Figura 64. Inmunofluorescencia de GSNO en tres secciones de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la variedad sensible (HA89) inoculada por <i>P. halstedii</i> -----	128
Figura 65. Inmunofluorescencia de GSNO en hipocótilos de girasol pertenecientes a la variedad sensible (HA89) -----	129
Figura 66. Inmunofluorescencia de GSNO en hipocótilos de girasol pertenecientes a la variedad resistente (X55) -----	130
Figura 67. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i> sobre el contenido en RNAm de la <i>GSNOR</i> en hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55 -----	131
Figura 68. Efecto de la inoculación por el hongo biotrofo <i>P. halstedii</i> sobre la actividad GSNOR determinada mediante espectrofotometría en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55 ----	132
Figura 69. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i> sobre la actividad GSNOR en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55 -----	132
Figura 70. Inmunolocalización de la GSNOR en secciones de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55 -----	133
Figura 71. Inmunolocalización de la GSNOR en secciones de hipocótilos de plántulas de girasol -----	134
Figura 72. Patrón de nitración de proteínas en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea X55 sin tratamiento -----	134
Figura 73. Gel correspondiente a la línea X55 sin tratamiento -----	135
Figura 74. Inmunoblot correspondiente a la línea X55 sin tratamiento -----	136
Figura 75. Gel correspondiente a la línea X55 sin tratamiento -----	136
Figura 76. Inmunolocalización de n-Tyr en secciones de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55 -----	138
Figura 77. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en RNA mensajero de la <i>Mn-SOD1</i> y la <i>Mn-SOD2</i>	

en hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea HA89 -----	139
Figura 78. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en RNA mensajero de la <i>Mn-SOD1</i> y la <i>Mn-SOD2</i> en hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea X55 -----	140
Figura 79. Efecto de distintas condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína Cu/Zn-SOD en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea HA89 -----	141
Figura 80. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína Cu/Zn-SOD en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea X55 -----	142
Figura 81. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína catalasa en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89 -----	143
Figura 82. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína catalasa en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55 -----	143
Figura 83. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína APX en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89 -----	144
Figura 84. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína APX en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55 -----	145
Figura 85. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína MDAR en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea HA89 -----	146
Figura 86. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína MDAR en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55 -----	146
Figura 87. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína GR en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89 -----	147
Figura 88. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína GR en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55 -----	148
Figura 89. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína G6PDH-NADP en extractos crudos de hipocótilos	

de plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89 -----	149
Figura 90. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína G6PDH-NADP en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55-----	150
Figura 91. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína EM-NADP en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89 -----	150
Figura 92. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína EM-NADP en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55-----	151
Figura 93. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína ICDH-NADP en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89 -----	152
Figura 94. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína ICDH-NADP en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55-----	153
Figura 95. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína Prx en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89 -----	153
Figura 96. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína Prx en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55-----	154
Figura 97. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína Leu-AP en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea HA89 -----	155
Figura 98. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína Leu-AP en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55-----	156
Figura 99. Análisis de la actividad NOS por quimioluminiscencia de ozono en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89, control y sometidas a diferentes condiciones de estrés abiótico-----	158
Figura 100: Análisis de la actividad NOS por quimioluminiscencia de ozono en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55, control y sometidas a diferentes condiciones de estrés abiótico -----	158

Figura 101. Detección de $\cdot\text{NO}$ en secciones de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89-----	159
Figura 102. Detección de $\cdot\text{NO}$ en secciones de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea HA89 -----	160
Figura 103. Detección de $\cdot\text{NO}$ en cortes de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55 -----	161
Figura 104. Detección de $\cdot\text{NO}$ en secciones de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea X55 -----	162
Figura 105. Análisis de S-nitrosotioles totales mediante quimioluminiscencia de ozono en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea HA89, control y sometidos a diferentes condiciones de estrés abiótico-----	163
Figura 106. Análisis de S-nitrosotioles totales mediante quimioluminiscencia de ozono en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea X55, control y sometidos a diferentes condiciones de estrés abiótico-----	163
Figura 107. Inmunolocalización de GSNO en secciones de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55-----	165
Figura 108. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en RNA mensajero de la <i>GSNOR</i> en hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea HA89 -----	166
Figura 109. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en RNA mensajero de la <i>GSNOR</i> en hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea X55 -----	166
Figura 110. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre la actividad <i>GSNOR</i> determinada a nivel espectrofotométrico en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea HA89 -----	167
Figura 111. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre la actividad de <i>GSNOR</i> determinada a nivel espectrofotométrico en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea X55 -----	167
Figura 112. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre la actividad <i>GSNOR</i> en geles de poliacrilamida en condiciones nativas en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea HA89 -	168
Figura 113. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre la actividad <i>GSNOR</i> en geles de poliacrilamida en condiciones nativas en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea X55----	169

Figura 114. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína GSNOR en extractos crudos de hypocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89 -----	170
Figura 115. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína GSNOR en extractos crudos de hypocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55-----	170
Figura 116. Inmunolocalización de la GSNOR en secciones de hypocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55 -----	172
Figura 117: Efecto de diferentes concentraciones de cPTIO sobre el contenido en RNA mensajero de <i>GSNOR</i> y <i>Ha-PR5</i> en hypocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55-----	173
Figura 118. Inmunolocalización de n-Tyr en secciones de hypocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55 -----	174
Figura 119. Inmunolocalización de GSNO en hypocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55 sin tratamiento -----	175
Figura 120. Inmunolocalización de la GSNOR en hypocótilos de girasol pertenecientes a la línea X55 sin tratamiento -----	175

Índice de tablas

Tabla 1. Funciones de NO en diferentes procesos de plantas -----	38
Tabla 2. Actividad NOS a partir de L-arginina en algunas especies de plantas -----	39
Tabla 3. Protocolo de preparación de geles de SDS-PAGE -----	68
Tabla 4. Protocolo de preparación de geles nativos -----	73
Tabla 5. Protocolo de inmunización llevado a cabo para la obtención del antisuero frente a la GSNOR -----	76
Tabla 6. Secuencia de oligonucleótidos degenerados utilizados para la clonación parcial de cDNAs -----	93
Tabla 7. Programa de PCR utilizado en los ensayos con oligonucleótidos degenerados ---	93
Tabla 8. Secuencias de oligonucleótidos específicos de GSNOR, Mn-SOD1, Mn-SOD2, Ha-PR5, Quitinasa y RNA 18S -----	95
Tabla 9. Temperaturas de “annealing” y “meeting” de los cebadores -----	97
Tabla 10. Programa utilizado para la amplificación mediante PCR a tiempo real -----	98
Tabla 11. oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los extremos 5' / 3' de las dos isoformas de la Mn-SOD -----	99
Tabla 12. Programa utilizado para la amplificación mediante PCR -----	100
Tabla 13. Efecto de la inoculación por el hongo biotrofo <i>Plasmopara</i> <i>halstedii</i> sobre el crecimiento de plántulas de girasol -----	105
Tabla 14. Propiedades moleculares de la Mn-SOD1 y Mn-SOD2 -----	109
Tabla 15. Efecto de la inoculación por <i>P. halstedii</i> sobre el contenido en H ₂ O ₂ en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a las variedades sensible (HA89) y resistente (X55) -----	118
Tabla 16. Proteínas nitradas identificadas mediante huella peptídica en hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55 sin tratamiento -----	137
Tabla 17. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en hidroperóxidos lipídicos en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55 -----	157
Tabla 18. Resumen de la modulación de RNS en plántulas de girasol inoculadas por <i>P. halstedii</i> -----	257
Tabla 19. Resumen de la modulación de RNS en plántulas de girasol sometidas a estreses por alta temperatura (AT) y daño mecánico (D) -----	258

Summary and Conclusions

FUNCTION OF REACTIVE NITROGEN SPECIES IN SUNFLOWER (*Helianthus annuus* L.) UNDER BIOTIC AND ABIOTIC STRESS CONDITIONS

Summary

Nitric oxide (NO) is a membrane-permeable free radical with a central role in the regulation of plants function. Thus, NO has been also showed to participate in the mechanism of plant response against biotic and abiotic stress conditions. However, less it is known of the involvement of other NO-derived molecules designated as reactive nitrogen species (RNS) such as S-nitrosothiols (RSNOs), S-nitrosoglutathione (GSNO), peroxynitrite and nitrotyrosine (n-Tyr). Therefore, this research work is focused in the study of the metabolism of NO and NO-related molecules in plant under biotic and abiotic stress conditions using multidisciplinary approaches including biochemical, molecular and cell biology analysis.

The select model plant has been sunflower (*Helianthus annuus* L.). For biotic stress, it was studied the infection by the pathogen *Plasmopara halstedii*. Based of previous works, it was selected two sunflower lines HA89 and X55 which correspond to susceptible sunflower line where the pathogen can develop (compatible interaction) and resistant sunflower line where the pathogen cannot develop (incompatible interaction), respectively. The results have showed that RSNOs and GSNO are key elements in the mechanism of resistant in the incompatible interaction avoiding the process of nitrosative stress observed in the compatible interaction, considering the protein tyrosine nitration as marker of this type of stress. Moreover, by a pharmacological approach it is demonstrated that the low level of NO, and consequently of GSNO, induced both *GSNOR* and *Ha-PR5* genes in the uninfected resistant cultivar. This has allowed proposing that *GSNOR* gene could be included in the category of pathogenesis-related (*PR*) genes.

On the other hand, the abiotic stress has been studied using the same model plant under different stress conditions including continuous light, high light intensity, continuous dark, low-temperature, high temperature and mechanical wounding. Thus, a higher content of RSNOs was observed in sunflower hypocotyls exposed to high temperature and mechanical wounding. On the other hand, the gene expression of S-nitrosoglutathione reductase (*GSNOR*), enzyme that catalyzes the reduction of S-nitrosoglutathione (GSNO) to GSSG and NH₃, and the L-arginine-dependent nitric oxide (NOS) activity which generate NO showed that in the analysed stress conditions, the *GSNOR* mRNA content was down-

regulated whereas the NOS activity was not affected. Taken together, these findings suggest that the nitrosative stress generated under abiotic stress conditions is supported by the induction of nitrosothiols content and this induction is independent of L-arginine-dependent NO generation.

Complementary, it was study at molecular level the participation of superoxide dismutase (SOD) because it is a first line of protection against the toxic effects of superoxide radicals produced in different cellular compartments. In general, there are three types of SODs, containing either Mn, Fe, or Cu plus Zn as prosthetic metals and the number and type of SOD isozymes can change depending on the plant species, age of development and environmental conditions. In this work, using sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls, it has been identified two new genes of Mn-SOD isoforms because so far only it has been described the presence of Cu/Zn-SOD in this plant species. They coded for two proteins of 226 and 228 amino acids that were designated as Mn-SOD1 and Mn-SOD2, respectively. Both Mn-SOD1 and Mn-SOD2 have a cleaved sequence of 14 residues that target to mitochondria with a probability of 81% and 95%, respectively. To distinguish both MnSOD isoforms, it was designed specific primers that annealed in the most divergent regions. The mRNA expression of these two Mn-SODs was analysed by real time quantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR) of sunflower seedlings under stress conditions (biotic and abiotic stresses), *Mn-SOD1* showed the highest expression level and modulation in all stress conditions. However the *Mn-SOD2* was almost undetectable in all situations with the exception of the mechanical wounding stress where the *Mn-SOD2* was strongly induced indicating a specific function in this type of abiotic stress.

Conclusions

1. The infection of sunflower seedlings with the fungus *Plasmopara halstedii* provokes a significant reduction in several growth parameters in the sensitive cultivar (HA89) whereas it does not affect in the resistant cultivar (X55). Moreover, this biotic stress cause a oxidative stress in both sunflower cultivars characterized by a raise in the generation of reactive oxygen species (ROS) such as H_2O_2 and $\text{O}_2^{\cdot-}$ and by a imbalance in the gene expression and activity of antioxidative enzymes and NADP-dependent dehydrogenases.
2. The production of ROS and reactive nitrogen species (RNS) in vascular tissues of hypocotyls of both sunflower cultivars infected by *Plasmopara halstedii* suggests the involvement of this tissue in the mechanism of cell signalling under this biotic stress condition. Moreover, the cellular distribution of RSNOs, GSNO and GSNOR in vascular tissue and epidermis cells also suggests the involvement of these RNS in the mechanism of defence to avoid the spread of the pathogen.
3. A pharmacological approach demonstrates that the low level of 'NO, and consequently of GSNO, induce both *GSNOR* and *HaPR5* genes in the uninfected resistant cultivar (X55). This allows proposing that *GSNOR* gene could be included in the category of pathogenesis-related (*PR*) genes.
4. Environmental stress by high temperature and high light intensity induce an oxidative stress in both sunflower cultivars (HA89 and X55); however, the mechanical wounding produces only oxidative stress in the cultivar HA89. Furthermore, in the sunflower cultivar XA89, the abiotic stress (high temperature and mechanical wounding) and biotic stress also generate a nitrosative stress which is characterized by a raise in the protein tyrosine nitration (n-Tyr) and RSNOs being independent of the enzymatic NO generation. Additionally, the regulation of RNS (NO, RSNOs, GSNO and n-Tyr) and the nitrosative stress generation in the sunflower cultivar HA89 has similar pattern under biotic and abiotic stress.
5. In sunflower hypocotyls, it has been identified two new genes which codified for two superoxide dismutases (SODs) containing both Mn as prosthetic metal. They are designated as Mn-SOD1 and Mn-SOD2. Both deduced proteins possess at the N-terminus a motif of 14 amino acids that target these Mn-SODs to mitochondrion. Under stress conditions (biotic and abiotic stresses), Mn-SOD1 shows the highest expression level and modulation being the Mn-SOD2 almost undetectable. However, under mechanical wounding the Mn-SOD2 is stronger induced indicating a specific function in this type of abiotic stress.

INTRODUCCIÓN

1.1. LA PLANTA DE GIRASOL

El girasol (*Helianthus annuus* L.) era, antes del descubrimiento de América, uno de los principales productos agrícolas empleados en la alimentación por muchas comunidades americanas. A partir del siglo XIX fue utilizado por los Rusos para la alimentación, y lo empezaron a usar para la obtención de aceite en la primera mitad del siglo XX. El girasol también fue cultivado en España y en el resto de Europa al principio del siglo XVI por su valor ornamental, debido sobre todo a la belleza de sus inflorescencias.

El girasol es considerado como una planta termoadaptable, ya que presenta una buena tolerancia a valores extremos de temperatura, tanto altos como bajos, por lo que se adapta fácilmente al ambiente en que vive. La orientación de su capítulo hacia el sol, lo que le da nombre a esta planta, se debe al crecimiento diferencial del tallo. Cuando la iluminación es desigual, en el lado sombreado de la planta se acumula auxina, haciendo que esta parte crezca más rápidamente que la soleada, provocando que la planta se incline hacia el sol.

1.2. ORIGEN BOTÁNICO

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es una planta herbácea de la familia de las *asteráceas*, cultivada como oleaginosa y ornamental, por su flor apical de color amarillo vibrante. Dentro de esta especie existen numerosas subespecies.

El género *Helianthus* tiene unas 67 especies, las formas más altas miden hasta 3 metros, las hojas son alternas y ásperas y el capítulo puede llegar a medir hasta 1 metro de diámetro.

1.3. EL ESTRÉS EN PLANTAS

Las plantas están sometidas frecuentemente a situaciones desfavorables para su desarrollo y su funcionamiento óptimo, ocasionadas por alteraciones en el medioambiente. De esta manera, el estrés se define generalmente como cualquier factor medioambiental capaz de inducir una tensión potencialmente dañina para las plantas. Dependiendo de sus efectos en los organismos, los estreses se pueden clasificar en moderados y fuertes. Un estrés moderado puede activar el metabolismo celular e incrementar la actividad fisiológica de una planta sin causar ningún daño, por el contrario, el fuerte puede ser dañino para la planta.

1.3.1. EL ESTRÉS BIÓTICO

Está causado por agentes que pueden resultar patógenos, como bacterias, hongos, virus, insectos, nematodos, así como, otras plantas. La interacción planta-patógeno puede

ser compatible y, en este caso, el patógeno logrará infectar la planta e invadirla, o incompatible, en cuyo caso los mecanismos de defensa de la planta impedirán la entrada o el establecimiento del patógeno.

Los patógenos desarrollan métodos específicos para invadir las plantas, entrando en contacto íntimo con las células de las raíces y los tallos y causando, de esta forma, enfermedades. Algunas especies penetran en la planta atravesando directamente la capa superficial mediante presión mecánica o ataque enzimático, mientras que otras realizan la invasión a través de tejidos heridos o aperturas naturales. Una vez que el patógeno está dentro de la planta, su modo de actuación varía dependiendo de su naturaleza; si es un patógeno necrotrofo mata las células de la planta, si es un patógeno biotrofo actúa dejando vivas las células de la planta y si es hemibiotrofo actúa manteniendo las células vivas, matándolas posteriormente en la siguiente etapa de la infección.

1.3.1.1. El hongo biotrofo *Plasmopara halstedii*

Plasmopara helianthi Novot, descrito por primera vez en 1882 en América del norte, es un parásito obligatorio que causa el mildiu de girasol. Perteneciente a la familia *Peronosporáceas*, orden *oomycetos* (Alonso, 1988), género *Helianthus* y se incluye dentro de la especie colectiva *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. & de Toni. *P. halstedii* es un hongo biotrofo que toma los nutrientes de la planta a través de un haustorio (**Figura 1**).

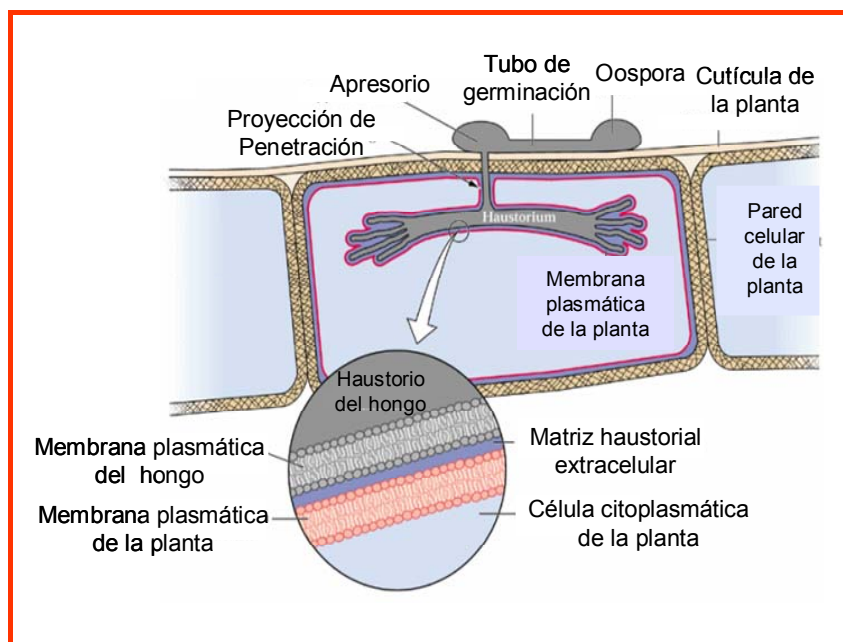


Figura 1. Diagrama del haustorio del hongo (Figura extraída de Biochemistry and Molecular Biology of Plants, Buchanan, Gruissem and Jones).

El mildiu es uno de las principales enfermedades en los cultivos de girasol, en los que causa enormes pérdidas. Penetra por las raíces de las plantas de girasol y se propaga a través del hipocótilo hacia la parte superior de la planta. Los síntomas de la enfermedad se manifiestan en todas las fases del crecimiento vegetativo, aunque los daños son más graves cuanto más temprano se presente el ataque. Las plantas enfermas presentan clorosis alrededor de las nervaduras principales de las hojas, lo que se manifiesta principalmente en el haz de las hojas más jóvenes, comenzando desde la base hacia el ápice. Las plantas atacadas pueden presentar, además, una disminución en su altura en varios grados e, incluso, llegan a morir.

1.3.1.2. Interacción girasol-mildiu

El hongo biotrofo *P. halstedii* se mantiene en el suelo en forma de oosporas producidas sexualmente que pueden permanecer viables más de 4 años (Jiménez Díaz, 1973). Una vez en el suelo y pasado el invierno, las oosporas germinan y producen zoosporangios que a su vez liberan zoosporas biflageladas. Estas zoosporas se adhieren a las raíces o al hipocótilo de plántulas jóvenes e inmediatamente pierden los flagelos para penetrar en ellas. En el interior, conquistan los espacios intercelulares hasta alcanzar el xilema y dan lugar a una infección sistémica. Al mismo tiempo, emiten haustorios que penetran en el interior celular.

En condiciones adecuadas de humedad y temperatura, el hongo produce esporangióforos que salen por los estomas y que contienen los esporangios que terminan por liberar entre 3 y 10 zoosporas. Estas zoosporas pueden provocar una infección secundaria sobre las plantas sanas que están en las proximidades.

Radwan *et al.*, 2005, utilizando una línea de girasol sensible y otra resistente al mildiu, realizaron un estudio histológico de la inoculación con *P. halstedii*. Tres días tras la inoculación, observaron hifas intracelulares y haustorios en raíces de las dos variedades. Seis días después, en la línea sensible el hongo había llegado a la mitad del hipocótilo y había formado haustorios. Sin embargo, en la línea resistente, las células presentaron una reacción de hipersensibilidad (**Figura 2**). Nueve días después de la inoculación, en la interacción compatible, se observó el desarrollo de hifas intracelulares y abundantes haustorios en los hipocótilos sin formación de necrosis, mientras que en la interacción incompatible las células parenquimáticas que tenían haustorios sufrieron muerte celular.

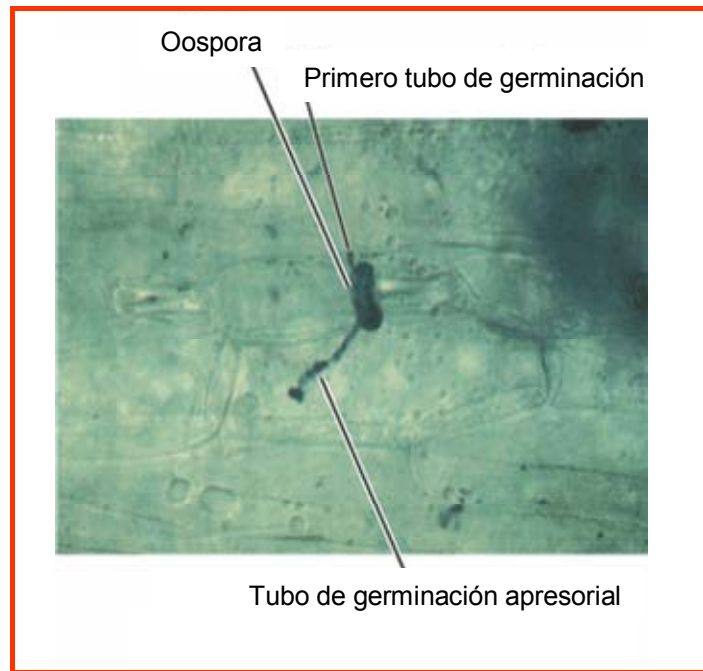


Figura 2. Respuesta hipersensible de una célula epidérmica al ataque del patógeno (Figura extraída de Biochemistry and Molecular Biology of Plants, Buchanan, Gruissem and Jones).

1.3.1.3. Mecanismos de defensa de las plantas frente a patógenos

En respuesta al intento de colonización por parte del patógeno, la planta desarrolla una serie de mecanismos de defensa. Esta protección se realiza por medio de la formación de una serie de barreras físicas y químicas, o por la activación de reacciones de defensa de una forma no específica (Collins *et al.*, 2003).

La interacción entre la planta y el patógeno puede ser compatible o incompatible. En la interacción compatible, el patógeno es capaz de desarrollar su virulencia y conseguir invadir la planta. Su entrada en la planta huésped está favorecida por la secreción de una serie de enzimas como quitinasas, pectinasas y proteasas que hidrolizan las estructuras protectoras como la cutícula y la pared de las células epidérmicas. Mientras que, en la interacción incompatible, el patógeno no tiene éxito en su ataque. La falta de virulencia puede deberse a que la planta atacada no sea el huésped adecuado, a que el patógeno no pueda superar las barreras estructurales o químicas, o su reconocimiento por la planta dispare los mecanismos de defensa adecuados. La respuesta de hipersensibilidad (HR) es la forma principal de resistencia de plantas frente a patógenos (Goodman y Novacky, 1994), esta respuesta implica una muerte celular localizada en el lugar de la infección formando

lesiones necróticas, impidiendo así la propagación del hongo. Una de las primeras reacciones en la HR es la acumulación rápida de especies de oxígeno reactivo (ROS) (Levine, 2004) y óxido nítrico (NO) (Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998) (**Figura 3**).

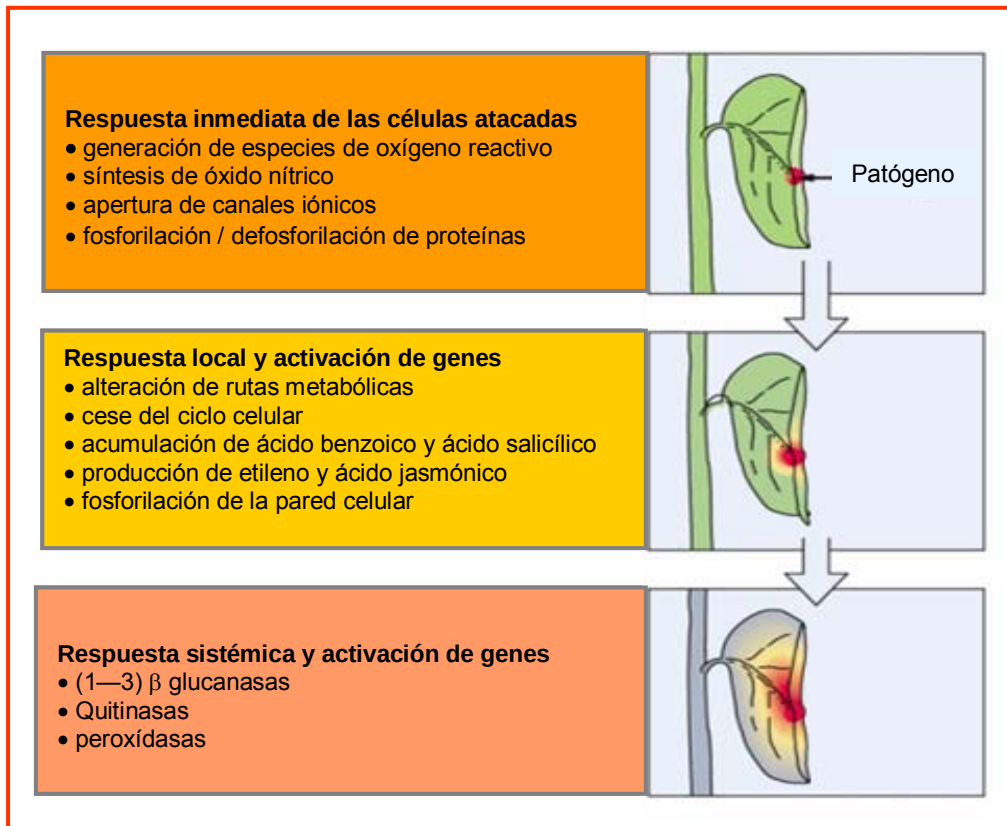


Figura 3. Representación esquemática de la respuesta de la planta al ataque de un patógeno (Figura extraída de Biochemistry and Molecular Biology of Plants, Buchanan, Gruissem and Jones).

Algunos patógenos potenciales activan en la planta huésped una rápida respuesta de defensa que es muy específica, esto ocurre cuando el patógeno porta un gen de avirulencia (*Avr*) que interacciona específicamente con el correspondiente gen de resistencia del huésped (*R*). Este mecanismo es conocido con el nombre de interacción “gen a gen” (Flor, 1947) y es el responsable de muchas reacciones de defensa inducidas por patógenos específicos. En muchos casos, los genes *Avr* y *R* son dominantes, lo que sugiere que sus productos génicos podrían interaccionar directamente mediante un tipo de unión ligando-receptor (Glazebrook, 1999) (**Figura 4**).

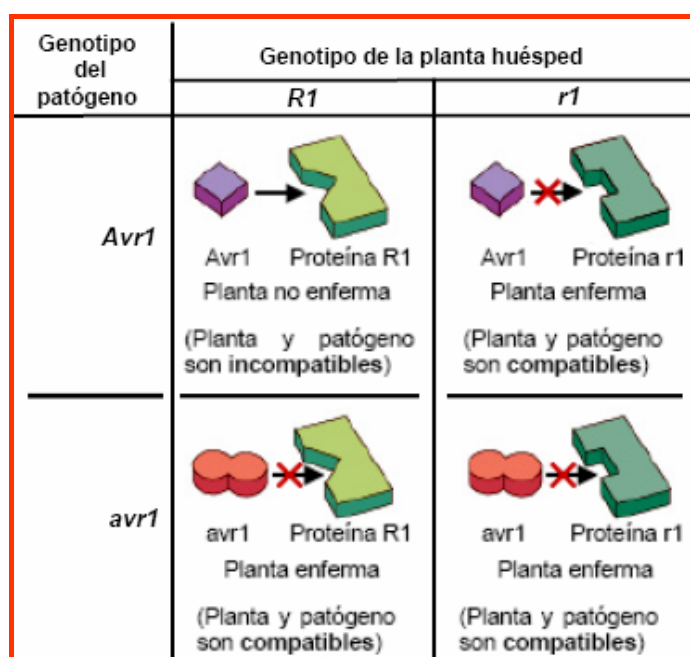


Figura 4. Modelo de interacción “gen a gen” (Figura extraída de Biochemistry and Molecular Biology of Plants, Buchanan, Gruissem and Jones).

La respuesta frente al patógeno también está controlada por una rápida activación transcripcional de los llamados “genes de defensa”, entre los que se incluyen los genes de la vía de los fenilpropanoides, que están implicados en la síntesis de lignina, fitoalexina y ácido salicílico, y los genes relacionados con la patogénesis (genes *PR*) que codifican un grupo amplio y complejo de proteínas intra y extracelulares que se acumulan en los tejidos de la planta tras el ataque de un patógeno o bajo determinadas condiciones de estrés abiótico. Fueron detectados por primera vez a principios de los años 70 (Van Loon y Van Kammen, 1970), concretamente en los estudios realizados sobre la inoculación de plantas de tabaco con el virus del mosaico del tabaco (MTV), y tienen en común una serie de características fisicoquímicas que ayudan a su detección y aislamiento (Stintzi *et al.*, 1993). Los genes *PR* tienen una gran estabilidad a pHs ácidos, además, son relativamente resistentes a la acción de enzimas proteolíticas, tanto de origen endógeno como exógeno, lo que supone que, probablemente, estén sometidas a un bajo nivel de recambio. Algunos genes *PR*, como quitinasas y glucanasas, desempeñan, probablemente, un doble papel en la defensa frente a patógenos, ya que pueden actuar directamente atacando la pared celular del hongo, o liberar fragmentos como oligosacáridos que pueden actuar como elicitores.

La interacción planta-patógeno induce también una respuesta de resistencia que se denomina “resistencia adquirida”. Esta resistencia se manifiesta en primer lugar localmente, en las proximidades del punto de necrosis causado por la infección del patógeno o por el contacto con el compuesto químico y se denomina “resistencia local adquirida” (LAR), para posteriormente extenderse a zonas alejadas de la planta denominándose “resistencia sistémica adquirida” (SAR). La SAR está relacionada con la inducción de un conjunto de genes de defensa (genes SAR) que reducen la severidad de los síntomas causados por los patógenos, SAR esta acompañada por un incremento de ácido salicílico (SA) (**Figura 5**).

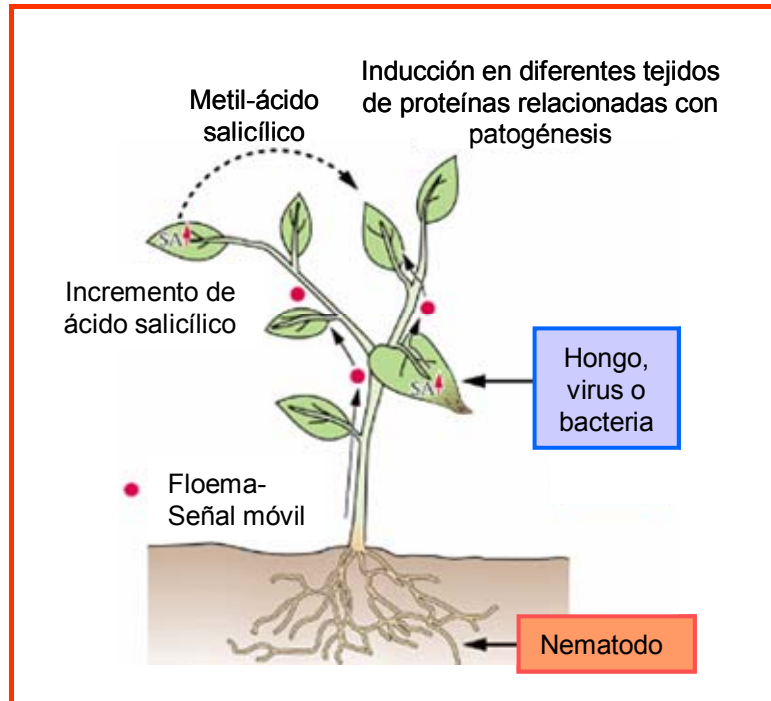


Figura 5. Resistencia sistémica adquirida (SAR) (Figura extraída de Biochemistry and Molecular Biology of Plants, Buchanan, Gruissem and Jones).

Los estudios genéticos concluyen que la resistencia del girasol al mildiu está controlada por genes dominantes que se designan con el nombre de *PI* (Vranceanu y Stoenescu, 1970). La interacción girasol/*Plasmopara halstedii* parece que no se ajusta exactamente al concepto de gen a gen según el cual a cada gen de resistencia del hospedador le corresponde un gen de avirulencia del patógeno y que conduce a que cada gen de resistencia confiere esta característica sólo frente a una raza del patógeno ya que se ha encontrado que alguno de estos genes *PI* confiere resistencia frente a dos razas del patógeno (Vear *et al.*, 1997).

1.3.2. EL ESTRÉS ABIÓTICO

El estrés abiótico es un problema grave, siendo el principal causante de pérdidas de cosechas en todo el mundo, reduciendo el rendimiento de los cultivos en más de 50% (Boyer, 1982; Bray *et al.*, 2000). Entre los factores ambientales que causan daño a la planta están: sequía, altas y bajas temperaturas, salinidad, luz extrema y ozono. La resistencia o la sensibilidad al estrés dependen de la especie, del genotipo y de la edad de la planta (**Figura 6**). El estrés abiótico provoca una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que afectan el crecimiento y la productividad. La respuesta de la planta a los factores ambientales esta asociada a la activación de las especies de oxígeno reactivo, incluyendo el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Mittler, 2002). Recientemente, se ha estudiado de forma intensiva la respuesta de las plantas a los estreses ambientales, tanto a nivel bioquímico como a nivel molecular (Rizhsky *et al.*, 2004; Kotchoni *et al.*, 2006).

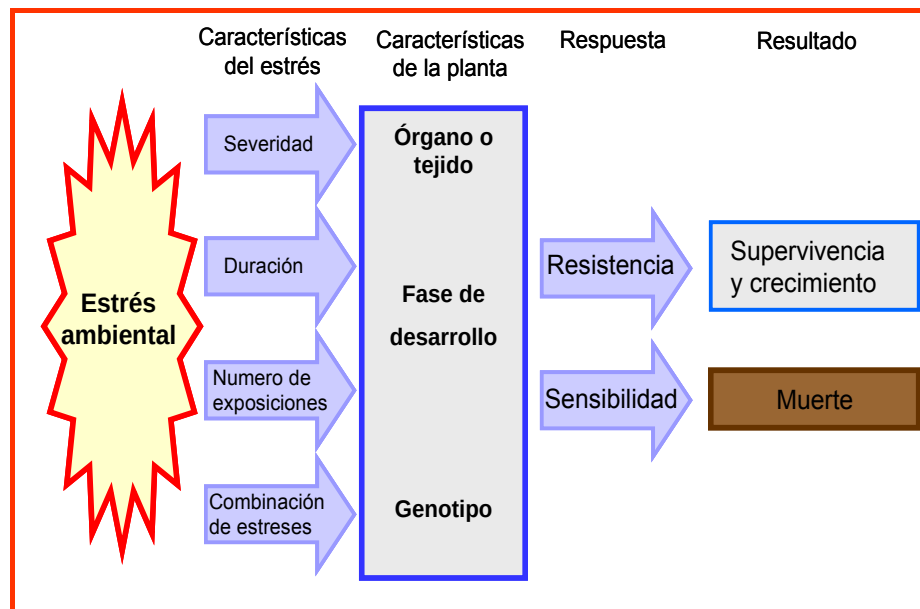


Figura 6. Respuesta de las plantas al estrés abiótico (Figura extraída de Biochemistry and Molecular Biology of Plants, Buchanan, Gruissem and Jones).

1.3.2.1. Estrés inducido por temperaturas anómalas

La temperatura es el principal factor abiótico que limita tanto la distribución natural de las plantas como la agricultura. El estrés, tanto por frío como por calor, modifica la fluidez de las membranas induciendo cambios en su composición de ácidos grasos, inhibe la fotosíntesis y la respiración, reduce la tasa de crecimiento y activa la senescencia.

1.3.2.1.1. Estrés inducido por alta temperatura

La mayoría de las plantas reducen sus crecimientos a temperaturas superiores a 40°C, sólo las plantas xerófitas y termófilas pueden soportar bien estas temperaturas. Las altas temperaturas afectan a la actividad enzimática alterando los procesos metabólicos, desnaturalizan e inactivan las enzimas (Vierling, 1991; Kampinga *et al.*, 1995), provocan la muerte celular programada (Swidzinski *et al.*, 2002; Vacca *et al.*, 2004) e inducen daños en membranas y proteínas (Gong *et al.*, 1998; Larkindale y Knight, 2002), también, causan un desacoplamiento entre el transporte de electrones y la síntesis de ATP, la inhibición del fotosistema II (PSII) (Kato y San Pietro, 1967) y de la cadena de transporte de electrones, y peroxidación lipídica (Mishra y Singhal, 1992). Además, las altas temperaturas producen daños en las funciones de la mitocondria induciendo de este forma, un estrés oxidativo (Larkindale y Knight, 2002; Vacca *et al.*, 2004).

Probablemente, la mejor forma de respuesta al estrés por alta temperatura es la producción de proteínas de choque térmico (HSPs) (Vierling, 1991) que incrementan la tolerancia de la planta al calor (Queitsch *et al.*, 2000; Katiyar-Agarwal *et al.*, 2003). Estudios recientes han demostrado la implicación de calcio, ácido abscísico, etileno y ácido salicílico en la protección frente al daño oxidativo producido por altas temperaturas.

1.3.2.1.2. Estrés inducido por baja temperatura

La baja temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que afectan el crecimiento de la planta, limitan su distribución geográfica y reducen el rendimiento de algunos cultivos. La exposición de las plantas a bajas temperaturas induce cambios a nivel fisiológico y bioquímico.

La sensibilidad a bajas temperaturas depende de la especie, la edad y las condiciones ambientales en las que viva la planta. En general, las plántulas muy jóvenes son muy sensibles. También es diferente la sensibilidad de los distintos órganos, las semillas en germinación y las flores suelen ser más sensibles a las bajas temperaturas, mientras que, las semillas en reposo son más resistentes. Además, las raíces son más sensibles que las partes aéreas. Las bajas temperaturas reducen la capacidad de las raíces para absorber el agua y bloquean la función de los estomas. También provocan una inhibición de la fotosíntesis y la senescencia prematura (Nie y Baker, 1991; Nie *et al.*, 1992; 1995).

Entre las estrategias más estudiadas para incrementar la tolerancia de la planta a las bajas temperaturas es la aclimatación al frío, que implica cambios morfológicos, anatómicos, fisiológicos y bioquímicos de la planta, y también la síntesis de metabolitos como osmolitos. Weiser (1970) ha propuesto que la aclimatación a bajas temperaturas

necesita la transcripción de genes específicos. Además, se ha demostrado que la síntesis de determinadas proteínas es necesaria para incrementar la tolerancia a bajas temperaturas (Lalk y Dorffling, 1985; Hughes y Dunn, 1996). Entre las proteínas inducidas por las bajas temperaturas hay proteínas reguladas por el frío (COR), proteínas de aclimatación al frío (CAPs) y proteínas asociadas a fosfolípidos de membrana (Hughes *et al.*, 1992).

1.3.2.2. Estrés inducido por daño mecánico

Los daños mecánicos provocan la activación de una serie de genes, algunos se expresan únicamente en la zona dañada, mientras que otros lo hacen de forma sistémica activándose en zonas no dañadas de la planta (Bowles, 1990). Se ha visto que las heridas causan un incremento en los niveles endógenos de ácido jasmónico (Albrecht *et al.*, 1993) y este incremento es necesario para la activación de los genes de defensa (Peña-Cortés *et al.*, 1993). En plantas de tomate, se ha demostrado que el etileno participa en la respuesta defensiva frente a las heridas (O'Donnell *et al.*, 1996).

1.3.2.3. Estrés inducido por alta intensidad luminosa

La exposición a alta intensidad luminosa lleva a un incremento en los niveles intracelulares de ROS debido al incremento de la tasa de fotorreducción de O₂ en el cloroplasto y el incremento del flujo de H₂O₂ en el peroxisoma vía fotorrespiración (Niyogi, 1999; Mittler, 2002). La exposición a alta intensidad luminosa está generalmente asociada con altas actividades de las enzimas antioxidantes incluyendo la superóxido dismutasa (SOD), la ascorbato peroxidasa (APX) y la glutatión reductasa (GR), y las antioxidantes no enzimáticas de bajo peso molecular como glutatión y ascorbato (Grace y Logan, 1996; Logan *et al.*, 1998a, 1998b). Recientemente, se han identificado en plantas de *Arabidopsis* un gen implicado en la aclimatación al estrés por alta intensidad luminosa, la sobreexpresión de este gen incrementa la tolerancia al estrés.

La alta intensidad luminosa reduce el tamaño de los cloroplastos (Maxwell *et al.*, 1999) y causa una disminución de aproximadamente un 60% de proteínas totales solubles y del contenido de clorofila.

1.3.2.4. Estrés inducido por luz continua

La luz es la fuente de energía utilizada para transformar el anhídrido carbónico (CO₂) en compuestos orgánicos necesarios para la vida de la planta, pero también es la fuente principal de estrés para las células. El estrés por luz disminuye la capacidad fotosintética y el crecimiento de la planta, siendo el cloroplasto el foco principal del estrés por luz (Aro *et al.*, 1993; Prasil *et al.*, 1992). Produciéndose, además, alteraciones en el

metabolismo del carbono y del nitrógeno en toda la planta. La planta responde al estrés por luz mediante la expresión de genes que codifican proteínas específicas al estrés con una posible función protectora, como se ha visto en los niveles de RNA mensajero de estos genes en hojas verdes maduras de *Arabidopsis* en respuesta al estrés (Dunaeva y Adamska, 2001).

1.3.2.5. Estrés inducido por oscuridad

En la oscuridad la planta no puede llevar a cabo la fotosíntesis, las hojas pierden su color verde y muestran un menor cantidad de proteínas. El estrés por oscuridad afecta el metabolismo de los nódulos de guisante y la respiración de la raíz, y causa una ligera disminución en los niveles de algunos antioxidantes y carbohidratos. Por otro lado, se ha visto que el estrés por oscuridad puede provocar la acumulación de proteínas modificadas y estructuralmente alteradas (Matamoras *et al.*, 1999), e inducir pérdida de proteínas citosólicas totales (Cohen *et al.*, 1986).

1.3.2.6. Mecanismos de respuesta al estrés

La respuesta al estrés empieza cuando la planta reconoce el estrés a nivel celular. Una vez reconocido el estrés, se activa una vía de transducción de señales que transmite esta información a las células en toda la planta (**Figura 7**).

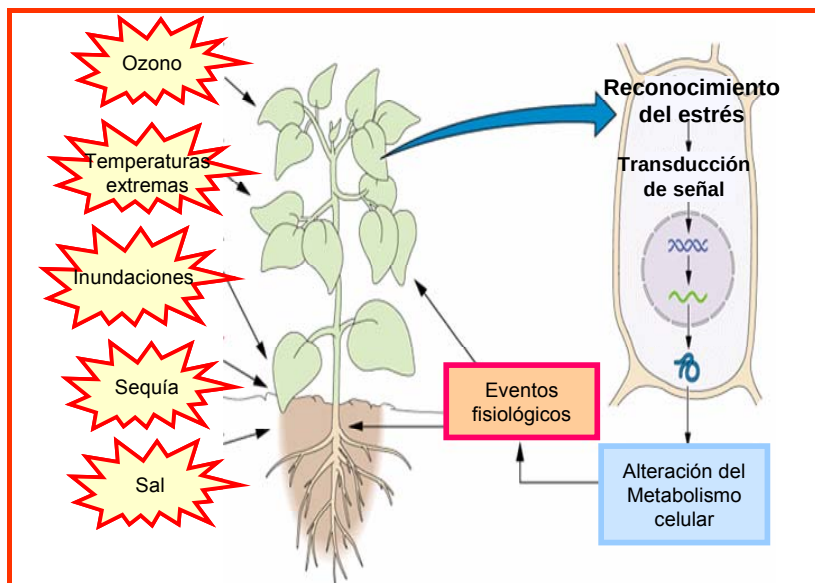


Figura 7. Mecanismos de respuesta al estrés abiótico (Figura extraída de Biochemistry and Molecular Biology of Plants, Buchanan, Grissem and Jones).

La respuesta al estrés puede ser específica a un determinado estrés o general, se realiza a través de modificaciones de los niveles hormonales, cambios en el patrón de crecimiento que normalmente implican reducción del crecimiento vegetativo del tallo, síntesis de nuevas proteínas como ubiquitina, proteasas y proteínas de choque térmico, síntesis y acumulación de compuestos osmoprotectores que actúan como osmolitos, restaurando el potencial hídrico o bien como protectores de la estructura de membranas y macromoléculas, y activación de reacciones que tratan de disminuir la concentración de las especies de oxígeno reactivo, que es incrementada prácticamente por todos los tipos de estreses.

1.4. ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo se puede producir tanto como consecuencia de un incremento en la exposición a oxidantes como a un descenso en la protección frente a estos oxidantes, pudiendo producirse ambos problemas simultáneamente (Davies, 1999). De hecho, se define el estrés oxidativo como un desequilibrio entre la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS) y la protección antioxidante (Halliwell y Gutteridge, 1989). El estrés oxidativo provocado por cualquiera de estas causas, puede causar daño a proteínas, lípidos, glúcidos y ácidos nucleicos. Son numerosos los datos que sugieren que las ROS a nivel fisiológico pueden jugar un papel importante en la señalización celular normal. En plantas, se ha comprobado que diferentes estreses ambientales, entre ellos el estrés por temperaturas extremas, heridas y alta intensidad luminosa causan un estrés oxidativo (**Figura 8**).

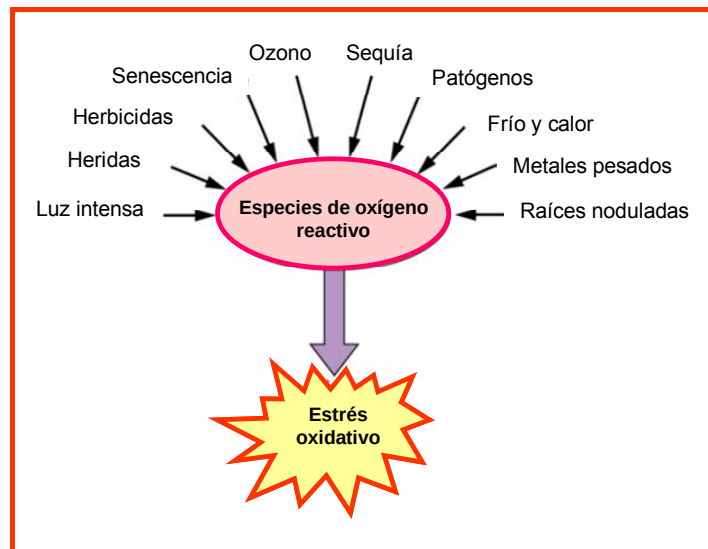


Figura 8. Factores ambientales que aumentan la concentración de especies de oxígeno reactivo (Figura extraída de *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Buchanan, Griseham and Jones).

1.4.1. LA MOLÉCULA DE OXÍGENO (O₂)

El oxígeno molecular (O₂) representa, aproximadamente, el 21% de la atmósfera terrestre, es requerido tanto en la atmósfera como en el agua para el mantenimiento de las formas de vida aeróbica. El reservorio actual de oxígeno (37 Emol, 1 Emol= 10¹⁸ moles) es resultado de la fotosíntesis, proceso en el que se libera dioxígeno a partir de agua, este valor se mantiene prácticamente constante gracias a la respiración, en la cual el oxígeno se utiliza como aceptor final de electrones.

El oxígeno es relativamente poco reactivo y tóxico, sin embargo si se altera su distribución electrónica se vuelve muy reactivo y puede alterar los sistemas biológicos. En condiciones normales de presión y temperatura, el oxígeno se encuentra en estado gaseoso formando moléculas diatómicas (O₂). El efecto tóxico del oxígeno es ejercido principalmente por sus derivados reactivos, los cuales se denominan especies de oxígeno reactivo (ROS). El dioxígeno en su estado basal es un gas inerte que no reacciona con la materia orgánica, lo cual se explica por la disposición paralela de los espines de los dos electrones desapareados que posee ("restricción de espín") (Perl-Treves y Perl, 2002). Por el contrario, las ROS son capaces de oxidar componentes celulares produciendo un daño oxidativo (Asada y Takahashi, 1987; Dat *et al.*, 2000; Asada, 1999; Hammond-Kosack y Jones, 1996).

1.4.2. ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVO (ROS)

Las especies de oxígeno reactivo son compuestos altamente reactivos que se producen como consecuencia a procesos de transferencia de energía así como de otros procesos fisiológicos, con frecuencia en respuesta a diferentes factores del ambiente (Halliwell y Gutteridge, 1989; Apel y Hirt, 2004).

El dioxígeno debe ser activado de forma física o química para hacerse químicamente reactivo. La activación física ocurre principalmente por la transferencia de energía de excitación desde un pigmento fotoactivado, como por ejemplo una molécula de clorofila activada, lo cual provoca la inversión del espín de uno de los electrones desapareados que posee originando la primera especie de oxígeno reactivo que es el oxígeno singlete. La activación química consiste en reducciones univalentes del oxígeno, se requieren cuatro electrones y cuatro protones para la reducción completa del oxígeno hasta agua, los tres intermediarios de la reducción univalente son: el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Halliwell y Gutteridge, 1989), que son químicamente reactivos y biológicamente tóxicos (Hamilton, 1991; McKersie y Leshem, 1994; Yu, 1994) **(Figura 9).**

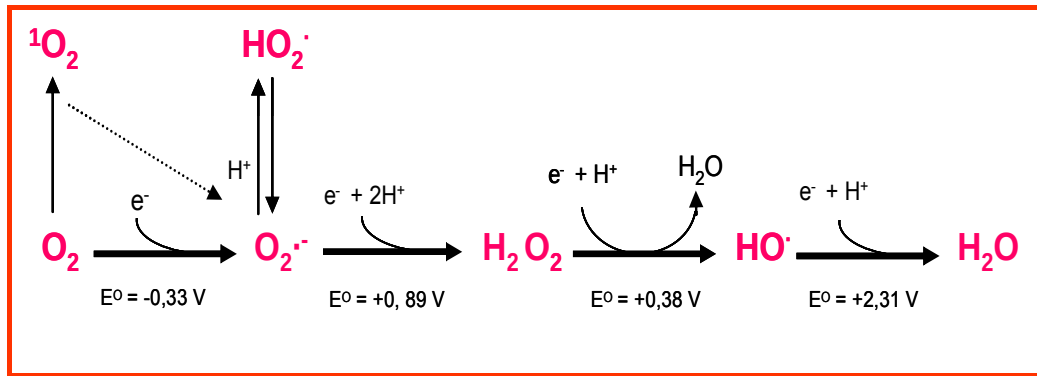


Figura 9. Formación de las especies de oxígeno reactivo.

Recientemente se ha analizado extensivamente la respuesta de plantas a los estreses ambientales, tanto a nivel bioquímico como a nivel molecular (Rizhsky *et al.*, 2004), y se han acumulado evidencias que indican que las especies de oxígeno reactivo son necesarias para diferentes aspectos del ciclo de la vida, incluyendo los procesos de adaptación a las condiciones del estrés ambiental (Bartels, 2001; Ramanjulu y Bartels, 2002).

La generación de ROS en plantas se puede detectar a los pocos minutos del tratamiento con elicitores o agentes microbiales (Apóstol *et al.*, 1989; Draper, 1997) (**Figura 10**). En la respuesta de la planta a los patógenos se ha observado una producción típicamente bifásica de ROS, una primera fase transitoria seguida de una fase sostenida y de mayor amplitud (Lamb y Dixon, 1997), estas dos fases se observan cuando existe un reconocimiento del patógeno por parte del gen de resistencia (*R*) y activación de la respuesta hipersensible, si no se reconoce al patógeno sólo actúan las defensas basales.

Las especies de oxígeno reactivo se generan en citosol, cloroplasto y mitocondria (Bowler y Fluhr, 2000; Mittler, 2002) de los tejidos y órganos de plantas durante el crecimiento y el desarrollo de la misma y también, en la respuesta a los estreses ambientales y biológicos (Dangl *et al.*, 1996; Greenberg, 1996; Pennell y Lamb, 1997). Las ROS participan en muchos procesos como la regulación de la fotosíntesis, la respuesta al patógeno, el crecimiento y el desarrollo de la planta (Dat *et al.*, 2000; Mittler, 2002; Mullineaux y Karpinski, 2002; Torres *et al.*, 2002; Foreman *et al.*, 2003; Kwak *et al.*, 2003; Apel y Hirt, 2004).

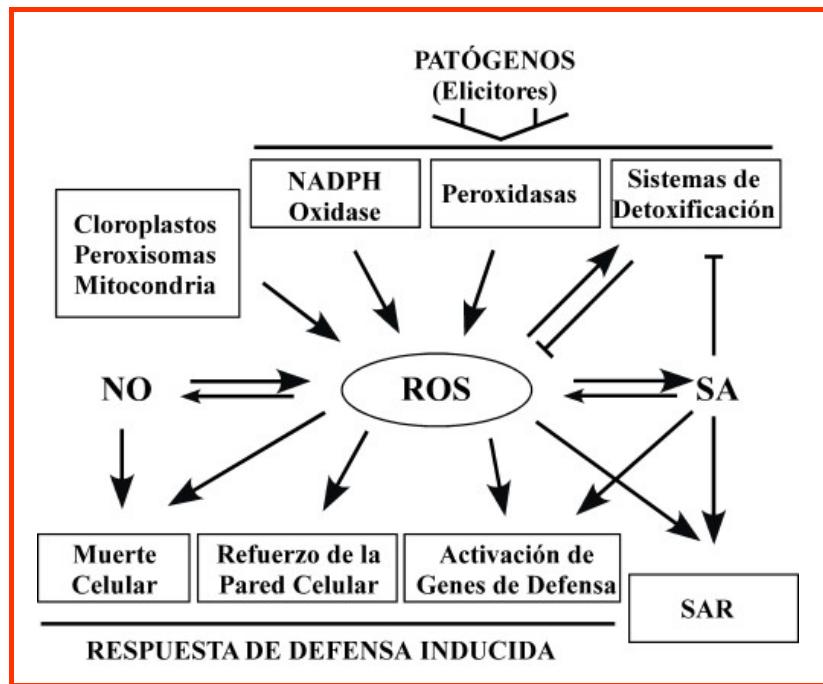


Figura 10. Producción de ROS y su funciones en la respuesta a patógenos (Figura extraída de Ángel Torres *et al.*, 2006).

En condiciones fisiológicas normales, las especies de oxígeno reactivo generadas por el metabolismo celular no producen efectos tóxicos, ya que, una vez ejercida su función, son eliminadas eficientemente por los sistemas antioxidantes. Sin embargo, bajo determinadas situaciones de estrés, la síntesis de ROS se incrementa hasta el punto de no poder ser eliminadas por los sistemas antioxidantes, generando, de esta forma, un estrés oxidativo que provoca daño en membranas células, lípidos, proteínas y otros componentes celulares llevando finalmente a la muerte celular o a la aparición de lesiones necróticas (Doke, 1997; Foyer y Noctor, 2005). En plantas, se ha descrito que las ROS son generadas en respuesta a situaciones tanto de estrés biótico como abiótico, tales como bajas temperaturas, salinidad, sequía, metales pesados, contaminantes, herbicidas, heridas mecánicas y patógenos (Bartosz, 1997; Palma *et al.*, 2002; Sandalio *et al.*, 2001; Dat *et al.*, 2000).

Aunque ROS causa un daño oxidativo a las células durante el estrés ambiental, estudios recientes han demostrado también su papel como molécula señal involucrada en la respuesta a la infección por patógenos, estrés ambiental y muerte celular programada (Mittler *et al.*, 2004; Torres y Dangl, 2005).

1.4.2.1. El oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)

Es una especie muy reactiva, que se origina por la transferencia de energía desde otra molécula reactiva por reacciones fotoquímicas, principalmente por la transferencia de energía de excitación desde un pigmento fotoactivado, lo cual provoca la inversión del espín de uno de los electrones desapareados que posee, originando el oxígeno singlete. Se forma en altas cantidades en el cloroplasto y tiene una vida muy corta, de unos 4 microsegundos en agua y 100 microsegundos en un ambiente no polar (Foyer y Harbinson, 1994).

El oxígeno singlete puede inactivar a las proteínas presentes en los fotosistemas e incluso a las clorofilas y probablemente actuar como iniciador del proceso que conduce a la peroxidación de lípidos con el consiguiente daño de las membranas tilacoidales. Además, puede ejercer daños en el DNA, así como estimular la formación de otras ROS y de radicales hidropéroxilo e hipoclorito en su forma protonada o no protonada.

1.4.2.2. El anión superóxido (O_2^-)

Es un mecanismo de defensa bien caracterizado que utilizan las células del sistema inmunológico de animales para matar los microorganismos. En plantas, la producción de esta molécula se realiza mediante la enzima NADPH oxidasa localizada en la membrana plasmática de las células o mediante la acción de xantina oxidasa en la matriz peroxisomal y de la cadena de transporte de electrones dependiente de NADH en la membrana peroxisomal (del Río *et al.*, 1992, 1996; López-Huertas *et al.*, 1996).

El anión superóxido es ligeramente reactivo, tiene una vida media de 2 a 4 microsegundos, y provoca daño oxidativo a determinadas enzimas como la ribonucleótido reductasa, fumarasa y aconitasa (Halliwell y Gutteridge, 2000). En soluciones acuosas, la protonación del anión superóxido genera el radical hidropéroxilo, el cual, a diferencia del anión superóxido puede atravesar las membranas biológicas, quitando átomos de hidrógeno de sus ácidos grasos poliinsaturados y hidropéroxidos lipídicos convirtiéndolos en peróxidos lipídicos tóxicos, iniciando la destrucción de las membranas biológicas (Halliwell y Gutteridge, 1989; Grant y Loake, 2000; Asada y Takahashi, 1987).

1.4.2.3. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

El peróxido de hidrógeno es ligeramente reactivo, tiene una vida media relativamente larga, puede difundir libremente por los compartimentos acuosos y las membranas y puede inactivar algunas enzimas mediante la oxidación de sus grupos tiol. Al principio, se consideraba como un metabolito celular tóxico, sin embargo, con el tiempo se han demostrado su importancia como molécula señal tanto en plantas como en animales (Neill *et al.*, 2002b; Finkel, 2000).

La síntesis de H_2O_2 tiene lugar durante la β -oxidación de ácidos grasos y en la reacción de la glicolato oxidasa de peroxisoma durante la fotorrespiración (Foyer y Noctor, 2000). Además, hay otras enzimas capaces de producir H_2O_2 como oxalato oxidasa, peroxidasas de la pared celular, aminooxidasa y oxidasa que contienen flavinas (Berna y Barnier, 1999; Bolwell, 1999; Sagi y Fluhr, 2001) (**Figura 11**). El H_2O_2 se induce tras la exposición de plantas a varios estreses bióticos y abióticos, entre ellos las temperaturas extremas, irradiación ultravioleta, ozono, deshidratación, heridas y patógenos (Prasad *et al.*, 1994; Orozco-Cárdenas y Ryan, 1999; Guan *et al.*, 2000; Langebartels *et al.*, 2000; Pei *et al.*, 2000; AH-Mackerness *et al.*, 2001). Su concentración es diferente entre un tejido y otro y entre especies, en *Arabidopsis* varía de 60 μM a 7 mM (Veljovic-Jovanovic *et al.*, 2001; Karpinski *et al.*, 1999), y de 1 a 2 mM en maíz y arroz (Jiang y Zhang, 2001; Lin y Kao, 2001).

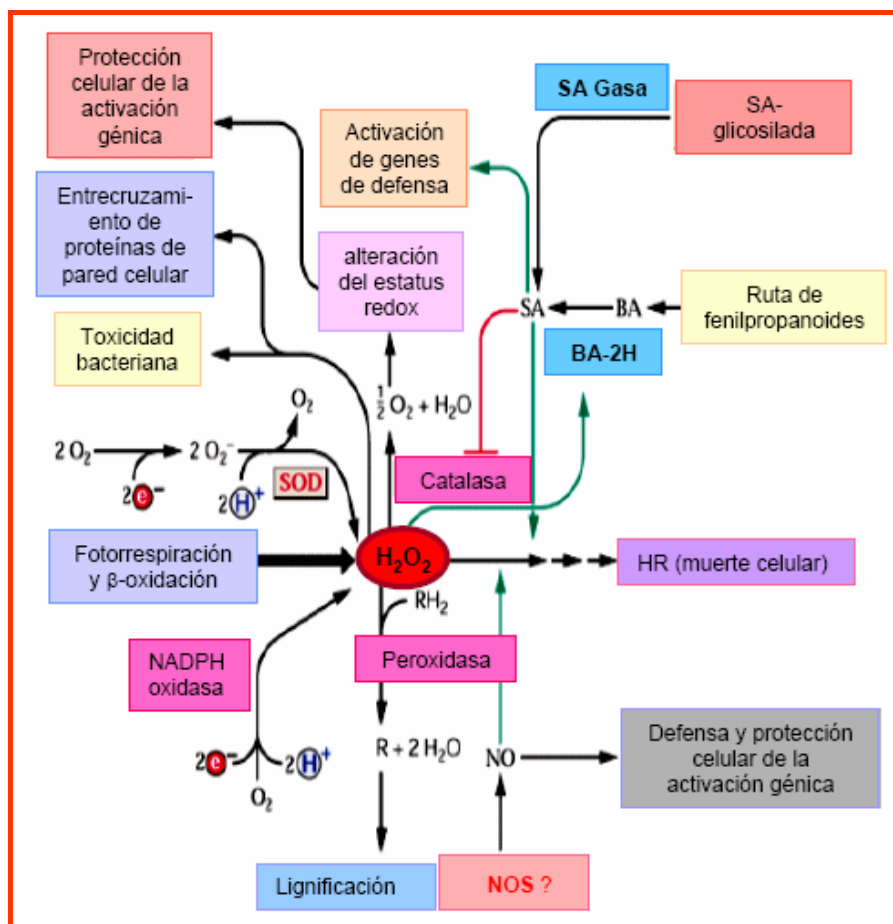


Figura 11. Papel del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), óxido nítrico (NO) y ácido salicílico (SA) en la activación y coordinación de las reacciones de defensa en plantas. SOD, superóxido dismutasa; SAGas, SA glicosiltransferasa; BA-2H, ácido benzoico 2-hidroxilasa abiótico (Figura extraída de Biochemistry and Molecular Biology of Plants, Buchanan, Griseham and Jones).

Por otro lado, el H_2O_2 regula directamente la expresión de muchos genes, algunos de ellos están implicados en la defensa de la planta y en la respuesta hipersensible (Levine *et al.*, 1994; Alvarez *et al.*, 1998; Desikan *et al.*, 2000; Kovtun *et al.*, 2000). Además, está implicado en la biosíntesis de fitoalexina (Degousee *et al.*, 1994), en el proceso de lignificación y en la transcripción de proteínas de defensa (Levine *et al.*, 1994). Su acumulación es potencialmente dañina, ya que puede llevar a un daño oxidativo. En plantas, parece ser que el estallido oxidativo y la acumulación de H_2O_2 están mediados por la activación del complejo NADPH oxidasa unido a la membrana (Lamb y Dixon, 1997; Ogawa *et al.*, 1997; del Río *et al.*, 1998; Potikha *et al.*, 1999; Pei *et al.*, 2000), y puede ser eliminado por la catalasa y la ascorbato peroxidasa (Asada, 1994; Willekens *et al.*, 1997).

1.4.2.4. El radical hidroxilo (OH)

Es la especie de oxígeno reactivo más reactiva, se forma en el cloroplasto a partir de H_2O_2 por la reacción de Haber-Weiss o Fenton (Halliwell y Gutteridge, 1989). El radical hidroxilo es un agente altamente oxidante que se genera por la adición de un electrón al peróxido de hidrógeno. Es el derivado de oxígeno reactivo más tóxico que se produce, tiene una vida media de nanosegundos y precisamente debido a su corta existencia ha sido difícil estudiarlo con detalle. El radical hidroxilo provoca la abstracción de una molécula de hidrógeno (H) de una molécula orgánica (RH) formando un radical orgánico ($R^\cdot$) que reacciona con O_2 para formar el radical peroxilo ($ROO^\cdot$), éste a su vez puede reaccionar con una segunda molécula orgánica para formar un hidroperóxido ($ROOH$) y un nuevo radical orgánico que continuará la cadena de reacciones (Nappi y Vass, 1998). Además, reacciona con la mayoría de los compuestos presentes en los sistemas biológicos provocando daño oxidativo en proteínas y en ácidos nucleicos, así como la rotura de las cadenas de estos últimos (Packer y Glazer, 1990; Halliwell y Gutteridge, 2000).

1.5. MECANISMOS DE DEFENSA FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO

La gran diversidad en la vida media de los distintos prooxidantes, desde nanosegundos en el caso del radical hidroxilo hasta varios segundos en el de los radicales peroxilo pone de manifiesto la gran variedad de sistemas de defensa necesarios para hacerles frente (Sies y Stahl, 1995). Por esa razón, se han desarrollado una serie de mecanismos de defensa, entre ellos las enzimas secuestradoras y los antioxidantes no enzimáticos. Estos sistemas controlan la formación excesiva de radicales libres y especies de oxígeno reactivo o inhiben su reacción con estructuras biológicas. Esta función antioxidante puede inducir cambios en el metabolismo y juega un papel importante en la

regulación de la expresión de determinadas proteínas y en su actividad a nivel transcripcional y/o postranscripcional (Chaudière y Ferrari-Iliou, 1999).

1.5.1. ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

Las células disponen de un conjunto de mecanismos no enzimáticos que le permiten protegerse de la agresión oxidativa que pueden causar los radicales libres, por lo que deben estar presentes en todos los compartimentos celulares. Los más importantes están constituidos por vitaminas y micronutrientes (Sies y Stahl, 1995), algunos son hidrosolubles como la vitamina C y el glutathione y otros son liposolubles como los β -carotenos o la vitamina E.

1.5.1.1. El ascorbato

El L-ácido ascórbico (L-AA, L-treo-hexenon-1,4-lactona) o vitamina C, es un antioxidante conocido en sistemas animales que reacciona no sólo con el peróxido de hidrógeno, sino también con el anión superóxido y el radical hidroxilo. El ascorbato es considerado como un antioxidante muy importante en fluidos extracelulares, donde actúa eficientemente atrapando los radicales peroxilo en la fase acuosa, antes de que estos puedan iniciar la peroxidación lipídica, de esta forma el ácido ascórbico protege a las membranas del daño peroxidativo.

Además, el ascorbato está implicado de alguna forma en el control del crecimiento de las células vegetales. Los niveles del ascorbato de la planta dependen de la edad del organismo o del tejido (Potters *et al.*, 2002), así, las plantas en fase de crecimiento presentan una síntesis continua de ascorbato (de Gara *et al.*, 2000; de Pinto *et al.*, 1999, 2000), pero cuando las hojas comienzan a envejecer el contenido en ascorbato del apoplasto se reduce de manera significativa (Takahama, 1999). El metabolismo del ascorbato está relacionado con la regulación del ciclo celular de manera que la división celular requiere ascorbato y éste promueve además el progreso del ciclo celular (Potters *et al.*, 2002) favoreciendo la transición a la fase S. Para que el ascorbato funcione de manera eficaz eliminando H_2O_2 debe encontrarse en estado reducido. La primera forma oxidada del ascorbato es el monodeshidroascorbato, un radical poco reactivo (Bielski *et al.*, 1975) y con tendencia a desproporcionarse de manera espontánea hasta una molécula de ascorbato y otra de deshidroascorbato.

1.5.1.2. El glutathione

El glutathione (GSH, γ -L-glutamyl-L-cisteinyl-glicina) es uno de los principales antioxidantes en las células de plantas donde participa en el ciclo de ascorbato-glutathione

(Noctor y Foyer, 1998; Foyer, 2001). Es un tiol soluble no proteico muy abundante en el citoplasma de las células donde juega un papel central en la defensa antioxidante. Actúa como donador o aceptor de electrones, su oxidación provoca que dos moléculas de glutathion reducido (GSH) se unan por un puente disulfuro dando lugar al disulfuro de glutathion o glutathion oxidado (GSSG). Debido a su alta concentración intracelular (5-10 mM), es considerado como un regulador homeostático del estado de oxido-reducción celular. En este metabolito predomina ampliamente su forma reducida sobre la oxidada. Debido a su participación en muchos equilibrios de óxido-reducción acoplados, un ligero desplazamiento del equilibrio hacia la forma oxidada afecta de manera alarmante el estado de oxido-reducción general de la célula. Esto es especialmente crítico para la regulación de algunos factores de transcripción, cuya actividad depende del estado de oxido-reducción en el que se encuentren.

La síntesis de glutathion se lleva a cabo en dos etapas consecutivas: en la primera fase, catalizada por la γ -glutamylcisteína sintetasa (γ -ECS), se sintetiza el péptido γ -glutamylcisteína a partir de glutamato, cisteína y ATP. En la segunda fase, la enzima glutathion sintetasa (GS) cataliza la adición de una molécula de glicina al extremo C-terminal del dipéptido anterior, con la consiguiente formación de GSH, estas dos reacciones se realizan en citosol y cloroplasto.

El GSH tiene un papel importante en la detoxificación de especies de oxígeno reactivo. Se ha visto que las células se protegen del estrés oxidativo y nitrosativo aumentando los niveles basales de glutathion (Chatterjee *et al.*, 2000). Su regeneración depende del consumo de NAD(P)H. También, actúa como compuesto de transporte a larga distancia de azufre reducido, y está implicado en los procesos de transducción de señales (Puppo *et al.*, 2005). La subida o bajada de los niveles normales de GSH puede incrementar la susceptibilidad al estrés oxidativo y puede facilitar la señalización redox en procesos importantes como la interacción incompatible planta-patógeno o la muerte celular programada (Foyer y Noctor, 2005).

1.5.1.3. Los tocoferoles

Son conocidos como vitamina E, y son antioxidantes fenólicos presentes en plantas y animales. Las plantas sintetizan los tocoferoles mediante enzimas localizadas en la membrana cloroplastídica (Soll *et al.*, 1984). Debido a la hidrofobicidad de los tocoferoles, se encuentran en medio lipídico, sobre todo en lípidos de membrana y en lipoproteínas de baja densidad, y es aquí donde ejercen principalmente sus acciones antioxidantes, como inhibidores de la peroxidación lipídica.

1.5.1.4. Los carotenoides

Son moléculas liposolubles sintetizadas por plantas y microorganismos. Son los responsables del color de muchas plantas, frutas y flores. Protegen las plantas y los animales frente al daño oxidativo. Los carotenoides de plantas se forman en el cloroplasto a partir del difosfato isopentil. La función natural de los carotenoides es la de colaborar en la absorción de la luz del sol durante la fotosíntesis y proteger a las células de la fotosensibilización.

1.5.1.5. Los flavonoides

Son compuestos fenólicos que se encuentran en muchas plantas y tienen una alta capacidad para neutralizar los radicales libres. Su síntesis aumenta en plantas frente al aumento en la radiación ultravioleta, y podrían proteger a la célula frente a la peroxidación lipídica (Torel *et al.*, 1986).

1.5.2. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

La función de estos antioxidantes es prevenir la iniciación de las oxidaciones en cadena, eliminando las especies de oxígeno reactivo parcialmente reducidos ($O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2). Los principales mecanismos de plantas para la eliminación de las ROS son las enzimas superóxido dismutasas, ascorbato peroxidasa y catalasa (Asada y Takahashi, 1987; Bowler *et al.*, 1992; Willekens *et al.*, 1997).

1.5.2.1. Superóxido dismutasas (SODs, EC 1.15.1.1)

Las superóxido dismutasas fueron descubiertas por McCord y Fridovich (1969), son las principales enzimas antioxidantes presentes en células procarióticas y eucarióticas, y son las primeras en la defensa contra los efectos tóxicos del radical superóxido producido en los diferentes compartimentos celulares (Fridovich, 1986; Halliwell y Gutteridge, 2000). Las SODs son metaloproteínas que catalizan la dismutación del anión superóxido hasta peróxido de hidrógeno y oxígeno en todos los organismos aeróbicos y en algunos anaeróbicos (Hassan, 1989) (**Figura 12**).

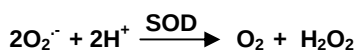


Figura 12. Reacción catalizada por la superóxido dismutasa.

Las SODs se localizan en todos los compartimentos subcelulares susceptibles al estrés oxidativo (Bowler *et al.*, 1992). De acuerdo con el cofactor metálico que presente la enzima en su sitio activo, las SODs se clasifican en tres grupos: cobre-zinc SOD (Cu/Zn-SOD), hierro SOD (Fe-SOD) y manganeso SOD (Mn-SOD). Las isoformas Fe-SOD y Mn-SOD tienen una estructura similar (Stallings *et al.*, 1984). Se distingue entre las tres isoformas por su sensibilidad diferencial a KCN y H₂O₂.

El número y el tipo de isoformas de SOD se varía dependiendo de la especie de planta, edad del desarrollo y las condiciones ambientales (Corpas *et al.*, 2006a). Hay algunas especies de plantas con una sola isoforma de SOD, en plantas de girasol se ha detectado únicamente la isoforma Cu/Zn-SOD (Corpas *et al.*, 1998).

La Cu/Zn-SOD es una proteína dimérica que presenta una molécula de Cu y otra de Zn en cada subunidad, es la más abundante en plantas superiores y se localiza en citosol, cloroplasto, peroxisoma y apoplasto (Sandalio y del Río, 1988; Kanematsu y Asada, 1991; Ogawa *et al.*, 1997; Sandalio *et al.*, 1997; Corpas *et al.*, 1998; del Río *et al.*, 2002), y en hojas de olivo se localiza en cloroplastos, citosol, núcleo y peroxisomas (Corpas *et al.*, 2006a). En cotiledones de girasol se han identificado cuatro isoformas en mitocondria, y al menos una isoforma en peroxisomas. Además, se ha descrito que la Cu/Zn-SOD cataliza la descomposición de S-nitrosotioles de bajo peso molecular a óxido nítrico (Jourdain *et al.*, 1999; Jonson *et al.*, 2001).

La Mn-SOD es una proteína homotetramérica, que ha sido caracterizada en una serie de organismos incluyendo bacterias, algas, hongos y animales (Bannister *et al.*, 1987), y también en algunas plantas superiores (Sevilla *et al.*, 1980a, 1980b, 1982; Fernández *et al.*, 1982; Baum y Scandalios, 1981; Steller *et al.*, 1994; Kröniger *et al.*, 1995). En células eucarióticas, la Mn-SOD se localiza en la mitocondria (Fridovich, 1995; Halliwell y Gutteridge, 2000), en hojas de guisante se encuentra principalmente en la mitocondria y con menos extensión en peroxisoma (del Río *et al.*, 1983; Sandalio *et al.*, 1987). La secuencia de la Mn-SOD de plantas tiene una alta similitud con la de bacterias.

La Fe-SOD es una proteína homodimérica, probablemente es la isoforma más antigua, se ha encontrado en todas las células procarióticas y eucarióticas. Se ha aislado a partir de *Euglena gracilis* (Kanematsu y Asada, 1979) y de plantas superiores. Se localiza principalmente en cloroplastos (Asada, 1994) y peroxisomas (Droillard y Paulin, 1990).

1.5.2.2. Catalasa (Cat; EC 1.11.1.6)

Las catalasas son hemoproteínas con estructura tetramérica, catalizan la dismutación de H₂O₂ hasta O₂ y H₂O sin utilizar sustratos reductores (Kirkman y Gaetani, 1978; Kirkman *et al.*, 1987) (**Figura 13**).



Figura 13. Reacción catalizada por la catalasa.

Las catalasas son capaces de llevar a cabo ciertas reacciones peroxidásicas a pH básico, en presencia de H_2O_2 actuando sobre algunos aldehídos y ácidos orgánicos como sustratos (Halliwell y Gutteridge, 2000). Estas proteínas están presentes en casi todos los organismos aeróbicos y algunos anaeróbicos. En células eucarióticas, se localizan en peroxisoma casi de forma exclusiva (del Río *et al.*, 1992), aunque también se ha descrito su presencia en citosol y mitocondria (Willekens *et al.*, 1994; Guan y Scandalios, 1996). En plantas de girasol se han identificado ocho isoformas de catalasa con tamaños moleculares entre 55 y 59 kDa por subunidad. Estas proteínas tienen un papel importante en la regulación de la concentración de ROS en las células (Elstner, 1987). Las catalasas tanto animales como vegetales son sensibles a la luz (Björn, 1969; Feierabend y Engel, 1986).

1.5.2.3. Enzimas del ciclo ascorbato-glutation

También denominado ciclo de Foyer-Halliwell-Asada (Foyer y Halliwell, 1976) (**Figura 14**), protege las células vegetales frente al estrés oxidativo usando una serie de reacciones redox, principalmente en los tejidos fotosintéticos (Foyer y Halliwell, 1976), mitocondria y peroxisoma (Jiménez *et al.*, 1997). En este ciclo participan las siguientes enzimas: ascorbato peroxidasa (APX), monodeshidroascorbato reductasa (MDAR), deshidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión reductasa (GR). Las enzimas de este ciclo se localizan principalmente en cloroplastos, mitocondrias, citosol y peroxisomas (Jiménez *et al.*, 1997; Foyer *et al.*, 1997; Mittler *et al.*, 2002).

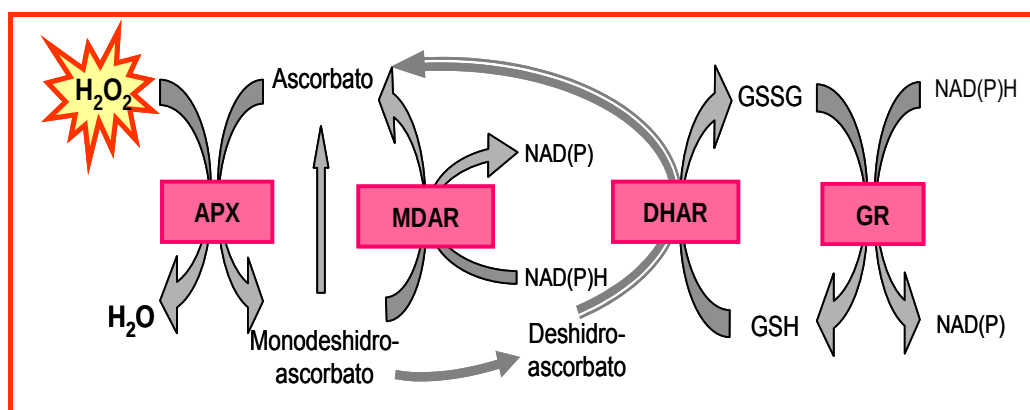


Figura 14. Reducción de H_2O_2 por el ciclo del Ascorbato-Glutatión o de Foyer-Halliwell-Asada.

1.5.2.3.1. Ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11)

La APX es una proteína monomérica que tiene un tamaño molecular entre 30 y 40 kDa (Tanaka *et al.*, 1991; Ishikawa *et al.*, 1996; Morimura *et al.*, 1996), aunque también se han descrito otras formas diméricas (Mittler y Zilinskas, 1991). Tiene un papel importante en la eliminación de H_2O_2 usando el ascorbato como donador de electrones reduciendo el H_2O_2 a H_2O y monodeshidroascorbato (MDHA). Esta proteína reduce el H_2O_2 en cloroplasto y citosol de plantas, algas y algunas cianobacterias, está implicada directamente en la respuesta de defensa frente al estrés oxidativo.

Dependiendo de la localización subcelular de la ascorbato peroxidasa, se han descrito diferentes isoformas: citosólica, estromatal, mitocondrial, tilacoidal y glioxisomal (Shigeoka *et al.*, 2002). Las isoformas tilacoidal y estromatal se localizan en el cloroplasto (Miyake y Asada, 1992) y están implicadas en la eliminación del H_2O_2 producido por la fotosíntesis.

1.5.2.3.2. Monodeshidroascorbato reductasa (MDAR; EC 1.6.5.4)

La MDAR esta implicada en la regeneración del ascorbato reducido usando NAD(P)H como donador de electrones. En plantas, la actividad MDAR ha sido descrita en diferentes compartimentos celulares como cloroplasto (Hossain *et al.*, 1984), citosol, mitocondria (Dalton *et al.*, 1993; Jiménez *et al.*, 1997; Mittova *et al.*, 2003), glioxisoma (Bowditch y Donaldson, 1990) y matriz peroxisomal (Leterrier *et al.*, 2005; Lisenbee *et al.*, 2005). Esta enzima se ha purificado a partir de distintas fuentes como fruto de pepino (Hossain y Asada, 1985) y nódulos de raíz de soja (Dalton *et al.*, 1992), y también se ha aislado el DNA complementario de un número significativo de especies (Murphy y Zilinskas, 1994; Sano y Asada, 1994; Grantz *et al.*, 1995).

1.5.2.3.3. Deshidroascorbato reductasa (DHAR, EC 1.8.5.1)

La DHAR cataliza la reducción divalente de deshidroascorbato (DHA) a ascorbato usando glutatión reducido (GSH) como fuente de poder reductor (Hossain y Asada, 1984; Villalba *et al.*, 1995). Es una enzima poco caracterizada debido a su baja estabilidad (Foyer y Halliwell, 1977; Trumper *et al.*, 1994) lo que unido a su baja afinidad por el sustrato (Minetti *et al.*, 1992), ha llevado a sugerir que *in vivo* esta enzima no parece ser fundamental en el mantenimiento de ascorbato en su forma reducida e incluso se ha dudado de su existencia como enzima específica (Morell *et al.*, 1997). La DHAR es un monómero de unos 23 kDa, se ha purificado, entre otras fuentes, a partir de hojas de espinaca (Foyer y Halliwell, 1977; Hossain y Asada, 1984), tallos de guisante (Jablonski y Anderson, 1981) y tubérculos de patata (Dipierro y Borranccino, 1991).

1.5.2.3.4. Glutation reductasa (GR, EC 1.6.4.2)

La glutatión reductasa es una flavoproteína que cataliza la conversión de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) usando NAD(P)H como donador de electrones. Es una proteína dimérica con FAD en el centro activo de cada subunidad (Halliwell y Gutteridge, 2000). Se ha purificado y caracterizado en una serie de organismos como bacterias, hongos y plantas. En plantas superiores, la actividad GR está repartida al menos entre dos compartimentos subcelulares (plástido y citosol), y en guisante hay, al menos, una pequeña fracción mitocondrial. La GR peroxisomal se ha purificado y caracterizado en hojas de guisante (Romero-Puertas *et al.*, 2006). Esta enzima juega un papel importante en la protección de la planta frente a distintas situaciones de estrés.

1.5.2.4. Peroxirredoxina (Prx, EC 1.11.1.15)

Las peroxirredoxinas son proteínas con actividad peroxidasa, tienen un tamaño molecular en torno a 27 kDa y con una especificidad de sustrato amplia ya que son capaces de reducir diversos peróxidos como H₂O₂, alquil hidroperóxidos y peroxinitritos (Bryk *et al.*, 2000, Rhee *et al.*, 2005). Las Prx poseen una o dos cisteínas características en regiones altamente conservadas que son fundamentalmente para la actividad catalítica y se pueden dividir en cuatro subgrupos. El primer subgrupo está representado de las peroxirredoxinas de una cisteína que se localizan en el núcleo. El segundo subgrupo está representado por las peroxirredoxinas de dos cisteínas que se localizan en el cloroplasto. El tercer grupo son Prx de tipo II fueron descubiertas por Verdoucq *et al.* (1999), parece situarse en peroxisomas de células eucarióticas, citosol, mitocondrias y cloroplastos. Por último, el cuarto grupo son Prx Q se localizan fundamentalmente en los cloroplastos. La mayoría de las peroxirredoxinas dependen de la tiorredoxina como donador de electrones, aunque pueden recibir electrones de otros tioles o de otras proteínas específicas (Hofmann *et al.*, 2002). Recientemente, se ha puesto de manifiesto el papel de algunas peroxirredoxinas en la defensa frente al estrés oxidativo (Dietz *et al.*, 2006).

1.5.2.5. Deshidrogenasas dependientes de NADP

1.5.2.5.1. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP (G6PDH-NADP; EC 1.1.1.49)

La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa es la primera enzima implicada en la ruta de las pentosas fosfato, cataliza la oxidación de glucosa 6-fosfato hasta 6-fosfogluconolactona reduciendo NADP a NADPH (**Figura 15**).

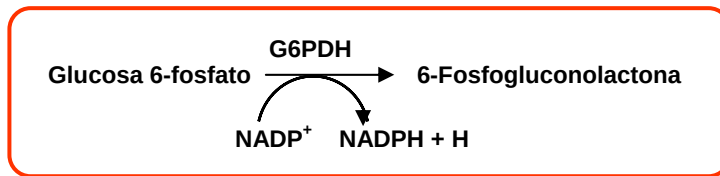


Figura 15. Reacción catalizada por la G6PDH-NADP.

Estudios recientes han demostrado que la G6PDH juega un papel clave en la protección frente al estrés oxidativo en bacterias, levaduras y humanos, debido a que el NADPH generado mantiene los niveles adecuados de glutatión reducido necesarios para combatir el estrés oxidativo y mantener el medio reductor en la célula.

En plantas superiores, se han identificado dos isoformas de G6PDH, una en el citosol y otra en el plástido (Heber *et al.*, 1967; Schnarrenberger *et al.*, 1973), la isoforma citosólica representa aproximadamente 90% de la actividad total en muchas especies/órganos (Debnam y Emes, 1999). Se ha demostrado que altas concentraciones de NADPH son capaces de inhibir tanto la isoforma cloroplastídica (Lendzian y Bassham, 1975) como la citosólica (Fickenscher y Scheibe, 1986).

1.5.2.5.2. Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP (ICDH-NADP, EC 1.1.1.42)

Esta enzima cataliza la conversión reversible de isocitrato a 2-oxoglutarato y CO₂ con la producción de coenzima reducido NADPH (Gálvez y Gadál, 1995) (**Figura 16**). *In vitro* el equilibrio de la reacción depende principalmente de pH de la solución del ensayo (Siebert *et al.*, 1957).

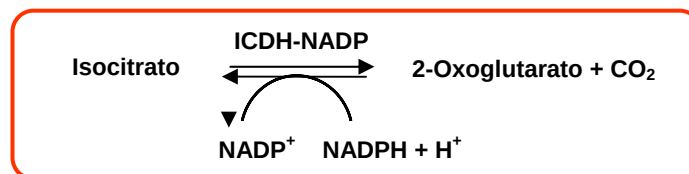


Figura 16. Reacción catalizada por la ICDH-NADP.

La ICDH-NADP es una proteína dimérica que se ha localizado en células procarióticas y en diferentes compartimentos de eucarióticas como citosol, mitocondria y peroxisoma (Illingworth y Tipton, 1970; Gonzalez-Villasenor y Powers, 1986; Haselbeck y McAlister-Henn, 1991). La distribución subcelular de la actividad ICDH en plantas superiores

se encuentra en aproximadamente un 90% en el citosol (Chen *et al.*, 1988, 1989; Fieuw *et al.*, 1995; Canino *et al.*, 1996; Palomo *et al.*, 1998), 10% en el cloroplasto (Randall y Givan, 1981), menos de 1% en peroxisoma (Corpas *et al.*, 1999) y incluso menos en la mitocondria (Satoh, 1972; Randall y Givan, 1981; Rasmusson y Møller, 1990; Attucci *et al.*, 1994; Møller y Rasmusson, 1998).

La actividad ICDH-NADP mitocondrial es más alta en los tejidos fotosintéticos que en no fotosintéticos (Igamberdiev y Gardeström, 2003), lo que indica la importancia de esta enzima durante la fotosíntesis. Además, juega un papel importante en la defensa frente al estrés oxidativo en levadura (Minard y McAlister-Henn, 2001).

1.5.2.5.3. Enzima málico dependiente de NADP (EM-NADP, EC 1.1.1.40)

Se ha detectado en tejidos animales, vegetales y en microorganismos procarióticos y eucarióticos (Walker, 1962). Esta enzima cataliza la descarboxilación oxidativa de malato a piruvato (**Figura 17**).

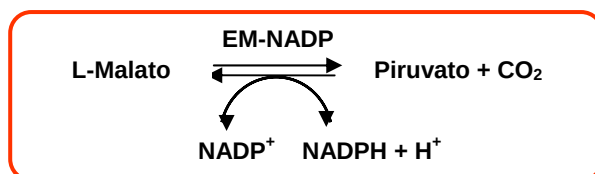


Figura 17. Reacción catalizada por la EM-NADP.

La actividad EM-NADP se ha encontrado en la matriz de la mitocondria de todas las plantas analizadas hasta la fecha, la presencia de esta enzima permite a la mitocondria de las plantas manejar una vía alternativa para el metabolismo de fosfoenolpiruvato (PEP) derivado de glicólisis. La isoforma citosólica participa en la regulación de pH intracelular (Davies y Patil, 1974) o en la provisión del poder reductor que puede usar en los procesos que utilizan el NADPH. En el citosol el malato se puede formar a partir de PEP por la acción de las enzimas PEP carboxilasa y malato deshidrogenasa, posteriormente, se transporta al interior de la matriz mitocondrial donde la enzima málico lo reoxida de nuevo a piruvato. El nivel de expresión de EM-NADP citosólica y plastídica aumenta en respuesta al estrés por hongos, luz ultravioleta, sal y heridas (Schaaf *et al.*, 1995).

Uno de los papeles más claro de EM-NADP en plantas es su función como donador de CO₂ a la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa del ciclo de Calvin, también tiene un papel muy importante en la fotosíntesis en algunas plantas.

1.6. LEUCINA AMINOPEPTIDASA (Leu-AP, EC 3.4.11.1)

Es un miembro de la familia M17 de peptidasas, se ha localizado en animales, plantas y células procarióticas. Es una metalopeptidasa hexamérica que cataliza la liberación del residuo N-terminal de la proteína o del péptido. En células animales las exopeptidasas son importantes en la activación y desactivación de péptidos y en la regulación de la vida media de las proteínas (Bradshaw *et al.*, 1998). De forma similar, la leucina aminopeptidasa puede participar en la modulación de los niveles o la actividad de proteínas o péptidos reguladores. Además, puede facilitar el recambio de las proteínas que han sufrido daños debido a las especies de oxígeno reactivo generadas durante el estrés.

1.7. EL ÓXIDO NÍTRICO EN PLANTAS

1.7.1. ESPECIES DE NITRÓGENO REACTIVO (RNSs)

Se forman por la interacción del óxido nítrico (NO) con otros radicales y oxígeno. Las principales especies de nitrógeno reactivo son el NO y otras moléculas relacionadas con el como peroxinitrito (ONOO⁻), trióxido dinitrógeno (N₂O₃), 3-nitrotirosina (n-Tyr), dióxido de nitrógeno (NO₂) y catión nitrosonio (NO⁺) (Hausladen y Stamler, 1999; Halliwell y Gutteridge, 2000).

Las RNSs pueden dañar y matar las células por distintos mecanismos como la inactivación de los diferentes complejos de la cadena respiratoria (Brown, 1999), daño a proteínas y lípidos (Berlett y Stadtman, 1997; Steinberg, 1997; Tien *et al.*, 1999; Prescott, 1999) e inhibición de la síntesis proteica o del DNA (Kim *et al.*, 1998; Bundy *et al.*, 2000). La mayoría de los estudios sobre las plantas se han enfocado sobre el NO y se conoce poco sobre otras especies de nitrógeno reactivo.

1.7.1.1. El óxido nítrico (NO)

El óxido nítrico (NO) es un gas inorgánico incoloro y muy lábil, de bajo peso molecular, que tiene un electrón desapareado en su capa exterior y debido a ello posee las características de un radical, lo cual explica su elevada reactividad y su tendencia a unirse con hemoproteínas reducidas. Es inestable en medio acuoso y en presencia de oxígeno se oxida a nitritos y nitratos que son sus metabolitos estables. El NO es ligeramente soluble en agua y algo más soluble en solventes orgánicos, tiene una vida media de menos de seis segundos (Thomas *et al.*, 2001), siendo el nitrito el producto más abundante de su catabolismo.

El óxido nítrico o monóxido de nitrógeno puede existir como tres especies distintas e interconvertibles, ya que puede adoptar una estructura energéticamente más favorable ganando o perdiendo un electrón, estas especies son el propio radical (NO), el anión

nitroxilo (NO^-) y el catión nitrosonio (NO^+), las cuales difieren en sus propiedades físicas y en su reactividad química (Stamler *et al.*, 1992; Hughes, 1999; Wojtaszek, 2000).

La emisión de óxido nítrico en plantas y su efecto sobre el crecimiento fueron observados por primera vez por Klepper en 1975, mucho antes que en animales. En 1998 aparecieron dos publicaciones que describían su participación como señal de defensa en plantas tanto a nivel intra como intercelular (Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998). En los últimos años el NO en plantas ha recibido una atención considerable y hay evidencias cada vez más importantes sobre su papel en el crecimiento y el desarrollo de plantas. En plantas superiores, diferentes trabajos demostraron el papel de NO como mensajero en varios procesos fisiológicos importantes. No obstante, hay pocas informaciones hasta la fecha sobre su producción celular y subcelular (Neill *et al.*, 2003).

La molécula de NO parece ser que se sintetiza principalmente en tejidos que se encuentran en fase de crecimiento, como el eje embrionario y los cotiledones, en cambio, sus niveles bajan en órganos senescentes y maduros (Beligni y Lamattina, 2001). Estudios recientes han demostrado su participación en el aumento de Ca^{2+} citosólico inducido por el estrés hiperosmótico.

El NO puede ejercer efectos directos e indirectos dependiendo de su concentración. Los efectos directos son aquellas reacciones en las cuales el NO reacciona directamente con sus dianas biológicas, que suelen ser radicales o complejos metálicos, estas reacciones son, generalmente, rápidas y requieren concentraciones bajas de NO ($< 1 \mu\text{M}$), mientras que, los efectos indirectos son mediados por especies reactivas de nitrógeno tales como dióxido de nitrógeno (NO_2) y trióxido de dinitrógeno (N_2O_3) que, en un ambiente oxigenado, derivan de NO , que antes de reaccionar con su sustrato es activado por el anión superóxido (O_2^-) o por el O_2 . Estas RNS son altamente reactivas pudiendo alterar macromoléculas tales como proteínas, lípidos y DNA, también se cree que son responsables de la muerte celular.

1.7.1.2. Funciones fisiológicas de óxido nítrico en plantas

El óxido nítrico tiene un papel interesante en el crecimiento y el desarrollo de la planta (Ribeiro *et al.*, 1999; Corpas *et al.*, 2006b). Dependiendo de su concentración en la célula, puede tener efectos tóxicos o actuar como molécula señal (Lamattina *et al.*, 2003; Neill *et al.*, 2003; del Río *et al.*, 2004). El NO está implicado en la modulación de los procesos fisiológicos durante toda la vida de la planta (Crawford y Guo, 2005) desde la germinación (Bethke *et al.*, 2004b; Simontacchi *et al.*, 2004) hasta la maduración del fruto y la senescencia (Leshem *et al.*, 1998; Beligni y Lamattina, 2001) (**Tabla 1**). Además, es una molécula señal en el control de tiempo de floración (He *et al.*, 2004) y la orientación del crecimiento del tubo de polen (Prado *et al.*, 2004).

Tabla 1. Funciones de NO en diferentes procesos de plantas.

Procesos	Referencia
Germinación de las semillas	Bethke <i>et al.</i> , 2004b
Crecimiento de la raíz	Beligni y lamattina, 2000
Expansión de las hojas	Beligni y lamattina, 2000
Cierre de estomas	Wendehenne <i>et al.</i> , 2004
Senescencia	Corpas <i>et al.</i> , 2004b
Muerte celular programada	Zhang <i>et al.</i> , 2003
Emisión de etileno	Leshem y Haramaty, 1996
Patógeno	Delledonne <i>et al.</i> , 2001
Luz ultravioleta	An <i>et al.</i> , 2005; Shimoda <i>et al.</i> , 2005
Salinidad	Valderrama <i>et al.</i> , 2007
Temperatura	An <i>et al.</i> , 2005; Shimoda <i>et al.</i> , 2005
Estrés osmótico	An <i>et al.</i> , 2005; Shimoda <i>et al.</i> , 2005

Muchos estudios han utilizado la aplicación exógena de NO en plantas para estudiar cómo esta molécula afecta algunos procesos fisiológicos como la inhibición de algunas actividades enzimáticas (Clark *et al.*, 2000; Navarre *et al.*, 2000), la lignificación de la pared celular (Ferrer y Ros Barceló, 1999) y la organogénesis de raíces (Pagnussat *et al.*, 2002). Se ha visto que los donadores de NO inducen el cierre de estomas en plantas de guisante, *Arabidopsis*, tomate y trigo (Desikan *et al.*, 2002; Neill *et al.*, 2002a). El efecto de NO sobre el crecimiento de las plantas parece dependiente especialmente de su concentración (Anderson y Mansfield, 1979), a altas concentraciones (40-80 ppm) inhibe el crecimiento en tomate, lechuga y guisante, sin embargo, a bajas concentraciones (0-20 ppm) estimula el crecimiento (Hufton *et al.*, 1996; Leshem y Haramaty, 1996). La exposición a NO reduce la fotosíntesis en hojas de avena y alfalfa (Hill y Bennet, 1970) e inhibe la respiración en una suspensión celular de zanahoria (Zottini *et al.*, 2002).

1.7.1.3. Actividad óxido nítrico sintasa en plantas

En sistemas animales, el NO se produce a partir de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS; EC 1.14.13.39) (Moncada *et al.*, 1991). La enzima cataliza la oxidación dependiente de oxígeno y NADPH de L-arginina hasta NO y L-citrulina mediante una reacción compleja que requiere FAD, FMN, BH_4 , calmodulina y Ca^{2+} (Alderton *et al.*, 2001). En plantas, se ha demostrado la generación enzimática de NO a partir de L-arginina y todos los cofactores

usados para NOS animal, pero el gen de la NOS de plantas no está descrito (Barroso *et al.*, 1999; del Río *et al.*, 2004; Corpas *et al.*, 2004a, 2006b). En raíces, tallos y hojas de guisante se han demostrado la presencia de la actividad NOS dependiente de L-arginina durante el desarrollo de la planta (Corpas *et al.*, 2006b).

Recientemente, se ha demostrado la generación de NO dependiente de L-arginina en peroxisomas y mitocondrias de plantas (Corpas *et al.*, 2001, 2004b) (**Tabla 2**).

Tabla 2. Actividad NOS a partir de L-arginina en algunas especies de plantas.

Especies	Tejido	Referencia
<i>Lupinus albus</i>	Raíces y nódulos	Cueto <i>et al.</i> , 1996
<i>Nicotiana tabacum</i>	Hoja	Durner <i>et al.</i> , 1998
<i>Nicotiana tabacum</i>	Cultivo celular	Tun <i>et al.</i> , 2001
<i>Glycine max</i>	Cotilidones	Modolo <i>et al.</i> , 2002
<i>Pisum stivum</i>	Peroxisoma de hojas	Corpas <i>et al.</i> , 2004b
<i>Pisum stivum</i>	Raíz, tallo y hoja	Corpas <i>et al.</i> , 2006b
<i>Olea europea</i>	Hoja	Valderrama <i>et al.</i> , 2007

1.7.1.4. Sistemas generadores de NO en plantas

Las plantas pueden generar NO por sistemas tanto enzimáticos como no enzimáticos (Neill *et al.*, 2003; del Río *et al.*, 2004).

En cuanto a la producción no enzimática, se puede generar NO *in vitro*, a partir de la reacción de H_2O_2 con L-arginina a pH 7,4 y a 37°C (Nagase *et al.*, 1997). Además, la reducción no enzimática de nitritos puede conducir a la formación de NO y nitratos a pH ácido (Stöhr y Ullrich, 2002), los nitritos también pueden ser reducidos químicamente por ácido ascórbico a valores de pH entre 3 y 6, produciendo NO y ácido deshidroascórbico (Henry *et al.*, 1997; Weitzberg y Lundberg, 1998). Otro método no enzimático consiste en la producción de NO mediado por los carotenoides en presencia de nitritos y luz (Cooney *et al.*, 1994). Además, se ha descrito la síntesis de NO de forma no enzimática en el apoplasto por la reducción química de nitritos a pH ácido en respuesta a giberelina y ácido abscísico, dos hormonas que acidifican el medio apoplástico (Bethke *et al.*, 2004a).

Sin embargo, hay pocas informaciones sobre la fuente enzimática de NO endógeno durante el desarrollo normal de planta. La enzima nitrato reductasa (NR) puede generar NO a partir de nitritos utilizando NADH como donador de electrones (Dean y Harper, 1988; Yamasaki *et al.*, 1999; Rockel *et al.*, 2002), aunque esta enzima no produce NO a partir de

L-arginina, por lo que no se considera una NOS característica. Otra fuente enzimática de NO en plantas es la Nicotiana-óxido nítrico reductasa (Ni-NOR) (Stöhr *et al.*, 2001), una enzima de la planta de tabaco, unida a la membrana plasmática que tiene un peso molecular de 310 kDa y cataliza la reducción de nitritos a NO usando citocromo C como donador de electrones (Stöhr *et al.*, 2001). La peroxidasa de rábano produce NO en plantas a partir de N-hidroxiarginina (NOHA) y H₂O₂ (Boucher *et al.*, 1992a) o a partir de hidroxiurea y H₂O₂ (Huang *et al.*, 2002). El citocromo P450, que está presente en animales y plantas, cataliza la oxidación de NOHA por NADPH y O₂ generando NO (Boucher *et al.*, 1992b).

1.7.1.5. Implicación de NO en la señalización celular

Muchas publicaciones han descrito el papel de óxido nítrico como molécula señal en diferentes procesos fisiológicos en plantas superiores (Lamattina *et al.*, 2003; del Río *et al.*, 2004; Shapiro, 2005). En 1998, dos trabajos relevantes mostraron la importancia del NO como molécula señal en la generación de la reacción de hipersensibilidad durante la interacción planta-patógeno (Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998) (**Figura 18**). Esta molécula está implicada en la resistencia al ataque de patógenos avirulentos. Tras el reconocimiento del patógeno, un sistema complejo de transducción de señales provoca una respuesta de defensa basada en la acumulación de ROS y NO (Levine *et al.*, 1994; Delledonne *et al.*, 1998). El NO induce la síntesis de ácido salicílico (SA) que es una molécula señal implicada en el desarrollo de la resistencia sistémica adquirida (SAR) (Draper, 1997). Así, Durner *et al.*, (1998) sugieren que el NO participa en la resistencia sistémica adquirida. El NO y SA presentan dianas comunes, de forma que las dos moléculas pueden inhibir de forma reversible la actividad catalasa y ascorbato peroxidasa en tabaco (Clark *et al.*, 2000), lo cual indica que ambas moléculas podrían regular los niveles de peróxido de hidrógeno durante la respuesta de la planta a diferentes situaciones de estrés (Clark *et al.*, 2000). El óxido nítrico también estimula la activación de genes de defensa como el de la fenilalanina amonía liasa (*Pal*) y de proteínas relacionadas con la patogénesis (*PR*) en tabaco y *Arabidopsis* (Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998; Klessig *et al.*, 2000).

Por otro lado, se ha sugerido la participación de NO como mediador en la respuesta de la planta a diferentes condiciones de estrés abiótico, tales como el estrés osmótico y salino, exposición a alta y baja temperatura, radiación ultravioleta, exposición a ozono, y heridas (Gould *et al.*, 2003; Neill *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004). También participa como mediador en procesos de regulación de los canales iónicos de las células guarda de los estomas (García-Mata *et al.*, 2003), lignificación de la pared celular (Ferrer y Ros-Barceló, 1999) y señalización a través de una cascada dependiente de GMP cíclico implicada, en

algunos casos, en la generación de ADP ribosa cíclica (ADPRc) y en la activación de las MAP quinasas (MAPKs) (Klessig *et al.*, 2000; Kumar y Klessig, 2000).

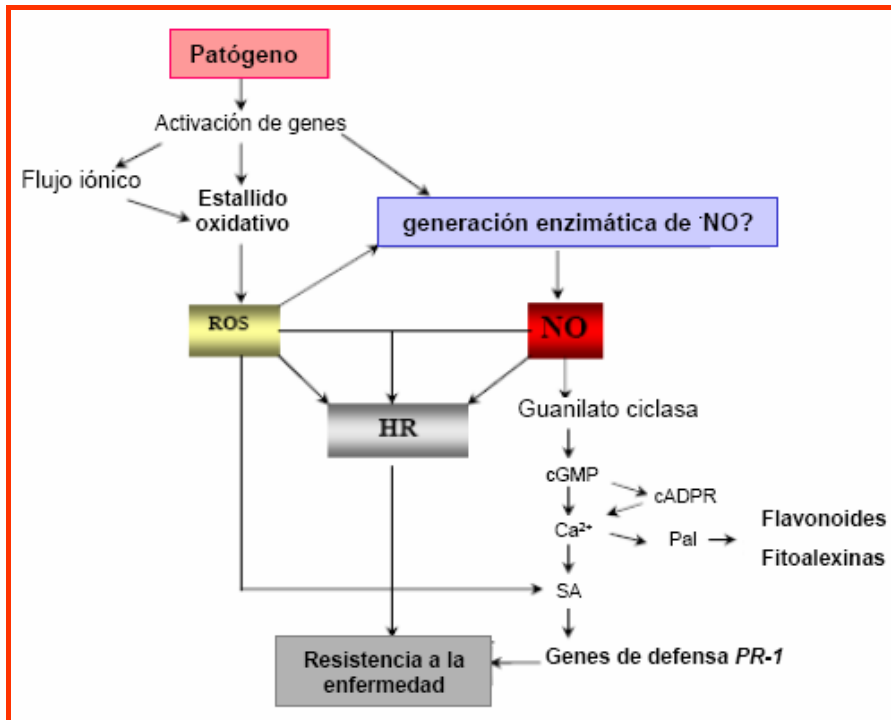


Figura 18. Proceso de señalización mediado por NO en la defensa frente al patógeno.

Además, el óxido nítrico tiene un papel en el incremento de Ca^{2+} citosólico en células de tabaco en respuesta a un estrés hiperosmótico (Lamotte *et al.*, 2004; Gould *et al.*, 2003). Se ha demostrado que el NO participa en el cierre de estomas inducido por el ácido abscísico (García-Mata y Lamattina, 2002) y para ello necesita tanto un flujo de Ca^{2+} desde el exterior celular como su liberación desde los almacenes celulares (MacRobbie, 2000). El óxido nítrico está asociado con la inducción y/o la regulación de la muerte celular programada. El tratamiento con donadores de NO en un cultivo celular de *Citrus sinensis* induce una muerte celular, la cual comparte semejanza con la muerte celular programada en células animales, incluyendo la condensación de la cromatina y la pérdida de potencial eléctrico de la membrana mitocondrial (Saviani *et al.*, 2002).

1.7.1.6. El peroxinitrito

El peroxinitrito (OONO^-) es un potente oxidante, se genera por una reacción no enzimática entre el NO y el anión superóxido (O_2^-) (**Figura 19**) (Squadrito y Pryor, 1998a), y tiene un papel importante en diferentes procesos fisiológicos tanto en células animales

como en plantas (Halliwell y Gutteridge, 2000). El peroxinitrito es una molécula capaz de reaccionar con todas las clases de biomoléculas (Beckman *et al.*, 1990), incluyendo proteínas de bajo peso molecular y grupos tioles de proteínas (Radi *et al.*, 2000). *In vivo*, sólo un limitado número de moléculas interactúan directamente con el, ya que esta especie reacciona rápidamente con el dióxido de carbono en una reacción compleja que da lugar a intermediados nitrantes, nitrosilantes y especies oxidantes como los radicales libres $\text{NO}_2^\cdot$ y $\text{CO}_3^\cdot$ (Squadrito y Pryor, 1998b). Estas especies reactivas serían realmente las responsables de la mayoría de los efectos causados por el peroxinitrito en las células.

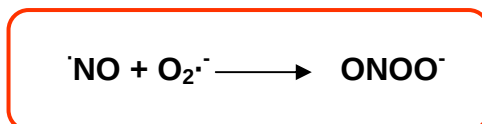


Figura 19. Formación de peroxinitrito a partir de óxido nítrico y anión superóxido

El $\text{ONOO}^\cdot$ es muy tóxico, puede dañar las células de forma irreversible por oxidación de los tioles libres, nitración de residuos de tirosina y peroxidación lipídica (Schopfer *et al.*, 2003; Pacher *et al.*, 2005). Datos recientes sugieren que a niveles fisiológicos, el $\text{ONOO}^\cdot$ puede reaccionar con GSH formando una S-glutatioilación reversible de proteínas.

El peroxinitrito es más estable a pH alcalino (Feelisch y Stamler, 1996). En soluciones neutras (pH fisiológico) aproximadamente un 20% se encuentra en forma protonada dando lugar a ácido peroxinitroso (HOONO) que es altamente reactivo y proporciona especies oxidantes y nitrantes, aunque en ausencia de un sustrato adecuado se descompone hasta nitrato, consiguiéndose de esta manera su detoxificación. El ácido peroxinitroso media la mayor parte de las reacciones de oxidación y nitración de peroxinitrito (Koppenol *et al.*, 1992).

1.7.2. NITRACIÓN DE PROTEÍNAS

Es una modificación covalente de las proteínas por adición de un grupo nitró (-NO₂) en posición *orto* del anillo de un residuo de tirosina formando 3-nitrotirosina (Gow *et al.*, 2004) (**Figura 20**). La nitración de tirosina está mediada por especies de nitrógeno reactivo como peroxinitrito y dióxido de nitrógeno (Radi, 2004). La nitración del residuo tirosina es una reacción que puede alterar la estructura de la proteína, la actividad catalítica, la solubilidad y la susceptibilidad a la agregación, y, además, aumentar la degradación de la proteína (Beckman, 1996; Yamakura *et al.*, 1998; Koppal *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2000; Squier, 2001).

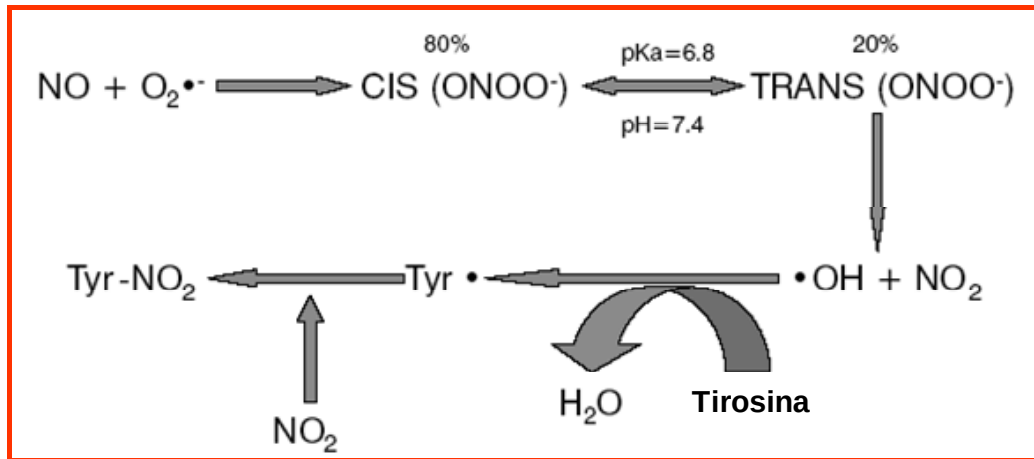


Figura 20. Nitración de proteínas en tirosina (Figura extraída de Hanafy *et al.*, 2001).

La mayoría de los estudios sobre la localización y identificación de proteínas nitradas se han realizado sobre tejidos enfermos, sin embargo, hay muy pocos trabajos que muestren la distribución intracelular de proteínas nitradas por tirosina *in vivo* en estados fisiológicos (Heijnen *et al.*, 2006).

La nitración de tirosina puede representar una modificación post-transduccional importante en situaciones no patológicas (Schopfer *et al.*, 2003). También, la nitración de proteínas puede participar en otras funciones importantes como el recambio de proteínas y la transducción de señales (Ischiropoulos, 2003). Recientemente se ha mostrado que una acumulación en la nitración de tirosina puede estar implicada en la progresión de varias enfermedades (Ischiropoulos, 2003; Comhair *et al.*, 2005).

La nitración de proteínas causa la inactivación de varias proteínas importantes de mamíferos, entre ellas Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, actina y tirosina hidroxilasa (Butterfield y Stadtman, 1997). La nitración de proteínas observada en condiciones inflamatorias ha sido relacionada con la presencia de especies de oxígeno y nitrógeno reactivo, considerando que el producto de la nitración (3-nitrotirosina) era producido por la reacción entre el peroxinitrito y la tirosina, pero estudios posteriores indican la participación, además, de nitritos y peroxidasas entre los mecanismos de nitración (Eiserich *et al.*, 1998).

La mitocondria ha sido considerada como fuente crítica y diana para la nitración (Radi *et al.*, 2002). La nitración de proteínas de mitocondria es un proceso mediado por

mecanismos que no han sido aún identificados. Entre las proteínas nitradas *in vivo* e *in vitro* en la mitocondria están la aconitasa, el citocromo C y la ATPasa (Radi *et al.*, 2002; Turko *et al.*, 2003).

Dependiendo del grado del estrés oxidativo causado en condiciones metabólicas fisiológicas o patológicas, se han descrito tres diferentes situaciones que determinan el equilibrio de la nitración/denitración: A) estrés metabólico bajo con equilibrio entre la nitración y denitración; B) incremento del estrés con aumento en los niveles de proteínas nitradas que exceden a los de las proteínas denitradas, y posteriormente se degradan; C) estrés extensivo con nitración de proteínas que supera la denitración y la degradación de las proteínas, lo que conduce a la acumulación y agregación de proteínas nitradas (**Figura 21**).

En células animales, se han localizado proteínas modificadas por nitración de tirosina en mitocondria y retículo endoplasmático, y han sido usadas como marcadores de situaciones patológicas y estrés nitrosativo (Heijnen *et al.*, 2006; Bartsaghi *et al.*, 2006). También, Van der Loo *et al.* (2000) han observado proteínas nitradas en citoplasma, núcleo y mitocondria de tejidos vasculares de ratas viejas. Además, se ha mostrado la nitración de proteínas dependiente de NO en varios tejidos de rata y humanos en condiciones fisiológicas (Heijnen *et al.*, 2006). Mediante técnicas inmunohistoquímicas y analíticas se han podido detectar y cuantificar proteínas nitradas en varias patologías humanas (Greenacre y schiropoulos, 2001; Turko y Murad, 2002), aunque no se conoce bien la localización subcelular de las proteínas nitradas en condiciones fisiológicas. Entre las proteínas nitradas en tejidos humanos bajo las condiciones patológicas se incluyen la lipoproteína de baja densidad, tirosina hidroxilasa, glicina sintetasa y prostaciclina sintetasa (Radi, 2004). Por otro lado, la nitración de tirosina puede interferir con los procesos de señalización asociados con la fosforilación de tirosina.

Sin embargo, en plantas, hay mucha menos informaciones sobre la nitración de tirosina. En hojas de plantas de olivo se mostró un incremento del número de proteínas nitradas en plántulas sometidas a salinidad (Valderrama *et al.*, 2007) y en una suspensión celular de tabaco tratada con un hongo se ha visto una inducción de proteínas que han sufrido nitración de tirosina (Saito *et al.*, 2006).

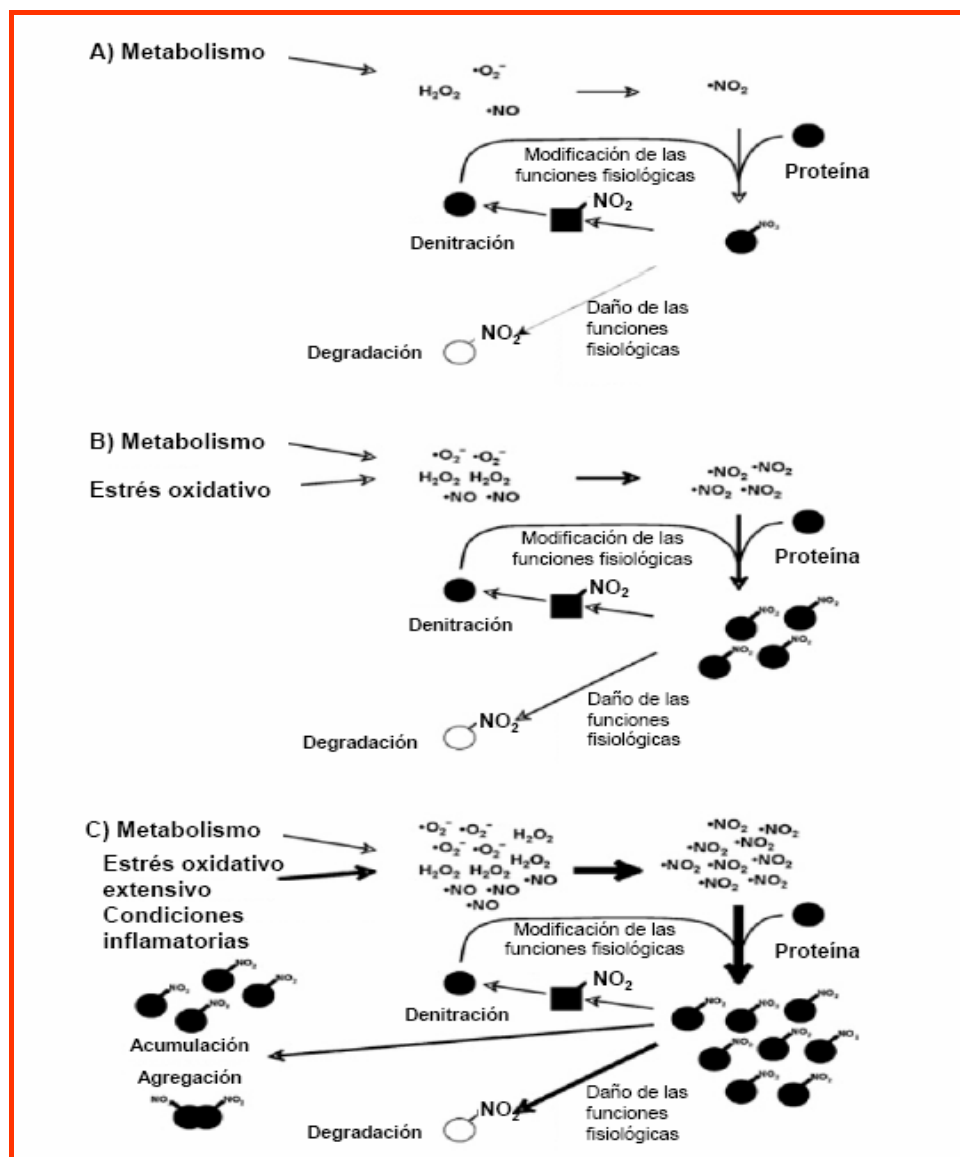


Figura 21. Nitración de tirosina dependiendo del grado del estrés oxidativo (Figura extraída de Koeck *et al.*, 2005)

1.7.3. S-NITROSILACIÓN DE PROTEÍNAS

La S-nitrosilación de proteínas es un mecanismo que ha despertado un gran interés en los últimos años. Consiste en la unión de $\cdot\text{NO}$ con el grupo tiol de un residuo cisteína provocando, de esta forma, variaciones en la función de un amplio rango de proteínas (Stamler *et al.*, 2001). La S-nitrosilación de proteínas es una modificación específica y reversible, modula diversas funciones biológicas y fisiológicas, puede inducir o inhibir la

formación de la unión disulfuro dentro o entre proteínas, dependiendo de la proximidad y la orientación del grupo tiol (Stamler y Toone, 2002; Arnelle y Stamler, 1995).

En sistemas animales y en algunas patologías humanas, se ha visto que tanto unos niveles excesivos como deficitarios de S-nitrosilación de proteínas pueden estar implicados en una serie de condiciones patofisiológicas (Foster *et al.*, 2003; Benhar *et al.*, 2006) lo que puede contribuir a la generación de un estrés nitrosativo. El análisis de los procesos dependientes de NO en sistemas animales ha mostrado que la S-nitrosilación de residuos de cisteína es uno de los mecanismos reguladores dominantes en muchas proteínas animales. Sin embargo, en plantas, hay pocos trabajos sobre este proceso, aunque hay evidencias de que la S-nitrosilación de proteínas puede tener una papel importante también en la biología de plantas (Wang *et al.*, 2006).

Generalmente, el proceso de la S-nitrosilación depende de la reacción de NO con O_2 para formar trióxido de dinitrógeno (N_2O_3) que reacciona con el grupo tiol formando S-nitrosotiol (Martínez-Ruiz y Lamas, 2004) (**Figura 22**). El NO necesario para la S-nitrosilación puede proceder de diferentes fuentes como las especies NO_x , metal- NO , peroxinitrito o nitritos aunque, hasta el momento, el mecanismo enzimático responsable de la S-nitrosilación no está identificado. Varias enzimas promueven reacciones de S-nitrosilación, entre ellas la ceruloplasmina que cataliza la S-nitrosilación de proteoglicanos, y también puede catalizar la formación de S-nitrosoglutation (GSNO) a partir de NO (Inoue *et al.*, 1999), la Cu/Zn-SOD que cataliza la S-nitrosilación de hemoglobina a partir de NO en solución (Gow *et al.*, 1999) o de NO procedente de GSNO (Romeo *et al.*, 2003).

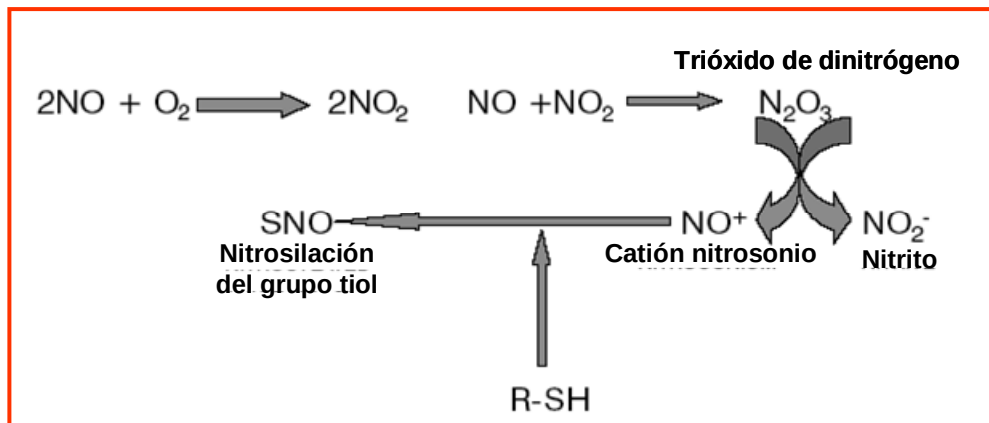


Figura 22. S-nitrosilación de proteínas (Figura extraída de Hanafy *et al.*, 2001).

La regulación de la función de las proteínas mediante S-nitrosilación está favorecida por mecanismos que controlan tanto la adición como la eliminación de NO en grupos tiol de

residuos de cisteína. La S-nitrosilación se induce tanto por donadores exógenos de NO como por el NO endógeno, y regula la actividad de algunas enzimas como oxidoreductasas, proteasas, proteínas quinasas y fosfatasa *in vitro* e *in vivo*, y también de proteínas respiratorias y factores de transcripción (Stamler *et al.*, 2001).

1.7.3.1. Efecto de la S-nitrosilación de proteínas

La S-nitrosilación es un importante mecanismo de señalización redox que ocurre durante diferentes procesos fisiológicos y patológicos y que puede alterar la función y la actividad de las proteínas. Son muchas las proteínas que sufren S-nitrosilación *in vivo*, y éstas tienen un papel importante en muchos procesos como la transducción de señal (Stamler, 1994) y la defensa frente a patógenos.

En animales, la S-nitrosilación en residuos de cisteína participa en el control del metabolismo celular, apoptosis (Haendeler *et al.*, 2002) y transducción de señales (Akhand *et al.*, 1999). También puede proteger a las proteínas frente al estrés oxidativo irreversible (Haendeler *et al.*, 2002; Whiteman *et al.*, 2006). La S-nitrosilación del sitio activo de la caspasa-3 inhibe la apoptosis en varios tipos celulares (Mannick *et al.*, 1999, 2001). Sin embargo, en plantas las funciones reguladoras de la S-nitrosilación están empezando a ser estudiadas, y se conoce muy poco sobre las funciones fisiológicas de este proceso. Lindermayr *et al.*, (2005) han identificado 63 proteínas S-nitrosiladas en un cultivo celular de *Arabidopsis* tratado con GSNO y 52 proteínas S-nitrosiladas en hojas de *Arabidopsis* tratadas con NO . Entre ellas se incluyen proteínas relacionadas con el estrés, proteínas relacionadas con el estado redox y proteínas implicadas en la señalización. Entre las enzimas identificadas como posibles dianas para la S-nitrosilación se encuentran la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y la metionina adenosil transferasa (Lindermayr *et al.*, 2005, 2006). Casi el 60% de las proteínas identificadas en plantas han sido descritas también en sistemas animales (Lindermayr *et al.*, 2005). Recientemente, se ha señalado que la metacaspasa 9 de *Arabidopsis* se inactiva por la S-nitrosilación y se activa por la desnitrosilación, de esta forma la S-nitrosilación puede regular aquellos procesos en los que las metacaspasas están implicadas (Belenghi *et al.*, 2007).

1.7.4. S-NITROSOTIOLES

Los S-nitrosotioles (RSNOs) son metabolitos biológicos de NO , que se forman por la reacción de NO con proteínas o componentes no proteicos que contienen grupos sulfidrilo (Hogg, 2000; Foster *et al.*, 2003) (**Figura 23**). Los RSNOs participan en reacciones biológicas importantes, incluyendo liberación de NO , transnitrosación y S-tiolación (Hogg, 2000; Stamler *et al.*, 2003).

La oxidación de NO a NO^+ seguido de una reacción con tioles produce S-nitrosotioles (Inoue *et al.*, 1999; Ckless *et al.*, 2004). Las condiciones ácidas, como las que se encuentran en el lisosoma y en el espacio intermembranoso mitocondrial, así como los metales de transición pueden promover la formación de RSNOs a partir de NO o nitritos (Zhang *et al.*, 2005; Mannick *et al.*, 2001).

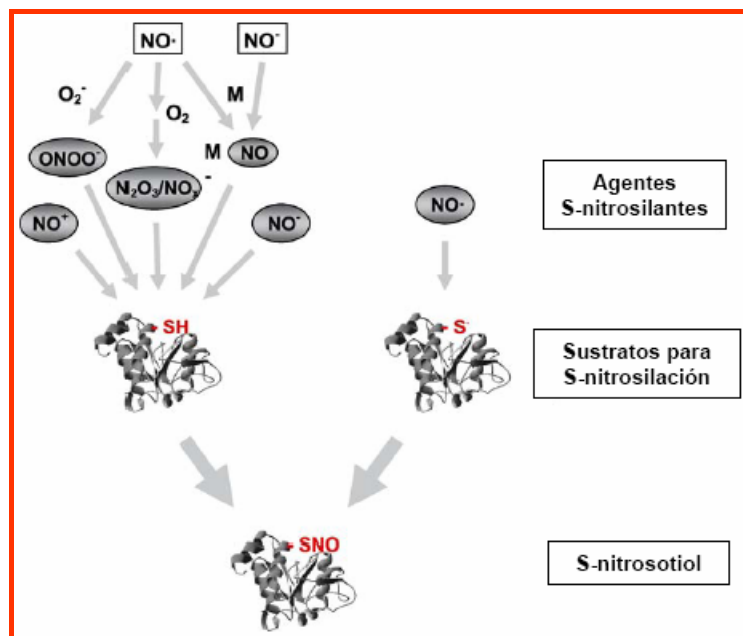


Figura 23. Formación de S-nitrosotioles en función de los diferentes estados redox de NO .

En los últimos años, ha aumentado el interés de estudiar los S-nitrosotioles debido a que la vida media del óxido nítrico *in vivo* es muy corta mientras que los RSNOs son más estables en disolución. En condiciones fisiológicas y en presencia de un aceptor de electrones el NO puede reaccionar directamente con un grupo tiol para formar RSNO (Broillet, 1999). Los S-nitrosotioles se pueden descomponer fotoquímicamente liberando NO y disulfuro (Sexton *et al.*, 1994).

Los S-nitrosotioles se encuentran en muchos sistemas biológicos en condiciones basales (Stamler *et al.*, 1992). En células animales participan en el transporte y almacenamiento de NO , en la modificación post-transduccional de proteínas en condiciones fisiológicas y patológicas y en la señalización celular (Foster *et al.*, 2003; Benhar *et al.*, 2006), aumentan en respuesta a estímulos inflamatorios (Crawford *et al.*, 2004), inhiben la agregación plaquetaria (Radomski *et al.*, 1992), y también pueden proteger contra la toxicidad asociada a altas concentraciones de NO (Gaston *et al.*, 1993; Ignarro *et al.*, 1980).

En tejidos de mamíferos se han detectado S-nitrosotioles tanto de alto como de bajo peso molecular y pueden estar implicados en procesos biológicos como comunicación neuronal, apoptosis y la defensa celular frente al estrés oxidativo.

Sin embargo, en organismos vegetales existe poca información disponible sobre el metabolismo de RSNOs y su modulación bajo condiciones de estrés, a pesar de que algunas evidencias indican que puede tener funciones similares a las que tiene en animales (Feechan *et al.*, 2005; Valderrama *et al.*, 2007). Los S-nitrosotioles tienen un papel intermediario en el metabolismo celular y en la bioactividad de NO[•]. Recientemente, se ha descrito que los RSNOs juegan un papel importante en la regulación de diversos modos de resistencia a la enfermedad durante la interacción planta-patógeno (Feechan *et al.*, 2005; Rusterucci *et al.*, 2007). La mayoría de los S-nitrosotioles son inestables en soluciones acuosas excepto el S-nitrosoglutation (GSNO) (Smith y Dasgupta, 2000), por ese razón se considera este metabolito como un mejor medio de transporte y almacenamiento de NO[•] en las células.

El S-nitrosoglutation es uno de los metabolitos endógenos más abundantes de NO[•], se forma mediante la S-nitrosilación de glutation con NO[•] en presencia de una molécula de oxígeno (Gaston *et al.*, 1993), y también se puede formar por la reacción de glutation reducido con peroxinitrito (Halliwell y Gutteridge, 2000). El GSNO es muy estable en oscuridad y en presencia de quelantes de iones metálicos en soluciones acuosas, pero algunos factores como luz, temperatura, pH y algunos agentes reductores producen su descomposición a NO[•] y GSSG (Smith y Dasgupta, 2000). Además, en presencia de agentes reductores como glutation, ascorbato e iones de cobre, el GSNO se descompone a NO[•] (Gorren *et al.*, 1996; Holmes y Williams, 2000). Se ha demostrado que la S-nitrosoglutation reductasa (Liu *et al.*, 2001), tioredoxina reductasa (Nikitovic y Holmgren, 1996; Haendeler *et al.*, 2002), Cu/Zn-superóxido dismutasa (Johnson *et al.*, 2001) y γ -glutamyl transpeptidasa (Hogg *et al.*, 1997) descomponen el GSNO, y tienen un papel fisiológico importante en la regulación del contenido de S-nitrosotioles endógenos.

El S-nitrosoglutation es considerado como un reservorio natural de NO[•] tanto en animales (Padgett y Whorton, 1995; Steffen *et al.*, 2001; He *et al.*, 2004; Zhang y Hogg, 2004) como en plantas (Durner *et al.*, 1999; Díaz *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006). El GSNO y otros S-nitrosotioles pueden tener un papel importante en la señalización por NO[•] en células de plantas (Durner *et al.*, 1999; Díaz *et al.*, 2003) (**Figura 24**).

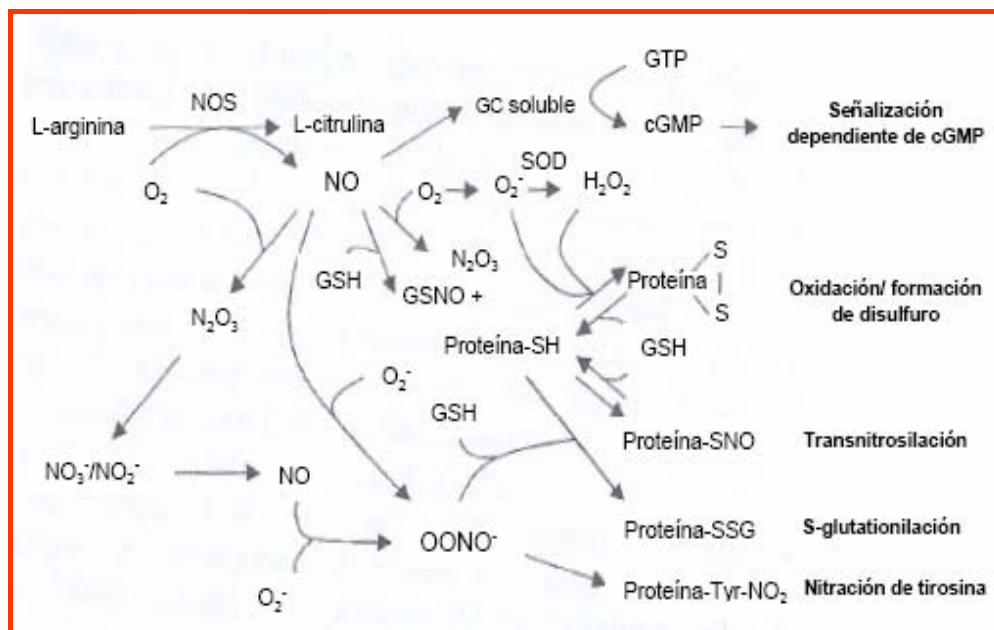


Figura 24. Señalización redox relacionada con NO

1.7.4.1. S-nitrosotioles en los procesos de señalización celular

En plantas, se conoce muy poco acerca de los mecanismos de modulación de los S-nitrosotioles. Se ha descrito su papel en la transducción de señales y en la regulación de procesos fisiológicos de plantas (Lamattina *et al.*, 2003). El S-nitrosoglutation ha generado un considerable interés debido a su capacidad de actuar como donador de NO y a su posible participación en sistemas biorreguladores como reacciones de transferencia de NO. La formación de GSNO es un mecanismo fundamental en la protección de las células frente al daño provocado por el peroxinitrito. El GSNO es una molécula señal a larga distancia, puede activar los genes de defensa (Durner y Klessig, 1999), y también se ha demostrado que induce la resistencia sistémica adquirida (SAR) en plantas de tabaco tras la infección con el virus del mosaico de tabaco (Song y Goodman, 2001) (**Figura 25**). En condiciones fisiológicas, la S-nitrosilación y los S-nitrosotioles protegen las células frente al estrés oxidativo y nitrosativo.

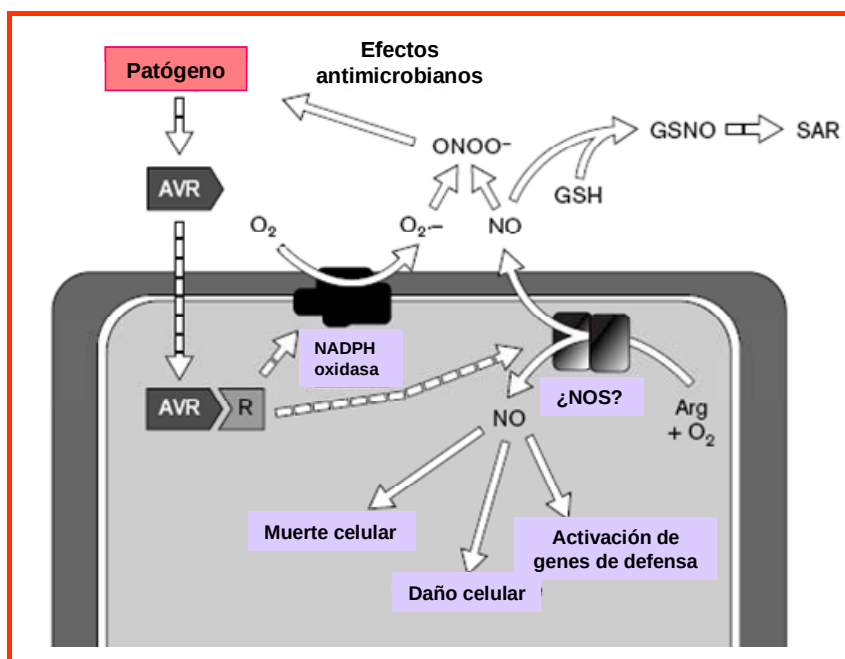


Figura 25. Modelo hipotético de la participación de NO en la respuesta de defensa de la planta. SAR: Resistencia sistémica adquirida. AVR: Factor avirulento del patógeno. R: Gen de resistencia de la planta.

1.7.5. ACTIVIDAD S-NITROSOGLUTATION REDUCTASA EN PLANTAS (GSNOR, EC 1.2.1.1)

La enzima formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH) fue purificada por primera vez por Strittmatter y Ball, quienes en 1955 la obtuvieron del hígado de buey y de pollo. Su función principal es la detoxificación endógena y exógena de formaldehído. La FALDH, denominada también alcohol deshidrogenasa clase III (ADH3), tiene un papel importante en el metabolismo de GSNO (Jensen *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2001). Recientemente, se ha demostrado que la enzima formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión tiene actividad GSNO reductasa en bacterias, levaduras y mamíferos y esta implicada en el mecanismo de S-nitrosilación de proteínas en células de mamíferos (Haqqani *et al.*, 2003). La S-nitrosoglutation reductasa (GSNOR) cataliza la reducción de GSNO dependiente de NADH, a glutatión oxidado (GSSG) y amoníaco (NH_3) (Liu *et al.*, 2001; Lamotte *et al.*, 2005) (**Figura 26**), controlando de esta forma los niveles intracelulares de GSNO, la biodisponibilidad de NO, y limitando así su toxicidad (Kotchoni y Gachomo, 2006). En plantas, se ha detectado la actividad GSNOR en *Arabidopsis* (Sakamoto *et al.*, 2002; Achkor *et al.*, 2003; Feechan *et al.*, 2005), tabaco (Díaz *et al.*, 2003) y guisante (Barroso *et al.*, 2006). La formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión se ha

purificado y caracterizado en semillas de guisante (Uotila y Koivusalo, 1979; Shafqat *et al.*, 1996) y en plantas de *Arabidopsis* (Martínez *et al.*, 1996).

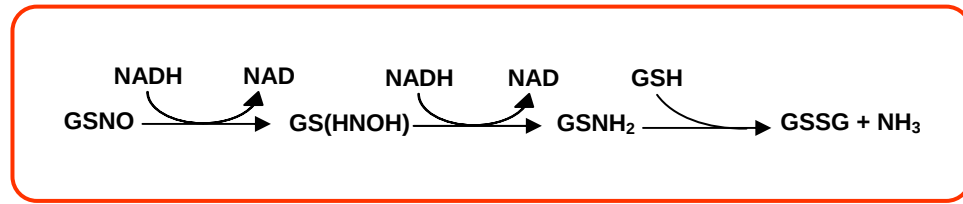


Figura 26. La S-nitrosoglutation reductasa cataliza la reducción de GSNO dependiente de NADH a glutatión oxidado (GSSG) y amoníaco (NH₃).

La GSNOR es imprescindible para el metabolismo de RSNOs y en la homeostasis vascular (Liu *et al.*, 2004), protege las células de levadura frente al estrés nitrosativo tanto *in vitro* (Liu *et al.*, 2001) como *in vivo* (de Jesús-Berrios *et al.*, 2003). Datos recientes han indicado que la GSNOR actúa como regulador negativo de la respuesta inflamatoria, proporciona la protección frente al estrés nitrosativo y al daño en tejidos de ratón (Liu *et al.*, 2004). En mamíferos, el gen que codifica FALDH se expresa en todos los tejidos y el nivel de expresión varía en los diferentes tipos de células, con altos niveles en el hígado y el riñón (Adinolfi *et al.*, 1984; Duley *et al.*, 1985).

1.8. LA RELACIÓN ENTRE ESPECIES DE OXÍGENO Y NITRÓGENO REACTIVO EN PLANTAS

Tanto las ROS como las RNS desempeñan un papel como segundo mensajero en la respuesta a distintas situaciones de estrés biótico y abiótico (Apel y Hirt, 2004; Grün *et al.*, 2006). El óxido nítrico y el peróxido de hidrógeno son moléculas reguladoras en varios procesos del desarrollo y de repuesta al estrés, cooperan sinérgicamente en la inducción de la respuesta hipersensible durante la interacción planta-patógeno (Dangl *et al.*, 1996; Wojtaszek, 1997; Delledonne *et al.*, 1998; McDowell y Dangl, 2000; de Pinto *et al.*, 2002), y también colaboran en el cierre de estomas (Desikan *et al.*, 2004), lo que sugiere que la interacción entre estas dos moléculas modula varias respuestas fisiológicas. Las especies de oxígeno y nitrógeno reactivo, además, están implicadas en la germinación de semillas, lignificación de la pared celular y el desarrollo de la raíz.

El NO y el H₂O₂ regulan la expresión de varios genes cuyo producto está implicado en la reducción del crecimiento del hongo, protección celular y en otras respuestas de señalización (Desikan *et al.*, 2001) (**Figura 27**).

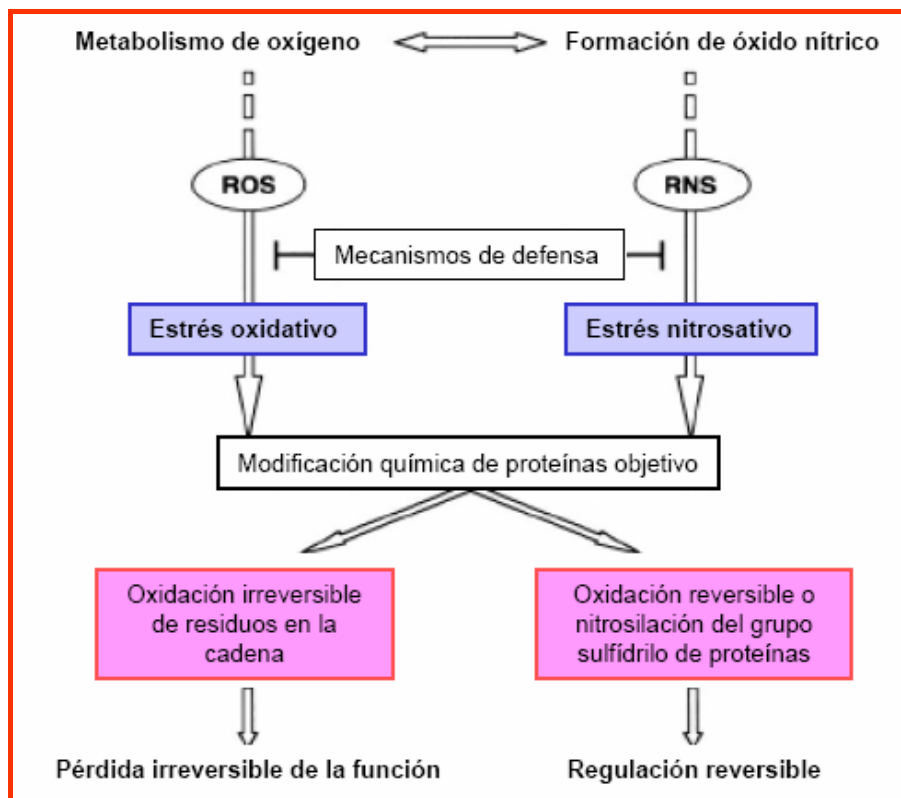


Figura 27. Impacto del estrés oxidativo y nitrosativo en la función de las proteínas (Figura extraída de Klatt y Lamas, 2000).

OBJETIVOS

En la presente tesis doctoral utilizando plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.) como modelo experimental, hemos estudiado los procesos que intervienen en la respuesta de plántulas de girasol al estrés biótico por el hongo biotrofo *Plasmopara halstedii*, causante del mildiu, y a una serie de estreses abióticos tales como alta y baja temperatura, daño mecánico, alta intensidad luminosa, luz continua y oscuridad. En este estudio hemos tratado de conocer la respuesta de la planta frente a estos estreses mediante aproximaciones bioquímicas, celulares y moleculares, y usando hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 (sensible al mildiu) y X55 (resistente al mildiu). Para ello, se han establecido los siguientes objetivos:

- Estudio de la expresión de diferentes genes de defensa de la planta y su respuesta frente a las condiciones de estrés biótico.
- Estudio de la respuesta de los principales sistemas antioxidantes enzimáticos (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Catalasa, enzimas del ciclo ascorbato-glutation y deshidrogenasas dependientes de NADP) a diferentes situaciones de estrés biótico y abiótico.
- Estudio de la respuesta de las principales especies de oxígeno y nitrógeno reactivo a las distintas situaciones de estrés biótico y abiótico.
- Estudio de la expresión y distribución de la S-nitrosoglutation reductasa (GSNOR) en hipocótilos de plántulas de girasol en distintas condiciones de estrés biótico y abiótico.
- Estudio de la relación existente entre las especies de oxígeno y nitrógeno reactivo en la respuesta de plántulas de girasol al estrés biótico y abiótico.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Se han utilizado plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.) obtenidas a partir de semillas de tres variedades con diferente tolerancia al estrés biótico por el hongo biotrofo *Plasmopara halstedii* causante del mildiu (Roldán-Serrano *et al.*, 2007):

- Peredovik es una variedad sensible que se ha utilizado para el mantenimiento del cultivo del patógeno. A partir de estas plántulas se ha obtenido el inóculo que se ha usado en todos los tratamientos de inoculación.
- La línea HA89, sensible al mildiu (interacción compatible), no presenta ningún gen de resistencia al hongo *P. halstedii*.
- La línea X55, resistente al mildiu (interacción incompatible), muestra resistencia frente a las razas 1 a 10 de *P. halstedii*. Se obtuvo a través de una reelección de la línea HA335 del departamento de agricultura de EEUU (Gulya *et al.*, 1991).

Para la inoculación de las semillas se ha utilizado la raza 2 de *Plasmopara halstedii*.

Tanto las semillas de las tres variedades de girasol como la raza 2 de *P. halstedii* fueron suministradas por Koipesol Semillas S. A (Sevilla).

3.2. CULTIVO DEL GIRASOL *Helianthus annuus* L.

El cultivo de plántulas de girasol, se realizó utilizando material de laboratorio estéril. Las semillas se desinfectaron durante 4 minutos con etanol al 70% (v/v), se lavaron varias veces con agua destilada y se trataron con una solución de hipoclorito sódico al 10% (v/v) durante 20 minutos. Por último, se lavaron con agua destilada hasta eliminar el hipoclorito sódico. Posteriormente, se colocaron sobre papel de filtro humedecido, cubriéndolas con papel de aluminio y se pusieron a 28°C durante 48 horas para favorecer su germinación. Una vez germinadas, se sembraron en vermiculita y se mantuvieron humedecidas hasta el punto de saturación durante todo el periodo de cultivo, las macetas se mantuvieron en una cámara de cultivo, a una temperatura de 19 a 21°C, 60% de humedad y a un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

3.3. CULTIVO DEL HONGO *Plasmopara halstedii*

El hongo se cultivó sobre plántulas de girasol de la variedad Peredovik (**Figura 28**), las semillas se germinaron siguiendo el protocolo anteriormente descrito. Se preparó una suspensión de 90.000 esporangios/ml en agua destilada y se mantuvo durante 2 horas en agitación en oscuridad para permitir que los esporangios liberen las zoosporas, pasado este

periodo se puso durante 10 minutos en contacto con las semillas germinadas (Cohen y Sackston, 1973), lo que produce una infección de 100%. Las semillas se sembraron siguiendo el protocolo anteriormente descrito. A los nueve días desde el día de siembra, las macetas se envolvieron con bolsas de plástico transparentes para someterlas a una humedad próxima al 100% consiguiendo así las condiciones óptimas de esporulación del hongo. Tras 48 horas, apareció sobre los cotiledones una cubierta blanca formada por los esporangióforos y zoosporangios del hongo. Los zoosporangios se recogieron de los cotiledones que habían esporulado lavándolos con agua destilada. Usando un microscopio óptico y una cámara de recuento Neubauer (profundidad de rejilla: 0,1 mm, superficie de retícula: 1 mm²) se realizó el cálculo de la concentración de zoosporangios. Se determinó el valor medio de zoosporangios en las 8 rejillas de la cámara y el resultado se multiplicó por 10.000 obteniendo así el valor del número de zoosporangios por mililitro de suspensión. La suspensión con la que infectaron las plántulas se obtuvo diluyendo esta suspensión hasta una concentración final de 90.000 zoosporangios/ml.

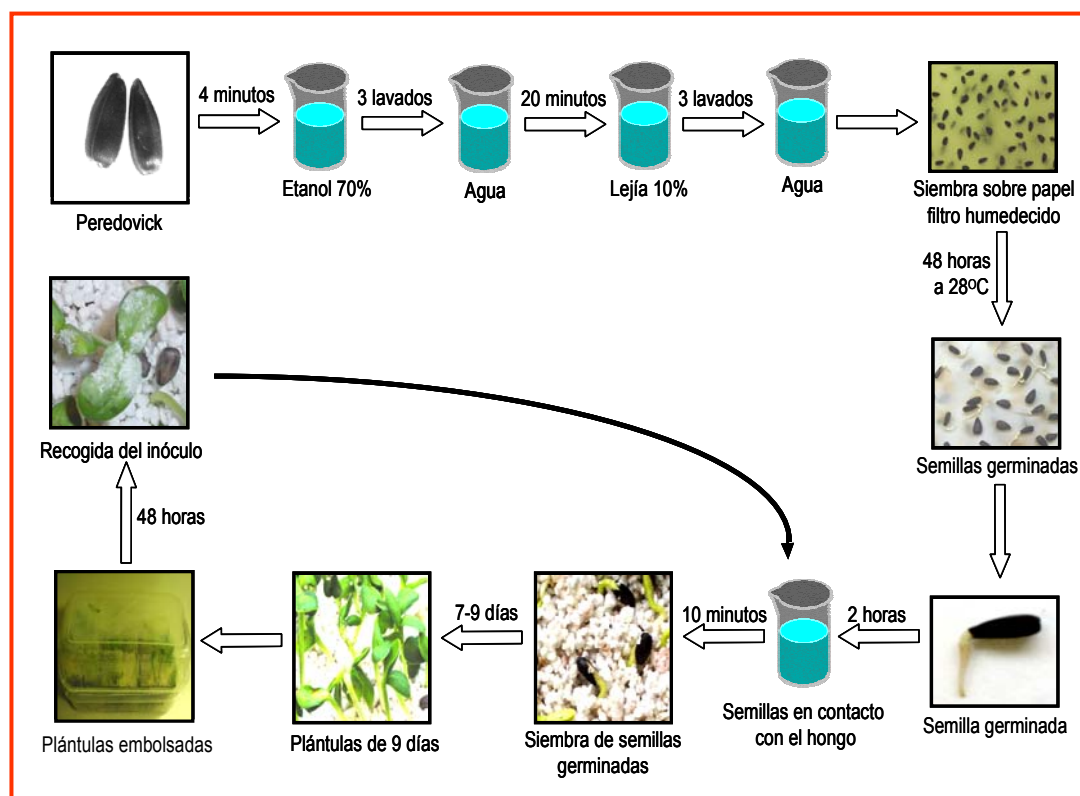


Figura 28. Protocolo para el cultivo de *Plasmopara halstedii* sobre plántulas de la variedad Peredovik.

3.4. TRATAMIENTO DE PLÁNTULAS DE GIRASOL CON DISTINTAS SITUACIONES DE ESTRÉS

3.4.1. ESTRÉS BIÓTICO

3.4.1.1. Tratamiento de plántulas de girasol con *P. halstedii*

Las semillas de girasol germinadas pertenecientes a las variedades sensible (HA89) y resistente (X55) se inocularon durante 10 minutos en oscuridad con el hongo *P. halstedii* siguiendo el mismo protocolo de inoculación de plántulas de Peredovik. Posteriormente, las plántulas inoculadas se sembraron en macetas sobre vermiculita humedecida y se mantuvieron en la cámara de cultivo a una temperatura de 19 a 21°C, 60% de humedad y a un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. A los nueve días desde el día de siembra, una parte de plántulas obtenidas se usaron para llevar a cabo los diferentes experimentos y otra parte se envolvieron con bolsas de plástico transparentes durante 48 horas para someterlas a las condiciones óptimas de esporulación del hongo, como se ha descrito previamente. La aparición de los esporangióforos y zoosporangios del hongo sobre los cotiledones de las plántulas permitió asegurar la efectividad de la inoculación.

3.4.2. ESTRÉS ABIÓTICO

Los distintos tratamientos de estrés abiótico han sido realizados sobre plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55 de nueve días de edad.

3.4.2.1. Alta temperatura

Las plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55 se expusieron de forma escalonada a distintas temperaturas hasta alcanzar la temperatura final de tratamiento. Primero se expusieron a una temperatura de 30°C durante una hora, después a 35°C durante una hora y finalmente, a 38°C durante cuatro horas.

3.4.2.2. Baja temperatura

Las plántulas de girasol de ambas líneas se mantuvieron durante 24 horas a una temperatura de 4 a 8°C.

3.4.2.3. Daño mecánico

Se practicaron daño mecánico mediante pinzamiento a lo largo del hipocótilo. Tras lo cual, las plántulas se mantuvieron en la cámara de cultivo durante 2, 4 y 8 horas.

3.4.2.4. Alta intensidad luminosa

Se expusieron las plántulas de girasol durante 4 horas a una intensidad luminosa aproximada de $1.180 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, situándolas a una distancia media a la fuente luminosa de 22 cm. Como fuente de luz se ha usado una lámpara GE 300W-230V tipo PAR 56/WFL. Para evitar que el calor producido por la bombilla llegara a las plantas, se interpuso entre la fuente luminosa y la planta una placa de petri (19 cm de diámetro y a unos 12 cm sobre las plantas) con agua, que se cambiaba cada 30 minutos (**Figura 29**).



Figura 29. Plántulas de girasol sometidas a alta intensidad luminosa.

3.4.2.5. Luz continua

Las plántulas de girasol de las dos líneas se mantuvieron durante 24 horas a una iluminación continua de $190 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$.

3.4.2.6. Oscuridad

Las plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55 se mantuvieron durante 24 horas en oscuridad.

3.5. TRATAMIENTO CON cPTIO (Secuestrador de $\cdot\text{NO}$)

Se ha llevado a cabo en plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55 sin tratamiento de nueve días de edad. Las plántulas se incubaron con 0,1 o 1 μM de cPTIO (Carboxy-2-fenil-5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido) durante 3 horas en la cámara de cultivo, posteriormente se cortaron los hipocótilos y se guardaron a -80°C para su posterior utilización.

3.6. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS TRAS EL ESTRÉS

Una vez las plántulas fueron sometidas a diferentes estreses durante los periodos indicados en cada caso se cortaron los hipocótilos, y dependiendo del tipo del experimento, se procesaron directamente en fresco o se congelaron a -80°C para su posterior procesamiento (**Figura 30**).

En el caso del estrés biótico, es interesante señalar que es precisamente en los hipocótilos donde parecen ponerse de manifiesto, más claramente, los mecanismos de respuesta frente a la infección por el hongo (Delanoe y Hamant, 1972; Virányi y Dobrovolszky, 1980).

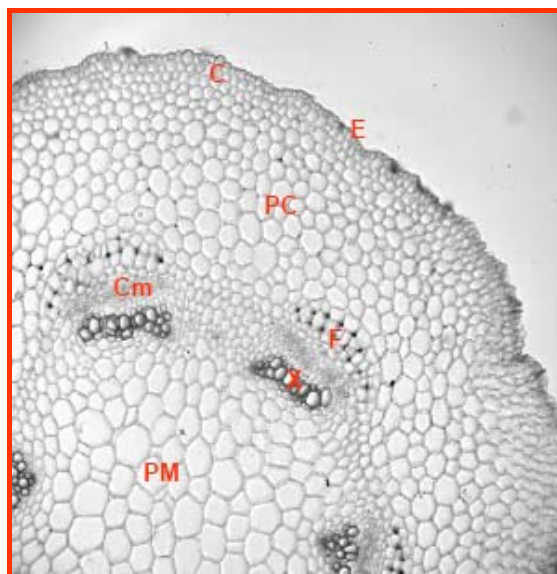


Figura 30. Corte transversal del hipocótilo de girasol. E: epidermis, C: cortex, PC: parénquima cortical, F: floema, Cm: cambium, X: xilema, PM: parénquima modular.

3.7. OBTENCIÓN DE LOS HOMOGENEIZADOS

Los hipocótilos se homogeneizaron en morteros de porcelana con nitrógeno líquido hasta la obtención de un polvo fino al que se añadió el tampón en la proporción 1/3 (p/v).

En primer lugar se empezó utilizando un tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5 que contenía: sacarosa 5%; PVPP 7%; Triton X-100 0,2% y β -mercaptoetanol 1,5%, pero usando este tampón el extracto se oxidaba y oscurecía con el tiempo, por lo que fue cambiado por otro tampón.

Finalmente, se optó por un tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6 que contenía: sacarosa 5%; PVPP 7%; Triton X-100 0,05% y EDTA 0,1 mM. A este tampón se le añadía, de manera extemporánea: DTT 15 mM; PMSF 1 mM y un cocktail de inhibidores de proteasas de

plantas 100x (2x) (Sigma). Este cocktail de inhibidores de proteasas de plantas está formado por: *AEBSF*, que inhibe serín proteasas como la tripsina o quimotripsina, *1,10-fenantrolina*, que inhibe metaloproteasas, *Pepstatina A*, que inhibe proteasas ácidas como pepsina, renina, catepsina D, cimosina (renina bovina) y proteasa B, *Leupeptina*, que inhibe serín y cisteín proteasas, como calpaína, tripsina, papaína y catepsina B, *Bestatina*, que inhibe aminopeptidasas como leucina aminopeptidasa y alanina aminopeptidasa y *E-64*, que inhibe cisteín proteasas como calpaína, papaína, catepsina B y catepsina L. Tras la homogeneización, el extracto se pasaba por una capa de miracloth (Calbiochem) previamente humedecida en el tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6. Finalmente, se centrifugaron a 3000 xg durante 6 minutos a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos se utilizaron para posteriores análisis.

3.8. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

La determinación de la concentración de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford (1976) utilizando albúmina sérica bovina (ASB) a una concentración de 0,6 mg/ml para elaborar la recta patrón. Se realizaron tres diluciones de cada muestra con un volumen final de 800 µl a los que se añadieron 200 µl de reactivo comercial de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Reagent), se agitaron los tubos y se dejaron reaccionar durante 10 minutos. Seguidamente, se determinó la absorbancia a 595 nm frente a un blanco que contenía 800 µl de agua milli Q y 200 µl de reactivo de Bradford.

3.9. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)

La separación de proteínas se llevó a cabo según el método descrito por Laemmli (1970), utilizando un sistema minigel vertical (Bio-Rad Mini-Protean II). El método se basa en someter el extracto que contiene las proteínas a electroforesis sobre geles discontinuos de poliacrilamida constituidos por dos zonas distintas: el gel concentrador y el gel separador, el gel se dispone como una lámina delgada situada verticalmente, al aplicarse un campo eléctrico, el complejo SDS-proteína debido a su carga negativa migra hacia el ánodo. Los geles de poliacrilamida son soportes químicamente inertes formados mediante la polimerización de acrilamida y N,N'-metilén-bis-acrilamida, con la participación de persulfato amónico y TEMED. La polimerización se inicia por TEMED que cataliza la formación de radicales libres a partir de persulfato amónico.

La electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes minimiza la agregación molecular y asegura la completa disociación de las proteínas en sus

subunidades polipeptídicas individuales, para este propósito se utiliza el SDS en combinación con un agente reductor DTT y calor.

La gran carga negativa que impone el SDS a pH básico enmascara la carga de la proteína de manera que las proteínas tratadas con SDS tienden que exhibir idénticas relaciones carga-masa y formas semejantes. Esta técnica separa las proteínas de acuerdo con sus masas moleculares debido a la selección de tamaños impuestos por los poros del gel. La movilidad de las proteínas en este tipo de geles varía linealmente con el logaritmo de su masa molecular y no están afectadas por su carga original. La masa molecular de la proteína se determina sometiendo a una misma electroforesis junto a la proteína problema varios patrones de proteínas de masas moleculares conocidas.

Reactivos

- Tampón gel concentrador: Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8.
- Tampón gel separador: Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8.
- Acrilamida: metilén bisacrilamida 30% (29:1): acrilamida 17 M y bisacrilamida 640 mM.
- Tris-HCl/SDS (4x): Tris-HCl 1,5 M, pH 6,8 y SDS 0,4% (p/v).
- Tampón de tratamiento de muestra 2x: Tris-HCl/SDS 4x (0,1 M) pH 6,8; glicerol 20% (v/v); SDS 4% (p/v); azul de bromofenol 0.001% (p/v) y DTT 0,2 M.
- Tampón de tratamiento de muestra 6x: Tris-HCl/SDS 4x (0.28 M) pH 6,8; glicerol 30% (v/v); SDS 10% (p/v); azul de bromofenol 0,0012% (p/v) y DTT 0,6 M.
- Tampón de electroforesis: Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3; glicina 0,192 M y SDS 0,1% (p/v).
- Persulfato amónico 10% (p/v).
- Colorante para geles de poliacrilamida: azul Coomassie brillante R-250 0,1% (p/v), metanol 50% (v/v) y ácido acético 7% (v/v).
- Solución decolorante: metanol 50% (v/v) y ácido acético 7% (v/v).

Preparación de geles

Se utilizaron geles de 7,5 x 8 cm y un grosor de 1,5 mm, y dependiendo del tamaño de la proteína que se deseara detectar, se usaron diferentes porcentajes de acrilamida (10%, 12% y 15%) en la elaboración del gel separador. Los geles de poliacrilamida se prepararon adicionando los volúmenes mostrados en la siguiente tabla en el orden indicado, y desgasificando la mezcla con el objeto de eliminar, en la medida de lo posible, el oxígeno disuelto que pudiera retrasar la polimerización (**Tabla 3**).

Tabla 3. Protocolo de preparación de geles de SDS-PAGE.

	Gel inferior de 1,5 mm de grosor			Gel superior
	10%	12%	15%	4%
Acrilamida al 30%	3,1 ml	3,7 ml	4,6 ml	0,5 ml
Tampón de geles	2,3 ml	2,3 ml	2,3 ml	1 ml
SDS 10% (p/v)	90 µl	90 µl	90 µl	40 µl
Glicerol 50% (v/v)	0,9 ml	0,9 ml	0,9 ml	-
H₂O milli Q	2,7 ml	2,1 ml	1,2 ml	2,46 ml
Desgasificación				
PSAM 10% (p/v)	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	10 µl

Preparación de muestras

Las muestras para la SDS-PAGE se prepararon añadiendo el tampón de tratamiento de muestra 6x en la proporción 1/6. También se prepararon controles positivos que se trataron con el tampón de tratamiento de muestra 2x en la proporción 1/2. Tanto las muestra como los controles positivos se calentaron durante 5 minutos a 95°C para llevar a cabo la desnaturalización.

Para llevar a cabo la electroforesis se normalizó la cantidad de proteínas de cada muestra. En la electroforesis se cargaron también los marcadores tanto de alto como de bajo peso molecular (Bio-Rad).

La electroforesis se desarrolló, utilizando el tampón de electroforesis anteriormente descrito, a 140 mA y a 100 voltios durante 15 minutos y, posteriormente, se aumentó el voltaje a 200 voltios hasta que la frente del azul de bromofenol llegó al límite inferior del gel inferior.

3.9.1. TINCIÓN DE PROTEÍNAS CON AZUL COOMASSIE

Los geles de poliacrilamida se tiñeron con la solución de azul Coomassie durante una hora en agitación, posteriormente, se decoloraron realizando varios cambios con la solución decolorante hasta que se observaron bandas proteicas en color azul sobre fondo transparente.

3.10. TRANSFERENCIA SEMISECA DE PROTEÍNAS Y DETECCIÓN INMUNOLÓGICA (WESTERN BLOT)

3.10.1. TRANSFERENCIA SEMISECA

Tras la SDS-PAGE, se realizó la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de PVDF, que tiene un tamaño de poro de 0,45 μm (Inmobilon-P, Millipore), utilizando un sistema de transferencia semiseco Trans-Blot SD (Bio-Rad).

Reactivos

- Tampón de transferencia: CAPS 10 mM, pH 11 y metanol 10% (v/v).

Técnica

Debido a su naturaleza hidrofóbica, primero se activaron las membranas durante 15 segundos con metanol 100% (v/v), se lavaron 2 minutos con agua milli Q y posteriormente, se equilibraron con el tampón de transferencia. Se prepararon papeles Whatman n° 3 cortados con las mismas medidas del gel (6 para cada gel), y estos papeles y los geles se equilibraron en el mismo tampón.

La transferencia se realizó a una intensidad de 1,5 mA/cm² de membrana y un voltaje de 25 voltios durante 2 horas.

3.10.2. BLOQUEO E INMUNODETECCIÓN POR QUIMIOLUMINISCENCIA

La primera etapa de la inmunodetección consistió en el bloqueo de la membrana para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos directamente a la membrana.

Reactivos

- TBS 10x: Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 y NaCl 0,13 M.
- Solución de bloqueo: leche desnatada en polvo al 1,5% o al 7,5% (p/v) y TBS 10x (1x). En algunos casos concretos se añadió Tween 20 0,2 % (v/v) a esta solución.
- Solución de lavado: leche desnatada en polvo al 1% (p/v), Tween 20 0,05% (v/v) y TBS 10x (1x).
- Tampón de revelado: Tris-HCl 50 mM, pH 8,6 y NaCl 150 mM.
- 4-iodofenol: 10 mg en 1 ml de DMSO.
- Solución de revelado por quimioluminiscencia: se disolvieron 8 mg de luminol en 20 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,6. Justo antes de usarlo se añadieron 3,2 μl de H₂O₂ al 30% (v/v) y 200 μl de 4-iodofenol.

Técnica

Una vez finalizado el proceso de transferencia se lavaron las membranas con agua y se sumergieron en una solución de bloqueo durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Transcurrido el bloqueo las membranas se lavaron con TBS 1x durante 10 minutos para eliminar los restos de tampón de bloqueo. A continuación, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en TBS 1x o en otras ocasiones en TBS con Tween 20 0,01% (v/v) o en solución de bloqueo. La incubación se realizó durante toda la noche a 4°C con agitación suave (**Figura 31**).

Se han utilizado como anticuerpos primarios los siguientes anticuerpos policlonales:

- ♦ Anticuerpo frente a la Cu/Zn-superóxido dismutasa citosólica (Cu/Zn-SOD) de espinaca (Kanematsu y Asada, 1989), diluido 1/3000.
- ♦ Anticuerpo frente a la catalasa de calabaza cedidos por el Dr. M. Nishimura, del National Institute of Basic Biology, Okazaki (Japón), (Yamaguchi y Nishimura, 1984), diluido 1/500.
- ♦ Anticuerpo frente a la ascorbato peroxidasa (APX) de pepino (Corpas y Trelease, 1998a), diluido 1/1000.
- ♦ Anticuerpo frente a la monodeshidroascorbato reductasa (MDAR) de pepino (Sano *et al.*, 1995), diluido 1/8000.

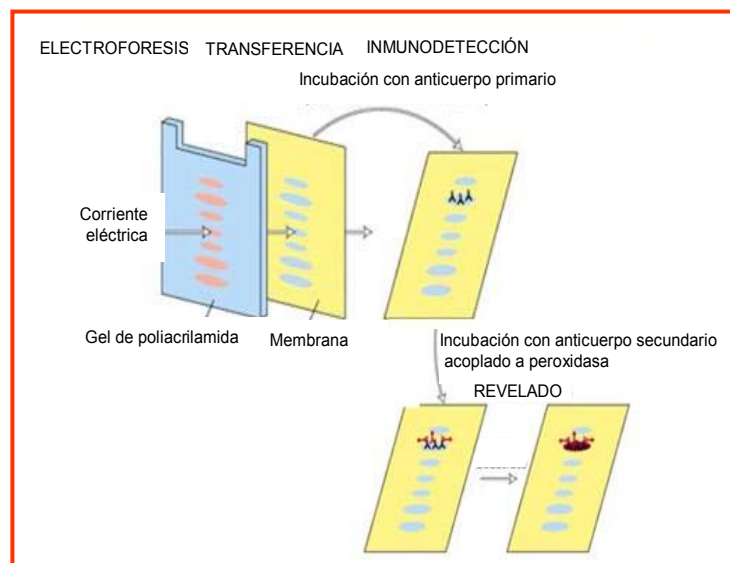


Figura 31. Proceso de SDS-PAGE y Western-blot.

♦ Anticuerpo frente a la glutathion reductasa (GR) de guisante cedido por el Dr. P. Mullineaux, del John Innes Centre, Norwich (Reino Unido) (Edwards *et al.*, 1990), diluido 1/500.

♦ Anticuerpo frente a la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP (G6PDH-NADP) de *Saccharomices cerevisiae* (Sigma), diluido 1/2500.

♦ Anticuerpo frente a la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP (ICDH-NADP) de tabaco cedido por el Dr. P. Gadal, de la Universidad de Paris-Sud, Orsay (Francia), diluido 1/8000.

♦ Anticuerpo frente a la enzima málico dependiente de NADP (EM-NADP) de hígado de rata (Valverde *et al.*, 1992), diluido 1/1000.

♦ Anticuerpo frente a la 3-nitrotirosina (n-Tyr) (Uttenthal *et al.*, 1998), diluido 1/5000 o 1/10000.

♦ Anticuerpo frente a la peroxirredoxina (Prx) de levadura cedido por el Dr. J.R. Pedrajas (Pedrajas *et al.*, 2000), diluido 1/200.

♦ Anticuerpo frente a la S-nitrosoglutation reductasa (GSNOR) (esta memoria), diluido 1/50.

♦ Anticuerpo frente a la leucina aminopeptidasa (Leu-AP) (Guo *et al.*, 1996), diluido 1/2000.

Posteriormente, las membranas se lavaron con la solución de lavado durante una hora para eliminar el exceso del anticuerpo no unido de manera específica a la proteína problema y, a continuación, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG (anti-conejo IgG) acoplado a peroxidasa de rábano diluido 1/8000 o 1/10000 en solución de lavado durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se hicieron varios lavados y se procedió a la detección de las proteínas por quimioluminiscencia.

Para el revelado, las membranas se incubaron en la solución de revelado durante 1 a 5 minutos en oscuridad. La reacción quimioluminiscente (Bunkelmann y Trelease, 1996) ocurre cuando la energía de una reacción química se emite en forma de luz. Se emplea la peroxidasa de rábano (HRP) para catalizar la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno, dando lugar a un compuesto intermediario activado que emite luz (Thorpe *et al.*, 1985). La luz emitida se potencia con 4-iodofenol, que actúa como transmisor de radicales de oxígeno al luminol. La emisión de luz producida por esta reacción impresiona una película de autorradiografía tipo “Hiperfilm” (Amersham) puesta en contacto directo con la membrana mediante un cassette de exposición (Kodak). Los tiempos de exposición variaron desde segundos hasta 30 minutos, según la intensidad luminosa obtenida (**Figura 32**).

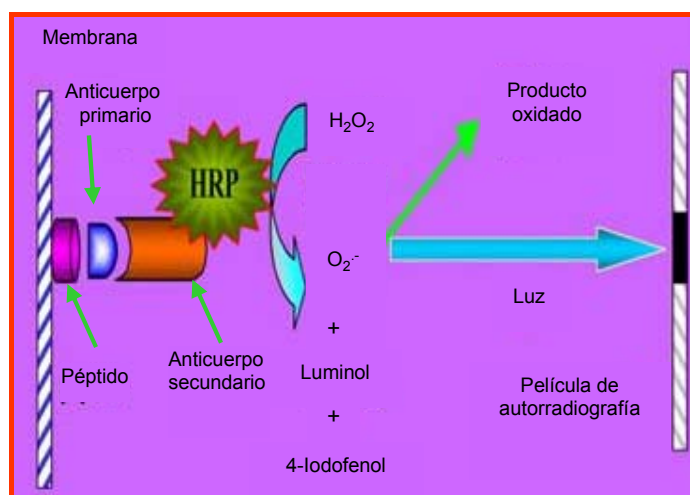


Figura 32. Inmunodetección mediante quimioluminiscencia.

3.11. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES NATIVAS

En la electroforesis nativa las proteínas se someten a migración sin desnaturalización. En esta situación, las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma. Además, en ciertos casos se mantienen las interacciones entre subunidades y entre proteínas, separándose los complejos.

Reactivos

- Tampón de geles: Tris-HCl 377 mM, pH 8,9.
- Tampón de electroforesis: glicina 38 mM ajustada el pH 8,2 con tampón de geles.
- Acrilamida:metilén-bisacrilamida 30% (29:1): acrilamida 17 M y bis-acrilamida 53 mM.

Preparación de geles

Se utilizaron geles de 7,5 x 8 cm y un grosor de 1,5 mm. Se utilizó acrilamida al 6% en la elaboración del gel separador. Los geles de poliacrilamida se prepararon adicionando los volúmenes mostrados en la siguiente tabla en el orden indicado, y desgasificando la mezcla con el objeto de eliminar, en la medida de lo posible, el oxígeno disuelto que pudiera retrasar la polimerización (**Tabla 4**).

Tabla 4. Protocolo de preparación de geles nativos.

	Gel inferior 6%	Gel superior 4%
Acrilamida 30% (p/v)	2,4 ml	0,4 ml
Tampón de geles	9,6 ml	2,6 ml
Desgasificación		
PSAM 10%(p/v)	75 µl	56 µl
TEMED	7,5 µl	8 µl

Preparación de muestras

A las muestras se adicionó glicerol 50% (concentración final 10% v/v) y 0,006% de azul de bromofenol y se cargaron directamente en el gel. Se normalizó cargando 10 µg de proteína por pocillo.

La electroforesis se desarrolló a 4°C utilizando el tampón de electroforesis anteriormente descrito. En primer lugar se aplicó una intensidad de 10 mA por gel hasta que las muestras penetraron en el gel separador y posteriormente se aumentó a 20 mA, hasta que la frente del azul de bromofenol llegó al límite inferior del gel.

3.11.1. ACTIVIDAD S-NITROSOGLUTATION REDUCTASA (GSNOR) EN GELES NATIVOS

La actividad GSNOR se determinó según el método descrito por Seymour y Lazarus (1989) modificado por Barroso *et al.* (2006) y Corpas *et al.* (2008).

El método se basa en el consumo del NADH debido a la actividad de la enzima en las condiciones experimentales. Al iluminar el gel con luz ultravioleta se observa una desaparición de la fluorescencia del NADH en la banda correspondiente.

Reactivos

- Tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4
- NADH 2 mM
- GSNO 3 mM

Técnica

Una vez terminada la electroforesis, los geles se sumergieron en tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,4 que contenía NADH 2 mM durante 15 minutos a 4°C. A continuación, se colocó encima del gel un papel whatman n° 1 empapado con GSNO 3 mM (Calbiochem) durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, se reveló el gel con luz ultravioleta, donde la desaparición de la fluorescencia del NADH indica la presencia de la actividad reductasa (Fernández *et al.*, 2003).

3.12. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

La electroforesis bidimensional se basa en separar las proteínas de una mezcla según dos propiedades moleculares. En la primera dimensión se separaron en función de su punto isoeléctrico mediante isoelectroenfoque y en la segunda dimensión en función de su peso molecular en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

Reactivos

- Acetona al 70%
- Tampón A: Tris-HCl 375 mM, pH 8,8; Urea 6 M; SDS 2%; glicerol 20% y DTT 2%.
- Tampón B: Tris-HCl 375 mM, pH 8,8; Urea 6 M; SDS 2%; glicerol 20% y Iodoacetamida 2,5%.
- Tampón de transferencia: Tris-HCl 25 mM, pH 8,3; Glicina 192 mM; Metanol 20% y SDS 0,02%.
- Solución A: Ácido acético 7% (v/v) y metanol 10% (v/v).
- Sulfato de Zinc 0,2 M.
- EDTA 100 mM

Técnica

Homogenización de muestra

Hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea X55 sin tratamiento se homogeneizaron en nitrógeno líquido, y se añadió el tampón de homogeneización en proporción 1/1 (p/v), seguidamente, la muestra se centrifugó a 20.000 xg durante 15 minutos. Posteriormente, el sobrenadante obtenido se precipitó con acetona al 70% en frío y se pasó a través de columna de desalación NAP-10 (Amersham).

Limpieza de la muestra y solubilización

La muestra fue limpiada mediante el método de metanol-cloroformo (Wessel y Flügge, 1984) y posteriormente se solubilizó en un tampón que contenía Urea 7 M, Tiourea 2 M y CHAPS 4%. A continuación, se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford.

Electroforesis bidimensional

Se hizo por duplicado siguiendo el siguiente protocolo. La muestra fue sometida a una primera separación en función del punto isoelectrico de las proteínas (primera dimensión) utilizando IPG strips (geles de isoelectroenfoque de gradiente de pH inmovilizado) de 17 cm, pH 3-10 de gradiente lineal (Bio-Rad), en los que se cargaron 100 µg de proteínas. La electroforesis tuvo lugar con un incremento lineal del voltaje: rehidratación pasiva (sin voltaje) 1 hora, rehidratación activa 50 V/ 11 horas, 500 V/ 1 hora, 1000 V/ 1 hora, 1000-8000 V / 30 min y 8000 V/ hora hasta alcanzar 50000 V totales.

Las tiras fueron equilibradas por agitación durante 15 minutos con el tampón A y 15 minutos con el tampón B. Las tiras equilibradas fueron transferidas a un sistema vertical de geles de poliacrilamida al 10%. La electroforesis se llevó a cabo a 30 mA/gel durante 15 minutos y a 60 mA/gel hasta que el frente alcanzó el final del gel.

Tinción del gel

Una vez terminada la electroforesis uno de los geles se tiñó con Imidazol (Hardy *et al.*, 1996): Primero se incubó con H₂O destilada durante 30-60 segundos. A continuación se incubó durante 10 minutos en Imidazol 0,2 M conteniendo 0,1% de SDS. Posteriormente, se pasó a una solución de sulfato de zinc 0,2 M durante 30-40 segundos hasta que el gel adquirió coloración blanca, dejándose ver las proteínas transparentes. La tinción se paró con H₂O destilada y los geles se escanearon mediante un densitómetro calibrado (GS-800, Bio-Rad).

Transferencia a membrana de nitrocelulosa

El gel teñido anteriormente con Imidazol se lavó con EDTA 100 mM durante 10 minutos. Posteriormente, se equilibró durante 15 minutos con el tampón de transferencia antes de ser transferido a la membrana. El sistema utilizado para la transferencia fue Trans-Blot Plus Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad), el proceso se llevó a cabo a 30 V a 2°C durante 20 horas.

El segundo gel se tiñó con la tinción fluorescente Sypro Ruby (Bio-Rad). Las proteínas se fijaron con la solución A durante 30 minutos, posteriormente el gel se incubó

con Sypro Ruby durante toda la noche y por último, se lavó con la solución A durante 30 minutos para eliminar la fluorescencia del fondo.

Las imágenes fueron adquiridas a 535 nm con un escáner de fluorescencia (Molecular Imagen FX ProPlus, Bio-Rad), y con una resolución de 100 micrómetros.

Finalmente, las proteínas de interés se picaron del gel mediante un sistema automático en una estación ProPic Investigator™ (Genomic Solutions).

3.13. OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTISUERO DE LA S-NITROSOGLUTATION REDUCTASA (GSNOR)

Se sintetizó un péptido correspondiente a los 14 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutation de *Oryza sativa* (A2XAZ3), entre los residuos Glu78 y Asp91: N-ESVGEGVTEVQPGD-C. Este péptido está conservado entre las GSNOR de diferentes especies de plantas. La síntesis del polipéptido y la consiguiente inmunización y obtención de los sangrados se realizó a través de Sigma Génesis. Una vez sintetizado se conjugó por su extremo carboxilo terminal a una proteína transportadora KLH (*Keyhole Limpet Hemacyanin*) mediante el agente MBS (éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida), para así conferirle un mayor poder antigénico. Posteriormente, se procedió a la inmunización de los conejos mediante distintas inyecciones subcutáneas. La primera inyección se hizo mezclando el inmunógeno con adyuvante de Freund completo (CFA), el resto de las inyecciones se realizaron con el adyuvante de Freund incompleto (IFA) (**Tabla 5**).

Tabla 5. Protocolo de inmunización llevado a cabo para la obtención del antisuero frente a la GSNOR.

Días	Inyecciones/Sangrados
0	Suero preinmune
	Inyección (CFA)
14	Inyección (IFA)
28	Inyección (IFA)
35	Primer sangrado
42	Inyección (IFA)
49	Segundo sangrado
56	Inyección (IFA)
63	Tercer sangrado
70	Inyección (IFA)
77	Cuarto sangrado

3.13.1. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN DE anti-GSNOR A PARTIR DEL ANTISUERO

Para preparar la columna de inmutafinidad se realizó la purificación previa de las inmunoglobulinas G (IgG) mediante un Kit comercial de Bio-Rad, “Econo-Pac Serum IgG Purification Kit”, este protocolo necesita columnas desaladoras “Econo-Pac 10 DG” y columnas de afinidad “DEAE Aff-Gel Blue” (“Econo-Pac IgG Purification”, Bio-Rad). Se partió de un volumen total de 18 ml de suero, se centrifugó a 16000 xg durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se usó para la purificación de las IgG. Tras la aplicación de la muestra en la columna de afinidad, y eluyendola siguiendo las instrucciones del fabricante, se recogió el eluido en fracciones de 2,6 ml en las que se determinó la densidad óptica a 280 nm y la concentración de proteína según el método de Bradford. Posteriormente, las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE y se tiñeron los geles con azul coomassie. Las fracciones que tienen mayor cantidad de proteína se mezclaron y se concentraron por ultrafiltración utilizando membranas Diaflo Ultrafilters, YM-10 (Millipore), hasta un volumen final de 11 ml. Se analizó la concentración de proteína de este suero y se ensayó mediante SDS-PAGE y western-blot (**Figura 33**).

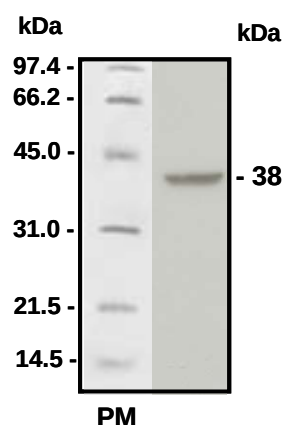


Figura 33. Muestra conteniendo 20 µg de proteínas se sometió a SDS-PAGE, se transfirió a membrana de PVDF y se incubó con un anticuerpo policlonal frente a la GSNOR diluido 1/50. A la derecha se indica el tamaño molecular aparente de la proteína inmunorreactiva y a la izquierda se sitúan los marcadores de peso molecular.

3.14. DETERMINACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO POR ESPECTROFLUORIMETRÍA

Se midió espectrofluorimétricamente la concentración de peróxido de hidrógeno según el método descrito por Creissen *et al.* (1999).

Reactivos

- Tampón Hepes 50 mM, pH 7,5
- Ácido clorhídrico 25 mM
- Hidróxido de potasio 1 N
- Peroxidasa de rábano 4 μ M
- Ácido homovanilínico 50 mM
- Peróxido de hidrógeno 19,6 μ M

Técnica

La concentración de peróxido de hidrógeno se determinó en hipocótilos de plántulas de girasol control y sometidas al estrés biótico por *P. halstedii*. Los hipocótilos se trituraron en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, el homogeneizado se mezcló con ácido clorhídrico 25 mM en proporción 1/15 (p/v). Se agitaron las muestras y se realizaron dos centrifugaciones consecutivas de 5 minutos cada una a 8200 xg, tomándose el sobrenadante en cada una de ellas. Posteriormente, se neutralizaron los sobrenadantes utilizando hidróxido de potasio 1 N.

La concentración de H_2O_2 se determinó midiendo la fluorescencia en un espectrofluorímetro Shimadzu RF-540 utilizando una λ de excitación de 315 nm y una λ de emisión de 425 nm.

Se preparó una mezcla de reacción constituida por el tampón Hepes 48 mM, pH 7,5, ácido homovanilínico 0,5 mM y volúmenes de muestra entre 10 y 100 μ l. La reacción comenzaba con la adición de peroxidasa de rábano 0,04 μ M. En paralelo se preparó una recta patrón con concentraciones de H_2O_2 entre 16 y 196 nM.

3.15. DETERMINACIÓN DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS

Se realizó un ensayo de determinación de hidroperóxidos lipídicos siguiendo las instrucciones del kit PeroxiDetect Kit (Sigma).

Reactivos

- Cloformo
- Metanol 100%
- Solución “working Color Reagent”: 100 volúmenes de “Organic Peroxide Color Reagent” + 1 volumen de reactivo de sulfuro de amonio ferroso.

Técnica

Se homogeneizaron en nitrógeno líquido hipocótilos de girasol tanto de plántulas control como de plántulas que habían estado sometidas a distintas condiciones de estrés abiótico y se añadió cloroformo/metanol 2/1 (v/v) en proporción 1/2 (p/v). Seguidamente, las muestras se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 3000 *xg* durante 5 minutos a 4°C. Tras la centrifugación, se recuperó la fase lipídica para la determinación de peróxidos.

Se mezclaron 20 µl de muestra con 200 µl de la solución "Working Color Reagent". Posteriormente, la mezcla se incubó durante 1 hora a 25°C, y finalmente se midió la absorbancia a 560 nm utilizando metanol como blanco espectrofotométrico.

Se usaron diferentes diluciones de *tert*-Butil hidroperóxido (t-BuOOH) a partir de un stock de 200 µM para elaborar la recta patrón.

3.16. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GSNOR MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA

La determinación de la actividad GSNOR en homogeneizados de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55 se realizó mediante la monitorización de la oxidación del NADH a 340 nm (Sakamoto *et al.*, 2002; Barroso *et al.*, 2006).

Reactivos

- Tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8 y EDTA 0,5 mM.
- Fosfato sódico 10 mM, pH 6,8.
- Fosfato potásico 50 mM, pH 7.
- NADH 0,2 mM.
- GSNO 400 µM.

Técnica

Los sobrenadantes obtenidos anteriormente, se pasaron a través de columnas desaladoras NAP-10 para eliminar el posible GSNO endógeno. Las columnas fueron equilibradas con tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8, pasando 15 ml de tampón por columna, posteriormente, se pasaron 1 ml de muestra y se recogieron 1,5 ml eluyendo con el tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,8.

Se incubaron 150 µl de muestra con 650 µl de tampón Tris-HCl y 100 µl de NADH. La reacción se inició añadiendo 100 µl de GSNO (Calbiochem) a la mezcla, obteniéndose una concentración final de 400 µM. La solución de GSNO se preparó en fresco justo antes de su uso y protegida de la luz. La actividad se determinó a 25°C, y se expresa en nmol de NADH consumido por min por mg de proteínas.

3.17. DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO MEDIANTE QUIMIOLUMINISCENCIA DE OZONO

La producción de óxido nítrico a partir de L-arginina se determinó mediante quimioluminiscencia de ozono utilizando un Autoanalizador de Óxido Nítrico (NOA 280i, Sievers, USA) (**Figura 34**).



Figura 34. Autoanalizador de óxido nítrico (Sievers NOA 280i)

Este método se basa en que la reacción entre NO y ozono (O_3) produce una emisión de luz, que es directamente proporcional a la concentración de NO presente en la muestra, lo que permite determinar la cantidad de NO producido por la actividad NOS de una forma muy fiable y sensible (Corpas *et al.*, 2004a). Esta técnica nos permite detectar la producción de NO en rango de picomolar (**Figura 35**).

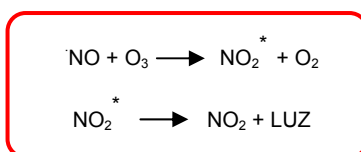


Figura 35. Reacción entre el óxido nítrico y el ozono.

A la muestra se añadía tanto el sustrato (L-arginina) como los diferentes cofactores que requiere la enzima óxido nítrico sintasa para llevar a cabo su actividad catalítica. Si en la muestra existe alguna proteína con actividad tipo NOS se va a producir NO . Debido a su elevada inestabilidad, el NO se oxida rápidamente en presencia de oxígeno y especies derivadas del mismo, lo que da lugar a la formación de nitritos y nitratos. Los nitritos y nitratos endógenos de la muestra así como los procedentes de la rápida oxidación de NO producto de la actividad óxido nítrico sintasa durante el tiempo de reacción, se inyectan en

la cámara de reacción del NOA, donde hay un agente reductor (cloruro de vanadio a 95°C) en medio ácido, lo que hace que tanto nitritos como nitratos se reduzcan de nuevo hasta NO. La cámara de reacción está sometida a una corriente de gas inerte (nitrógeno) que burbujea a flujo constante. Debido a su coeficiente de reparto, el NO escapa de la fase líquida a la fase gaseosa, de modo que es transportado hasta la cámara de reacción del autoanalizador por esa corriente de nitrógeno, donde reacciona con el ozono produciendo una señal quimioluminiscente que se detecta mediante un detector provisto de fotomultiplicador.

Reactivos

- Tampón de homogeneización: Tris-HCl 0,1 M, pH 8; NaCl 0,1 M; PVPP 7% (p/v); EDTA 1 mM; PMSF 1 mM; DTT 15 mM y inhibidores de proteasas 100x (2x).
- Tampón Hepes 160 mM, pH 7,2 y Chaps 0,8 mM.
- Cloruro de vanadio 0,8% (p/v) en HCl 1 M.
- Solución antiespumante para la cámara de reacción: silicona 1/30 en agua destilada.
- ZnSO₄ 16% (p/v).
- NaOH 0,8 N.
- β-NADPH 1mM.
- L-Arginina 1 mM.

Se homogeneizaron en nitrógeno líquido hipocótilos frescos tanto de plántulas control como de plántulas que habían estado sometidas a diferentes estreses usando el tampón anteriormente señalado en proporción 1/5 (p/v). Las muestras se centrifugaron a 12.000 xg durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se pasaron a través de una columna NAP-10 previamente equilibrada con 15 ml de tampón Hepes 40 mM pH 7,2. Posteriormente, se pasaron 1 ml de muestra y se recogieron 1,5 ml eluyendo con el mismo tampón.

Se preparó la mezcla de reacción compuesta por: la muestra; tampón Hepes 40 mM pH 7,2; calmodulina 10 µg/ml; FAD 10 µM; FMN 10 µM; BH₄ 10 µM; CaCl₂ 1,25 mM; β-NADPH 1 mM; y finalmente se añadía L-arginina 1 mM para disparar la reacción.

Inmediatamente después de añadir L-arginina (T = 0 minutos) se tomaron 200 µl de la mezcla de reacción y se desproteinizaron añadiendo 100 µl de NaOH y 100 µl de ZnSO₄, se agitó 30 segundos y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente, se centrifugó durante 5 minutos a 10.000 xg tomando 150 µl del sobrenadante desproteinizado para su medida en el autoanalizador.

El resto de la mezcla se incubó durante 30 minutos a 25°C (T = 30 minutos), pasando ese tiempo se tomaron otros 200 µl y se siguió el mismo procedimiento que para las muestras a T = 0.

Se hizo un control positivo de la reacción usando la NOS neuronal de rata (nNOS) (Calbiochem). Se preparó una mezcla de reacción sustituyendo la muestra por 2,9 U de nNOS y añadiendo agua para mantener el volumen final, siguiendo después el mismo protocolo aplicado a las muestras.

La actividad NOS se determinó en triplicado para cada muestra, las muestras a T = 0 y a T = 30 minutos se midieron en el analizador de NO inyectando 40 µl del sobrenadante en la cámara de reacción, donde los nitritos y nitratos de la muestra eran reducidos hasta NO, el cual posteriormente era transportado mediante un flujo constante de nitrógeno hasta la cámara de reacción del autoanalizador donde tras su reacción con el ozono, se cuantificaba la luz emitida. Se preparó una curva de calibración utilizando concentraciones estándar de nitritos entre 1 nM y 100 µM a partir de un stock de nitritos de 100 mM.

Para distinguir entre los nitritos y nitratos endógenos de la muestra y los obtenidos tras la oxidación de NO procedente de la actividad NOS, el NO formado durante el periodo de reacción se calculó como la diferencia entre el contenido de nitritos y nitratos entre T = 30 min y T = 0 min, la actividad se determinó en nmol NO / min mg de proteínas.

3.18. DETERMINACIÓN DE S-NITROSOTIOLES TOTALES MEDIANTE QUIMIOLUMINISCENCIA DE OZONO

Se siguió el método descrito por Jourd'heuil *et al.* (2005) modificado por Valderrama *et al.* (2007). Los S-nitrosotioles se midieron mediante un Autoanalizador de Óxido Nítrico (NOA 280i, Sievers, USA) usando como reactivo en la cámara de reacción una solución ácida de triyoduro, generada por la mezcla de yoduro potásico (KI) y yodo cristalino (I₂) en ácido acético glacial. En esta mezcla de reacción los S-nitrosotioles se descomponen liberando NO. El óxido nítrico liberado se transporta mediante un flujo constante de nitrógeno hasta la cámara de reacción del autoanalizador donde reacciona con el ozono como se ha descrito anteriormente.

Reactivos

- Tampón de homogeneización Tris-HCl 0,1M, pH 7,5; Sacarosa 5%; PVPP 7%; Triton X-100 0,05%; EDTA 0,1 mM; DTT 15 mM; PMSF 1 mM; DTPA 100 µM y cocktail de inhibidores de proteasas 100x (2x).
- Tampón para miracloth: Tris-HCl 0,1M, pH 7,5.
- N-etilmaleimida 10 mM

- Sulfanilamida 10 mM en HCl 1 N
- Yoduro potásico (KI) 45 mM
- Yodo cristalino (I₂) 10 mM
- Ácido acético glacial 17,5 M

Técnica

En la cámara oscura con luz neutra y en frío se homogeneizaron hipocótilos frescos de girasol tanto de plántulas control como de plántulas que habían estado sometidas a estrés biótico y abiótico, usando el tampón anteriormente indicado en proporción 1/5 (p/v), el homogeneizado se pasa por una capa de miracloth previamente equilibrada con el tampón indicado arriba. Las muestras se centrifugaron a 19.890 xg durante 10 minutos a 4°C, y se tomaron los sobrenadantes.

Se preparó una mezcla de reacción constituida por 1,5 ml del sobrenadante y 167 µl de N-etilmaleimida para bloquear los grupos sulfidrilo, se mezcló durante 15 segundos por inversión y se incubó 15 minutos en frío, pasando este tiempo se añadió 167 µl de sulfanilamida para eliminar los nitritos presentes en la muestra, se agitó 15 segundos y se incubó otros 15 minutos en frío.

Los RSNOs se determinaron por triplicado para cada muestra, inyectando 1 ml de muestra en la cámara de reacción del NOA, donde los S-nitrosotioles se descomponen liberando NO. Se preparó una recta patrón con concentraciones de nitritos entre 1 nM y 100 µM.

3.19. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL

3.19.1. DETECCIONES INMUNOLÓGICAS MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL

Reactivos

- Tampón fosfato (PB) 0,2 M, pH 7,4
- Tampón fosfato salino (PBS) 0,01 M, pH 7,4; PB 0,01 M; NaCl 0,15 M y KCl 3 mM.
- Tampón Tris-HCl 0.1 M, pH 7,4.
- Paraformaldehído 8% (p/v).
- Paraformaldehído 4% (v/v) en PB 0,1 M.
- Sacarosa 30% (p/v) en PB 0,1 M.

- TASB-ASBT: Tris-HCl 5 mM, pH 7,6; NaCl 0,9% (p/v); azida sódica 0,05% (p/v); BSA 0,1% (p/v) y Tritón X-100 0,1% (v/v).

Técnica

Se cortaron la parte baja de los hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55, tanto de plántulas control como de plántulas sometidas a estrés biótico y abiótico. Los cortes se incubaron en paraformaldehído al 4% durante 3 horas a 4°C y agitación suave. Seguidamente, se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con PB 0,1 M, pH 7,4 en agitación. A continuación, se incubaron en sacarosa al 30% durante toda la noche a 4°C.

Se realizaron cortes de 40 µm de grosor en criostato (Frigocut E., Reichert-Jung, Viena, Austria) a -20°C, que se recogieron en tampón TASB-ASBT y se repartieron en viales donde se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno con ese mismo tampón. Los cortes se incubaron durante toda la noche en agitación suave con los siguientes anticuerpos primarios diluidos en TASB-ASBT (Peinado *et al.*, 2000):

- ♦ Anticuerpo frente al S-nitrosoglutation (GSNO) (Calbiochem) diluido 1/2500.
- ♦ Anticuerpo frente a la S-nitrosoglutation reductasa (GSNOR) diluido 1/50.
- ♦ Anticuerpo frente a 3-nitrotirosina (n-Tyr) diluido 1/300.

Como controles negativos se procesaron algunos cortes de cada muestra eliminando el anticuerpo primario.

A continuación, se hicieron tres lavados de 10 minutos cada uno con TASB-ASBT y se incubaron durante una hora en agitación suave o bien con un anticuerpo secundario anti-conejo (Pierce Chemical, Rockford, IL) en el caso de los cortes incubados con la GSNOR y la n-Tyr, o bien con un anticuerpo anti-rata (Amersham, Buckinghamshire, UK) en el caso de los cortes incubados con GSNO, en ambos casos unidos a biotina y diluidos 1/1000 en TASB-ASBT. Tras varios lavados se procedió a la incubación con el fluorocromo Cy2 acoplado a estreptavidina (Amersham, Buckinghamshire, UK) diluido 1/1000 durante una hora y 30 minutos en oscuridad.

Finalmente, los cortes se lavaron con TASB-ASBT y se montaron sobre portas con PBS:glicerol 1/1 (v/v) para su posterior observación. Las longitudes de onda de excitación y emisión (λ_{ex} y λ_{em}) fueron 495 y 515 nm, respectivamente.

3.19.2. DETECCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO, S-NITROSOTIOLES TOTALES, ANIÓN SUPERÓXIDO Y ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVO MEDIANTE MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL

3.19.2.1. Detección de óxido nítrico (NO)

Se siguió el método descrito por Valderrama *et al.* (2007) utilizando el fluoróforo 4,5-diacetato de diaminofluoresceína (DAF-2 DA, Calbiochem). Las diaminofluoresceínas reaccionan con el NO, pero no reaccionan con ninguna ROS, presentando un límite de detección para el NO de menos de 2-5 nM (Nakatsubo *et al.*, 1998). El DAF-2 DA, entra en las células donde los grupos acetato son hidrolizados por las esterasas citosólicas dando lugar al DAF-2 que no puede atravesar la membrana plasmática y permanece en el interior de la célula. A pH fisiológico, el DAF-2 no es fluorescente, pero en presencia de óxido nítrico intracelular se forma el compuesto triazólico altamente fluorescente (DAF-2T) en la zona del espectro del verde (Kojima *et al.*, 1998). Otra ventaja de DAF-2T es que su longitud de onda de excitación es poco dañina para las células, lo que permitió usar este fluoróforo para estudiar la producción de NO *in vivo* en las células de plantas (Foissner *et al.*, 2000; Pedroso *et al.*, 2000; García-Mata y Lamattina, 2002; Neill *et al.*, 2002a) (**Figura 36**).

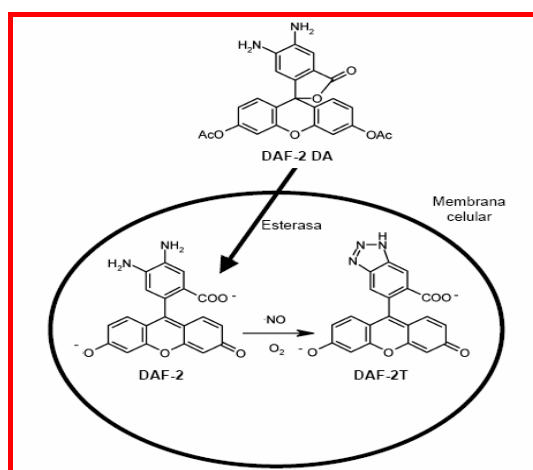


Figura 36. Formación de DAF-2T a partir de DAF-2 en presencia de NO y O₂.

Reactivos

- Tris-HCl 10 mM, pH 7,4.
- DAF-2 DA 10 µM en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,4.
- cPTIO 200 µM en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,4.
- Tampón fosfato (PB) 0,2 M.
- Tampón fosfato salino (PBS) 5x: PB 50 mM; NaCl 0,73 mM y KCl 13 mM.

- Solución de infiltración: acrilamida/bisacrilamida 30% (15%) (v/v); PBS 5x (1x) y TEMED 10% (v/v).
- Persulfato amónico (PSAM) 2% (p/v).

Técnica

Se realizaron cortes de 0,5 cm de la parte baja de los hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55, tanto de plántulas control como de plántulas que habían estado sometidas a estrés biótico y abiótico. Los cortes se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y oscuridad en la solución de DAF-2 DA. A continuación, se realizaron tres lavados de 15 minutos cada uno con el tampón Tris-HCl y seguidamente se incubaron en la solución de infiltración durante toda la noche a 4°C, en agitación y oscuridad.

Se realizaron controles negativos que se incubaron previamente con cPTIO (que actúa como secuestrador de NO) durante 30 minutos a temperatura ambiente, siguiendo después el mismo protocolo aplicado a las muestras.

A continuación se procedió a polimerizar la solución de infiltración en moldes de 1,5 x 0,9 x 0,5 mm (Sorvall) en cuyo interior se introducía el corte de hipocótilo, la polimerización se conseguía adicionando 50 µl de PSAM, obteniéndose de esta manera bloques de poli(acrilamida) que posteriormente serían cortados con el vibratomo (Leica UT 1000 ST). Se hicieron cortes de 60 ó 80 µm que se montaron sobre portas con la solución de PBS:glicerol 1/1 (v/v) y se observaron directamente en el microscopio láser confocal (Leica TCS SL) utilizando como λ de excitación y emisión 495 y 515 nm, respectivamente.

3.19.2.2. Detección de S-nitrosotioles totales (RSNOs)

Se siguió el método descrito por Valderrama *et al.* (2007) usando el fluoróforo Alexa fluor 488 Hg-link (Molecular Probes). Alexa fluor 488 Hg-link es un compuesto de fenilmercurio que reacciona con el grupo tiol para formar uniones tiol estables (**Figura 37**). Se usa para una detección directa de RSNOs en tejidos después de bloquear los grupos sulfidrilo preincubando con N-etilmaleimida para evitar la formación de S-nitrosotioles durante el procesamiento.

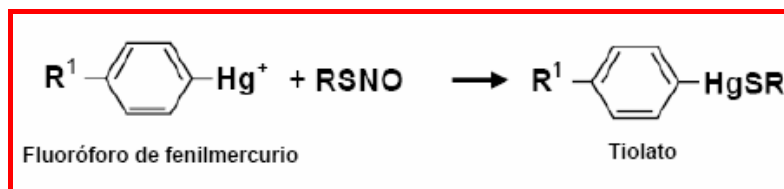


Figura 37. Reacción de Alexa fluor 488 Hg-link con S-nitrosotioles.

Reactivos

- N-etilmaleimida 10 mM.
- Alexa fluor 488 Hg-link 10 μ M.
- β -mercaptoetanol 10 mM.

Técnica

Se realizaron cortes de 0,5 cm en la parte baja de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55, tanto de plántulas control como de plántulas sometidas a estrés por *Plasmopara halstedii*. Los cortes se incubaron con N-etilmaleimida durante dos horas a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron tres lavados de 15 minutos cada uno con el tampón Tris-HCl, posteriormente se incubaron con β -mercaptoetanol durante 30 minutos, pasando ese tiempo se realizaron tres lavados de 15 minutos cada uno con el tampón Tris-HCl, y seguidamente se incubaron con el fluoróforo Alexa fluor 488 Hg-link durante una hora a temperatura ambiente en agitación y oscuridad. Por último, se realizaron tres lavados de 15 minutos cada uno con el tampón Tris-HCl y se incubaron toda la noche con la solución de infiltración en agitación a 4°C.

Se realizaron tres controles negativos, uno se incubó con N-etilmaleimida y β -mercaptoetanol y sin Alexa fluor 488 Hg-link, el segundo se incubó con β -mercaptoetanol y Alexa fluor 488 Hg-link y sin N-etilmaleimida, y tercer control se incubó sólo con β -mercaptoetanol.

Se siguió el mismo proceso descrito en el apartado anterior utilizando como λ de excitación y emisión 495 y 519 nm, respectivamente.

3.19.2.3. Detección del anion superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

Se siguió el método descrito por Valderrama *et al.* (2007) utilizando el fluoróforo dihidroetidio (DHE), es un compuesto no fluorescente que puede atravesar la membrana de las células vivas, ya en el interior se oxida por el anión superóxido produciendo etidio, y este compuesto se intercala entre el DNA, donde emite fluorescencia (Costa-Pereira y Cotter, 1999).

Reactivos

- DHE 10 μ M en Tris-HCl 10 mM, pH 7,4.
- TMP 1 mM en Tris-HCl 10 mM, pH 7,4.

Técnica

Se realizaron secciones de 0,5 cm de la parte baja de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55, tanto de plántulas control como de plántulas inoculadas por *P. halstedii*, los cortes se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad en la solución de DHE. A continuación, se realizaron un lavado de 20 minutos con el tampón Tris-HCl, y se incubaron con la solución de infiltración durante toda la noche a 4°C y oscuridad.

Se hicieron controles negativos que se incubaron previamente con TMP (actúa como secuestrador del $O_2^{\cdot-}$) durante una hora a temperatura ambiente y oscuridad, siguiendo después el mismo protocolo aplicado a las muestras.

Se siguió el mismo proceso descrito en el apartado **3.19.2.1** utilizando como λ de excitación y emisión 488 y 520 nm, respectivamente.

3.19.2.4. Detección de las especies de oxígeno reactivo (ROS)

Se siguió el método descrito por Brul *et al.* (1997) que consistió en la utilización del fluoróforo carboxi-diclorofluoresceína diacetato (DCFDA) (Sigma). Es un compuesto no fluorescente que puede atravesar las membranas celulares. Una vez en el interior celular los grupos acetato son hidrolizados por la acción de esterasas no específicas formando un compuesto no fluorescente que permanece en el interior de la célula (debido a su fuerte carga negativa). Este compuesto se puede oxidar con las especies de oxígeno reactivo presentes en la muestra convirtiéndose en un producto fluorescente (Breeuwer *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1995).

Reactivos

- DCFDA 25 μ M en Tris-HCl 10 mM, pH 7,4.
- Ascorbato 1 mM en Tris-HCl 10 mM, pH 7,4.

Técnica

Se realizaron cortes de 0,5 cm de la parte baja de los hipocótilos de girasol y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad en la solución de DCFDA. Se realizaron controles negativos que previamente se incubaron con ascorbato (actúa como secuestrador de ROS) durante una hora a temperatura ambiente y oscuridad, para después seguir el mismo protocolo aplicado a las muestras. A continuación, se realizó un lavado de 20 minutos con el tampón Tris-HCl, y se incubó en la solución de infiltración

durante toda la noche a 4°C y oscuridad. Se siguió el mismo proceso descrito en el apartado 3.19.2.1 usando unas λ de excitación y emisión de 485 y 530 nm respectivamente.

3. 20. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

3.20.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Para los estudios de microscopía electrónica se utilizaron plántulas pertenecientes a la línea X55 sin tratamiento.

Reactivos

Solución de fijación:

- Tampón Pipes-KOH 100 mM, pH 7,4 (50 mM)
- Paraformaldehído al 8% (4%)
- Glutaraldehído al 0,2 %
- Sacarosa 60 mM

Técnica

Se cortaron la parte baja de los hipocóilos en piezas de aproximadamente 1mm a 4°C y sobre una gota de la solución de fijación. A continuación estos bloques se sumergieron en la solución de fijación, se les hizo vacío durante 5 minutos a 4°C, y seguidamente se agitaron a 4°C durante 2 a 4 horas. Después se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con tampón Pipes. Seguidamente, se deshidrataron utilizando una serie escalonada de etanol (30%-100%, v/v) con intervalos de 20 minutos. A partir del 70% de etanol, las muestras se mantuvieron a -20°C. Después de la deshidratación, las muestras fueron infiltradas en series graduales de resina LRWhite (LRW) en etanol (25-100%, v/v) con intervalos de 4 horas e infiltración final de 12 horas. La polimerización se realizó a -20°C y con luz ultravioleta. Se prepararon cortes semifinos a partir de los cuales se obtuvieron cortes ultrafinos que se contrastaron únicamente con acetato de uranilo para su visualización al microscopio electrónico de transmisión (Zeiss EM 10C).

3.20.2. INMUNOLOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PROTEÍNAS

Reactivos

- Tampón TBST: Tris-HCl 10 mM, pH 7,6; NaCl 0,9% (p/v); Tween 20 0,05% (v/v) y azida sódica 0,02% (p/v).
- Solución de bloqueo (TBSTA): albúmina sérica bovina (ASB) al 2% en tampón TBST.

Técnica

Se llevó a cabo según el método descrito por Corpas *et al.* (2006a). Se partió de cortes ultrafinos previamente adheridos a rejillas de níquel específicas para microscopía electrónica de transmisión, el proceso empieza con 1 a 2 horas de bloqueo a temperatura ambiente, a continuación se llevaron a cabo las incubaciones con los anticuerpos primarios frente a GSNO y a GSNOR sin diluir. Como control negativo se utilizó una rejilla incubada con un suero normal de conejo diluido 1/500. Las incubaciones con los anticuerpos primarios fueron de 3 a 4 horas a temperatura ambiente y dentro de una cámara de humedad. Seguidamente se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBST y a continuación se incubaron los cortes durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes que iban unidos a partículas de oro coloidal de 15 nm de diámetro (diluidos 1/50 en TBSTA y diseñados en cabra frente a sueros de rata o conejo). Seguidamente, se realizó un lavado de 10 minutos con TBST y otros dos con agua.

3.21. EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y PRUEBA DE INTEGRIDAD DEL RNA TOTAL

3.21.1. AISLAMIENTO DEL RNA TOTAL

Se extrajo el RNA total de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55, tanto de plántulas control como de plántulas que habían estado sometidas a estrés biótico y abiótico usando una solución monofásica de fenol y de isotiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987) disponible comercialmente como Trizol (GIBCOBRL, Life Technologies).

Reactivos

- Trizol
- Cloroformo
- Isopropanol
- Agua-DEPC: agua milli Q tratada con DEPC (dietilpirocarbonato) 0,01% autoclavada.
- Etanol 75% diluido en agua-DEPC.
- Tampón TAE 50x: Trisma-base 2M; ácido acético glacial 950 mM y EDTA 50 mM.
- Tampón de electroforesis: TAE 0,5x.
- Tampón de carga 6x: glicerol 30% (v/v); azul de bromofenol 0.25% (p/v) y xilenocianol 0.25% (p/v).
- Bromuro de etidio 0,05%.
- Solución de Sybr Green I: Sybr Green diluido 1/100 en DMSO.

Técnica

En morteros previamente autoclavados se homogeneizaron los hipocótilos en presencia de nitrógeno líquido, inmediatamente después, se añadió 1 ml de Trizol por cada 0,1 g de polvo, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 12.000 xg durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 200 µl de cloroformo a cada muestra mezclando por inversión durante 15 segundos e incubando 2 minutos a temperatura ambiente, después, se centrifugó a 12.000 xg durante 15 minutos a 4°C. Se obtuvo una fase orgánica de fenol-cloroformo y otra acuosa, donde quedaba exclusivamente el RNA. Esta fase se recuperó y se mezcló con 200 µl de isopropanol puro, se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 xg durante 10 minutos a 4°C. Así se obtuvo un precipitado de RNA que se lavó con 1 ml de etanol al 75% y posteriormente se volvió a precipitar centrifugando a 7500 xg durante 5 minutos a 4°C. Se dejó secar el precipitado al aire libre durante unos minutos y se resuspendió el RNA en 40 µl de agua-DEPC. Finalmente, se incubaron las muestras en un baño de 55 a 60°C durante 10 minutos para resuspender bien el RNA.

3.21.2. CUANTIFICACIÓN DEL RNA TOTAL

La concentración de RNA total se determinó espectrofotométricamente mediante un análisis con luz ultravioleta, monitorizando la absorbancia a 260 nm, asumiendo que una unidad de densidad óptica a esta longitud de onda equivale aproximadamente a 40 µg/ml de RNA. Para ello se diluyó el RNA en agua-DEPC.

También se determinó la absorbancia a 280 nm ya que la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm (A_{260}/A_{280}) es un índice de la pureza del RNA, y su valor debe estar entre 1,8 y 2 para muestras con valores de pureza aceptables, en caso de detectarse valores fuera de ese rango podría ser indicativo de contaminación de la muestra por proteínas.

3.21.3. PRUEBA DE INTEGRIDAD DEL RNA TOTAL

La integridad de RNA se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) en TAE 0,5x en condiciones no desnaturalizantes. A cada 1µg de RNA se añadía agua-DEPC hasta 10 µl y 2 µl de tampón de carga 6x. Transcurrida la electroforesis, los geles se tiñeron con bromuro de etidio durante 5 minutos para visualizar el RNA mediante luz ultravioleta.

La observación en el gel de dos bandas definidas correspondientes a los RNAs ribosómicos, es indicativo de la integridad de la muestra de RNA, y por tanto se considera que es adecuada para ser utilizada en determinaciones posteriores.

3.22. OBTENCIÓN DEL DNA COMPLEMENTARIO (cDNA)

A partir de RNA total de los hipocótilos se obtuvo el cDNA mediante transcripción reversa utilizando el *Kit 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)* (Roche).

Reactivos

- Tampón de reacción 10x: Tris-HCl 100 mM, pH 8,3 y KCl 500 mM.
- MgCl₂ 25 mM
- Random primer 2 µg/µl
- Inhibidor de RNAsas 50 units/µl
- AMV Reverso Transcriptasa >20 units
- Desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 10 mM de cada uno)

Técnica

Se utilizó 1 µg de RNA total, al que se añadió agua-DEPC estéril hasta 8,2 µl y se incubó durante 15 minutos a 65°C. Posteriormente, se añadieron 11,8 µl de la mezcla de reacción previamente preparada conteniendo: 2 µl de tampón de reacción 10x, 4 µl de MgCl₂, 2 µl de la mezcla de desoxinucleótidos, 2 µl de random primer, 1 µl de inhibidor de RNAsas y 0.8 µl de la enzima AMV Reverso Transcriptasa, todas estas cantidades están ajustadas para un volumen final de reacción de 20 µl.

La reacción se llevó a cabo en el termociclador mediante una incubación de 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C y 5 minutos a 99°C. Finalmente, las muestras se mantuvieron a 4°C.

3.23. DISEÑO Y SÍNTESIS DE CEBADORES PARA LA OBTENCIÓN DE cDNAs

3.23.1. DISEÑO DE CEBADORES DEGENERADOS PARA GSNOR Y Mn-SOD

Para la GSNOR se ha usado la secuencia de formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión de guisante con número de acceso (P80572), y para la Mn-SOD los cebadores fueron diseñados para regiones altamente conservadas en diferentes especies vegetales relacionadas filogenéticamente con el girasol (**Tabla 6**).

El alineamiento y la búsqueda de regiones conservadas se llevaron a cabo mediante varios programas informáticos como el OMIGA 2 (Oxford Molecular) y el Clone Manager Suit.

Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos degenerados utilizados para la clonación parcial de cDNAs.

Secuencias de oligonucleótidos degenerados (5' a 3')	
GSNOR	F: ATCAC(C/T)TGCAAAGC(G/T)GCGGT R: G(A/G)AACACC(A/G)GT(G/T)CCA AG(A/C)AG
Mn-SOD	F: AC(C/A)(A/C)GAA(G/A)CACCA(C/T)CA(G/A)ACTTA R: TG(C/G)A(A/G)GTAGTAGGCATG(T/C)TCCCA

3.23.2. AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR

Para la GSNOR, la amplificación mediante PCR se llevó a cabo utilizando 1 µl de cDNA diluido 1/20, 4µl de cada uno de los cebadores degenerados (0,5 µM de cada uno), 1 µl de dNTPs (200 µM cada uno), 4 µl del tampón 10x, 1,2 µl de MgCl₂ 25 mM, 1,25 U de la enzima Taq DNA polimerasa y se completó con agua estéril hasta 20 µl.

Para la Mn-SOD, la amplificación mediante PCR se llevó a cabo utilizando 2 µl de cDNA, 1µl de cada uno de los cebadores degenerados (20 µM de cada uno), 1 µl de dNTPs 0,25 mM, 5 µl del tampón 10x, 5 µl de MgCl₂ 1,5 mM, 0,1 µl de la enzima Taq DNA polimerasa y se completó con agua estéril hasta 50 µl.

El proceso se llevó a cabo en el termociclador y consistió en las fases que se indican en la **tabla 7**.

Tabla 7. Programa de PCR utilizado en los ensayos con oligonucleótidos degenerados.

Ciclos	Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Ciclo 1 (1X)	Paso 1	94	2
Ciclo 2 (30X)	Paso 1	94	1
	Paso 2	55	1
	Paso 3	65	1
Ciclo 3 (1x)	Paso 1	65	10

3.23.3. PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE DNA

Un vez realizadas las amplificaciones, se cargó el producto de PCR diluido con el tampón de carga 6x y la solución de Sybr Green I en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE 0,5x. En paralelo se cargaron marcadores de peso molecular de 100 pb que nos

permiten determinar el tamaño molecular de la banda. Tras la electroforesis, los geles se visualizaron con la luz ultravioleta. Se extrajo las bandas correspondientes al DNA de GSNOR y Mn-SOD del gel y se purificó usando el kit *perfectprep Gel Cleanup procedure* (Eppendorf).

Para comprobar la pureza de la muestra, se cargaron en un gel de agarosa al 1% 5 μ l del producto purificado tratado con 1 μ l de tampón de carga 6x y 1 μ l de la solución de Sybr Green I. También, se cargaron los marcadores de peso molecular de 100 pb. La visualización se realizó mediante un transluminador de luz ultravioleta.

3.23.4. REACCIÓN DE LIGACIÓN

Usando el kit *pGEM –T Easy Vector systems* (Promega), se preparó una mezcla de reacción compuesta por 2 μ l del producto de PCR purificado, 5 μ l del tampón de ligación rápida 2x, 1 μ l del plásmido, 1 μ l de DNA ligasa del fago T4 y agua estéril para completar el volumen hasta 10 μ l. La mezcla se incubó una hora a temperatura ambiente y posteriormente a 4°C toda la noche.

3.23.5. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

Las bacterias se transformaron mediante choque térmico, según el método descrito por Lucotte y Baneyx (1993). Las células competentes *E. Coli* DH5 α conservadas a –80°C se descongelaron en hielo, se les añadió 10 μ l del plásmido de interés y se incubaron 30 minutos a 4°C. Posteriormente, las bacterias se sometieron a un choque térmico consistente a un calentamiento de las muestras a 42°C durante 50 segundos colocándolas después en hielo durante 2 minutos. Seguidamente, se añadieron 950 μ l del medio LB líquido y se incubaron a 37°C durante 1,5 horas en un agitador orbital a 150 rpm, se centrifugaron 10 minutos a 1000 xg. Se desecho el sobrenadante, y al precipitado se le añadieron 200 μ l de LB líquido, se agitó y se distribuyeron 100 μ l de esta suspensión de manera homogénea en una placa de Petri con un medio de cultivo comercial denominado S-Gal/LB Agar Blend (Sigma) que contenía LB 1x, 3,4-ciclohexenoesculetina- β -D-galactopiranosido (S-Gal) 0,03% (p/v), citrato de amonio férrico 0,05% (p/v) y 1-isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,003% (p/v), suplementado con ampicilina 100 μ g/ml y agar 25 % (p/v). Las bacterias se dejaron crecer en las placas durante 12-16 horas a 37°C.

3.23.6. AISLAMIENTO DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

Se seleccionaron las colonias que habían recibido el inserto, que aparecían de color blanco debido a su incapacidad de degradar la galactosa del medio, ya que el inserto se sitúa en la secuencia codificadora de la β -galactosidasa. Se tomaron colonias

individualizadas y se inocularon en tubos de ensayo con 4 ml del medio LB y ampicilina (100 µg/ml) y se mantuvieron en agitación a 200 rpm y 37°C de 12 a 16 horas. Utilizando estos cultivos se realizó el aislamiento del plásmido por Miniprep usando el kit *Perfectprep Plasmid Mini procedure* (Eppendorf).

El producto de la Miniprep se cargó en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE 0,5x. Las muestras fueron tratadas con tampón de carga 6x y solución de Sybr Green I. Tras la electroforesis, el gel se observó con luz ultravioleta visualizándose una única banda.

Una vez comprobada la presencia de los insertos y su tamaño, se envió a secuenciar los plásmidos recombinantes. Tras la secuenciación se obtuvo los clones parciales que se encuentran en la base de datos del Genbank Nucleotide Sequence (NCBI). Se realizó un análisis de estas secuencias con el programa informático BLAST del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) para comprobar su homología con las de otras especies de plantas.

3.24. DISEÑO DE CEBADORES ESPECÍFICOS PARA LA PCR A TIEMPO REAL

A partir de la secuencia de los clones parciales se diseñaron los cebadores específicos para la GSNOR y las dos isoformas de la Mn-SOD de girasol. También se diseñaron una pareja de cebadores específicos para los genes de defensa PR-5 y quitinasa a partir de secuencias conocidas de plantas con cierto grado de identidad. Se utilizó como control interno la amplificación del RNA ribosómico 18S (**Tabla 8**).

Tabla 8. Secuencias de oligonucleótidos específicos de GSNOR, Mn-SOD1, Mn-SOD2, Ha-PR5, Quitinasa y RNA 18S.

	Secuencias de oligonucleótidos específicos (5' a 3')	Tamaño del producto (pb)	Numero de acceso
GSNOR	F: TCTTGGTCATGAGGCTGCTGGGATTGTTG R: TGGCTCCCCTAATTTTGCCACACAGGTTG	160	AY941250
Mn-SOD1	F: GGAAGAATCTGGCTCCCACCAAG R: GCAATCAACTTTTCTACAGAACCATAACT	104	DQ812551
Mn-SOD2	F: CTGGAAGAATCTTGCCCTACTCGT R: CAACCAATTTTCCATAGAACCAAAATG	103	DQ812552
Ha-PR5	F: ACGCTTTGAACCAAGTTCAACAATCTTG R: TAAATCAGTTGGTCCACAATTTCCAGAA	241	AF364864
Quitinasa	F: TGTGCGGTCATCCAGAACCA R: ACTGCACCAGATGGGCGATTGTC	257	G31857
RNA 18S	F: TTTGATGGTACCTGCTACTCGGATAACC R: CTCTCCGGAATCGAACCCCTAATTCTCC	273	AF107577

3.24.1. AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL

Para la realización de la PCR a tiempo real se utilizó un termociclador acoplado a un detector de fluorescencia y a un ordenador. El aparato está equipado con filtros de excitación y de emisión, de tal modo que un haz de luz atraviesa el filtro de excitación seleccionado, llega a la muestra y provoca la emisión de fluorescencia correspondiente a una determinada longitud de onda. La luz emitida es captada por el filtro de emisión seleccionado y es recogida por un detector. La longitud de onda de la fluorescencia emitida depende del fluoróforo que se añadía a la muestra. El fluoróforo utilizado en nuestros experimentos fue Sybr Green-I (Bio-Rad), que es capaz de intercalarse en el DNA y de emitir fluorescencia a 520 nm, al excitarse a 497 nm. El fluoróforo Sybr Green-I emite una fluorescencia muy baja en solución acuosa, pero cuando se intercala en el DNA de doble cadena se produce un aumento en su fluorescencia. A medida que avanzan los ciclos de PCR la fluorescencia va aumentando como consecuencia de la formación de DNA. La fluorescencia captada es analizada y expresada por el “software” específico como unidades relativas de fluorescencia (RFU o “Relative Fluorescent Units”). El aparato comienza a captar fluorescencia antes del primer ciclo. Esta fluorescencia es la denominada “fluorescencia base”. En cada nuevo ciclo el aparato recoge los valores de fluorescencia y los compara con los del ciclo anterior. La fluorescencia debida al Sybr Green-I que se intercala en el DNA durante la amplificación es muy baja durante los primeros ciclos. Continuando el proceso, llega un ciclo determinado en el que la fluorescencia empieza a ser superior a la fluorescencia base, debido a la amplificación continua ciclo tras ciclo de la secuencia diana. Este ciclo en el cual la fluorescencia de la muestra comienza a ser mayor que la fluorescencia base se denomina Ciclo Umbral o C_t (threshold cycle) (**Figura 38**).

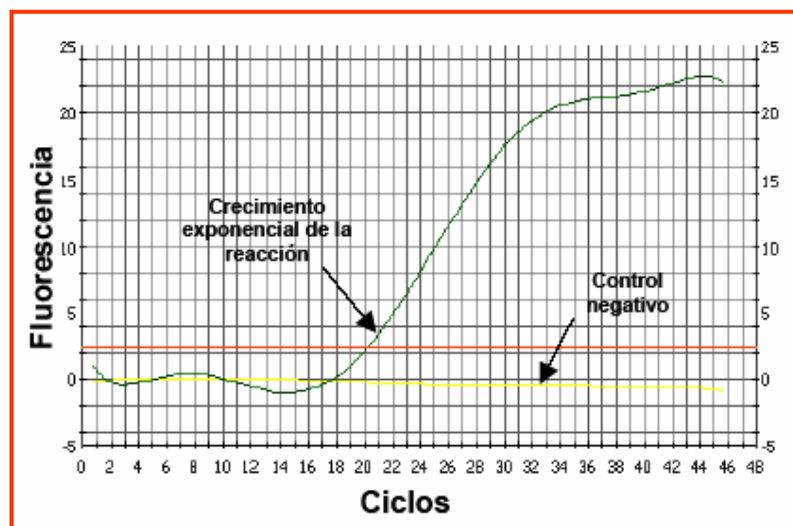


Figura 38. Diagrama de emisión de fluorescencia con respecto al ciclo de reacción.

El valor de C_t es el valor clave para los experimentos de PCR en tiempo real. C_t es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas diana en la muestra, de manera que cuanto mayor sea el número inicial de moléculas diana mas bajo será el valor de C_t , es decir la cantidad de DNA amplificado necesario para superar la fluorescencia base aparecerá antes. Aquellos casos en los que nunca se supere la fluorescencia base, es decir en los que no haya amplificación, se corresponden con ausencia de moléculas dianas iniciales en las muestras.

Reactivos

- Mezcla de reacción del *kit Master mix IQ TM SYBR® Green Supermix (2x)* (Bio-Rad): Tris-HCl 16 mM, pH 8,4; 0,5 unidades de hot-start TaqTM ADN polimerasa; KCl 20 mM; desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dUTP) 0,16 mM; MgCl₂ 2,4 mM; cebadores específicos 0,5 µM; Sybr Green I y fluoresceína 8 nM.

Técnica

Las amplificaciones mediante PCR se llevaron a cabo utilizando 1 µl de los cDNAs obtenidos anteriormente, 0,5 µl de cada uno de los cebadores específicos a una concentración de 20 pmol/µl, 10 µl de mezcla de reacción del *kit Master mix IQ TM SYBR® Green Supermix (2x)* y 8 µl de agua estéril, formando un volumen final de 20 µl. Como control interno se utilizó el RNA 18S, que se utilizó para la normalización de los resultados. Como controles negativos se realizaron mezclas de reacción suprimiendo el cDNA.

El proceso se llevó a cabo utilizando el equipo iCycler iQ (Bio-Rad) con módulo óptico acoplado y consistió en las fases que se indican en las **tablas 9 y 10**.

Tabla 9. Temperaturas de “annealing” y “melting” de los cebadores.

	Temperatura de “annealing” (°C)	Temperatura de “melting” (°C)
GSNOR	60	82
Mn-SOD1	62	82
Mn-SOD2	62	78
Ha-PR5	60,5	83
Quitinasa	60,6	82
RNA-18S	60-62	82

Tabla 10. Programa utilizado para la amplificación mediante PCR a tiempo real.

Ciclos	Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo
Ciclo 1 (1X)	Paso 1	95	5 minutos
Ciclo 2 (30X)	Paso 1	95	30 segundos
	Paso 2	T °C de annealing	30 segundos
	Paso 3	72	1 minuto
	Paso 4	T °C de melting	30 segundos
Ciclo 3 (1x)	Paso 1	72	7 minutos
Ciclo 4 (1x)	Paso 1	95	1 minuto
Ciclo 5 (1x)	Paso 1	55	1 minuto
Ciclo 6 (90x)	Paso 1	55+Δ 0.5°C	10 segundos
Ciclo 7 (1x)	Paso 1	4	> 1 hora

El producto de PCR fue analizado mediante migración en un gel de agarosa al 2% en tampón TAE 0.5x. Se cargaron 5 µl de muestra tratada con 1 µl de tampón de carga 6x y 1 µl de la solución de Sybr Green I. En paralelo se cargaron marcadores de peso molecular de 100 pb que nos permiten determinar el tamaño molecular de nuestra banda. La electroforesis transcurrió a 100 voltios durante 40 minutos.

3.25. REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN DE LOS EXTREMOS 5' Y 3' DEL cDNA (RACE 5'/3') DE LA Mn-SOD

La RACE (*Rapid Amplification of cDNA End*) es un tipo de reacción en cadena de la polimerasa que nos permite obtener de manera rápida las secuencias de los extremos de una cadena, al objeto de obtener la secuencia completa del gen.

3.25.1. DISEÑO DE CEBADORES PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS EXTREMOS 5' Y 3' DE LAS DOS ISOFORMAS DE LA Mn-SOD

A partir de las secuencias centrales de las dos isoformas de la Mn-SOD de girasol, que previamente hemos obtenido, se diseñaron cebadores para amplificar los extremos 3'/5' de las dos isoformas mediante PCR y obtener la secuencia completa del gen (**Tabla 11**).

Tabla 11. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los extremos 5' / 3' de las dos isoformas de la Mn-SOD.

Extremos de la cadena	Secuencias de oligonucleótidos (5' a 3')
Extremo 3'	Mn-SOD1-4: TCTGGATGGGTGTGGCTTGCA GTGG Mn-SOD2-4: GGAAGAATCTGGCTCCCACCAAG
Extremo 5'	Mn-SOD1-1: CCATGTGG (C/T)GGCTCACCACCCCTTC Mn-SOD1-2: GATTCTTCCAGAAAAT(G/T)GAGTGATTC Mn-SOD1-3: GAAAAT(G/T)GAGTGTTACATGACCTC Mn-SOD2-1: CAACCACAAGCCTCTTTAGCTCTTTG Mn-SOD2-2: AGCAATCAACTTTTCTACAGAACCATAGCT Mn-SOD2-3: TGGCTCACCACCCCTTCCTTG

3.25.2. REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN DEL EXTREMO 5'

La síntesis de cDNA

A partir de RNA total de hipocótilos de girasol se obtuvo el cDNA utilizando el *Kit 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)* (Roche).

Reactivos

- Tampón de síntesis de cDNA 5x: Tris-HCl 250 mM, pH 8,5; MgCl₂ 40 mM; KCl 150 mM y DTT 5 mM.
- Mezcla de desoxinucleótidos: dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10 mM cada uno en Tris-HCl pH 7,5.
- La enzima Reverso Transcriptasa: 25 U/μl, en fosfato potásico 200 mM, pH 7,2; DTT 2 mM; Triton x-100 0,2% y glicerol 50%.
- Transferasa Terminal: 80 U/μl en fosfato potásico 60 mM, pH 7,2; KCl 150 mM; β-mercaptoetanol 1 mM; Triton x-100 0,5% y Glicerol 50%.

Técnica

Se utilizaron 2 μg de RNA total, 4 μl de tampón de síntesis de cDNA 5x, 2 μl de la mezcla de desoxinucleótidos, 1 μl del oligo Mn-SOD1-1 o Mn-SOD2-1 (12,5 μM) y 1 μl de la enzima reverso transcriptasa. La mezcla se completó con agua-DEPC hasta un volumen final de reacción de 20 μl.

La reacción se llevó a cabo en el termociclador mediante una incubación de 60 minutos a 55°C y 5 minutos a 85°C. Finalmente, las muestras se mantuvieron a 4°C.

Purificación del cDNA

Se utilizó el *kit Montage PCR* (Genomics). Se pusieron 19 µl de cDNA obtenido en la columna y se añadieron 281 µl de agua estéril, se centrifugaron 15 minutos a 1000 xg. Posteriormente, se recogió el DNA purificado en 20 µl de agua estéril.

Introducción de la cola poli-A

Se preparó una mezcla constituida por 19 µl de cDNA purificado, 2,5 µl de tampón de reacción 10x (Tris-HCl 100 mM; MgCl₂ 15 mM; KCl 500 mM, pH 8,3) y 2,5 µl de dATP (en Tris-HCl 2 mM, pH 7,5), se incubó 3 minutos a 94°C, transcurrido ese tiempo se pasó a hielo y se añadió 1 µl de Transferasa Terminal. Posteriormente, la mezcla se incubó 30 minutos a 37°C y 10 minutos a 70°C.

Amplificación mediante la PCR 1

La amplificación se llevó a cabo utilizando 5 µl de cDNA que lleva la cola poli-A; 1 µl de dT anchor primer (37,5 µM), 1 µl del cebador Mn-SOD1-2 o Mn-SOD2-2 (12,5 µM), 1 µl de la mezcla de desoxinucleótidos, 5 µl de tampón de reacción 10x que lleva MgCl₂ y 0,5 µl de la enzima Fast Start High Fidelity (5 U/µl), la mezcla se completó con agua hasta un volumen final de reacción de 50 µl.

El proceso de amplificación se llevó a cabo en el termociclador, consistió en las fases que se indican en la **tabla 12**.

Tabla 12. Programa utilizado para la amplificación mediante PCR.

Ciclos	Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo
Ciclo 1 (1X)	Paso 1	94	2 minutos
Ciclo 2 (10X)	Paso 1	94	15 segundos
	Paso 2	61	30 segundos
	Paso 3	72	40 segundos
Ciclo 3 (25x)	Paso 1	94	15 segundos
	Paso 2	61	30 segundos
	Paso 3	72	40 segundos + Δ 20 segundos
Ciclo 4 (1x)	Paso 1	72	7 minutos

Amplificación mediante la PCR 2 (PCR nested)

Se hizo una segunda PCR usando 1 µl de producto de la PCR 1, 1 µl de PCR anchor primer (12,5 µM), 1 µl del cebador Mn-SOD1-3 o Mn-SOD2-3 (12,5 µM), 1 µl de la mezcla de desoxinucleótidos, 5 µl de tampón de reacción 10x que lleva MgCl₂ y 0,5 µl de la enzima Fast Start High Fidelity (5 U/µl), completándose con agua estéril hasta un volumen final de 50 µl. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador, siguiendo los mismos pasos de la PCR 1.

El producto de la segunda PCR se purificó usando el kit de purificación de la casa comercial "Montage", posteriormente, al producto de purificación se le añadieron 0,5 µl de Taq DNA-polimerasa, 1 µl de dNTP y 5 µl de tampón de reacción 10x que lleva MgCl₂. La mezcla de reacción se incubó 10 minutos a 72°C, después se purificó usando el mismo kit descrito anteriormente.

3.25.3. REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN DEL EXTREMO 3'

La síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA, se siguió el procedimiento descrito en el apartado 3.25.2 remplazando el cebador Mn-SOD1-1 por el oligo dT anchor primer.

Amplificación mediante PCR

La amplificación se llevó a cabo utilizando 2 µl de cDNA, 1 µl de PCR anchor primer (12,5 µM), 1 µl del cebador Mn-SOD1-4 o Mn-SOD2-4 (12,5 µM), 1 µl de la mezcla de desoxinucleótidos, 5 µl de tampón de reacción 10x que lleva MgCl₂ y 0,5 µl de la enzima Fast Start High Fidelity (5 U/µl), completándose con agua estéril hasta un volumen final de 50 µl.

La amplificación se llevó a cabo en el termociclador, siguiendo los mismos pasos de la PCR descritos en la tabla 12 cambiando la temperatura de annealing a 60°C.

Se cargó el producto de PCR en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE 0,5x. Las muestras fueron tratadas con tampón de carga 6x y Sybr Green I. Se cargaron también los marcadores de peso molecular de 100 pb. La electroforesis transcurrió a 100 voltios durante 40 minutos. Posteriormente, el gel se observó con luz ultravioleta visualizándose una única banda, se cortó y se purificó usando el kit *Perfectprep gel cleanup procedure* (Eppendorf).

3.25.4. REACCIÓN DE LIGACIÓN

Usando el kit *Acceptor Vector Kits* (Novagen), se preparó una mezcla de reacción compuesta por 2 µl del producto de PCR purificado del extremo 3' ó 5', 1 µl de acceptor vector, 5 µl de premix de ligación 2x y agua estéril hasta completar un volumen total de 10 µl.

La mezcla se incubó durante 45 minutos a 16°C. Seguidamente, se llevó a cabo el proceso de transformación.

3.25.5. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

A una alícuota de 50 µl de células competentes *E. Coli* DH5α se le añadió 1 µl de reacción de ligación y se incubó 30 minutos a 4°C. Posteriormente, se calentó durante 30 segundos a 42°C e, inmediatamente, se colocó en hielo durante 2 minutos. Se añadieron 250 µl del medio SOC y se incubó a 37°C durante 30 minutos en agitación a 200 rpm, posteriormente, se distribuyeron 100 µl de esta suspensión de manera homogénea en una placa de Petri con un medio de cultivo comercial denominado S-Gal/LB Agar Blend (Sigma) que contenía LB 1x, 3,4-ciclohexenoesculetina-β-D-galactopiranosido (S-Gal) 0,03% (p/v), citrato de amonio férrico 0,05% (p/v) y 1-isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,003% (p/v), suplementado con ampicilina 100 µg/ml y agar 25 % (p/v). Las bacterias se dejaron crecer en las placas durante 15-18 horas a 37°C.

3.25.6. AISLAMIENTO DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

Se seleccionaron las colonias que habían recibido el inserto y se inocularon en tubos de ensayo con 4 ml del medio LB y ampicilina (100 µg/ml) y se mantuvieron en agitación a 200 rpm y 37°C de 12 a 16 horas. Utilizando estos cultivos se inició el aislamiento del plásmido por Miniprep usando el kit *Perfectprep Plasmid Mini procedure* (Eppendorf).

Se hizo un gel de agarosa al 1% en TAE 0,5x en el que se cargaron 5 µl de producto de Miniprep tratado con tampón de carga 6x y Sybr Green I. En paralelo se cargaron 5 µl del marcador de peso molecular Fago λ para determinar la cantidad de DNA que tiene cada banda. La electroforesis se desarrolló a 50 voltios durante 1 hora y 40 minutos y, a continuación, se visualizó el DNA mediante un transluminador de luz ultravioleta.

Una vez comprobado la presencia de la banda, se envió los plásmidos recombinantes a secuenciar con lo que se obtuvo la secuencia entera de las dos isoformas de la Mn-SOD.

RESULTADOS

4.1. EFECTO DE LA INOCULACIÓN POR *Plasmopara halstedii* SOBRE EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE GIRASOL

Siguiendo el protocolo descrito, las plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.) fueron recogidas el día nueve del desarrollo (Radwan *et al.*, 2005) (**Figura 39**). En primer lugar se analizó el efecto del hongo *Plasmopara halstedii* sobre el crecimiento de biomasa vegetal, expresado como peso fresco del hipocótilo y peso fresco de plántula completa. En la variedad sensible (HA89), el hongo biotrofo *P. halstedii* causa una reducción significativa en el peso fresco del hipocótilo y de plántula completa. Sin embargo, en la variedad resistente (X55) inoculada no se observaron diferencias significativas en el peso fresco del hipocótilo y de plántula con respecto al control. Igualmente, el peso seco del hipocótilo y de plántula completa disminuyeron en la variedad sensible (HA89) inoculada por el hongo, no observándose diferencias significativas en la variedad resistente (X55) (**Tabla 13**).

Tabla 13. Efecto de la inoculación por el hongo biotrofo *Plasmopara halstedii* sobre el crecimiento de plántulas de girasol. Cada valor representa la media $\pm$ EEM de al menos cuatro réplicas. (*) $p < 0,05$.

Peso (g)	Hipocótilo fresco	Plántula fresca	Hipocótilo seco	Plántula seca
Sensible control	0,19 $\pm$ 0,03	0,65 $\pm$ 0,09	0,010 $\pm$ 0,001	0,048 $\pm$ 0,007
Sensible inoculada	0,15 $\pm$ 0,02 *	0,44 $\pm$ 0,05 *	0,007 $\pm$ 0,001 *	0,035 $\pm$ 0,01 *
Resistente control	0,18 $\pm$ 0,03	0,50 $\pm$ 0,03	0,009 $\pm$ 0,001	0,036 $\pm$ 0,007
Resistente inoculada	0,17 $\pm$ 0,02	0,51 $\pm$ 0,08	0,009 $\pm$ 0,001	0,035 $\pm$ 0,01

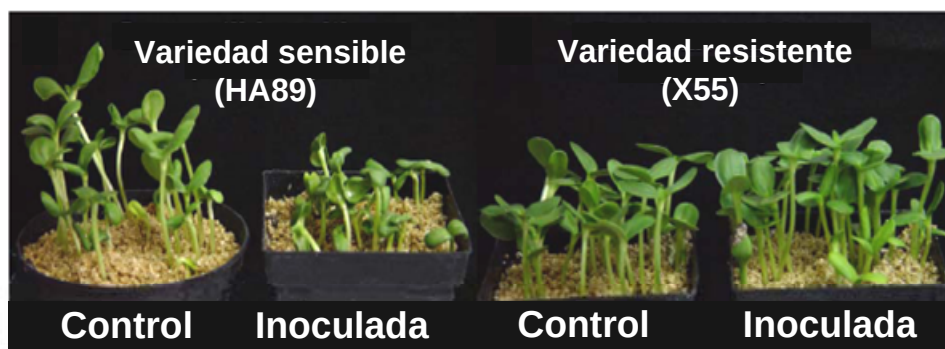


Figura 39. Plántulas de girasol sensible (HA89) y resistente (X55) de nueve días de edad, control e inoculadas por *P. halstedii*.

4.2. EFECTO DEL HONGO *P. halstedii* SOBRE EL PATRÓN ELECTROFORÉTICO DE PROTEÍNAS

Se ha estudiado mediante SDS-PAGE el patrón de proteínas en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a las variedades sensible (HA89) y resistente (X55), tanto de plántulas control como de plántulas inoculadas por *P. halstedii* (**Figura 40**). Se ha observado un patrón de polipéptido similar en las cuatro muestras, no encontrándose diferencias significativas ni entre variedades ni por efecto de la inoculación por *P. halstedii*.

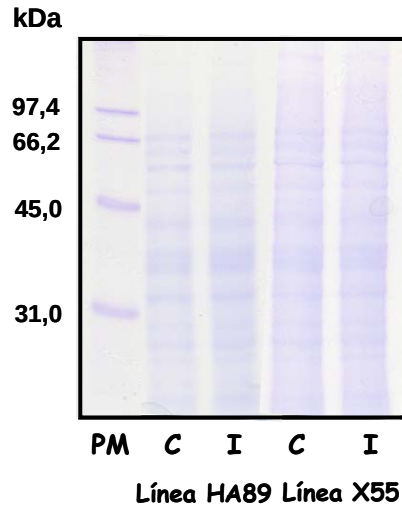


Figura 40. Patrón de polipéptido observado en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55, control e inoculados por *P. halstedii*. Las proteínas (20 µg) se separaron mediante SDS-PAGE y se tiñeron con azul Coomassie. **C:** control, **I:** inoculada, **PM:** patrón de peso molecular.

4.3. EFECTO DE LA INOCULACIÓN POR *P. halstedii* SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA

Mediante PCR a tiempo real se cuantificaron los niveles de RNA mensajero de proteínas relacionadas con la patogénesis (*Ha-PR5*) y de quitinasa en hipocótilos de girasol pertenecientes a las variedades sensible (HA89) y resistente (X55) a la inoculación por *P. halstedii* (**Figura 41**).

En la variedad sensible (HA89), los niveles del transcrito de *Ha-PR5* son indetectables en las plántulas control e inoculadas. Mientras que, en la variedad resistente (X55), los niveles del transcrito se incrementaron de forma significativa (388%) con la inoculación por *P. halstedii* (Panel A).

Por otro lado, los niveles de RNAm de quitinasa se incrementaron de forma significativa en las variedades sensible (HA89) y resistente inoculadas por *P. halstedii* (Panel B).

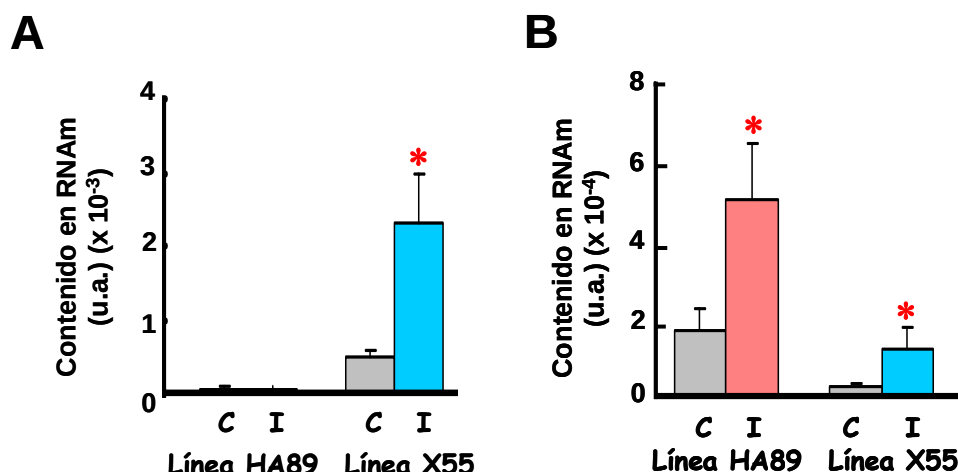


Figura 41. Efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre el contenido en RNAm de *Ha-PR5* y de quitinasa (Paneles **A** y **B**, respectivamente) en hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55, expresado en unidades arbitrarias (u.a.). Cada valor representa la media $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. C: control, I: inoculada. (*): $p < 0,05$.

4.4. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Se ha estudiado la expresión de enzimas antioxidantes en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.) control e inoculadas por el hongo biotrofo *Plasmopara halstedii*.

4.4.1. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE INMUNOBLOT DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN HIPOCÓTILOS DE GIRASOL

Los resultados del análisis por Western blot de extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.) usando anticuerpos policlonales frente a varias enzimas antioxidantes se muestran en la **figura 42**. El análisis por inmunoblot de las muestras reveló la presencia de bandas inmunorreactivas para las distintas proteínas, que presentaban los siguientes tamaños moleculares: 60 kDa para la catalasa (Cat) (calle 1), 17 kDa para la Cu/Zn-superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD) (calle 2), 30 kDa para la ascorbato peroxidasa (APX) (calle 3), 46 kDa para la monodeshidroascorbato reductasa (MDAR) (calle 4), 56 kDa para la glutatión reductasa (GR) (calle 5), 58 kDa para la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP (G6PDH-NADP) (calle 6), 63 kDa para la enzima málico dependiente de NADP (EM-NADP) (calle 7), 45 kDa para la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP (ICDH-NADP) (calle 8) y 27 kDa para la peroxirredoxina (Prx) (calle 9).

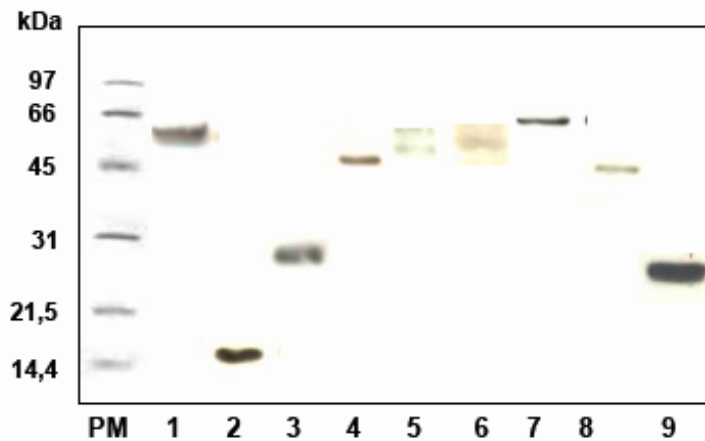


Figura 42. Caracterización mediante western blot de antioxidantes enzimáticos en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.) pertenecientes a la línea X55. Muestras conteniendo 20 µg de proteínas se sometieron a SDS-PAGE, posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con anticuerpos policlonales frente a la catalasa de calabaza diluido 1/500 (calle 1), Cu/Zn-SOD de espinaca diluido 1/3000 (calle 2), APX de pepino diluido 1/1000 (calle 3), MDAR de pepino diluido 1/8000 (calle 4), GR de guisante diluido 1/500 (calle 5), G6PDH-NADP de *Saccharomices cerevisiae* diluido 1/2500 (calle 6), EM-NADP de hígado de rata diluido 1/1000 (calle 7), ICDH-NADP citosólica de tabaco diluido 1/8000 (calle 8) y Prx de levadura diluido 1/200 (calle 9). **PM:** patrón de peso molecular.

4.4.2. EFECTO DE LA INOCULACIÓN POR *P. halstedii* SOBRE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Se ha estudiado mediante inmunoblot el contenido en proteína de las enzimas antioxidantes; Catalasa, Cu/Zn-superóxido dismutasa, enzimas del ciclo ascorbato-glutation, deshidrogenasas dependientes de NADP y peroxirredoxina, y mediante PCR a tiempo real la expresión de la manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD) en hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las variedades sensible (HA89) y resistente (X55) a la inoculación por *P. halstedii*, tanto en plántulas control como en plántulas inoculadas.

4.4.2.1. Superóxido dismutasa (SOD)

4.4.2.1.1. Manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD)

En hipocótilos de girasol se han identificado dos nuevos genes para dos superóxido dismutasas que contienen manganeso como metal prostético denominados *Mn-SOD1* y *Mn-SOD2*. Se diseñaron cebadores específicos para estas dos isoformas y se comprobaron mediante PCR a tiempo real que los cebadores son discriminantes (**Figura 43**). Tanto la *Mn-SOD1* como la *Mn-SOD2* se amplificaron únicamente con el oligonucleótido diseñado frente a cada una de ellas.

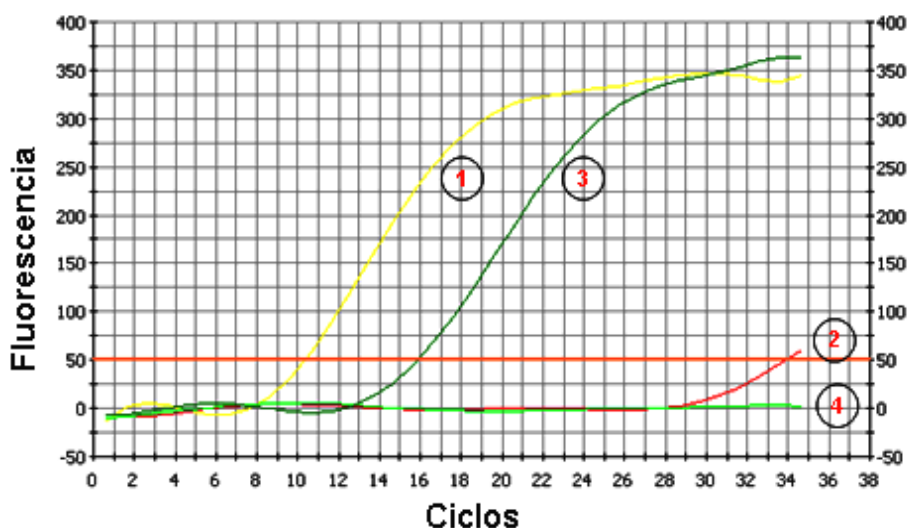


Figura 43. Análisis mediante PCR a tiempo real de la amplificación de la *Mn-SOD1* y *Mn-SOD2* con los oligonucleótidos discriminantes. **1.** Amplificación de cDNA de la *Mn-SOD1* con el oligonucleótido de la *Mn-SOD1*, **2.** Amplificación de cDNA de la *Mn-SOD1* con el oligonucleótido de la *Mn-SOD2*, **3.** Amplificación de cDNA de la *Mn-SOD2* con el oligonucleótido de la *Mn-SOD2* y **4.** Amplificación de cDNA de la *Mn-SOD2* con el oligonucleótido de la *Mn-SOD1*.

4.4.2.1.1.1. Características moleculares de la *Mn-SOD1* y *Mn-SOD2* de girasol

Se hizo un estudio a nivel molecular de las dos isoformas de la *Mn-SOD* determinando tanto las propiedades moleculares como los dominios de unión de la *Mn-SOD* (Tabla 14 y Figura 45). Además se realizó una comparación de la *Mn-SOD* de girasol con la *Mn-SOD* de otras especies de plantas (Figura 44).

La *Mn-SOD1* y la *Mn-SOD2* codifican para dos proteínas de 226 y 228 residuos de aminoácidos, respectivamente, y tienen una secuencia señal de partida de 14 residuos que indica que son dianas de la mitocondria con una probabilidad de 81% y 95%, respectivamente.

Tabla 14. Propiedades moleculares de la *Mn-SOD1* y *Mn-SOD2*

Propiedades	<i>Mn-SOD1</i>	<i>Mn-SOD2</i>
Tamaño de la subunidad (Da)	25288,76	25378,90
pI	7,17	7,10
Índice de estabilidad	30,75 (estable)	36,91 (estable)
ξ_{280} ($M^{-1} cm^{-1}$)	53400	54890
Secuencia señal	14 aa (N-terminal)	14 aa (N-terminal)

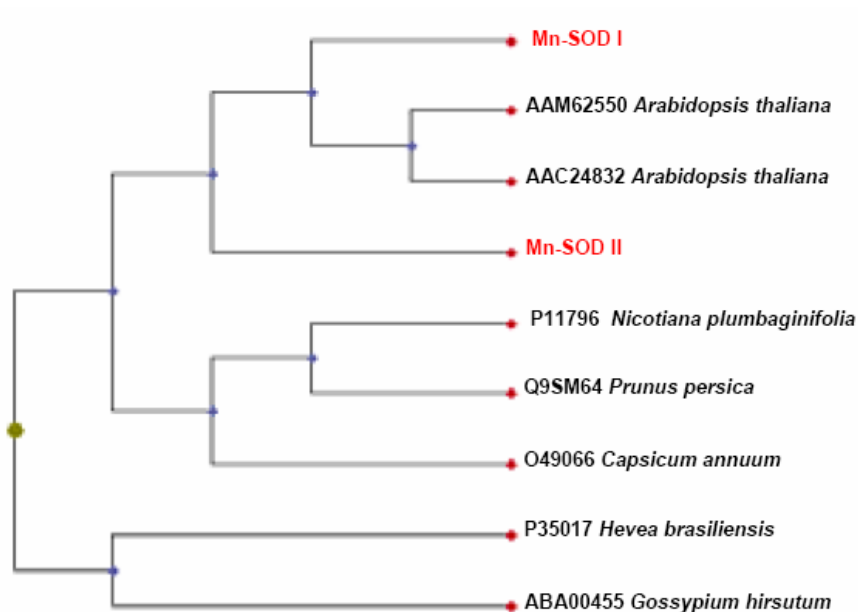
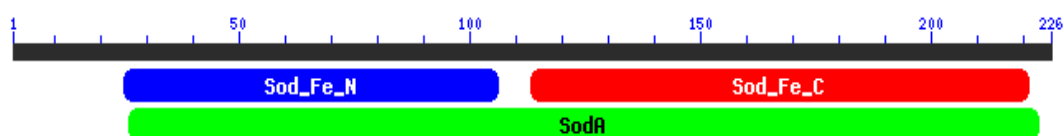


Figura 44. Cladograma de la Mn-SOD de varias plantas demostrando la relación evolutiva entre ellas.



Sod_Fe_C, hierro/manganeso superóxido dismutasa, dominio C-terminal

Sod_Fe_N, hierro/manganeso superóxido dismutasa, horquilla alfa

SodA, superóxido dismutasa (transporte de ion inorgánico y el metabolismo)

Figura 45. Dominios de unión de Mn-SODs

4.4.2.1.1.2. Secuencias de la Mn-SOD1 y Mn-SOD2 de girasol

A partir de las secuencias centrales de las dos isoformas de la Mn-SOD de girasol, que previamente habíamos obtenido, y usando los cebadores específicos diseñados para estas secuencias, se ha conseguido mediante la técnica de “RACE” amplificar los extremos 3’/ 5’ de la cadena y obtener el cDNA completo tanto de la *Mn-SOD1* (1095 pb) como de la *Mn-SOD2* (994 pb) (**Figura 46**).

```

MnSOD I  MALRALTNVKTILGRLLR--HQQIRGLQTFITLPDLSYDYGALPAISGEIMQLHHQKHHQTY 58
MnSOD II  MALRTLATRKTLGAFSTFPQQLRGLQTFITLPDLAYDYGALPAISGDIMQLHHQKHHQTY 60
          ****;*:; ****;      **:*****;*****;*****;*****

MnSOD I  ITNYNKALEQLDDAIAKGDASTAVKLQSAINFNGGGHVNHISIFWKNLAPTRGGGEPHPG 118
MnSOD II  ITNYNKALEQLDDAIAKGDASTAVKLQSAIKFNGGGHVNHISIFWKNLAPTRGGGEPHPG 120
          *****;*****;*****;*****;*****

MnSOD I  SLGWAIHQHFGSMKLVAKMNAEGAAVQGGSGVWLAVDKELKRLVVETTANQDPLVTKGA 178
MnSOD II  SLGWAIQSYGSEVKLIAKMNAEGAAVQGGSGVWLAVDKELKRLVVETTANQDPLVTKGP 180
          *****;*:;*:;*****;*****;*****;*****

MnSOD I  SLVPLVGIDVWEHAYYLQYKNVRPDYLNKNIWVINWKYASEVYEKECP 226
MnSOD II  SLVPLIGIDVWEHAYYLQYKNVRPDYLNKNIWVINWKYASEIYEKECP 228
          *****;*****;*****;*****;*****

```

Figura 46. Alineamiento entre las secuencias de la Mn-SOD1 y la Mn-SOD2 de girasol.

4.4.2.1.1.3. Efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre el contenido en RNA mensajero de la manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD)

Mediante PCR a tiempo real se cuantificaron los niveles de RNAm de las dos isoformas de la Mn-SOD en hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las dos variedades tanto en plántulas control como en plántulas inoculadas (**Figura 47**).

Tanto en la variedad sensible (HA89) como en la variedad resistente (X55) los niveles de RNAm de la Mn-SOD1 son más abundantes que los de la Mn-SOD2. Los niveles del transcrito de la Mn-SOD1 se incrementaron de forma significativa en la variedad sensible (HA89) y resistente (X55) inoculada por *P. halstedii*, en un 73% y 196%, respectivamente. Sin embargo, los niveles del transcrito de la Mn-SOD2 se detectaron sólo en la variedad resistente (X55) inoculada y con niveles muy bajos.

4.4.2.1.2. Efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre el contenido en Cu/Zn-superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD)

El análisis mediante western blot del efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre el contenido en proteína Cu/Zn-superóxido dismutasa en las dos variedades de girasol se muestra en la **figura 48**. En la variedad sensible (HA89), el contenido en proteína Cu/Zn-SOD se incrementó de forma significativa en plántulas inoculadas (45%). Por el contrario, en la variedad resistente (X55), no se encontraron diferencias significativas en el contenido de proteína entre las plántulas control e inoculadas.

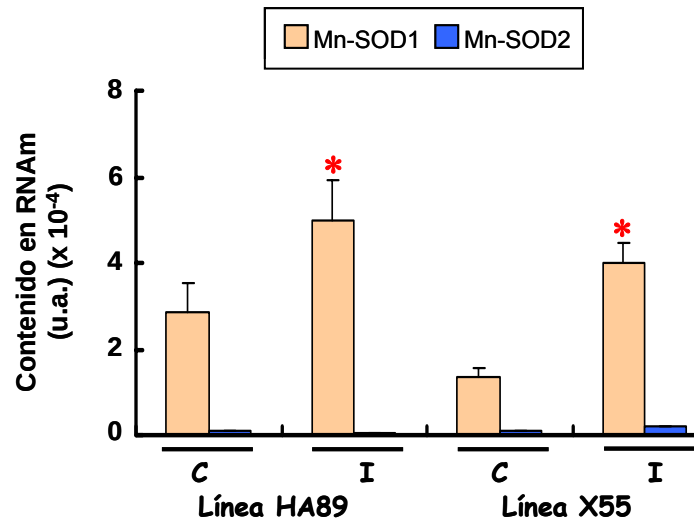


Figura 47. Efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre los niveles de RNAm de la *Mn-SOD1* y la *Mn-SOD2* en hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55, expresados en unidades arbitrarias (u.a.). Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. C: control, I: inoculada. (*): $p < 0,05$.

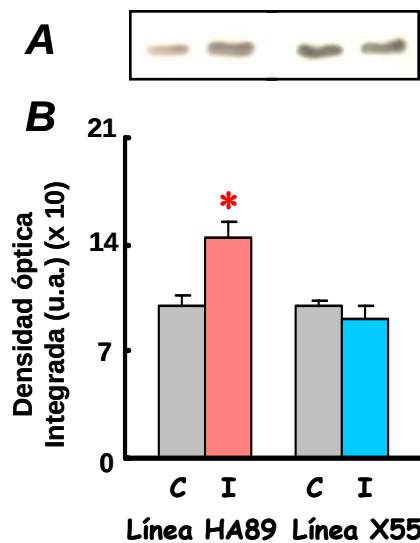


Figura 48. Efecto de la inoculación por el hongo biotrofo *P. halstedii* sobre el contenido en proteína Cu/Zn-SOD en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55. **Panel A:** muestras conteniendo 20 μ g de proteínas se sometieron a SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la Cu/Zn-SOD de espinaca diluido 1/3000. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. C: control, I: inoculada. (*): $p < 0,05$.

4.4.2.2. Efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre el contenido en catalasa

El análisis mediante western blot del efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre el contenido en proteína catalasa en las dos variedades de girasol se muestra en la **figura 49**. La inoculación por *P. halstedii* indujo un incremento significativo (52%) en los niveles de proteína en la variedad sensible (HA89). Sin embargo, en la variedad resistente (X55) no se observaron diferencias significativas entre las plántulas control e inoculadas.

4.4.2.3. Efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre las enzimas del ciclo ascorbato-glutation APX, MDAR y GR

El análisis mediante western blot del efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre el contenido en proteína de las enzimas del ciclo ascorbato-glutation en la línea HA89 sensible a la inoculación por *P. halstedii* se muestra en la **figura 50**. Los niveles de proteína ascorbato peroxidasa (APX) disminuyeron de forma significativa (45%) en plántulas inoculadas, no observándose diferencias para la glutatión reductasa (GR). Por otro lado, el contenido en proteína monodeshidroascorbato reductasa (MDAR) se incrementó de forma significativa (800%) en plántulas inoculadas.

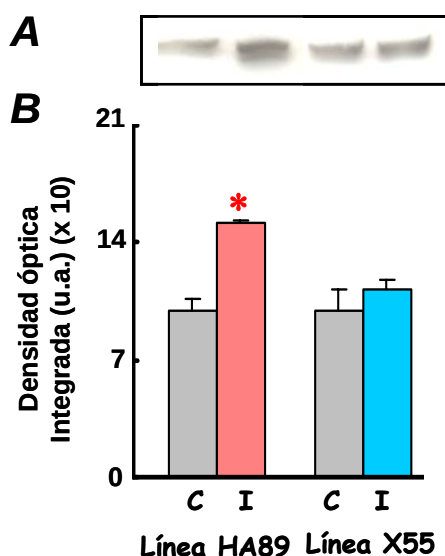


Figura 49. Efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre el contenido en proteína catalasa en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55. **Panel A:** muestras conteniendo 20 µg de proteínas se sometieron a SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la catalasa de calabaza diluido 1/500. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de ± EEM de al menos tres réplicas. C: control, I: inoculada. (*): $p < 0,05$.

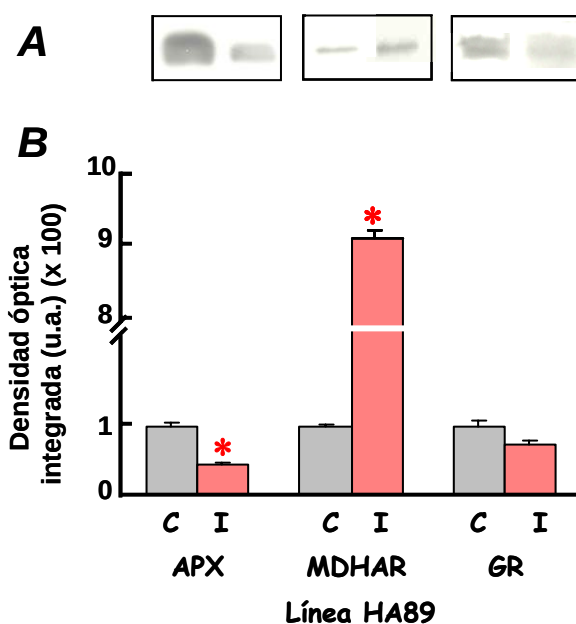


Figura 50. Efecto de la inoculación por el hongo *P. halstedii* sobre las enzimas del ciclo ascorbato-glutation en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la variedad sensible (HA89). **Panel A:** muestras de hipocótilo conteniendo 20 µg de proteínas se sometieron a SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con anticuerpos policlonales frente a la APX de pepino diluido 1/1000, la MDAR de pepino diluido 1/8000 y la GR de guisante diluido 1/500. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. C: control, I: inoculada. (*): $p < 0,05$.

El análisis mediante western blot del efecto de la inoculación por el hongo *P. halstedii* sobre el contenido en proteína de las enzimas del ciclo ascorbato-glutation en la línea X55 resistente a la inoculación por *P. halstedii* se muestra en la **figura 51**. Los niveles de proteína APX se incrementaron de un 23% en las plántulas inoculadas, no observándose diferencias para la GR, mientras que, los niveles de la proteína MDAR se redujeron en un 35% en las plántulas inoculadas.

4.4.2.4. Efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre las deshidrogenasas dependientes de NADP, G6PDH-NADP, EM-NADP e ICDH-NADP

El análisis mediante western blot del efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre el contenido en proteína de las deshidrogenasas dependientes de NADP en la línea HA89 sensible a la inoculación por *P. halstedii* se muestra en la **figura 52**. La inoculación con el hongo biotrofo *P. halstedii* incrementó de forma significativa (510%) los niveles de proteína EM-NADP, no observándose cambios en los niveles de G6PDH-NADP e ICDH-NADP.

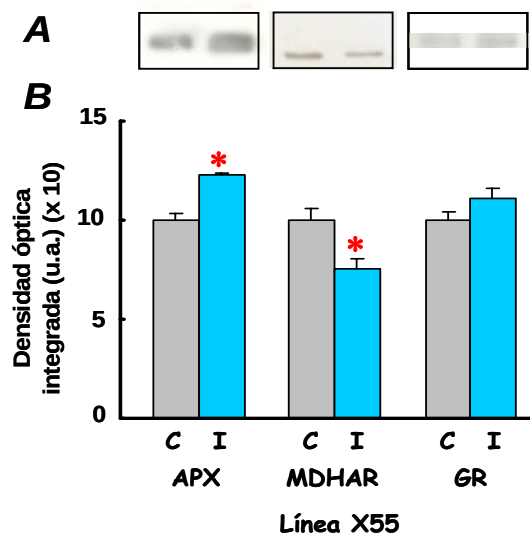


Figura 51. Efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre las enzimas del ciclo ascorbato-glutation en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la variedad resistente (X55). **Panel A:** muestras de hipocótilo conteniendo 20 μg de proteínas se sometieron a SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con anticuerpos policlonales frente a la APX de pepino diluido 1/1000, la MDAR de pepino diluido 1/8000 y la GR de guisante diluido 1/500. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. C: control, I: inoculada. (*): $p < 0,05$.

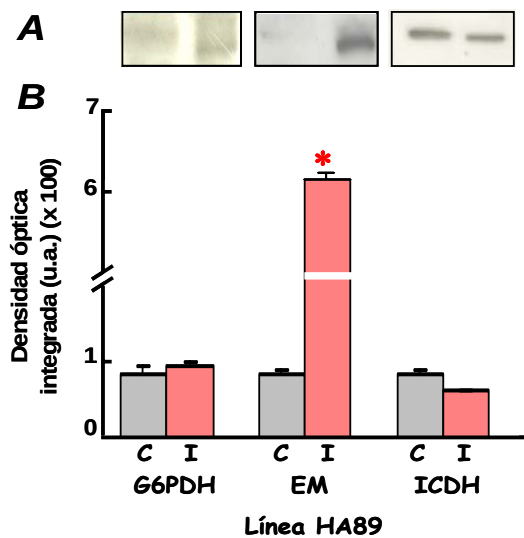


Figura 52. Efecto de la inoculación por el hongo *P. halstedii* sobre las deshidrogenasas dependientes de NADP en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la variedad sensible (HA89). **Panel A:** muestras de hipocótilo conteniendo 20 μg de proteínas se sometieron a SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con anticuerpos policlonales frente a la G6PDH de *Saccharomices cerevisiae* diluido 1/2500, la EM de hígado de rata diluido 1/1000 y la ICDH citosólica de tabaco diluido 1/8000. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. C: control, I: inoculada. (*): $p < 0,05$.

El análisis mediante inmunoblot del efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre el contenido en proteína de las deshidrogenasas dependientes de NADP en la línea X55 resistente a la inoculación por *P. halstedii* se muestra en la **figura 53**. Los niveles de proteína EM-NADP e ICDH-NADP se incrementaron de forma significativa en las plántulas inoculadas, siendo el incremento de un 101% y 46%, respectivamente. Mientras que, el contenido en proteína G6PDH-NADP se redujo en un 22%.

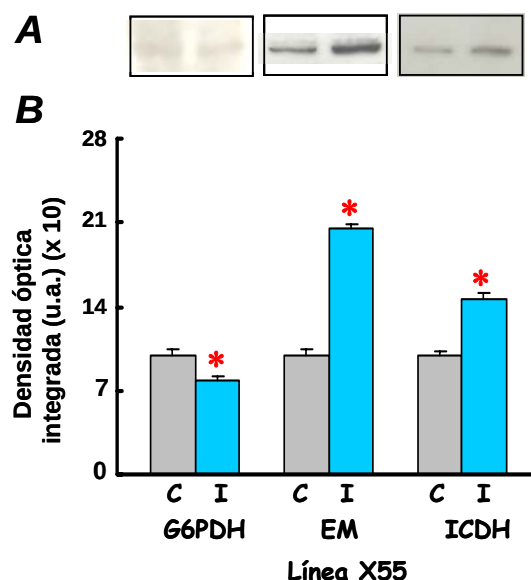


Figura 53. Efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre las deshidrogenasas dependientes de NADP en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la variedad resistente (X55). **Panel A:** muestras de hipocótilo conteniendo 20 μ g de proteínas se sometieron a SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con anticuerpos policlonales frente a la G6PDH de *Saccharomyces cerevisiae* diluido 1/2500, la EM de hígado de rata diluido 1/1000 y la ICDH citosólica de tabaco diluido 1/8000. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. C: control, I: inoculada. (*): $p < 0,05$.

4.4.2.5. Efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre el contenido en peroxirredoxina (Prx)

El análisis mediante inmunoblot del efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre el contenido en proteína peroxirredoxina en las dos variedades de girasol se muestra en la **figura 54**. La inoculación con *P. halstedii* indujo un incremento de un 113% en los niveles de proteína Prx en la variedad sensible (HA89), y una disminución en un 65% en la variedad resistente (X55).

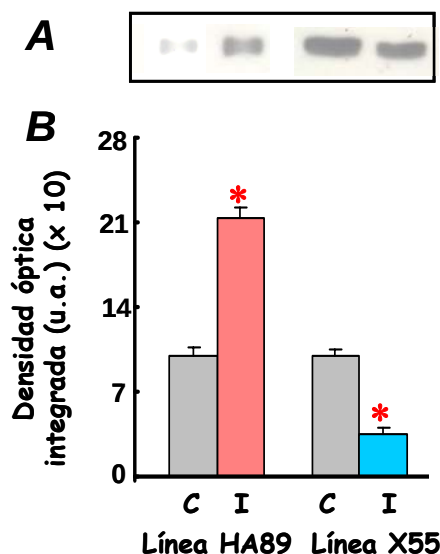


Figura 54. Efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre el contenido en proteína Prx en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55. **Panel A:** muestras conteniendo 20 μ g de proteínas se sometieron a SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la Prx de levadura diluido 1/200. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. C: control, I: inoculada. (*): $p < 0,05$.

4.5. EFECTO DE LA INOCULACIÓN POR *P. halstedii* SOBRE EL CONTENIDO EN PROTEÍNA LEUCINA AMINOPEPTIDASA (Leu-AP)

Debido a que las proteínas oxidadas pueden ser una diana para las proteasas, se ha analizado mediante western blot el efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre el contenido en proteína Leu-AP en plántulas de girasol (**figura 55**). La inoculación por el hongo biotrofo *P. halstedii* no produjo diferencias significativas en los niveles de proteína en las dos variedades de girasol.

4.6. EFECTO DE LA INOCULACIÓN POR *P. halstedii* SOBRE EL CONTENIDO EN PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Se determinó, mediante fluorimetría, el contenido en peróxido de hidrógeno en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol control e inoculadas por *P. halstedii* (**Tabla 15**). El hongo biotrofo *P. halstedii* indujo un incremento significativo en el contenido de H_2O_2 en la variedad sensible (HA89) y resistente (X55) a la inoculación, siendo este incremento de un 348% y 62%, respectivamente.

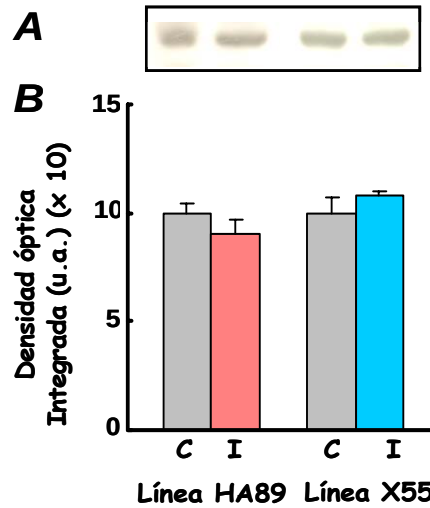


Figura 55. Efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre el contenido en proteína Leu-AP en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55. **Panel A:** muestras conteniendo 20 μ g de proteínas se sometieron a SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la Leu-AP diluido 1/2000. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. C: control, I: inoculada.

Tabla 15. Efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre el contenido en H_2O_2 en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a las variedades sensible (HA89) y resistente (X55). Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. (*): $p < 0,05$.

Estrés	Contenido en H_2O_2 (nmol/g hipocótilos)
Sensible control	15,83 $\pm$ 2,68
Sensible inoculada	70,93 $\pm$ 1,94 *
Resistente control	13,84 $\pm$ 1,72
Resistente inoculada	22,47 $\pm$ 0,15 *

4.7. EFECTO DE LA INOCULACIÓN POR *P. halstedii* SOBRE LA PRODUCCIÓN DEL ANIÓN SUPERÓXIDO Y DE ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVO

La detección del anión superóxido y de especies de oxígeno reactivo se llevó a cabo mediante microscopía láser confocal en cortes de hipocótilos de plántulas de girasol control e inoculadas por *P. halstedii*.

4.7.1. DETECCIÓN DEL ANIÓN SUPERÓXIDO

La detección del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) se muestra en la **figura 56**. En plántulas control pertenecientes a las líneas HA89 y X55 (Paneles A y C, respectivamente), el $O_2^{\cdot-}$ se localizaba fundamentalmente en haces vasculares. En la variedad sensible (HA89)

inoculada por *P. halstedii* (Panel B) se observó un extenso marcaje en epidermis, parénquima y haces vasculares. Mientras que, en la variedad resistente (X55) inoculada (Panel D), no se observó variaciones significativas en comparación con el control. En plántulas control pertenecientes a las líneas HA89 y X55 (Panel E y F, respectivamente) incubadas previamente con TMP (secuestrador del $O_2^{\cdot-}$) no se detectó ningún marcaje significativo.

4.7.2. DETECCIÓN DE ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVO

La localización de las especies de oxígeno reactivo (ROS) se muestra en la **figura 57**. En plántulas control pertenecientes a las líneas HA89 y X55 (Paneles A y C, respectivamente), las especies de oxígeno reactivo se localizaron principalmente en floema observándose, además, un ligero marcaje en xilema y epidermis. En la variedad sensible (HA89) inoculada por *P. halstedii* se observó un incremento en la intensidad de marcaje en haces vasculares apareciendo, además, en células parenquimáticas (Panel B), y en la variedad resistente (X55) inoculada por *P. halstedii* se observó un incremento en la intensidad del marcaje en epidermis y haces vasculares, y se detectó un ligero marcaje en cortex (Panel D). En plántulas control pertenecientes a las líneas HA89 y X55 incubadas previamente con L-ascorbato (secuestrador de ROS) no se detectó ningún marcaje significativo (Paneles E y F, respectivamente).

4.8. METABOLISMO DE LAS ESPECIES DE NITRÓGENO REACTIVO EN HIPOCÓTILOS DE GIRASOL

4.8.1. EFECTO DE LA INOCULACIÓN POR *P. halstedii* SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

4.8.1.1. Caracterización de la actividad NOS dependiente de L-arginina mediante quimioluminiscencia de ozono

La caracterización de la producción enzimática de NO a partir de L-arginina en extractos crudos de hipocótilos de girasol se determinó mediante quimioluminiscencia de ozono (**Figura 58**). La producción de NO es estrictamente dependiente de la concentración de L-arginina, calcio, BH_4 y calmodulina. La actividad NOS se redujo en un 86%, 83% y 93% en ausencia de NADPH, FAD y FMN, respectivamente. Cuando la muestra se incubó con inhibidores de la NOS animal como L-NMMA y aminoguanidina (AG), la actividad NOS disminuyó en un 97%.

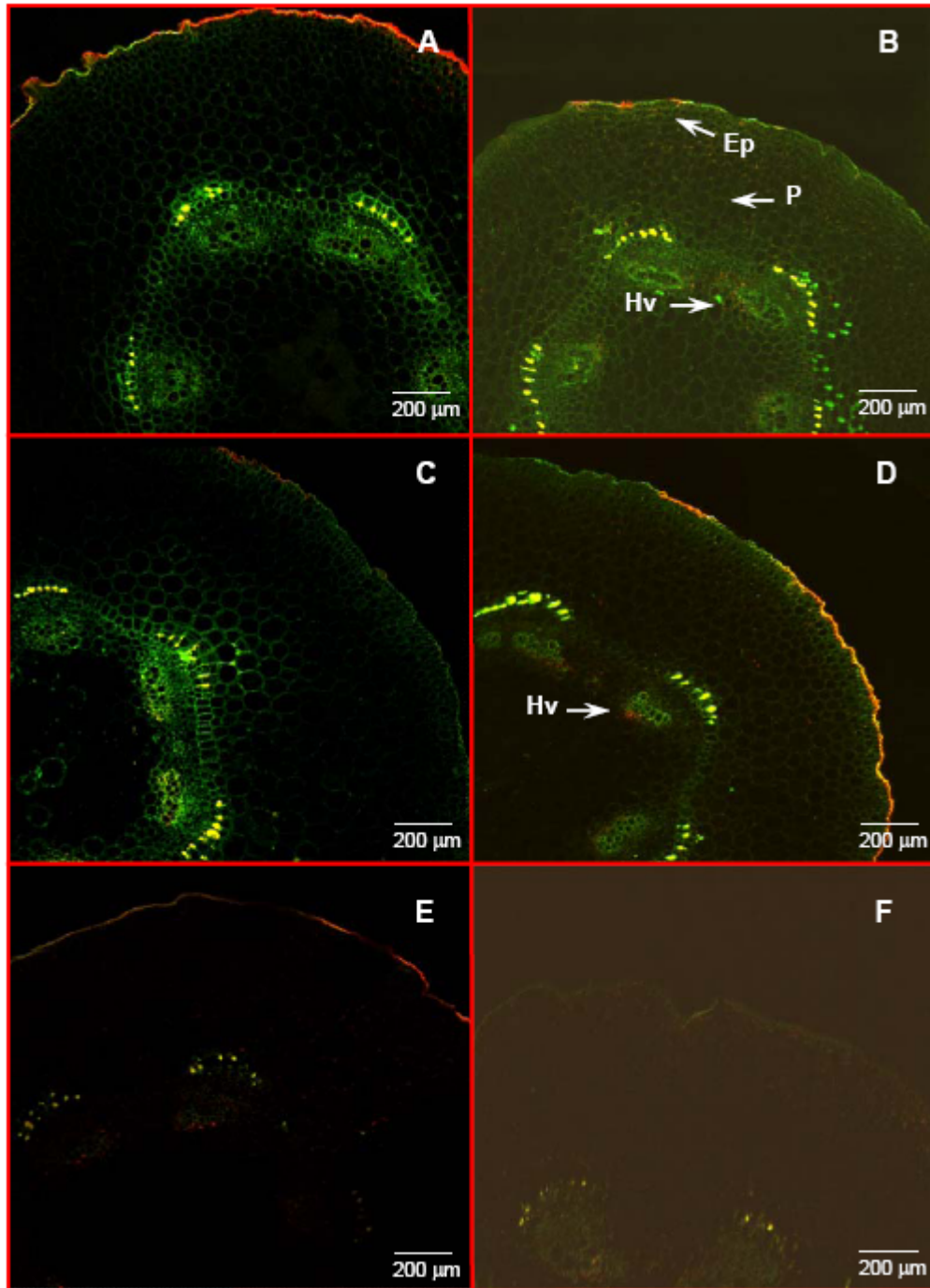


Figura 56. Detección del $O_2^{\cdot -}$ en cortes de hypocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55. En color rojo: autofluorescencia del tejido, en color verde: marcaje del fluoróforo. **Paneles A y B:** línea HA89, plántulas control y plántulas inoculadas por el hongo *P. halstedii*, respectivamente. **Paneles C y D:** línea X55, plántulas control y plántulas inoculadas por *P. halstedii*, respectivamente. **Paneles E y F:** plántulas control pertenecientes a las líneas HA89 y X55, respectivamente, incubadas previamente con TMP. **Ep:** epidermis, **P:** parénquima y **Hv:** haces vasculares.

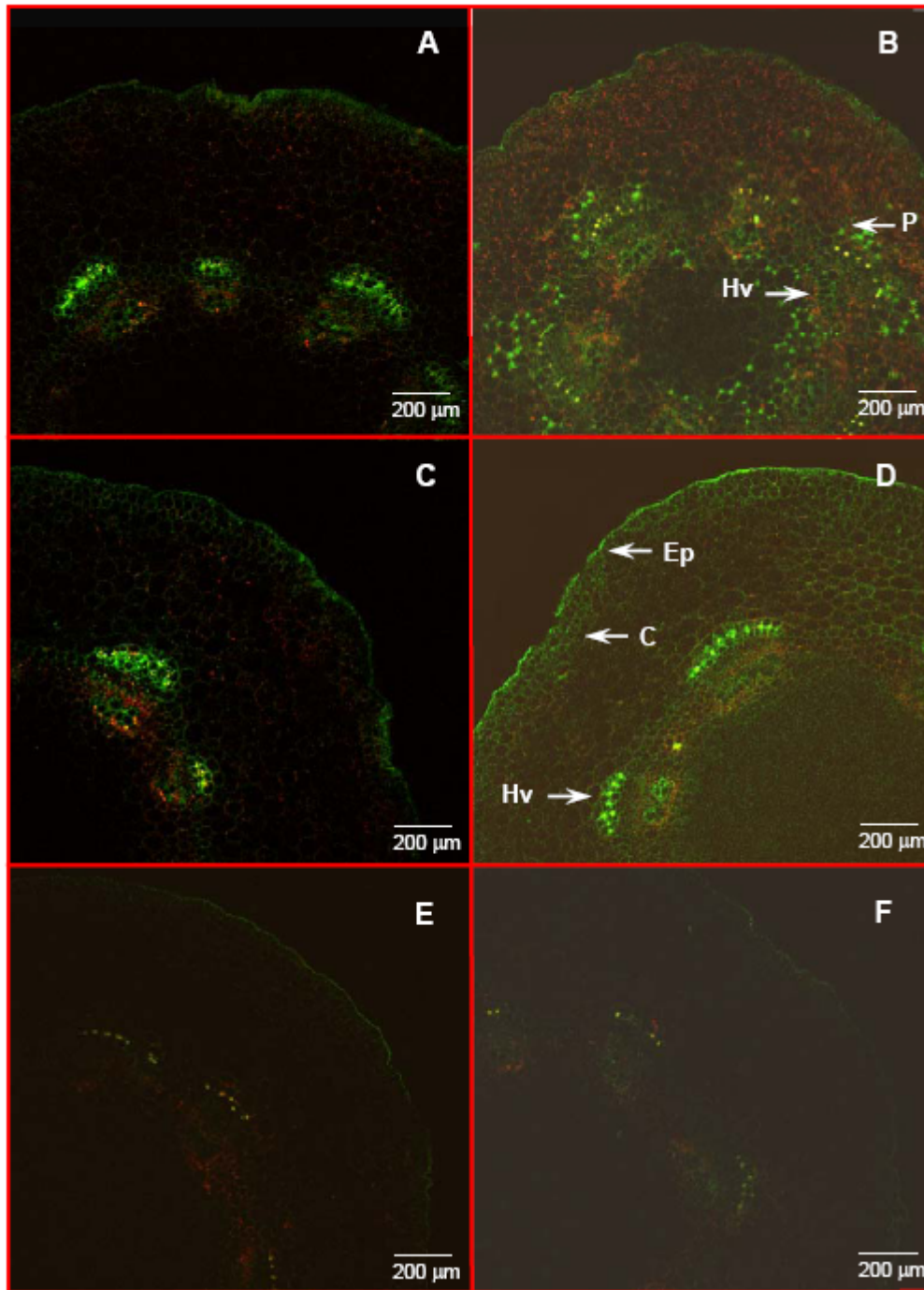


Figura 57. Detección de ROS en cortes de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55. En color rojo: autofluorescencia del tejido, en color verde: marcaje del fluoróforo. **Paneles A y B:** línea HA89, plántulas control y plántulas inoculadas por el hongo *P. halstedii*, respectivamente. **Paneles C y D:** línea X55, plántulas control y plántulas inoculadas por *P. halstedii*, respectivamente. **Paneles E y F:** plántulas control pertenecientes a las líneas HA89 y X55 incubadas previamente con L-ascorbato. **Ep:** epidermis, **C:** cortex, **P:** parénquima y **Hv:** haces vasculares.

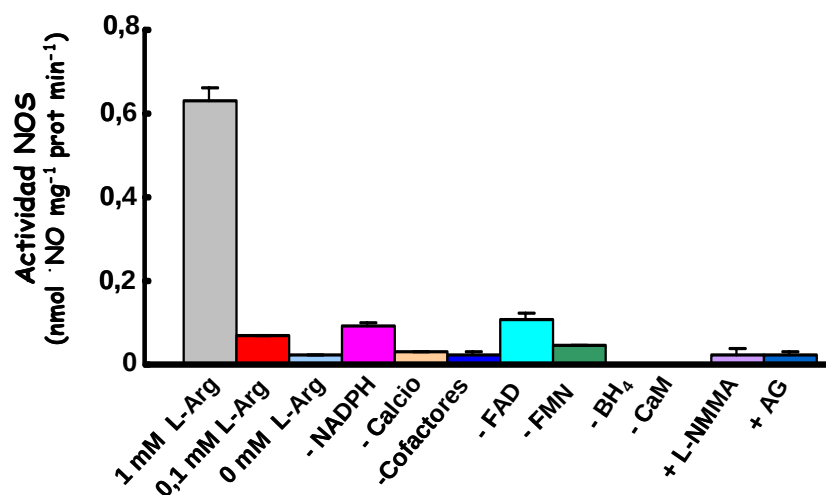


Figura 58. Caracterización de la actividad NOS dependiente de L-arginina en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea HA89 mediante quimioluminiscencia de ozono. La mezcla de reacción conteniendo extractos crudos de hipocótilos pertenecientes a la línea HA89 se incubó en ausencia o presencia de L-Arg 1 mM ó 0,1 mM, NADPH 1 mM, calcio 1,25 mM, FAD 1 μ M, FMN 1 μ M, BH₄ 1 μ M, calmodulina (CaM) 10 μ g/ml, L-NMMA 1 mM y aminoguanidina (AG) 5mM.

4.8.1.2. Detección de NO mediante quimioluminiscencia de ozono

La producción enzimática de NO a partir de L-arginina en hipocótilos de plántulas de girasol sensible (HA89) y resistente (X55) a la inoculación por *P. halstedii* se determinó mediante quimioluminiscencia de ozono (**Figura 59**). En la línea HA89, los niveles de NO se redujeron en un 29% en las plántulas inoculadas. Por el contrario, en la línea X55, la producción de óxido nítrico se incrementó en un 71% en las plántulas inoculadas.

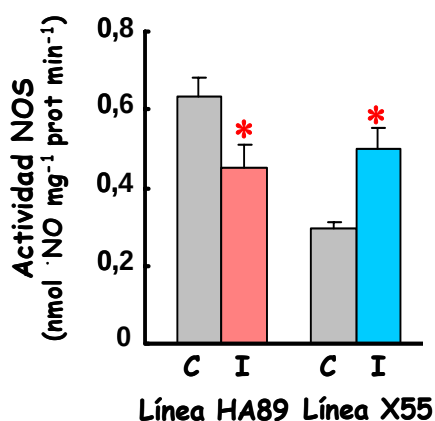


Figura 59. Efecto de la inoculación por el hongo biotrofo *P. halstedii* sobre la producción de óxido nítrico a partir de L-arginina en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las variedades sensible (HA89) y resistente (X55). Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. C: control, I: inoculada. (*): $p < 0,05$.

4.8.1.3. Detección de óxido nítrico mediante microscopía láser confocal

La detección de óxido nítrico mediante el uso del fluoróforo DAF-2DA se muestra en la **figura 60**. En hipocótilos de plántulas sensible (HA89) y resistente (X55) control e inoculadas, el óxido nítrico se detectó fundamentalmente en epidermis y haces vasculares, siendo más intenso en floema. Además, el marcaje era más intenso en la variedad sensible tanto en plantas control como en plántulas inoculadas por *P. halstedii* (Paneles A, B, C y D). En plántulas control pertenecientes a las líneas HA89 y X55 incubadas previamente con cPTIO, un agente secuestrador de NO, no se detectó ningún marcaje significativo (Paneles E y F, respectivamente).

4.8.2. EFECTO DE LA INOCULACIÓN POR *P. halstedii* SOBRE LA PRODUCCIÓN DE S-NITROSOTIOLES

4.8.2.1. Detección de S-nitrosotioles totales mediante quimioluminiscencia de ozono

La producción de S-nitrosotioles totales en extractos crudos de hipocótilos de girasol sometidos al estrés por *P. halstedii* se detectó mediante quimioluminiscencia de ozono (**Figura 61**). La inoculación por *P. halstedii* indujo un incremento significativo (249%) en la producción de S-nitrosotioles totales en la variedad sensible (HA89). Por el contrario, en la variedad resistente (X55) la producción de S-nitrosotioles totales se redujo con la inoculación por *P. halstedii* (41%). Siendo los niveles endógenos de RSNOs totales en plántulas control de la variedad resistente (X55) dos veces superiores a los de la variedad sensible (HA89).

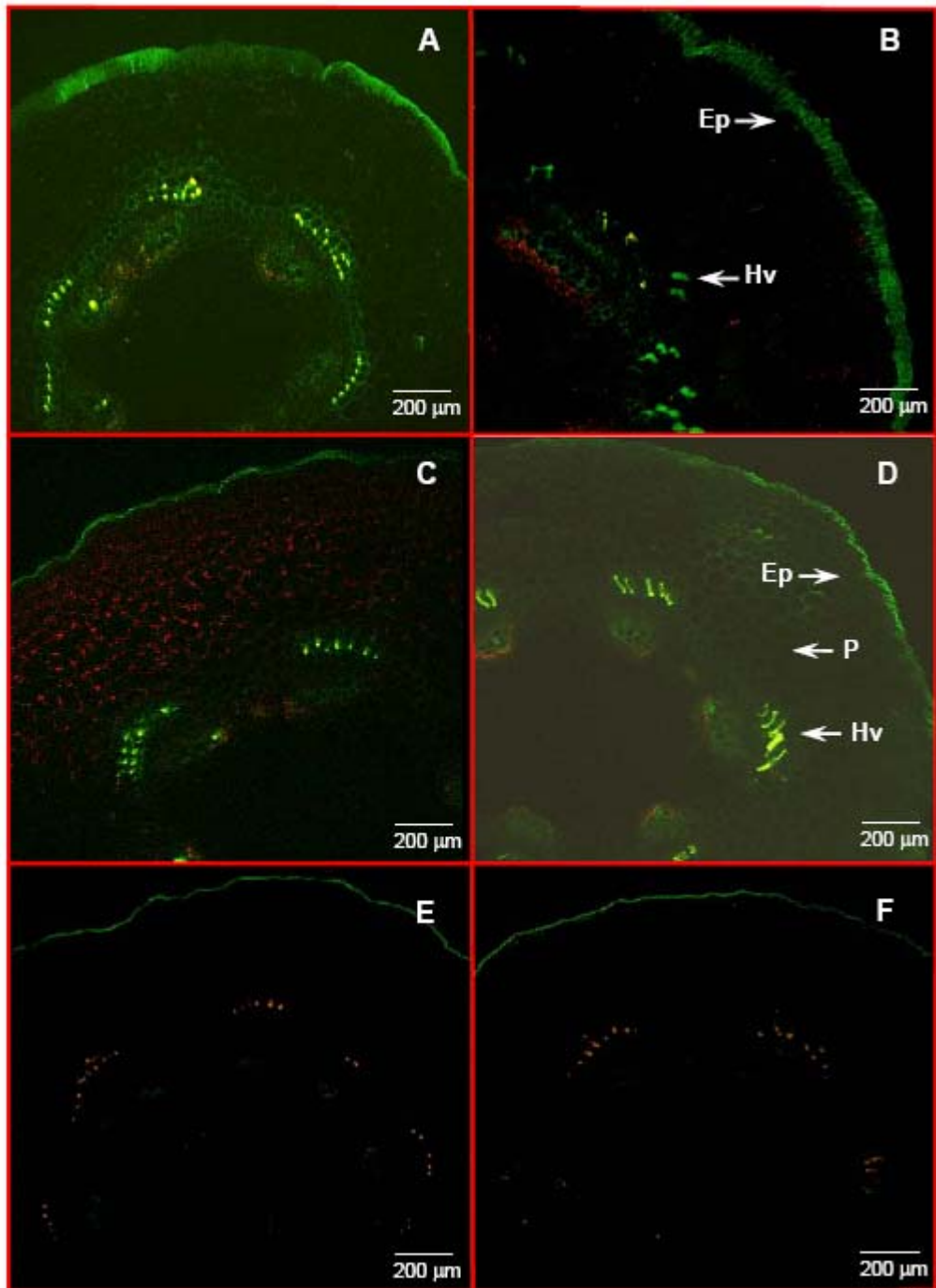


Figura 60. Detección de NO en secciones de hypocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55. En color rojo: autofluorescencia del tejido, en color verde: marcaje del fluoróforo. **Paneles A y B:** línea HA89, expresión del fluoróforo en hypocótilos de plántulas control e inoculadas por el hongo *P. halstedii*, respectivamente. **Paneles C y D:** línea X55, expresión del fluoróforo en hypocótilos de plántulas control e inoculadas por *P. halstedii*, respectivamente. **Paneles E y F:** expresión del fluoróforo en hypocótilos de plántulas control pertenecientes a las líneas HA89 y X55, respectivamente, incubadas previamente con cPTIO. **Ep:** epidermis **P:** parénquima y **Hv:** haces vasculares.

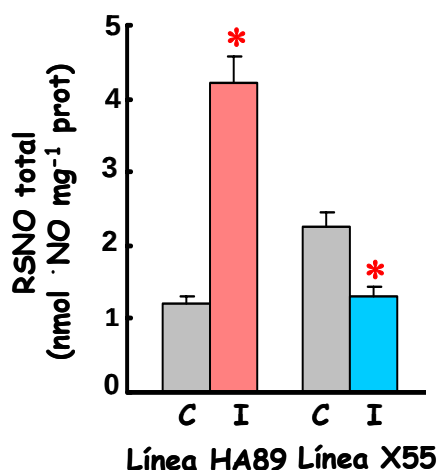


Figura 61. Efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre la producción de S-nitrosotioles totales en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. C: control, I: inoculada. (*): $p < 0,05$.

4.8.2.2. Detección de S-nitrosotioles totales mediante microscopía láser confocal

La determinación de S-nitrosotioles totales mediante el uso del fluoróforo Alexa fluor 488 Hg-link se muestra en la **figura 62**. En plántulas control pertenecientes a la variedad sensible (HA89) (Panel A) los S-nitrosotioles se detectaron de forma ligera en haces vasculares, y en la variedad resistente (X55) (Panel C) el marcaje se localizó fundamentalmente en epidermis, parénquima y haces vasculares. En la variedad sensible (HA89) inoculada por *P. halstedii* (Panel B) se observó una extensión del marcaje en epidermis, células parenquimáticas y haces vasculares. Por el contrario, en plántulas resistentes (X55) inoculadas conpor *P. halstedii* (Panel D) el marcaje se redujo de forma significativa fundamentalmente en células parenquimáticas.

En plántulas control pertenecientes a las líneas HA89 y X55 sin incubación con N-etilmaleimida y Alexa fluor 488 Hg-link no se detectó ningún marcaje significativo, resultados similares se obtuvieron cuando la muestra se incubó sin Alexa fluor 488 Hg-link o sin N-etilmaleimida (Resultados no mostrados).

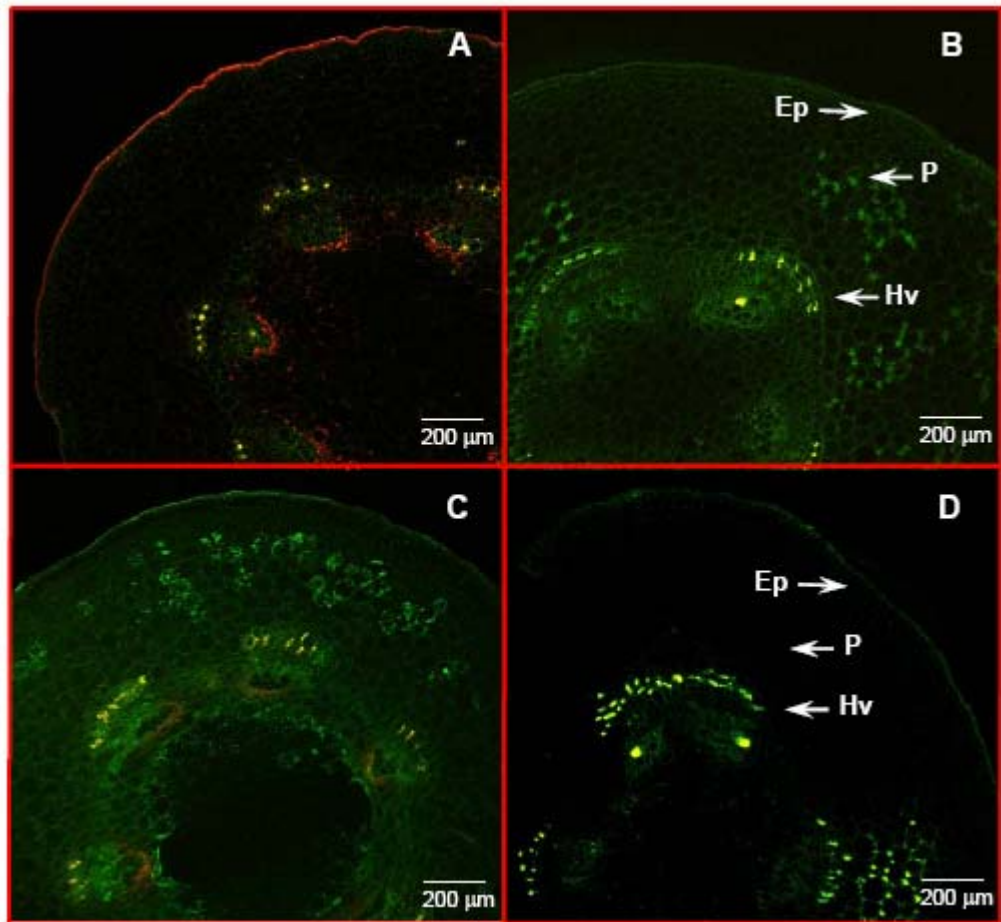


Figura 62. Detección de RSNOs totales en cortes de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55. En color rojo: autofluorescencia del tejido, en color verde: marcaje del fluoróforo. **Paneles A y B:** línea HA89, expresión del fluoróforo en hipocótilos de plántulas control e inoculadas por el hongo *P. halstedii*, respectivamente. **Paneles C y D:** línea X55, expresión del fluoróforo en hipocótilos de plántulas control e inoculadas por *P. halstedii*, respectivamente. **Ep:** epidermis, **P:** parénquima y **Hv:** haces vasculares.

4.8.3. DETECCIÓN DE S-NITROSOGLUTATION EN DIFERENTES SECCIONES DE HIPOCÓTILOS MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La inmunofluorescencia debida a GSNO en diferentes secciones de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la variedad sensible (HA89) inoculada por *P. halstedii* se muestra en las **figuras 63 y 64**. En la sección baja del hipocótilo (Panel D) se observó un inmunomarcaje extensivo en epidermis, cortex y células parenquimáticas, mientras que, en

la sección media del hipocótilo (Panel E) la intensidad del inmunomarcaje se redujo en las células parenquimáticas y se hizo más intensa en epidermis y cortex, sin embargo, en la sección alta del hipocótilo el inmunomarcaje frente a GSNO desaparecía (Panel F). No se observó ningún tipo de interferencia entre el inmunomarcaje debido a GSNO y la autofluorescencia debida al hongo o al tejido en las secciones baja, media y alta del hipocótilo (Paneles A, B y C, respectivamente).



Figura 63. Secciones de los hipocótilos de plántulas de girasol.

En la **figura 65** se muestra la inmunofluorescencia debida a GSNO en hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la variedad sensible (HA89). En plántulas control (Panel C) el GSNO se inmunolocalizaba fundamentalmente en epidermis y cortex, no observándose interferencia en el inmunomarcaje debido a GSNO y la autofluorescencia del tejido (Panel A). Sin embargo, en plántulas inoculadas por *P. halstedii* (Panel D) se observó un incremento significativo del inmunomarcaje en epidermis y cortex, además, se aprecia en células parenquimáticas, no observándose ningún tipo de interferencia entre el inmunomarcaje debido a GSNO y la autofluorescencia debida al hongo o al tejido (Panel B).

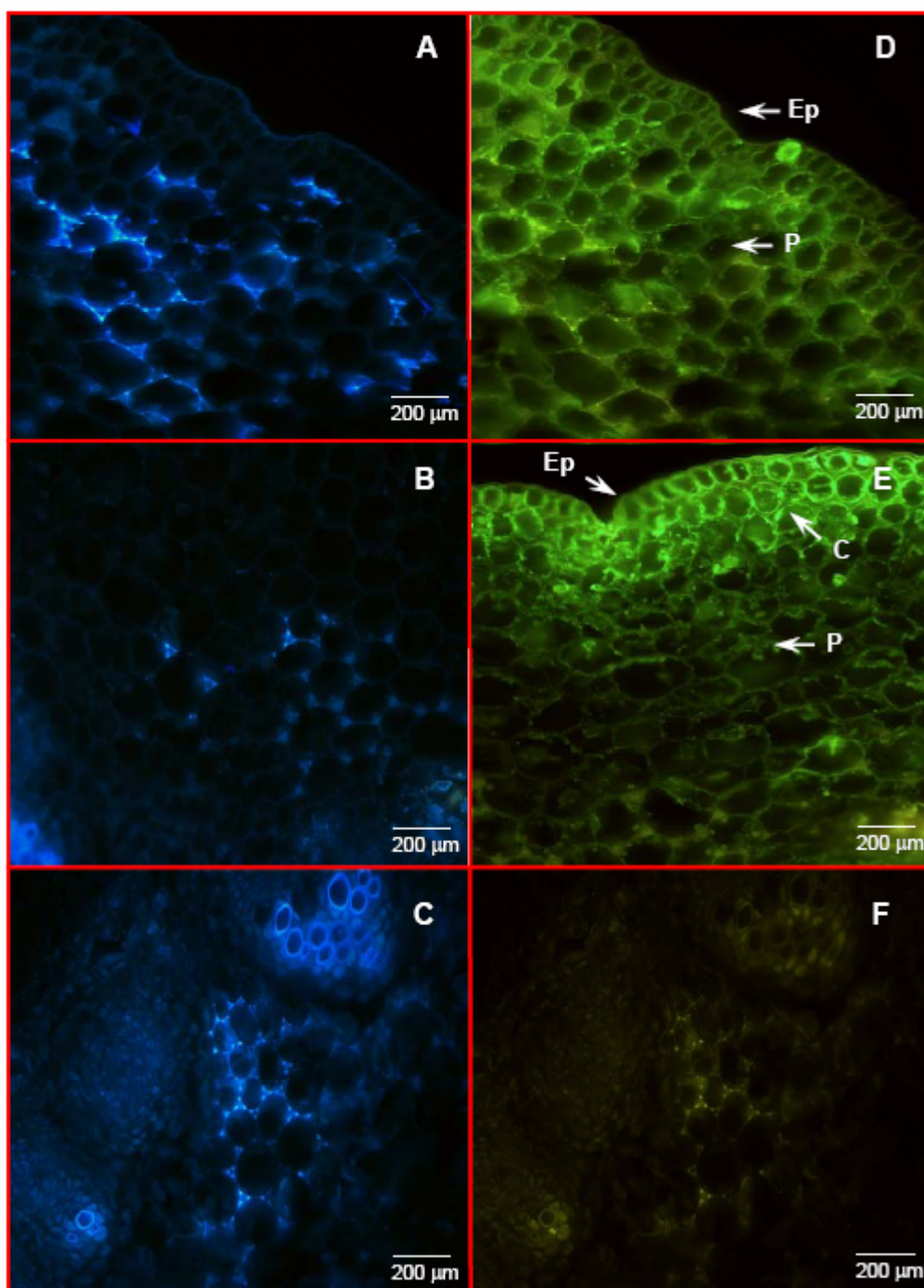


Figura 64. Inmunofluorescencia de GSNO en tres secciones de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la variedad sensible (HA89) inoculada por *P. halstedii*. **Paneles A, B y C:** plántulas inoculadas, autofluorescencia del tejido y/o del hongo en las secciones baja, media y alta de los hipocótilos, respectivamente, **Paneles D, E y F:** plántulas inoculadas, inmunorreactividad frente a GSNO en las secciones baja, media y alta de los hipocótilos, respectivamente. **Ep:** epidermis, **C:** cortex y **P:** parénquima.

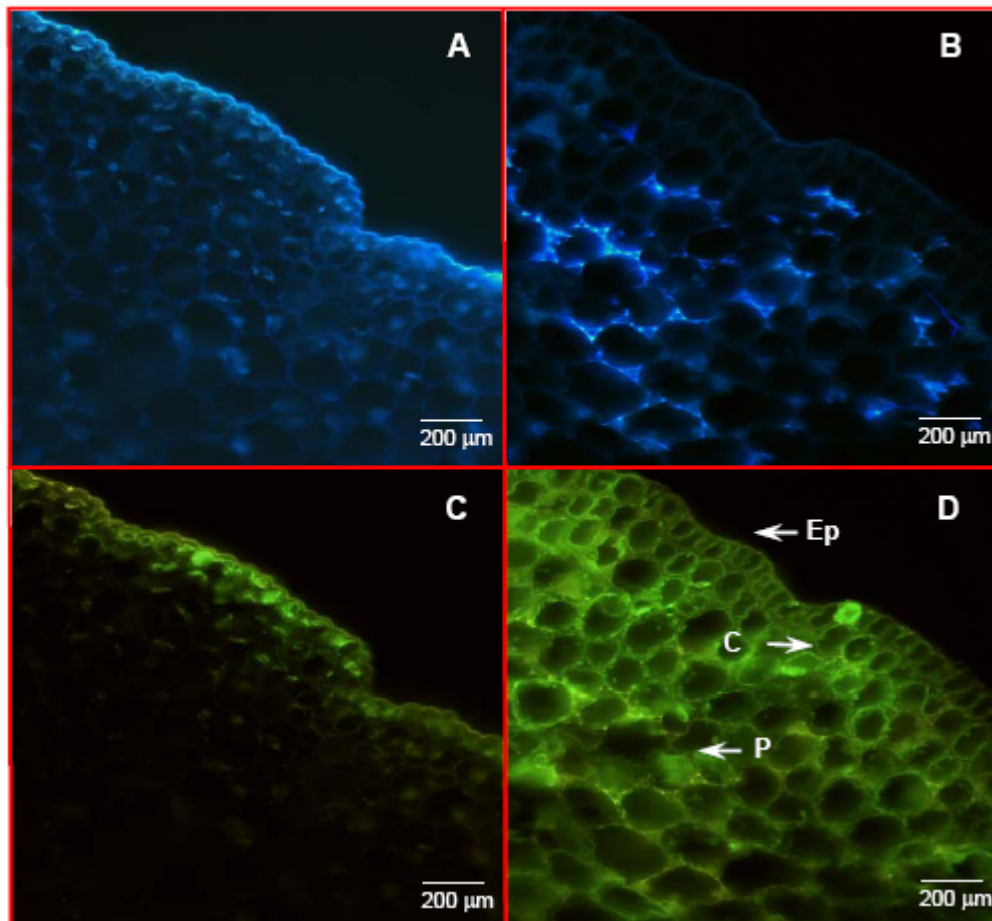


Figura 65. Inmunofluorescencia de GSNO en hipocótilos de girasol pertenecientes a la variedad sensible (HA89). **Paneles A y C:** plántulas control, autofluorescencia del tejido e inmunorreactividad frente a GSNO, respectivamente, **Paneles B y D:** plántulas inoculadas, autofluorescencia del tejido y/o del hongo e inmunorreactividad frente a GSNO, respectivamente. **Ep:** epidermis, **C:** cortex y **P:** parénquima.

La inmunofluorescencia de S-nitrosoglutation en la variedad resistente (X55) se muestra en la **figura 66**. El GSNO se inmunolocalizaba fundamentalmente en epidermis, cortex y parénquima de plántulas control (Panel C), no observándose interferencia entre el inmunomarcaje debido a GSNO y la autofluorescencia debida al tejido (Panel A). Sin embargo, en la variedad resistente (X55) inoculada (Panel D) se observó un incremento significativo en la intensidad del inmunomarcaje en epidermis y cortex, sin embargo, en las células parenquimáticas el inmunomarcaje desaparecía, no observándose ningún tipo de interferencia entre el inmunomarcaje debido a GSNO y la autofluorescencia debida al hongo o al tejido (Panel B). En plántulas control pertenecientes a las líneas HA89 y X55 sin incubación con el anticuerpo frente a GSNO no se detectó ningún marcaje significativo (Paneles E y F).

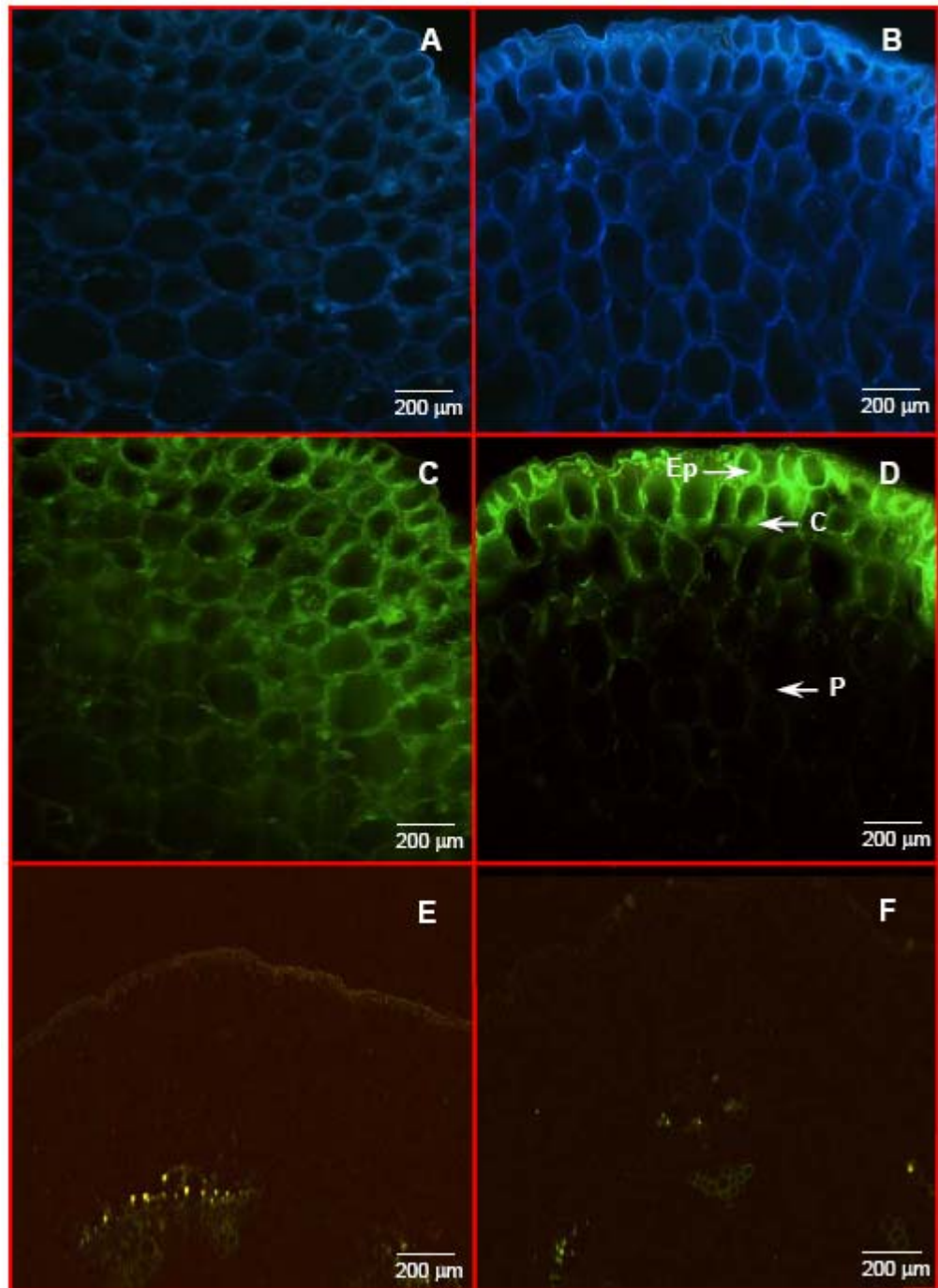


Figura 66. Inmunofluorescencia de GSNO en hipocótilos de girasol pertenecientes a la variedad resistente (X55). **Paneles A y C:** plántulas control, autofluorescencia del tejido e inmunorreactividad frente a GSNO, respectivamente, **Paneles B y D:** plántulas inoculadas, autofluorescencia del tejido y/o del hongo e inmunorreactividad frente a GSNO, respectivamente. **Paneles E y F:** plántulas control pertenecientes a las líneas HA89 y X55, respectivamente, sin incubación con el anticuerpo frente a GSNO. **Ep:** epidermis, **C:** cortex y **P:** parénquima.

4.8.4. EFECTO DE LA INOCULACIÓN POR *P. halstedii* SOBRE LA S-NITROSOGLUTATION REDUCTASA (GSNOR)

4.8.4.1. Efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre el contenido en RNA mensajero de la *GSNOR*

Mediante PCR a tiempo real se cuantificaron los niveles de RNA mensajero de la *GSNOR* en hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las variedades sensible (HA89) y resistente (X55) control e inoculadas por *P. halstedii* (**Figura 67**). Los niveles del transcrito de la *GSNOR* se incrementaron 5 veces en la variedad sensible (HA89) inoculada y 180 veces en la variedad resistente (X55) inoculada por *P. halstedii*.

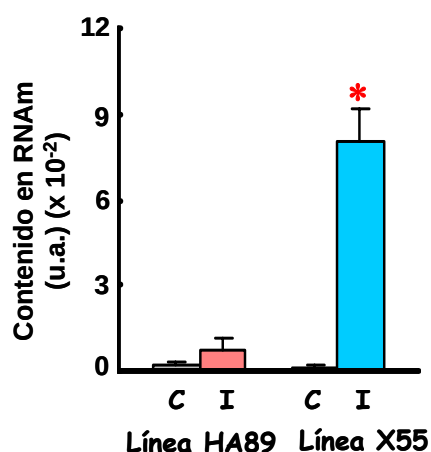


Figura 67. Efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre el contenido en RNAm de la *GSNOR* en hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55, expresado en unidades arbitrarias (u.a.). Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. C: control, I: inoculada. (*): $p < 0,05$.

4.8.4.2. Efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre la actividad S-nitrosoglutation reductasa

4.8.4.2.1. Determinación de la actividad *GSNOR* por espectrofotometría

La determinación de la actividad *GSNOR* en homogeneizados de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55 se realizó mediante la monitorización de la oxidación del NADH a 340 nm (**Figura 68**). La inoculación por *P. halstedii* produjo un incremento significativo (46% y 118%) en la actividad *GSNOR* en plántulas de girasol pertenecientes a las variedades sensible (HA89) y resistente (X55), respectivamente.

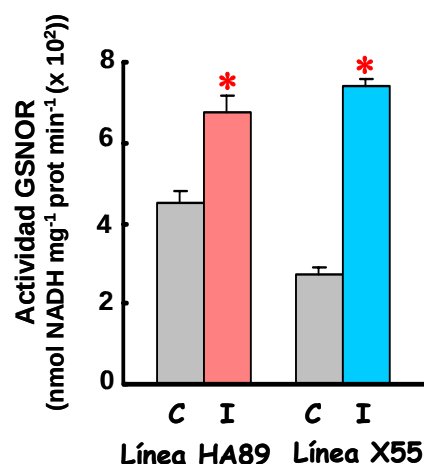


Figura 68. Efecto de la inoculación por el hongo biotrofo *P. halstedii* sobre la actividad GSNOR determinada mediante espectrofotometría en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. C: control, I: inoculada. (*): $p < 0,05$.

4.8.4.2.2. Determinación de la actividad GSNOR en geles de poliacrilamida

El análisis de la actividad GSNOR en extractos crudos de hipocótilos de girasol tras la separación de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones nativas se muestra en la **figura 69**. La actividad GSNOR incrementó en un 20% en la variedad sensible (HA89) inoculada por *P. halstedii*, y en un 149% en la variedad resistente inoculada (X55).

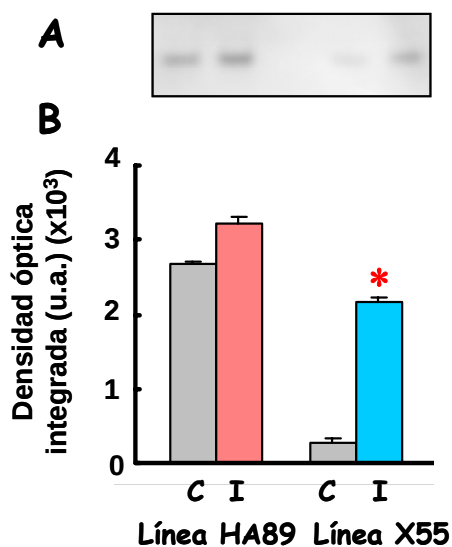


Figura 69. Efecto de la inoculación por *P. halstedii* sobre la actividad GSNOR en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55. **Panel A:** muestras de hipocótilos conteniendo 10 μ g de proteínas se sometieron a electroforesis nativa, el gel se incubó con NADH y con GSNO, posteriormente se reveló con luz ultravioleta. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A mediante el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.). Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. C: control, I: inoculada. (*): $p < 0,05$.

4.8.4.3. Inmunolocalización de la GSNOR mediante microscopía láser confocal

La inmunolocalización de la GSNOR se muestra en la **figura 70**. En plántulas control pertenecientes a las líneas HA89 y X55 (Paneles A y C, respectivamente), la GSNOR se inmunolocalizaba en haces vasculares, detectándose, también, un ligero marcaje en parénquima. En la variedad sensible (HA89) inoculada por *P. halstedii* no se observaron diferencias significativas con respecto a las plántulas control (Panel B). Por el contrario, en la variedad resistente (X55) inoculada por *P. halstedii*, el inmunomarcaje se hizo más intenso en epidermis, parénquima y haces vasculares (Panel D). En plántulas control pertenecientes a las líneas HA89 y X55 sin incubación con el anticuerpo frente a la GSNOR no se detectó ningún marcaje significativo (**Figura 71**, Paneles A y B, respectivamente).

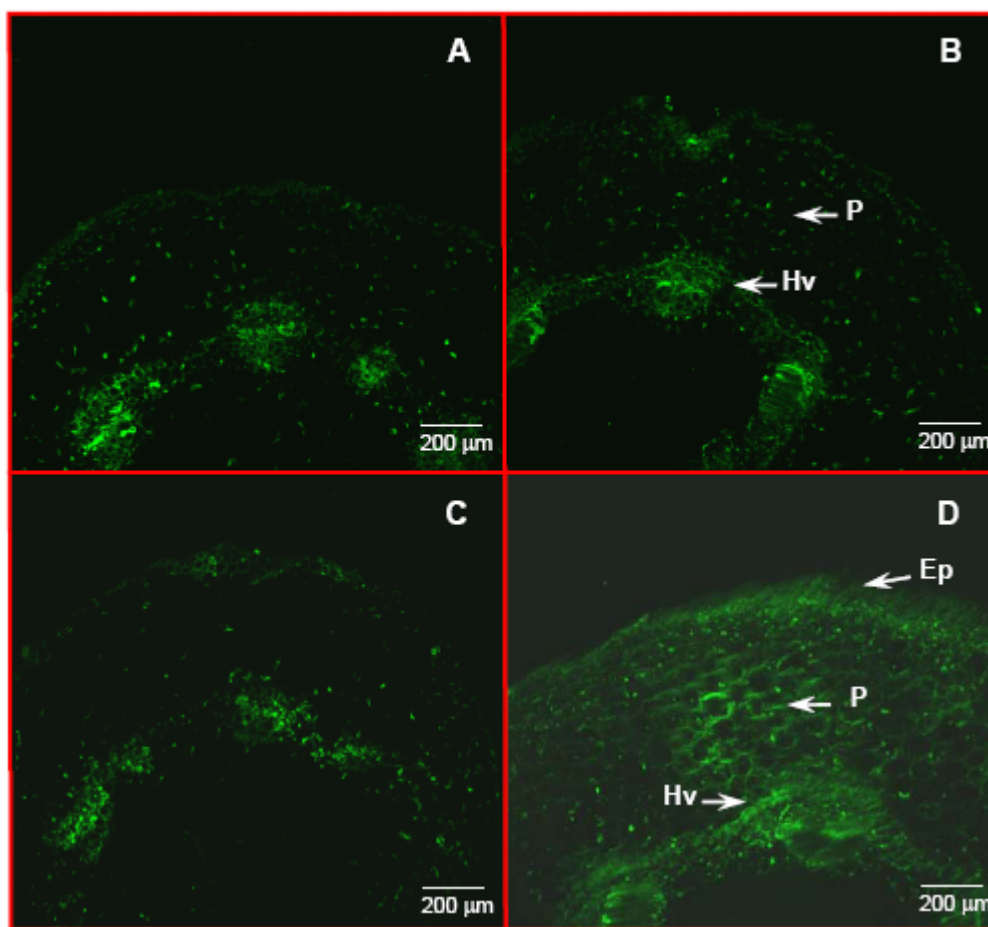


Figura 70. Inmunolocalización de la GSNOR en secciones de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55. En color verde: inmunomarcaje del fluoróforo: **Paneles A y B:** línea HA89, plántulas control y plántulas inoculadas por el hongo *P. halstedii*, respectivamente. **Paneles C y D:** línea X55, plántulas control y plántulas inoculadas por *P. halstedii*, respectivamente. **Ep:** epidermis, **P:** parénquima y **Hv:** haces vasculares.

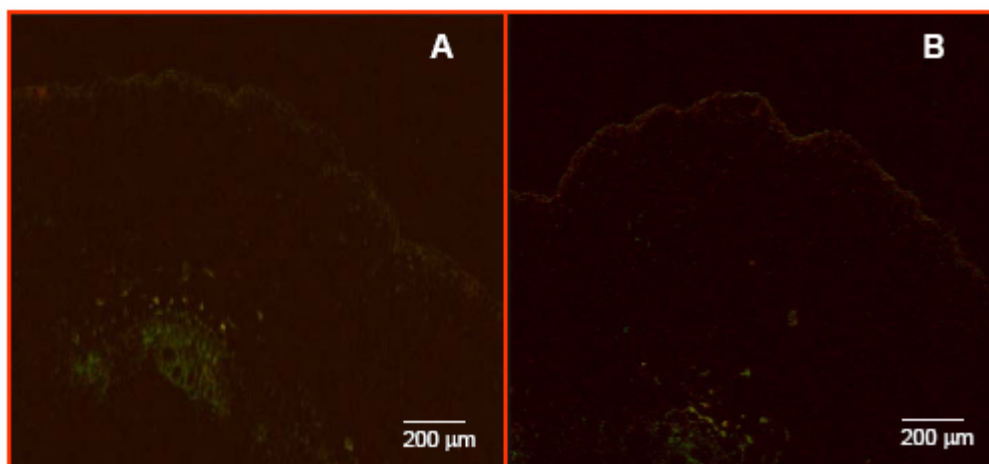


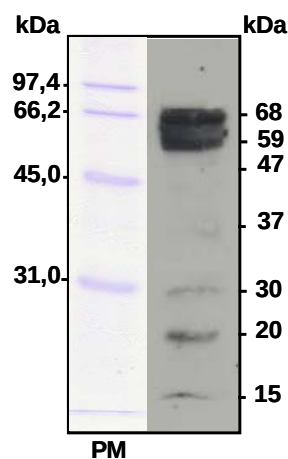
Figura 71. Inmunolocalización de la GSNOR en secciones de hipocótilos de plántulas de girasol. **Paneles A y B:** plántulas control pertenecientes a las líneas HA89 y X55, respectivamente, sin incubación con el anticuerpo frente a la GSNOR.

4.8.5. NITRACIÓN DE PROTEÍNAS EN HIPOCÓTILOS DE GIRASOL

4.8.5.1. El patrón de nitración de proteínas

Mediante western blot se ha estudiado el patrón de nitración de proteínas en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la variedad resistente (X55) sin tratamiento, observándose siete bandas inmunorreactivas con un tamaño molecular aparente comprendido entre 15 y 68 kDa (**Figura 72**).

Figura 72. Patrón de nitración de proteínas en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea X55 sin tratamiento. Se cargaron 20 μ g de proteínas, se sometieron a SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la 3-nitrotirosina de levadura diluido 1/5000. A la derecha se indica el tamaño molecular aparente de las proteínas inmunorreactivas y a la izquierda se sitúan los marcadores de peso molecular.



4.8.5.2. Análisis de la nitración de proteínas mediante electroforesis bidimensional

Mediante electroforesis bidimensional, se ha estudiado el patrón de proteínas nitradas en hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea X55 usando un anticuerpo frente a 3-nitrotirosina. Se detectaron nueve proteínas nitradas, la mayoría de ellas entre 29 y 63 kDa, y una proteína de aproximadamente 18 kDa. Estas proteínas fueron identificadas mediante huella peptídica (Malditof) (**Figuras 73, 74 y 75, Tabla 16**).

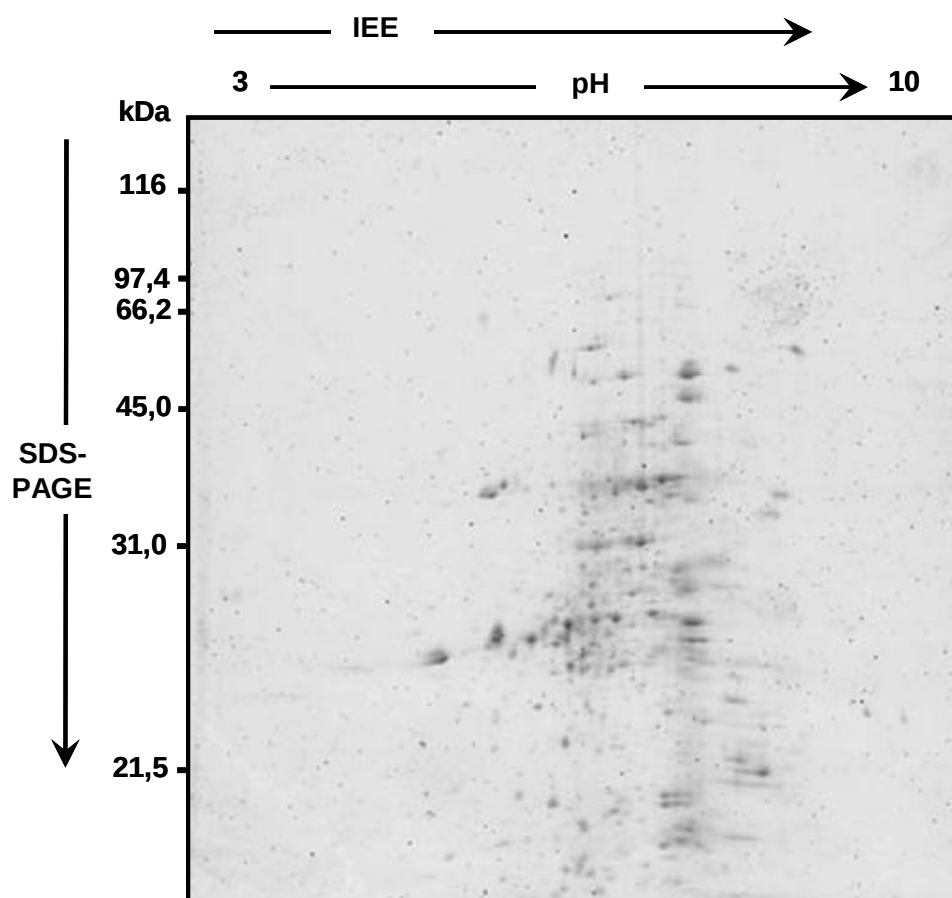


Figura 73. Gel correspondiente a la línea X55 sin tratamiento. 100 µg de proteínas se sometieron a electroforesis bidimensional, posteriormente, el gel se tiñó con la tinción fluorescente Sypro Ruby (Bio-Rad).

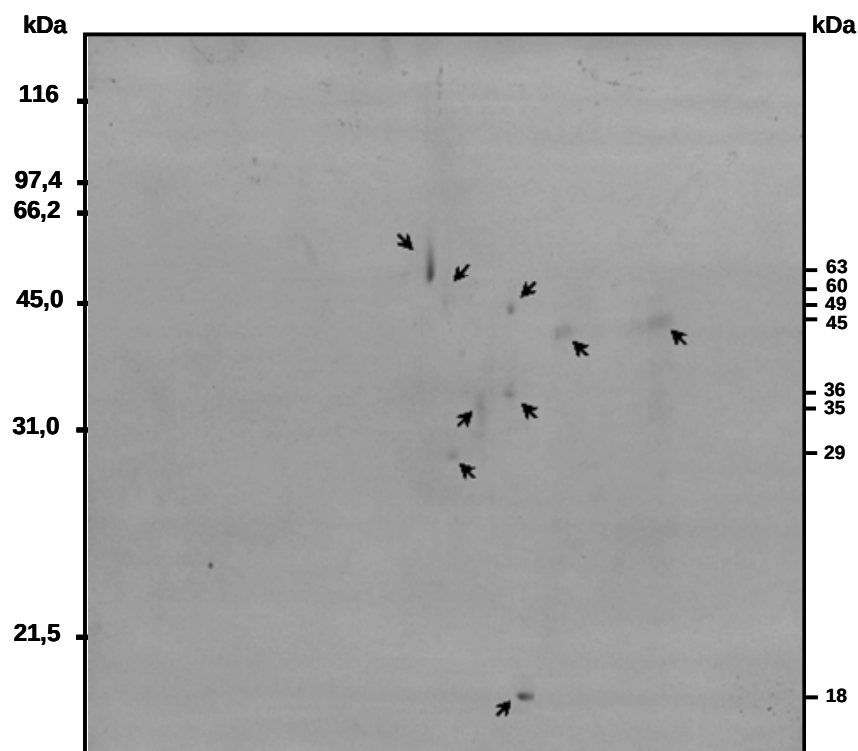


Figura 74. Inmunoblot correspondiente a la línea X55 sin tratamiento. 100 μ g de proteínas se sometieron a electroforesis bidimensional, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a n-Tyr diluido 1/10000. A la izquierda se sitúan los marcadores de peso molecular y a la derecha el tamaño molécula aparente de las proteínas inmunorreactivas.

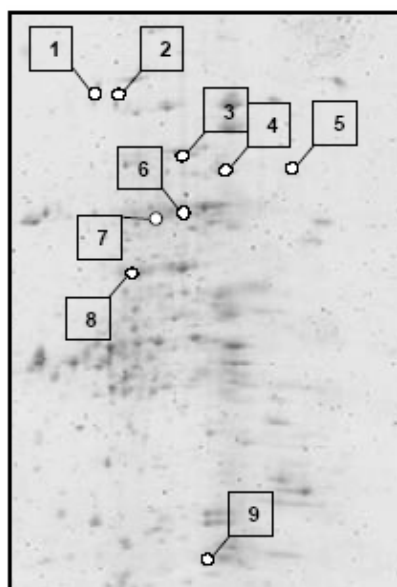


Figura 75. Gel correspondiente a la línea X55 sin tratamiento. 100 μ g de proteínas se sometieron a electroforesis bidimensional, posteriormente, el gel se tiñó con la tinción fluorescente Sypro Ruby (Bio-Rad), a partir de este gel se han picado proteínas inmunorreactivas frente a n-Tyr.

Tabla 16. Proteínas nitradas identificadas mediante huella peptídica en hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55 sin tratamiento.

Proteínas nitradas	Peso molecular	numero de acceso
Spot 1: Proteína hipotética	63 kDa	
Spot 2: Citocromo P450	60 kDa	Q2QYH7_ORYSA
Spot 3: Riboflavina quinasa	49 kDa	ABB47925
Spot 4: Fragmento de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	45 kDa	Q5ZFJ8_POPTN
Spot 5: Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa	45 kDa	O82542_9ROSI
Spot 6: S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa	36 kDa	Q4LB20_HORVU
Spot 7: Proteína de resistencia NBS/LRR	35 kDa	Q8LKJ0_CAPAN
Spot 8: Proteína hipotética	29 kDa	
Spot 9: Proteína hipotética	18 kDa	

4.8.5.3. Inmunolocalización de 3-nitrotirosina mediante microscopía láser confocal

La inmunolocalización de 3-nitrotirosina (n-Tyr) se muestra en la **figura 76**. La n-Tyr se inmunolocalizaba en epidermis, parénquima y haces vasculares de plántulas control pertenecientes a las líneas HA89 y X55, en esta última el inmunomarcaje es más intenso en xilema (Paneles A y C, respectivamente). En plántulas de la variedad sensible (HA89) inoculadas por *P. halstedii* (Panel B), se observó un aumento del inmunomarcaje en todos los tejidos. En plántulas resistentes (X55) inoculadas por *P. halstedii*, no se observó diferencias significativas del inmunomarcaje con respecto al control (Panel D).

En plántulas control pertenecientes a ambas variedades de girasol sin incubación previa con el anticuerpo frente a n-Tyr, no se detectó ningún marcaje significativo (Paneles E y F, respectivamente).

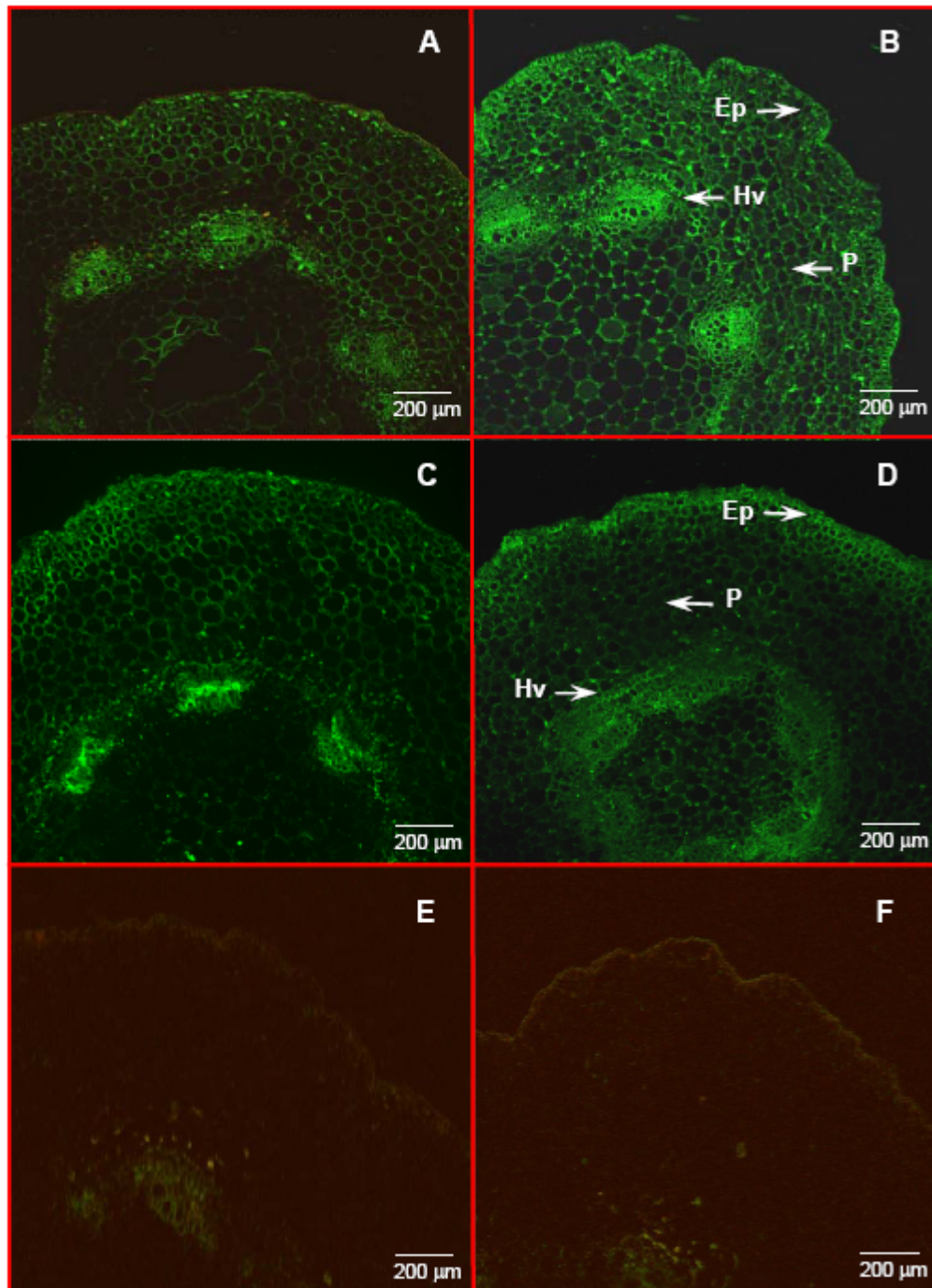


Figura 76. Inmunolocalización de n-Tyr en secciones de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55. En color verde: inmunomarcaje del fluoróforo: **Paneles A y B:** línea HA89, plántulas control y plántulas inoculadas por el hongo biotrofo *P. halstedii*, respectivamente. **Paneles C y D:** línea X55, plántulas control y plántulas inoculadas por *P. halstedii*, respectivamente. **Paneles E y F:** plántulas control pertenecientes a las líneas HA89 y X55, respectivamente, sin incubación con el anticuerpo frente a n-Tyr. **Ep:** epidermis, **P:** parénquima y **Hv:** haces vasculares.

4.9. EFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS ABIÓTICO SOBRE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

4.9.1. SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

4.9.1.1. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en RNA mensajero de la manganeso superóxido dismutasa (*Mn-SOD*)

Mediante PCR a tiempo real se cuantificaron los niveles de RNAm de las dos isoformas de la *Mn-SOD* en hipocótilos de plántulas de girasol sometidas a distintas condiciones de estrés abiótico.

En la línea HA89, los niveles del transcrito de la *Mn-SOD1* se redujeron de forma significativa (90%, 74%, 78% y 69%) en los tratamientos con alta y baja temperatura, y daño mecánico (4 y 8 horas), respectivamente, mientras que, los niveles del transcrito de la *Mn-SOD2* fueron indetectables en el tratamiento con alta temperatura, no detectándose en el resto de los tratamientos variaciones significativas con respecto a la situación control (**Figura 77**). Mientras que, en la línea X55 los niveles del transcrito de la *Mn-SOD1* se redujeron de forma significativa con todos los tratamientos, sin embargo, los niveles del transcrito de la *Mn-SOD2* se incrementaron de forma significativa con el estrés por daño mecánico (4 horas), no detectándose variaciones significativas en el resto de los tratamientos con respecto al control (**Figura 78**).

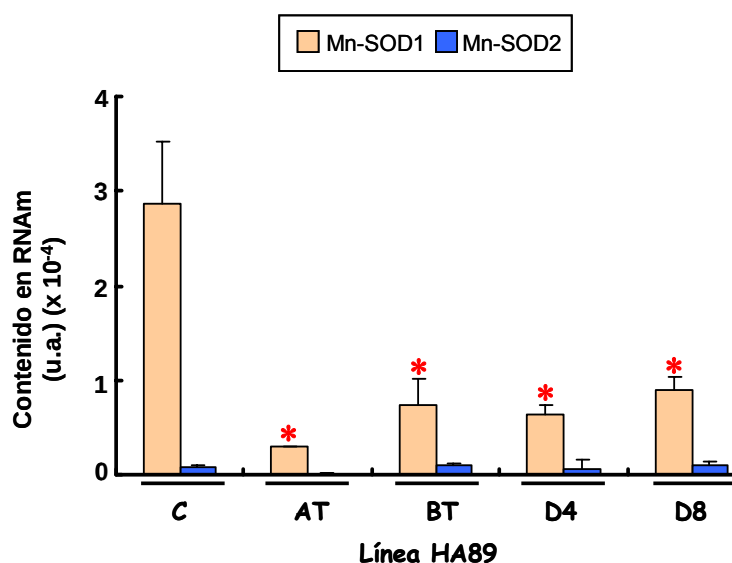


Figura 77. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en RNA mensajero de la *Mn-SOD1* y la *Mn-SOD2* en hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea HA89, expresado en unidades arbitrarias (u.a.). Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D4 y D8:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 y 8 horas. (*): $p < 0,05$.

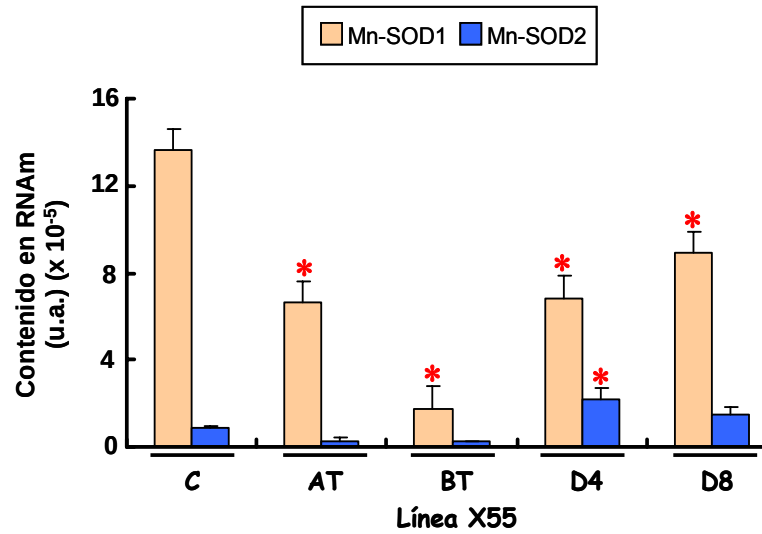


Figura 78. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en RNA mensajero de la *Mn-SOD1* y la *Mn-SOD2* en hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea X55, expresado en unidades arbitrarias (u.a.). Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D4 y D8:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 y 8 horas. (*): $p < 0,05$.

4.9.1.2. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en Cu/Zn-superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD)

El análisis mediante inmunoblot del efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína Cu/Zn-SOD en la línea HA89 se muestra en la **figura 79**. Los niveles de la Cu/Zn-SOD se incrementaron de forma significativa en los tratamientos con baja temperatura, alta intensidad luminosa u oscuridad, este incremento fue de un 166%, 96% y 43%, respectivamente. Por otro lado, en el tratamiento con daño mecánico, tanto a 4 como a 8 horas, los niveles de proteína disminuyeron en un 30% y un 65%, respectivamente. Con alta temperatura o luz continua no se observaron diferencias significativas en los niveles de proteína Cu/Zn-SOD con respecto al control.

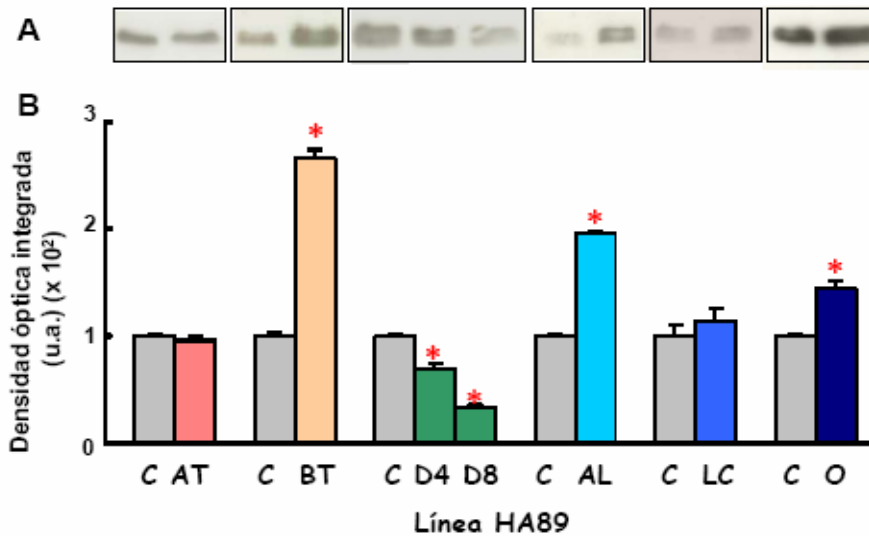


Figura 79. Efecto de distintas condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína Cu/Zn-SOD en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea HA89. **Panel A:** se cargaron 10 μ g de proteínas en el tratamiento con BT y LC, 12 μ g en el tratamiento con daño mecánico y 20 μ g en el tratamiento con AL, AT y O, las muestras se sometieron a SDS-PAGE, posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la isoforma Cu/Zn-SOD de espinaca diluido 1/3000. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D4** y **D8:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 y 8 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad. (*): $p < 0,05$.

El análisis mediante western blot del efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína Cu/Zn-SOD en la línea X55 se muestra en la **figura 80**. El contenido en proteína Cu/Zn-SOD se incrementó en las plántulas sometidas a los estreses por baja temperatura o alta intensidad luminosa, siendo este incremento de un 81% y 32%, respectivamente. En los estreses por daño mecánico a 4 u 8 horas, luz continua u oscuridad los niveles de proteína disminuyeron en un 37%, 14%, 54% y 34%, respectivamente. En el resto de los estreses no se observaron diferencias significativas con respecto a las plántulas control.

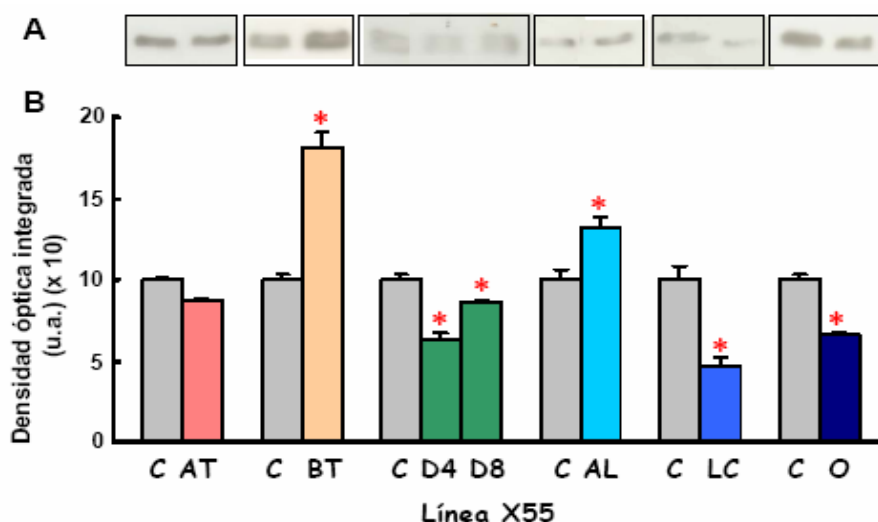


Figura 80. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína Cu/Zn-SOD en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea X55. **Panel A:** se cargaron 10 μ g de proteínas en el tratamiento con BT y LC, 15 μ g en el tratamiento con daño mecánico y 20 μ g en el tratamiento con AL, AT y O, las muestras se sometieron a SDS-PAGE, posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la isoforma Cu/Zn-SOD de espinaca diluido 1/3000. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D4** y **D8:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 y 8 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad. (*): $p < 0,05$.

4.9.2. EFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS ABIÓTICO SOBRE EL CONTENIDO EN CATALASA

El análisis mediante western blot del efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína catalasa en la línea HA89 se muestra en la **figura 81**. En plántulas sometidas al tratamiento con baja temperatura, alta intensidad luminosa u oscuridad, los contenidos en proteína se incrementaron de un 51%, 115% y 20%, respectivamente. Sin embargo, el tratamiento con alta temperatura, daño mecánico o luz continua no mostró diferencias significativas en el contenido de la catalasa con respecto a las plántulas control.

El análisis mediante western blot del efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína catalasa en la línea X55 se muestra en la **figura 82**. Se observaron incrementos significativos en los niveles de proteína catalasa en los tratamientos con baja temperatura, alta intensidad luminosa o luz continua, estos incrementos fueron de, aproximadamente, un 77%, 329% y 81%, respectivamente. No se observaron cambios significativos en las plántulas sometidas a los tratamientos por alta temperatura, daño mecánico u oscuridad.

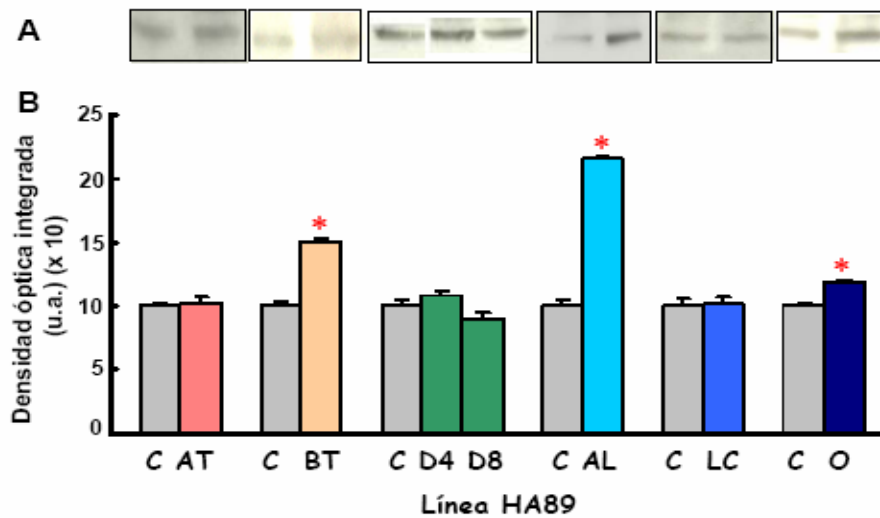


Figura 81. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína catalasa en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89. **Panel A:** se cargaron 10 μg de proteínas en el tratamiento con BT y LC, 12 μg en el tratamiento con daño mecánico y 20 μg en el tratamiento con AL, AT y O, las muestras se sometieron a SDS-PAGE, posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la catalasa de calabaza diluido 1/500. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D4** y **D8:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 y 8 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad. (*): $p < 0,05$.

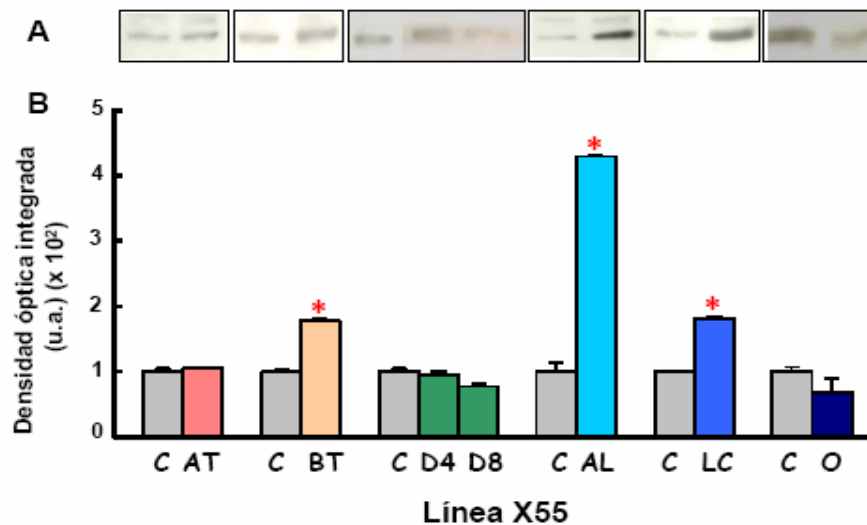


Figura 82. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína catalasa en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55. **Panel A:** se cargaron 10 μg de proteínas en el tratamiento con BT y LC, 15 μg en el tratamiento con daño mecánico y 20 μg en el tratamiento con AL, AT y O, las muestras se sometieron a SDS-PAGE, posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la catalasa de calabaza diluido 1/500. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D4** y **D8:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 y 8 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad. (*): $p < 0,05$.

4.9.3. EFECTO DE DISTINTAS CONDICIONES DE ESTRÉS ABIÓTICO SOBRE LAS ENZIMAS DEL CICLO ASCORBATO-GLUTATION

Mediante inmunoblot se analizó el efecto de los estreses abióticos señalados anteriormente sobre el contenido en proteínas APX, MDAR y GR en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55.

4.9.3.1. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína ascorbato peroxidasa (APX)

El contenido en proteína APX se incrementó de forma significativa como consecuencia al estrés por alta o baja temperatura, o daño mecánico a las 4 y 8 horas, siendo estos incrementos de un 75% para alta y baja temperatura, 291% y 204% para daño mecánico a las 4 y 8 horas, respectivamente. En cambio, el resto de los estreses no mostraron variaciones significativas con respecto al control (**Figura 83**).

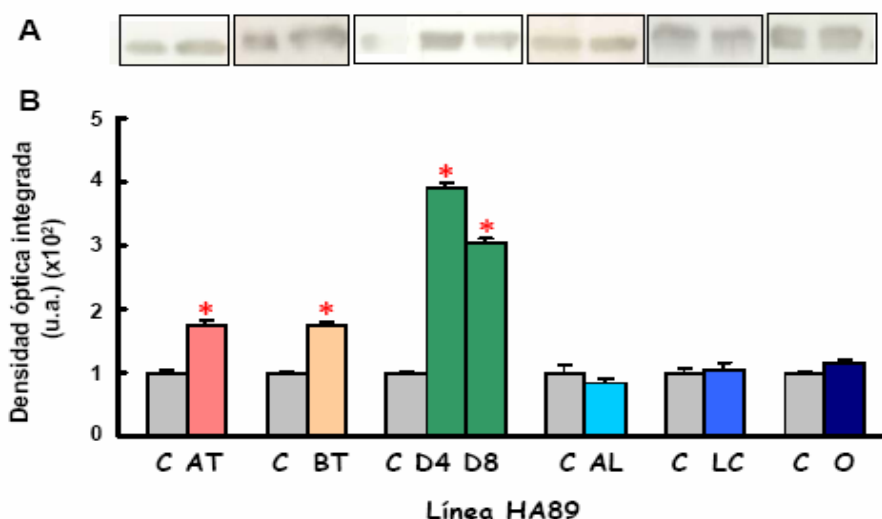


Figura 83. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína APX en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89. **Panel A:** se cargaron 10 µg de proteínas en el tratamiento con BT y LC, 12 µg en el tratamiento con daño mecánico y 20 µg en el tratamiento con AL, AT y O, las muestras se sometieron a SDS-PAGE, posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la APX de pepino diluido 1/1000. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de ± EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D4 y D8:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 y 8 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad. (*): $p < 0,05$.

En plántulas pertenecientes a la línea X55, los niveles de proteína APX se incrementaron en el tratamiento con alta temperatura (75%). Por el contrario, los niveles de proteína se redujeron en un 35% en el tratamiento con luz continua. Los tratamientos con

baja temperatura, daño mecánico, alta intensidad luminosa u oscuridad no afectaron el contenido en proteína APX (**Figura 84**).

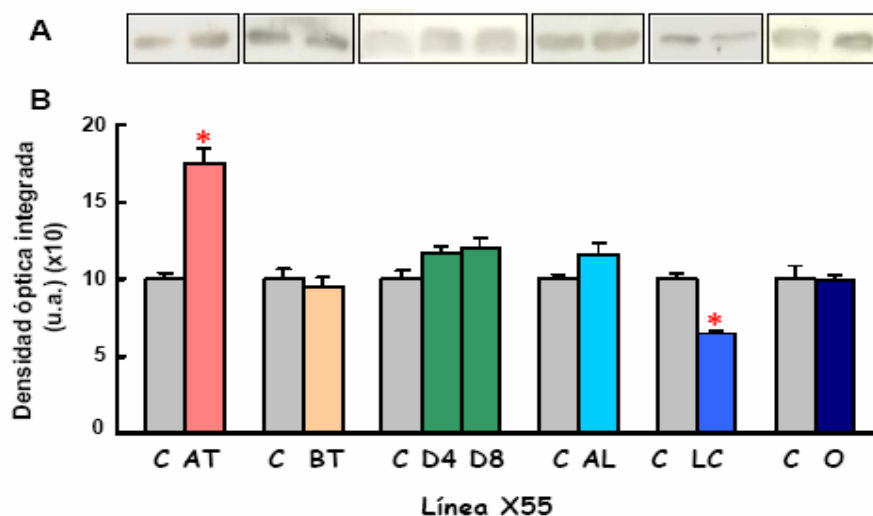


Figura 84. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína APX en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55. **Panel A:** se cargaron 10 μ g de proteínas en el tratamiento con BT y LC, 15 μ g en el tratamiento con daño mecánico y 20 μ g en el tratamiento con AL, AT y O, las muestras se sometieron a SDS-PAGE, posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la APX de pepino diluido 1/1000. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D4** y **D8:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 y 8 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad. (*): $p < 0,05$.

4.9.3.2. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína monodeshidroascorbato reductasa (MDAR)

En plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89, se detectó un aumento en el contenido de la MDAR en el tratamiento con oscuridad (54%). Sin embargo, en plántulas sometidas a daño mecánico (8 horas) se produjo una disminución en el contenido de proteína en un 43%. El resto de los tratamientos no afectaron de forma significativa el contenido en proteína MDAR (**Figura 85**).

Por otro lado, en la línea X55, se observó un aumento significativo en los niveles de proteína MDAR en plántulas sometidas a estrés por baja temperatura, alta intensidad luminosa o luz continua, los incrementos fueron de un 36%, 71% y 173%, respectivamente. En el resto de los tratamientos no se detectaron cambios significativos con respecto a las plántulas control (**Figura 86**).

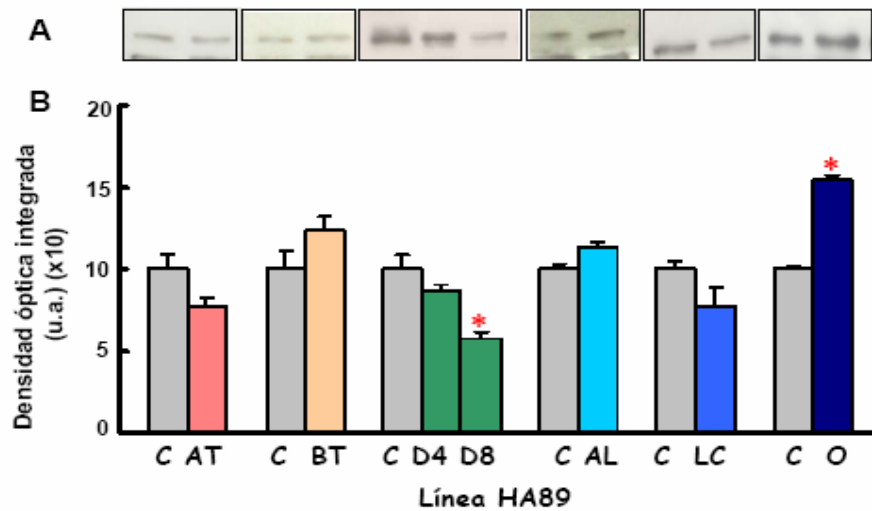


Figura 85. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína MDAR en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea HA89. **Panel A:** se cargaron 10 μg de proteínas en el tratamiento con BT y LC, 12 μg en el tratamiento con daño mecánico y 20 μg en el tratamiento con AL, AT y O, las muestras se sometieron a SDS-PAGE, posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la MDAR de pepino diluido 1/8000. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D4** y **D8:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 y 8 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad. (*): $p < 0,05$.

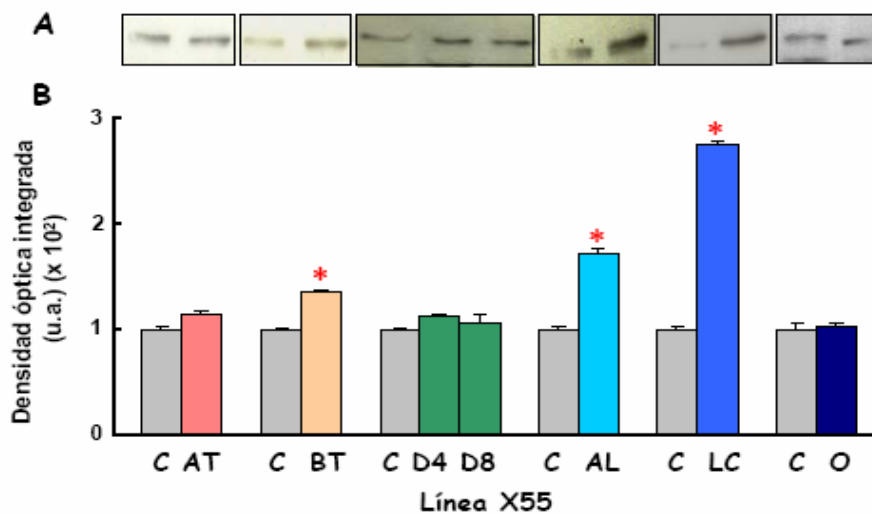


Figura 86. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína MDAR en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55. **Panel A:** se cargaron 10 μg de proteínas en el tratamiento con BT y LC, 15 μg en el tratamiento con daño mecánico y 20 μg en el tratamiento con AL, AT y O, las muestras se sometieron a SDS-PAGE, posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la MDAR de pepino diluido 1/8000. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D4** y **D8:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 y 8 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad. (*): $p < 0,05$.

4.9.3.3. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína glutathion reductasa (GR)

Se detectó un aumento significativo en los niveles de proteína GR en plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89 sometidas a tratamiento con baja temperatura, luz continua u oscuridad, los incrementos fueron de un 57%, 35% y 70%, respectivamente. Sin embargo, en el resto de los tratamientos no se detectaron diferencias significativas con respecto al control (**Figura 87**).

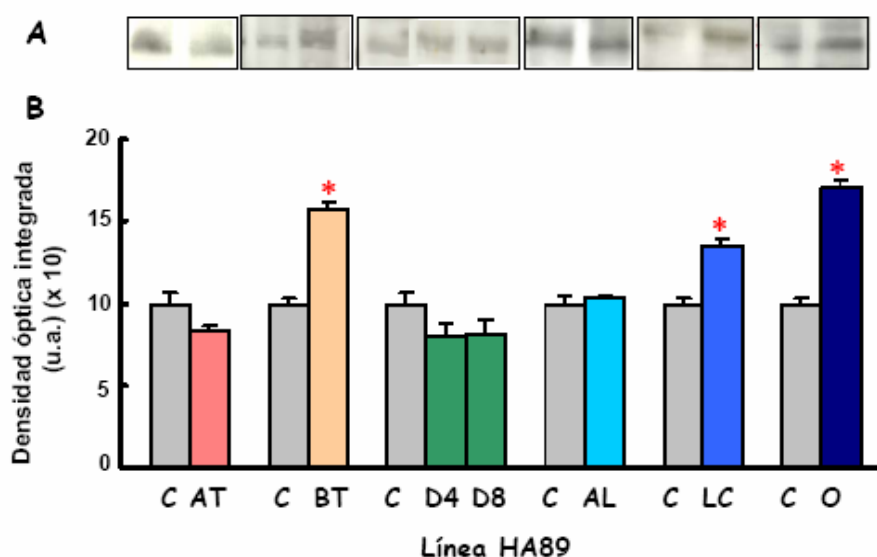


Figura 87. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína GR en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89. **Panel A:** se cargaron 10 μg de proteínas en el tratamiento con BT y LC, 12 μg en el tratamiento con daño mecánico y 20 μg en el tratamiento con AL, AT y O, las muestras se sometieron a SDS-PAGE, posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la GR de guisante diluido 1/500. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D4** y **D8:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 y 8 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad. (*): $p < 0,05$.

En plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55, los niveles de la GR se incrementaron en los tratamientos por baja temperatura (17%) o alta intensidad luminosa (27%). El resto de los tratamientos no afectaron de forma significativa el contenido en proteína GR (**Figura 88**).

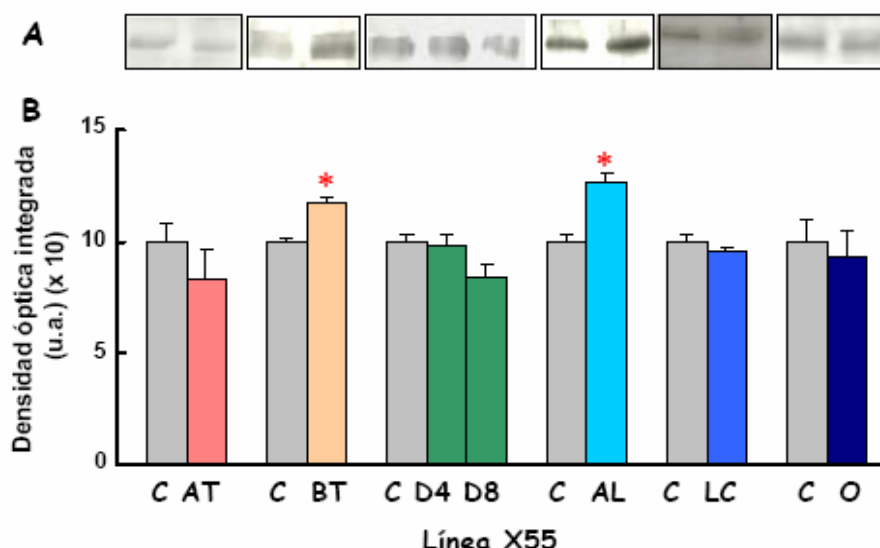


Figura 88. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína GR en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55. **Panel A:** se cargaron 10 μg de proteínas en el tratamiento con BT y LC, 15 μg en el tratamiento con daño mecánico y 20 μg en el tratamiento con AL, AT y O, las muestras se sometieron a SDS-PAGE, posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la GR de guisante diluido 1/500. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D4** y **D8:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 y 8 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad. (*): $p < 0,05$.

4.9.4. EFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS ABIÓTICO SOBRE LAS DESHIDROGENASAS DEPENDIENTES DE NADP, G6PDH-NADP, EM-NADP e ICDH-NADP

Se ha estudiado mediante inmunoblot el efecto de los estreses abióticos señalados anteriormente sobre el contenido en deshidrogenasas dependientes de NADP en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55.

4.9.4.1. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en glucosa 6-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP (G6PDH-NADP)

En la línea HA89, el tratamiento con alta temperatura incrementó el contenido en proteína G6PDH-NADP de un 33%. En cambio, se observó una disminución entre un 20 y un 32% en el contenido en proteína tras el estrés por daño mecánico (4 y 8 horas), luz continua u oscuridad. En el resto de los estreses no se detectaron diferencias significativas con respecto al control (**Figura 89**).

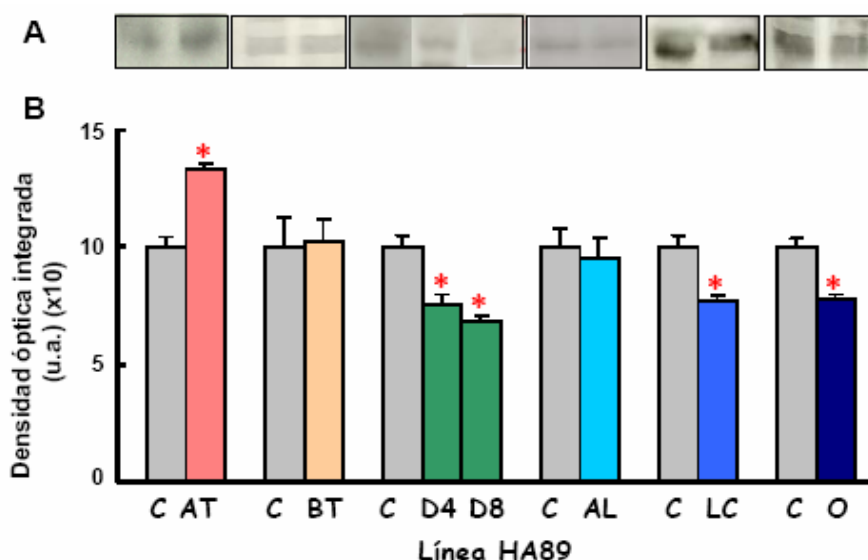


Figura 89. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína G6PDH-NADP en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89. **Panel A:** se cargaron 10 μg de proteínas en el tratamiento con BT y LC, 12 μg en el tratamiento con daño mecánico y 20 μg en el tratamiento con AL, AT y O, las muestras se sometieron a SDS-PAGE, posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la G6PDH-NADP de *Saccharomyces cerevisiae* diluido 1/2500. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D4** y **D8:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 y 8 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad. (*): $p < 0,05$.

En plántulas pertenecientes a la línea X55, se observó un aumento significativo en los niveles de proteína G6PDH-NADP en hipocótilos de plántulas sometidas a tratamiento con alta temperatura, alta intensidad luminosa o luz continua de un 39%, 55% y 32%, respectivamente. No observándose cambios significativos en el contenido en proteína G6PDH-NADP en plántulas sometidas a tratamiento con baja temperatura, daño mecánico u oscuridad (**Figura 90**).

4.9.4.2. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína enzima málico dependiente de NADP (EM-NADP)

El contenido en proteína EM-NADP incrementó de forma significativa en el tratamiento de plántulas de la línea HA89 con alta intensidad luminosa u oscuridad, siendo el incremento de un 100% y 65%, respectivamente. Sin embargo, el nivel de proteína se redujo en un 31% en el tratamiento con alta temperatura y en un 26% en el tratamiento con baja temperatura. En los tratamientos con daño mecánico y luz continua no se observaron cambios en el contenido de proteína con respecto a las plántulas control (**Figura 91**).

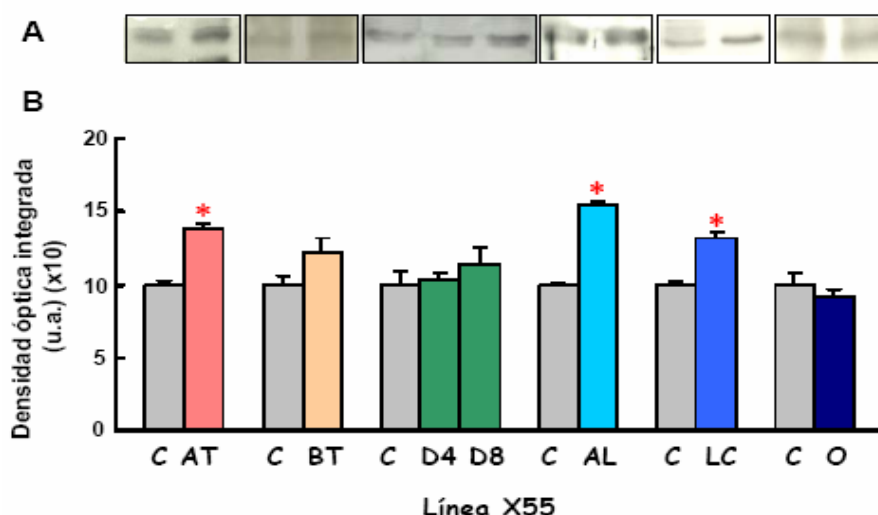


Figura 90. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína G6PDH-NADP en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55. **Panel A:** se cargaron 10 μg de proteínas en el tratamiento con BT y LC, 15 μg en el tratamiento con daño mecánico y 20 μg en el tratamiento con AL, AT y O, las muestras se sometieron a SDS-PAGE, posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la G6PDH-NADP de *Saccharomices cerevisiae* diluido 1/2500. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D4** y **D8:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 y 8 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad. (*): $p < 0,05$.

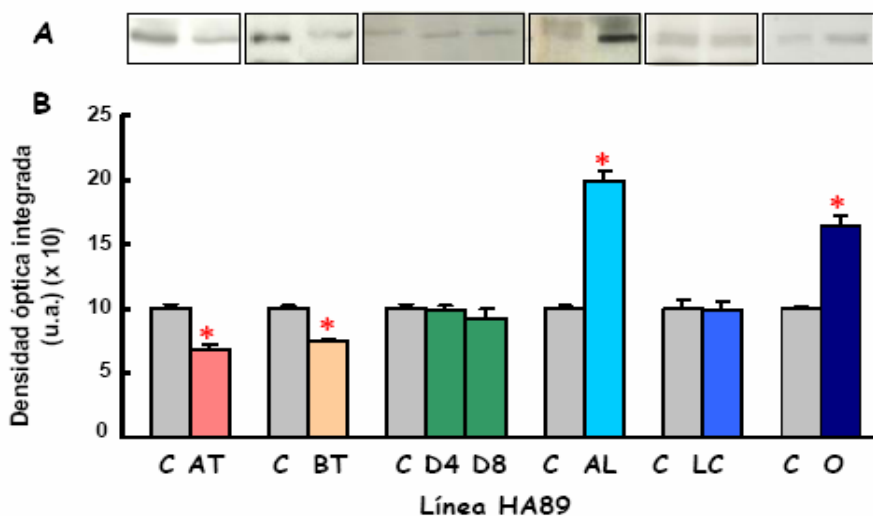


Figura 91. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína EM-NADP en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89. **Panel A:** se cargaron 10 μg de proteínas en el tratamiento con BT y LC, 12 μg en el tratamiento con daño mecánico y 20 μg en el tratamiento con AL, AT y O, las muestras se sometieron a SDS-PAGE, posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la EM-NADP de hígado de rata diluido 1/1000. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D4** y **D8:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 y 8 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad. (*): $p < 0,05$.

El análisis de los niveles de proteína EM-NADP en hipocótilos de plántulas pertenecientes a la línea X55, mostró un incremento significativo en el tratamiento con baja temperatura, alta intensidad luminosa, luz continua u oscuridad, los incrementos fueron de un 64%, 83%, 41% y 90%, respectivamente. Sin embargo, no observándose diferencias significativas en el contenido de proteína en plántulas tratadas con alta temperatura o daño mecánico (**Figura 92**).

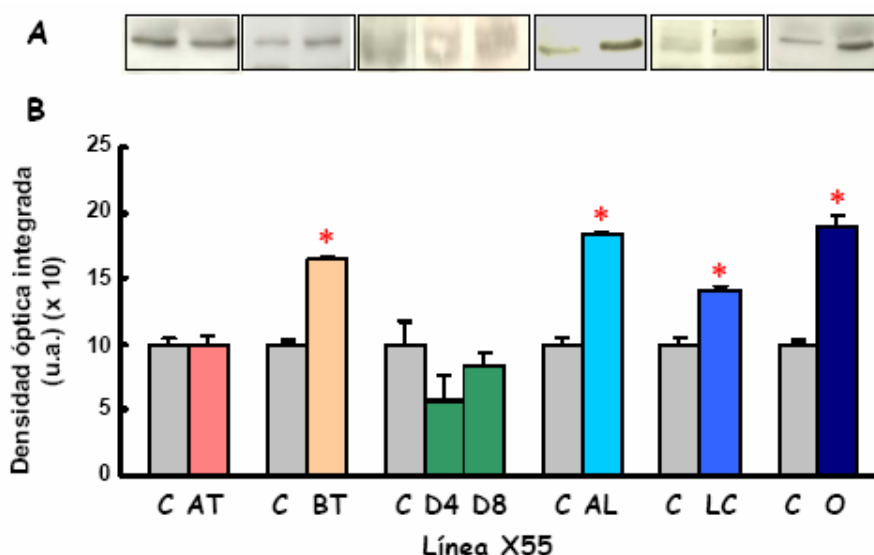


Figura 92. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína EM-NADP en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55. **Panel A:** se cargaron 10 μ g de proteínas en el tratamiento con BT y LC, 15 μ g en el tratamiento con daño mecánico y 20 μ g en el tratamiento con AL, AT y O, las muestras se sometieron a SDS-PAGE, posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la EM-NADP de hígado de rata diluido 1/1000. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D4** y **D8:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 y 8 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad. (*): $p < 0,05$.

4.9.4.3. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP (ICDH-NADP)

En hipocótilos de plántulas pertenecientes a la línea HA89 tratadas con baja temperatura u oscuridad, los niveles de proteína ICDH-NADP se incrementaron de un 95% y 33%, respectivamente, y se redujeron en un 40% en el tratamiento con daño mecánico (8 horas) o luz continua. En plántulas sometidas a tratamiento con alta temperatura, daño mecánico (4 horas) o alta intensidad luminosa no detectaron cambios significativos en el contenido de la proteína (**Figura 93**).

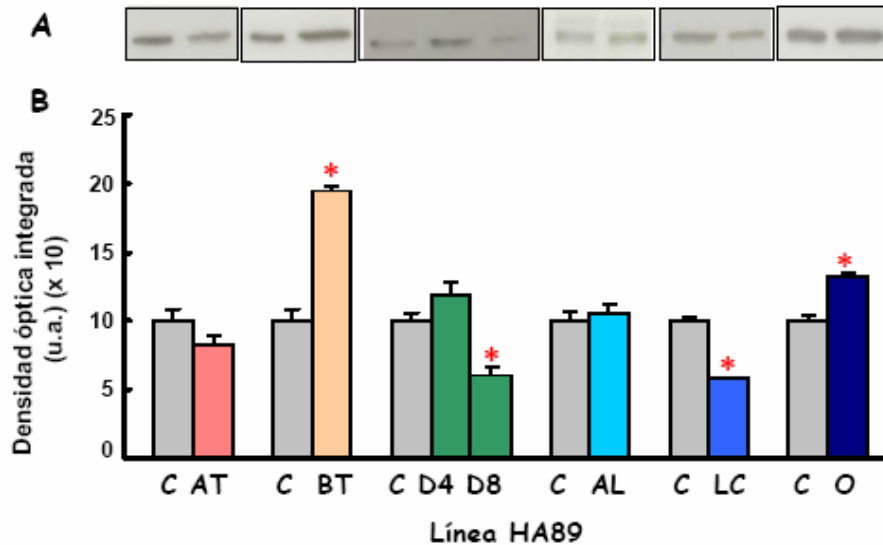


Figura 93. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína ICDH-NADP en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89. **Panel A:** se cargaron 10 µg de proteínas en el tratamiento con BT y LC, 12 µg en el tratamiento con daño mecánico y 20 µg en el tratamiento con AL, AT y O, las muestras se sometieron a SDS-PAGE, posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la ICDH-NADP citosólica de tabaco diluido 1/8000. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D4** y **D8:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 y 8 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad. (*): $p < 0,05$.

En plántulas pertenecientes a la línea X55, el estrés abiótico por baja temperatura incrementó de forma significativa los niveles de proteína ICDH-NADP (136%). Mientras que, el daño mecánico tanto a 4 como a 8 horas produjo una reducción en los niveles de proteína en un 56% y 28%, respectivamente. En el resto de los estreses no se encontraron diferencias significativas en el contenido de proteína con respecto a las plántulas control (**Figura 94**).

4.9.5. EFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS ABIÓTICO SOBRE EL CONTENIDO EN PROTEÍNA PEROXIRREDOXINA (Prx)

El análisis mediante western blot del efecto de los estreses abióticos sobre el contenido en proteína peroxirredoxina en la línea HA89 se muestra en la **figura 95**. Se observó un aumento significativo en los niveles de proteína Prx en plántulas sometidas a tratamiento con alta o baja temperatura, en un 53% y 248%, respectivamente. En el resto de los tratamientos, no se detectaron variaciones significativas en el contenido de proteína Prx.

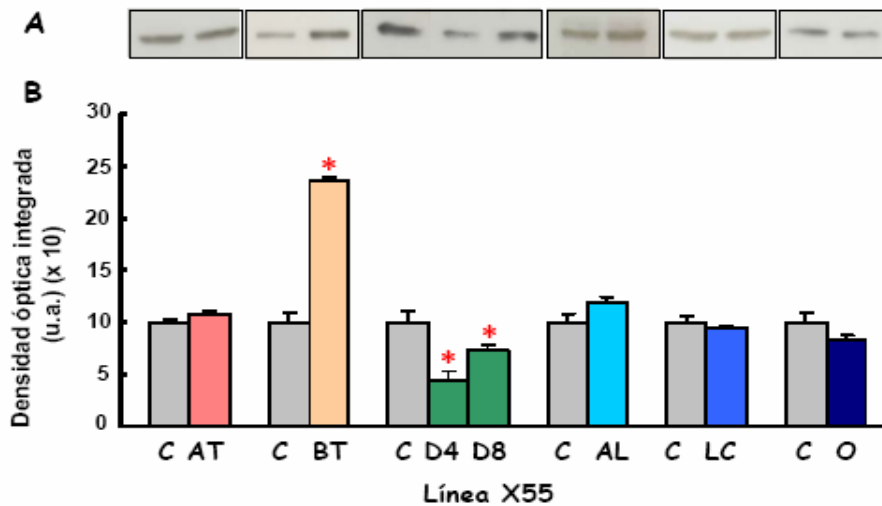


Figura 94. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína ICDH-NADP en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55. **Panel A:** se cargaron 10 μg de proteínas en el tratamiento con BT y LC, 15 μg en el tratamiento con daño mecánico y 20 μg en el tratamiento con AL, AT y O, las muestras se sometieron a SDS-PAGE, posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la ICDH-NADP citosólica de tabaco diluido 1/8000. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D4** y **D8:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 y 8 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad. (*): $p < 0,05$.

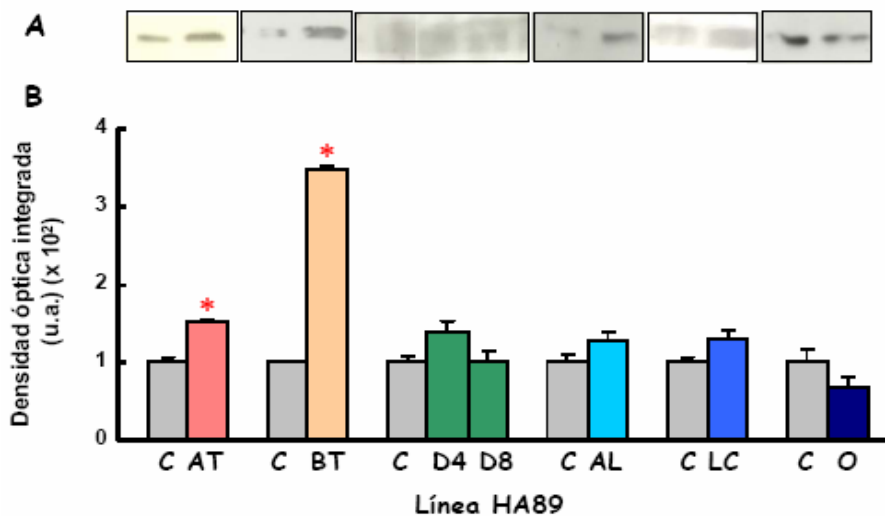


Figura 95. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína Prx en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89. **Panel A:** se cargaron 10 μg de proteínas en el tratamiento con BT y LC, 12 μg en el tratamiento con daño mecánico y 20 μg en el tratamiento con AL, AT y O, las muestras se sometieron a SDS-PAGE, posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la Prx de levadura diluido 1/200. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D4** y **D8:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 y 8 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad. (*): $p < 0,05$.

El análisis mediante inmunoblot del efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína peroxirredoxina en la línea X55 se muestra en la **figura 96**. El contenido en proteína Prx se incrementó de forma significativa en los tratamientos con alta o baja temperatura, o alta intensidad luminosa, los aumentos fueron de un 51%, 128% y 76%, respectivamente. Por otro lado, en el tratamiento con oscuridad el contenido en proteína se redujo en un 51%. Los tratamientos con luz continua o daño mecánico no afectaron de forma significativa el contenido en proteína Prx.

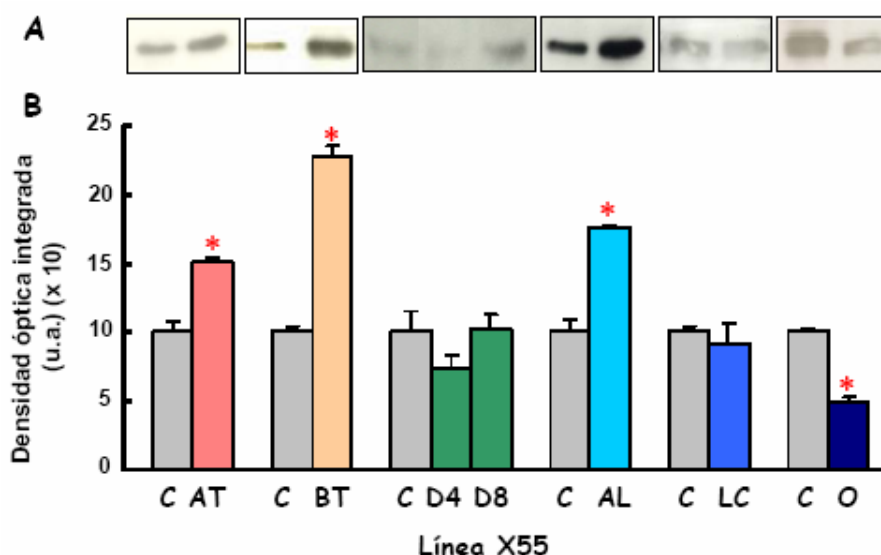


Figura 96. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína Prx en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55. **Panel A:** se cargaron 10 μ g de proteínas en el tratamiento con BT y LC, 15 μ g en el tratamiento con daño mecánico y 20 μ g en el tratamiento con AL, AT y O, las muestras se sometieron a SDS-PAGE, posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la Prx de levadura diluido 1/200. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D4** y **D8:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 y 8 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad. (*): $p < 0,05$.

4.10. EFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS ABIÓTICO SOBRE EL CONTENIDO EN PROTEÍNA LEUCINA-AMINOPEPTIDASA (Leu-AP)

El análisis mediante western blot del efecto de distintas condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína Leu-AP en la línea HA89 se muestra en la **figura 97**. Se observó un incremento significativo (64%) en el contenido de proteína Leu-AP en plántulas sometidas a baja temperatura. En el resto de los tratamientos, no se detectaron diferencias significativas en el contenido de proteína con respecto a las plántulas control.

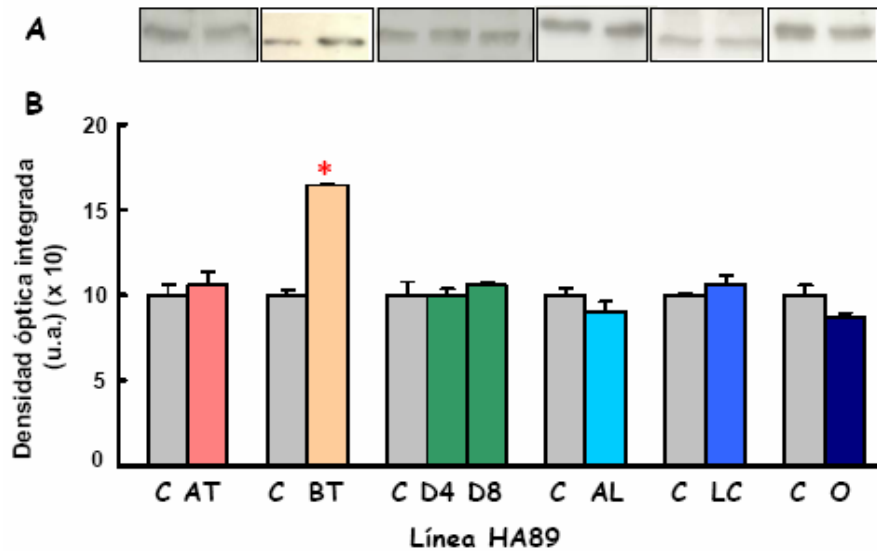


Figura 97. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína Leu-AP en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea HA89. **Panel A:** se cargaron 10 μ g de proteínas en el tratamiento con BT y LC, 12 μ g en el tratamiento con daño mecánico y 20 μ g en el tratamiento con AL, AT y O, las muestras se sometieron a SDS-PAGE, posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la Leu-AP diluido 1/2000. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D4 y D8:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 y 8 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad. (*): $p < 0,05$.

El análisis mediante western blot del efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína Leu-AP en la línea X55 se muestra en la **figura 98**. El tratamiento con baja temperatura incrementó de forma significativa los niveles de proteína Leu-AP (59%). Mientras que, en el resto de los estreses no se detectaron diferencias significativas en el contenido de proteína con respecto a las plántulas control.

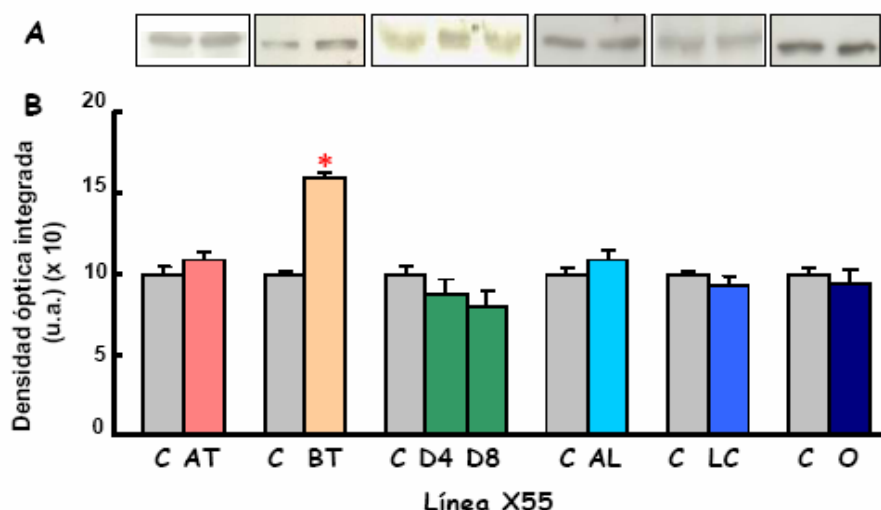


Figura 98. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína Leu-AP en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55. **Panel A:** se cargaron 10 μ g de proteínas en el tratamiento con BT y LC, 15 μ g en el tratamiento con daño mecánico y 20 μ g en el tratamiento con AL, AT y O, las muestras se sometieron a SDS-PAGE, posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la Leu-AP diluido 1/2000. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) normalizadas. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D4** y **D8:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 y 8 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad. (*): $p < 0,05$.

4.11. CONTENIDO EN HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS EN HIPOCÓTILOS DE PLÁNTULAS DE GIRASOL SOMETIDAS A DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS ABIÓTICO

En plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89, el contenido en hidroperóxidos lipídicos se incrementó de forma significativa en los tratamientos con alta temperatura, daño mecánico (4 horas) y alta intensidad luminosa, sin embargo, en los tratamientos con baja temperatura, luz continua y oscuridad no se observaron diferencias significativas en comparación con las plántulas control. Mientras que, en plántulas pertenecientes a la línea X55, el contenido en hidroperóxidos lipídicos se incrementó de forma significativa en los tratamientos con alta temperatura y alta intensidad luminosa, en el resto de los tratamientos no se detectaron cambios significativos con respecto a las plántulas control (**Tabla 17**).

Tabla 17. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en hidroperóxidos lipídicos en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. (*): $p < 0,05$.

Estreses	Contenido en hidroperóxidos lipídicos (nmol/g hipocótilos)
Línea HA89	
Control	75,21 $\pm$ 6,22
Alta temperatura	111,7 $\pm$ 6,04 *
Baja temperatura	76,52 $\pm$ 3,04
Daño mecánico (4 horas)	101,56 $\pm$ 10,13 *
Alta intensidad luminosa	124,39 $\pm$ 6,7 *
Luz continua	75,96 $\pm$ 2,09
Oscuridad	80,65 $\pm$ 1,55
Línea X55	
Control	74,45 $\pm$ 8,08
Alta temperatura	125,82 $\pm$ 0,46 *
Baja temperatura	79,25 $\pm$ 1,24
Daño mecánico (4 horas)	81,39 $\pm$ 1,15
Alta intensidad luminosa	102,42 $\pm$ 9,32 *
Luz continua	87,45 $\pm$ 3,95
Oscuridad	75,29 $\pm$ 2,8

4.12. METABOLISMO DE LAS ESPECIES DE NITRÓGENO REACTIVO EN HIPOCÓTILOS DE GIRASOL SOMETIDOS A DISTINTAS CONDICIONES DE ESTRÉS ABIÓTICO

4.12.1. EFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS ABIÓTICO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

4.12.1.1. Detección de óxido nítrico mediante quimioluminiscencia de ozono

Se determinó la producción de óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55 control y sometidas a distintas condiciones de estrés abiótico.

En plántulas pertenecientes a la línea HA89 sometidas a los estreses por alta temperatura y daño mecánico (4 horas), se observó una reducción significativa en los niveles de NO (33% y 54%, respectivamente). El resto de los tratamientos no mostraron variaciones significativas con respecto al control (**Figura 99**). También, se determinó la producción de NO en plántulas sometidas a estrés por daño mecánico a las 2 u 8 horas. A

las 2 horas se obtuvieron resultados similares al control, mientras que a las 8 horas eran similares a los resultados de 4 horas (resultados no mostrados).

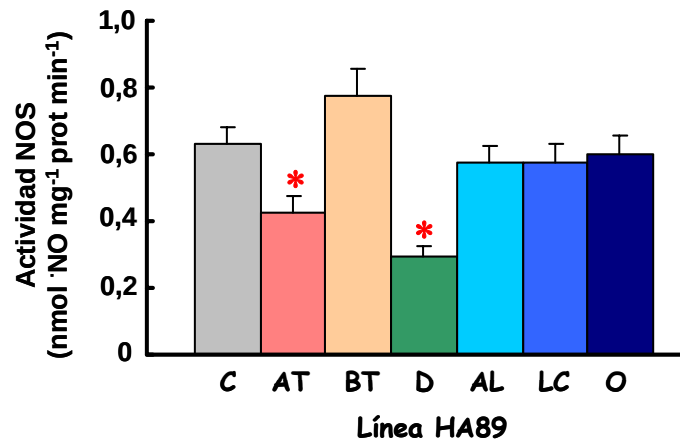


Figura 99. Análisis de la actividad NOS por quimioluminiscencia de ozono en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89, control y sometidas a diferentes condiciones de estrés abiótico. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. C: control, AT: alta temperatura, BT: baja temperatura, D: daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 horas, AL: alta intensidad luminosa, LC: luz continua y O: oscuridad. (*): $p < 0,05$.

En la línea X55, se observó un incremento significativo en los niveles de NO en plántulas sometidas a los tratamientos por alta temperatura o daño mecánico, el incremento fue de un 124% y 78%, respectivamente. En el resto de los estreses no se detectaron diferencias significativas en comparación con las plántulas control (**Figura 100**). También se determinó la producción de NO en plántulas sometidas a estrés por daño mecánico a las 2 u 8 horas, a las 2 horas se obtuvo resultados similares al control, no detectándose diferencias entre los resultados obtenidos a las 4 y 8 horas (resultados no mostrados).

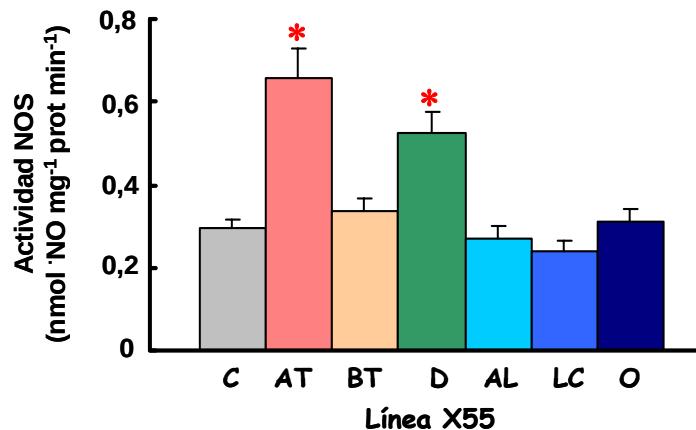


Figura 100: Análisis de la actividad NOS por quimioluminiscencia de ozono en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55, control y sometidas a diferentes condiciones de estrés abiótico. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. C: control, AT: alta temperatura, BT: baja temperatura, D: daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 horas, AL: alta intensidad luminosa, LC: luz continua y O: oscuridad. (*): $p < 0,05$.

4.12.1.2. Detección de óxido nítrico mediante microscopía láser confocal

La detección de óxido nítrico en plántulas pertenecientes a la línea HA89 mediante el uso del fluoróforo DAF-2DA se muestra en las **figuras 101 y 102**. En plántulas control (Panel A), el NO se detectó fundamentalmente en epidermis, floema y xilema. El tratamiento con alta temperatura o daño mecánico (4 horas) (Paneles B y C, respectivamente) redujo la intensidad del marcaje en las zonas anteriormente comentadas. Sin embargo, el tratamiento con alta intensidad luminosa no produjo ningún cambio significativo en la intensidad del marcaje (Panel D).

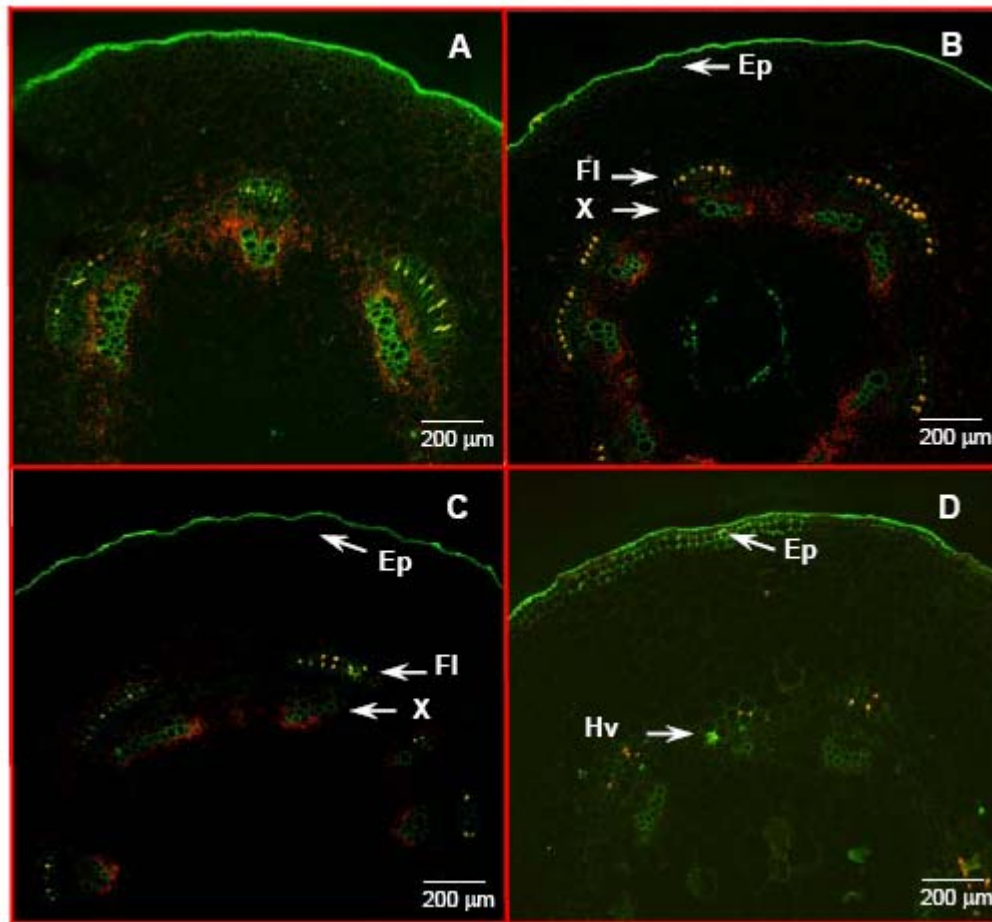


Figura 101. Detección de NO en secciones de hypocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89. En color rojo: autofluorescencia del tejido, en color verde: marcaje del fluoróforo. **Panel A:** expresión del fluoróforo en hypocótilos de plántulas control. **Paneles B, C y D:** expresión del fluoróforo en hypocótilos de plántulas sometidas a los estreses por alta temperatura, daño mecánico (4 horas) y alta intensidad luminosa, respectivamente. **Ep:** epidermis, **Fl:** floema, **X:** xilema y **Hv:** haces vasculares.

En cortes de hipocótilos control, el NO , como ya hemos mencionado, se detectó principalmente en epidermis, floema y xilema (Panel A). En plántulas sometidas a los tratamientos con baja temperatura, luz continua u oscuridad no se observaron variaciones significativas en el marcaje con respecto a las plántulas control (Paneles B, C y D, respectivamente).

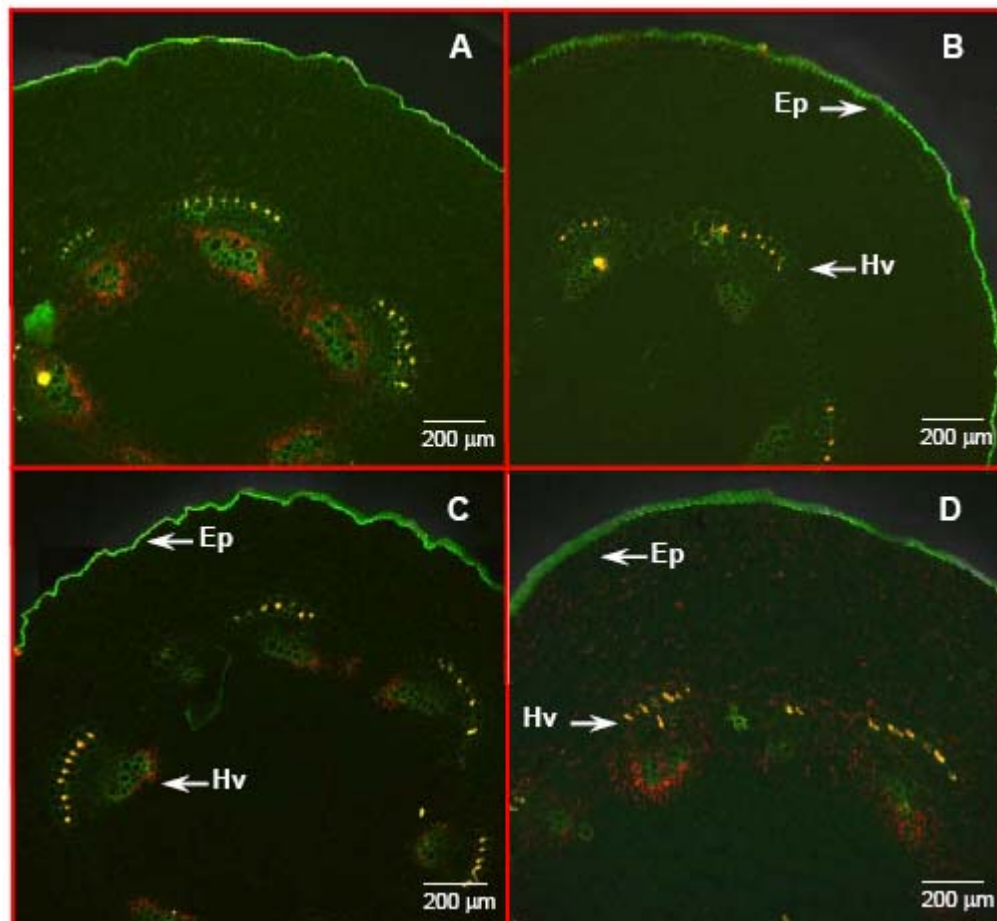


Figura 102. Detección de NO en secciones de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea HA89. En color rojo: autofluorescencia del tejido, en color verde: marcaje del fluoróforo. **Panel A:** expresión del fluoróforo en hipocótilos de plántulas control. **Paneles B, C y D:** expresión del fluoróforo en hipocótilos de plántulas sometidas a los estreses por baja temperatura, luz continua y oscuridad, respectivamente. **Ep:** epidermis y **Hv:** haces vasculares.

En plántulas pertenecientes a la línea X55, la detección de NO mediante el uso del fluoróforo DAF-2DA se muestra en las **figuras 103 y 104**. En secciones de plántulas control se localizó un ligero marcaje en epidermis y xilema (Panel A), mientras que, el tratamiento con alta temperatura o daño mecánico (4 horas) (Paneles B y C, respectivamente)

incrementó la intensidad del marcaje en las zonas descritas anteriormente, además, se detectó un ligero marcaje en floema. En el tratamiento con alta intensidad luminosa (Panel D) no se produjo ningún cambio significativo con respecto a las plántulas control.

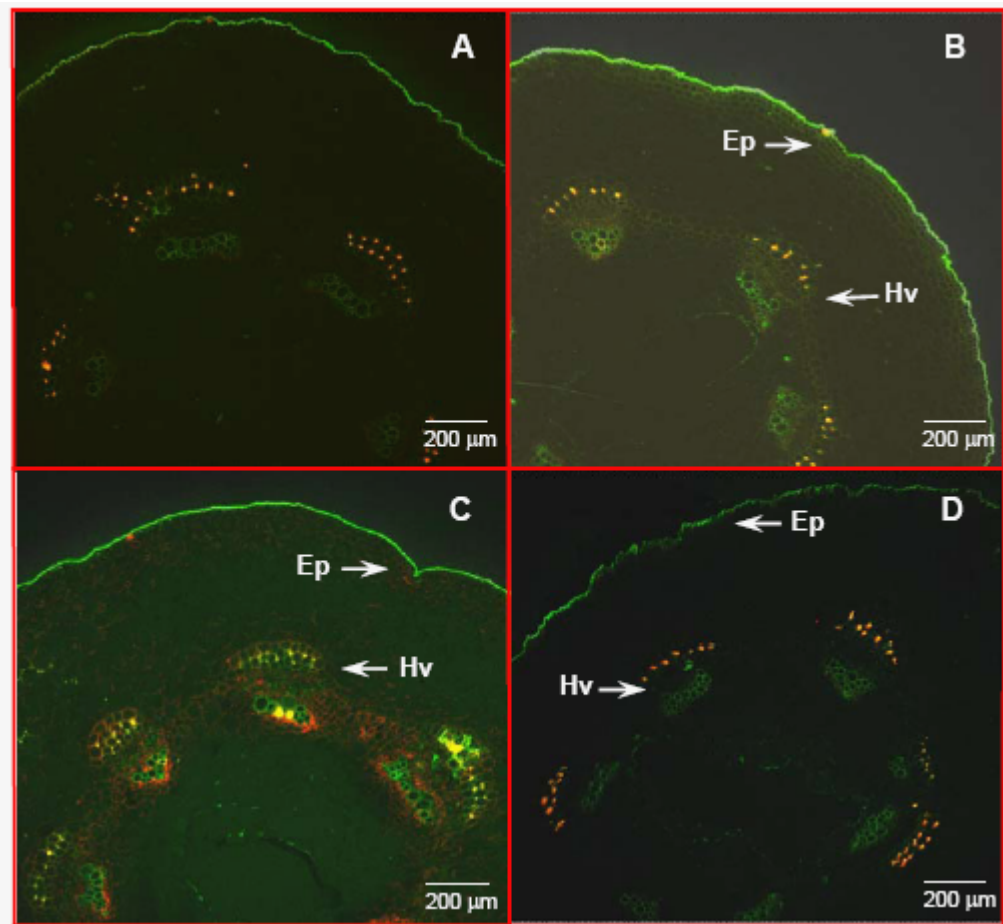


Figura 103. Detección de NO en cortes de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55. En color rojo: autofluorescencia del tejido, en color verde: marcaje del fluoróforo. **Panel A:** expresión del fluoróforo en hipocótilos de plántulas control. **Paneles B, C y D:** expresión del fluoróforo en hipocótilos de plántulas sometidas a los estreses por alta temperatura, daño mecánico (4 horas) y alta intensidad luminosa, respectivamente. **Ep:** epidermis y **Hv:** haces vasculares.

En secciones de hipocótilos de plántulas control se detectó, como ya hemos mencionado, un ligero marcaje en epidermis y xilema (Panel A), el estrés por baja temperatura, luz continua u oscuridad no produjo variaciones significativas en los niveles de NO con respecto a las plántulas control (Paneles B, C y D, respectivamente).

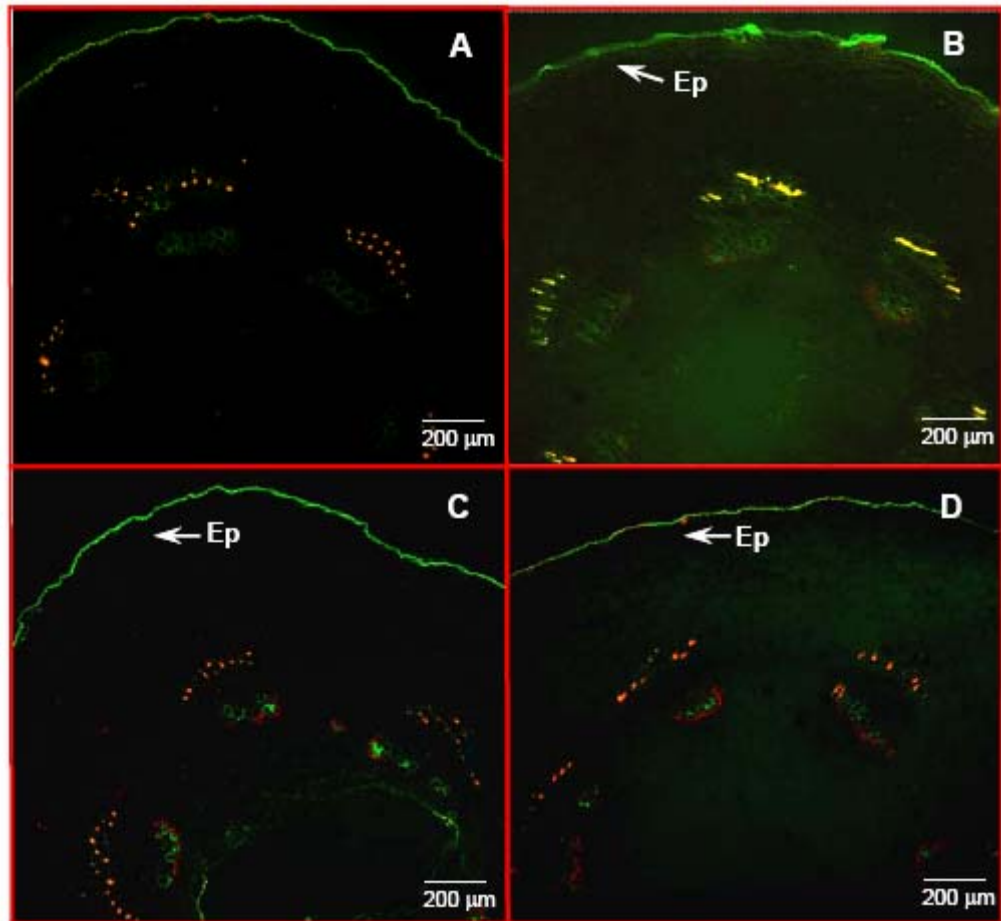


Figura 104. Detección de NO en secciones de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea X55. En color rojo: autofluorescencia del tejido, en color verde: marcaje del fluoróforo. **Panel A:** expresión del fluoróforo en hipocótilos de plántulas control. **Paneles B, C y D:** expresión del fluoróforo en hipocótilos de plántulas sometidas a los estreses por baja temperatura, luz continua y oscuridad, respectivamente. **Ep:** epidermis.

4.12.2. EFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS ABIÓTICO SOBRE EL CONTENIDO DE S-NITROSOTIOLES

4.12.2.1. Detección de S-nitrosotioles totales mediante quimioluminiscencia de ozono

La producción de S-nitrosotioles totales en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol sometidas a diferentes condiciones de estrés abiótico se determinó mediante quimioluminiscencia de ozono. En la línea HA89, el tratamiento con alta temperatura o daño mecánico (4 horas) produjo un incremento significativo de un 180% y 348%, respectivamente, en la producción de S-nitrosotioles totales. En cambio, el resto de

los estreses no mostraron variaciones significativas con respecto a las plántulas control (**Figura 105**). Mientras que, en la línea X55, los estreses abióticos no mostraron variaciones significativas en la producción de S-nitrosotioles totales en comparación con las plántulas control (**Figura 106**).

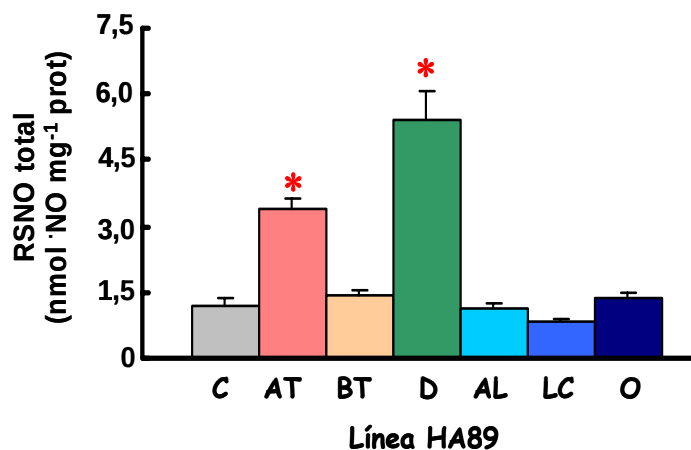


Figura 105. Análisis de S-nitrosotioles totales mediante quimioluminiscencia de ozono en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea HA89, control y sometidos a diferentes condiciones de estrés abiótico. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad. (*): $p < 0,05$.

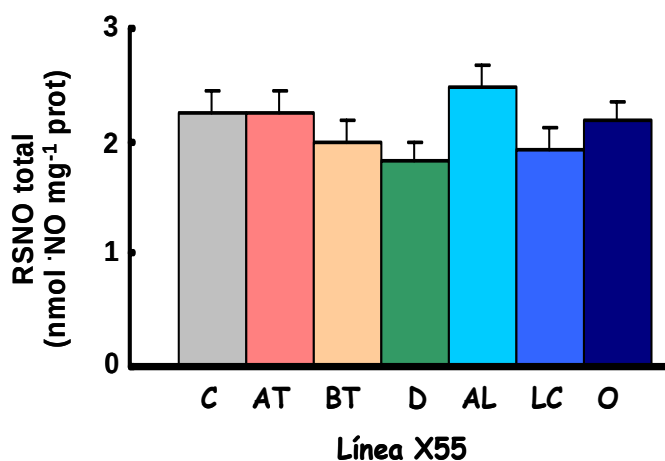


Figura 106. Análisis de S-nitrosotioles totales mediante quimioluminiscencia de ozono en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea X55, control y sometidos a diferentes condiciones de estrés abiótico. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad.

4.12.3. INMUNOLocalIZACIÓN DE S-NITROSOGLUTATION

La inmunolocalización de S-nitrosoglutation en hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55 se muestra en la **figura 107**. En plántulas control pertenecientes a la línea HA89 (Panel A) el inmunomarcaje frente a GSNO se localizó principalmente en epidermis y haces vasculares aunque también se detectó un ligero marcaje en células parenquimáticas. En la línea X55 (Panel D) el inmunomarcaje se detectó en epidermis, parénquima y haces vasculares. El tratamiento con alta temperatura o daño mecánico (4 horas) incrementó la intensidad del inmunomarcaje en las zonas anteriormente comentadas de la línea HA89 (Paneles B y C, respectivamente). Por el contrario, en la línea X55, el tratamiento con alta temperatura o daño mecánico (4 horas) no produjo modificaciones significativas en el inmunomarcaje frente a GSNO con respecto a las plántulas control (Paneles E y F, respectivamente).

4.12.4. EFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS ABIÓTICO SOBRE LA S-NITROSOGLUTATION REDUCTASA (GSNOR)

4.12.4.1. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en RNAm de *GSNOR*

Mediante PCR a tiempo real se analizó el efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre los niveles de RNA mensajero de la *GSNOR* en hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55.

En plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89, los niveles del transcrito de la *GSNOR* disminuyeron de forma significativa en los tratamientos con alta temperatura y daño mecánico (4 horas) (42% y 58%, respectivamente). En el resto de los tratamientos no se observaron diferencias significativas en comparación con las plántulas control (**Figura 108**).

Por otro lado, las diferentes condiciones de estrés abiótico señaladas anteriormente no afectaron de forma significativa los niveles de RNAm de la *GSNOR* en plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55 (**Figura 109**).

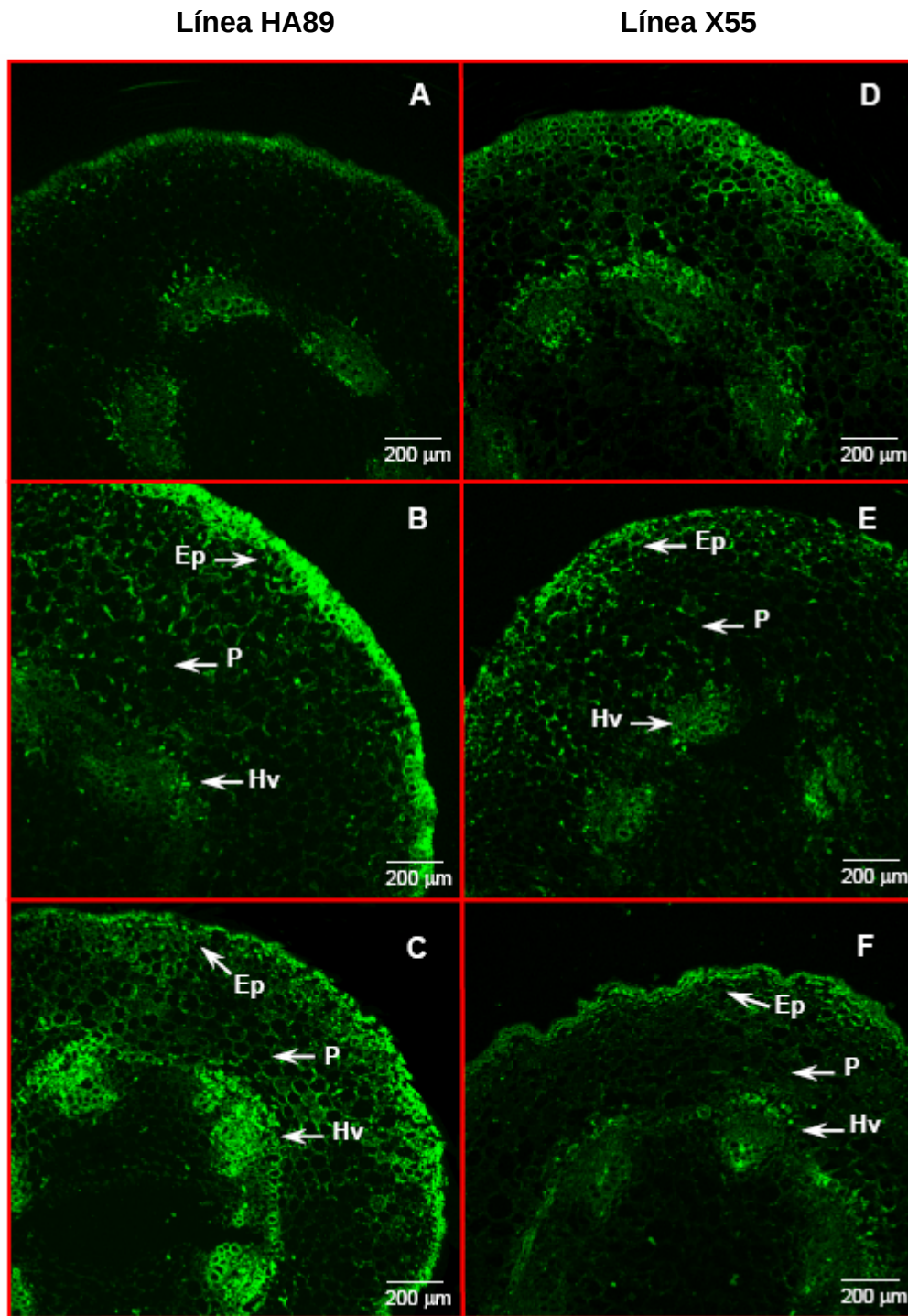


Figura 107. Inmunolocalización de GSNO en secciones de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55. En color verde: inmunomarcage del fluoróforo: **Paneles A, B y C:** línea HA89, plántulas control y plántulas sometidas a estrés por alta temperatura y daño mecánico (4 horas), respectivamente. **Paneles D, E y F:** línea X55, plántulas control y plántulas sometidas a estrés por alta temperatura y daño mecánico (4 horas), respectivamente. **Ep:** epidermis, **P:** parénquima y **Hv:** haces vasculares.

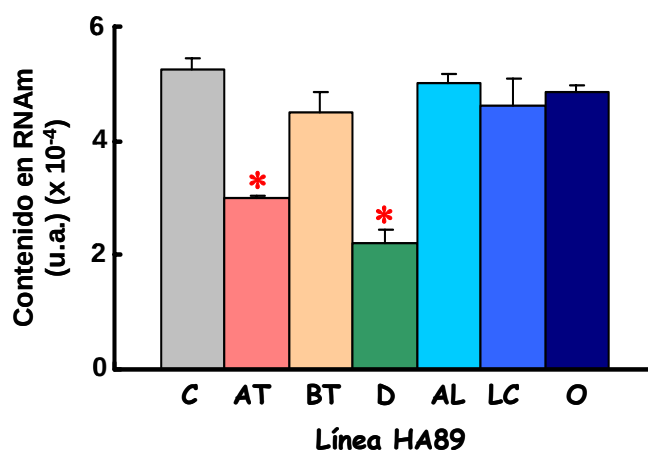


Figura 108. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en RNA mensajero de la *GSNOR* en hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea HA89, expresado en unidades arbitrarias (u.a.). Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad. (*): $p < 0,05$.

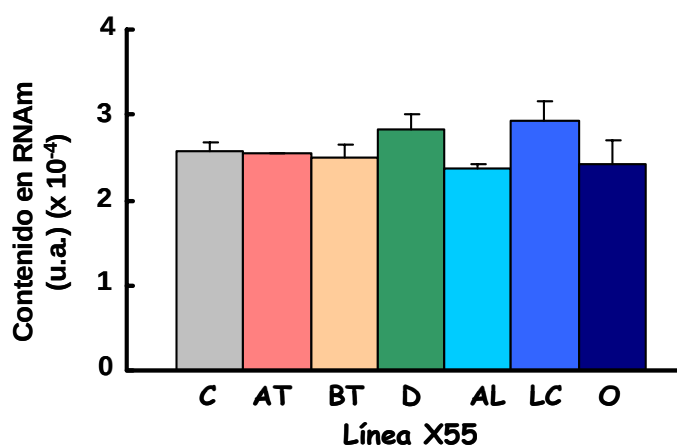


Figura 109. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en RNA mensajero de la *GSNOR* en hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea X55, expresado en unidades arbitrarias (u.a.). Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad.

4.12.4.2. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre la actividad S-nitrosoglutation reductasa (*GSNOR*)

4.12.4.2.1. Determinación de la actividad *GSNOR* por espectrofotometría

Se determinó la actividad *GSNOR* en homogeneizados de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55 tanto en plántulas control como en plántulas que habían estado sometidas a diferentes condiciones de estrés abiótico.

La actividad GSNOR se redujo en un 34% y 54% en plántulas de la línea HA89 sometidas a los tratamientos con alta temperatura y daño mecánico (4 horas), respectivamente. Por el contrario, el resto de los tratamientos no afectaron de forma significativa la actividad GSNOR (**Figura 110**).

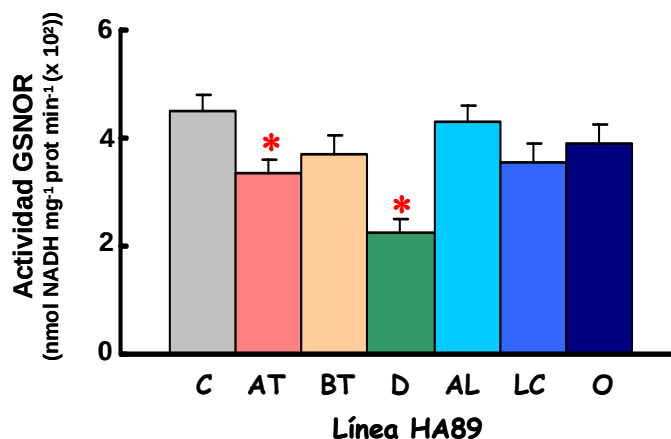


Figura 110. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre la actividad GSNOR determinada a nivel espectrofotométrico en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea HA89. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad. (*): $p < 0,05$.

En plántulas pertenecientes a la línea X55, los distintos estreses abióticos no produjeron variaciones significativas en la actividad GSNOR con respecto a las plántulas control (**Figura 111**).

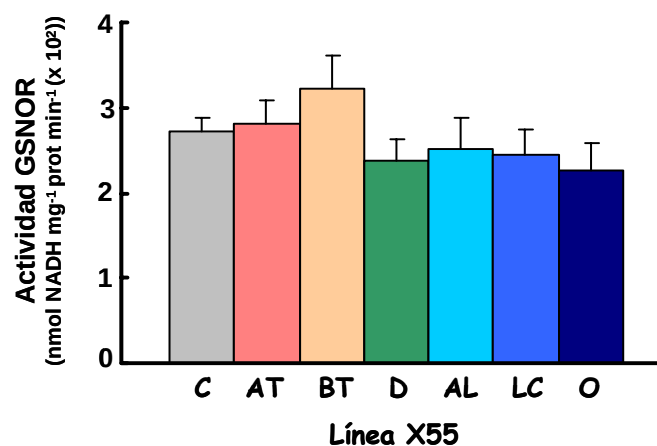


Figura 111. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre la actividad GSNOR determinada a nivel espectrofotométrico en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea X55. Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad.

4.12.4.2.2. Determinación de la actividad GSNOR en geles de poliacrilamida

El análisis de la actividad GSNOR en extractos crudos de hipocótilos de girasol se realizó tras la separación de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones nativas.

En plántulas pertenecientes a la línea HA89, los tratamientos con alta temperatura y daño mecánico (4 horas) redujeron la actividad GSNOR en un 45% y 55%, respectivamente. Mientras que, los tratamientos con baja temperatura, alta intensidad luminosa, luz continua u oscuridad no produjeron cambios significativos en comparación con las plántulas control (**Figura 112**).

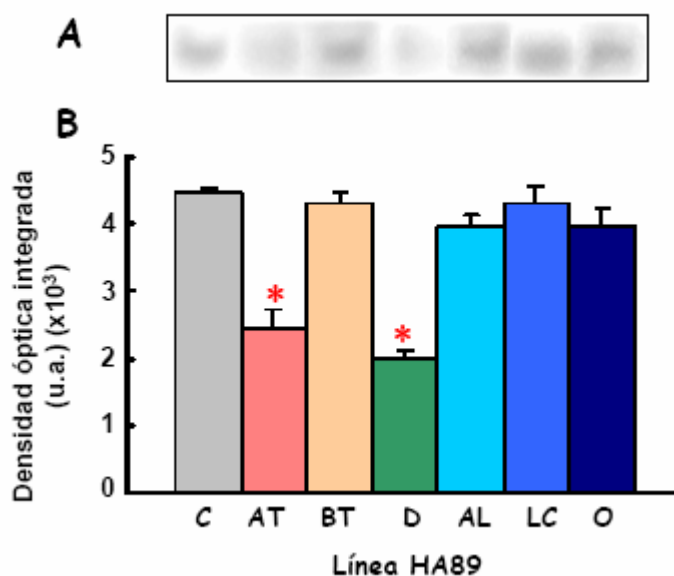


Figura 112. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre la actividad GSNOR en geles de poliacrilamida en condiciones nativas en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea HA89. **Panel A:** se cargaron 10 µg de proteínas por calle y se sometieron a electroforesis nativa, posteriormente los geles se revelaron para la detección de la actividad. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.). Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad. (*): $p < 0,05$.

En plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55, sometidas a los estreses abióticos señalados anteriormente no se detectaron variaciones significativas en la actividad GSNOR (**Figura 113**).

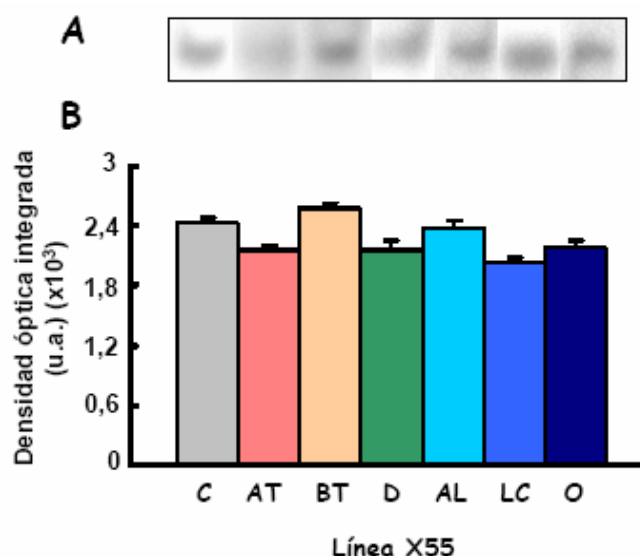


Figura 113. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre la actividad GSNOR en geles de poliacrilamida en condiciones nativas en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea X55. **Panel A:** se cargaron 10 μ g de proteínas por calle y se sometieron a electroforesis nativa, posteriormente los geles se revelaron para la detección de la actividad. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.). Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad.

4.12.4.3. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína S-nitrosoglutation reductasa

Se analizó mediante western blot el efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína GSNOR en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55.

En la línea HA89, el contenido en proteína GSNOR disminuyó en plántulas sometidas a los estreses por alta temperatura o daño mecánico, siendo esta reducción de un 37,5% y 65%, respectivamente. El resto de los estreses no afectaron de forma significativa el contenido en proteína GSNOR (**Figura 114**).

Mientras que, en la línea X55 las diferentes condiciones de estrés abiótico estudiadas no mostraron diferencias significativas en los niveles de proteína GSNOR con respecto a las plántulas control (**Figura 115**).

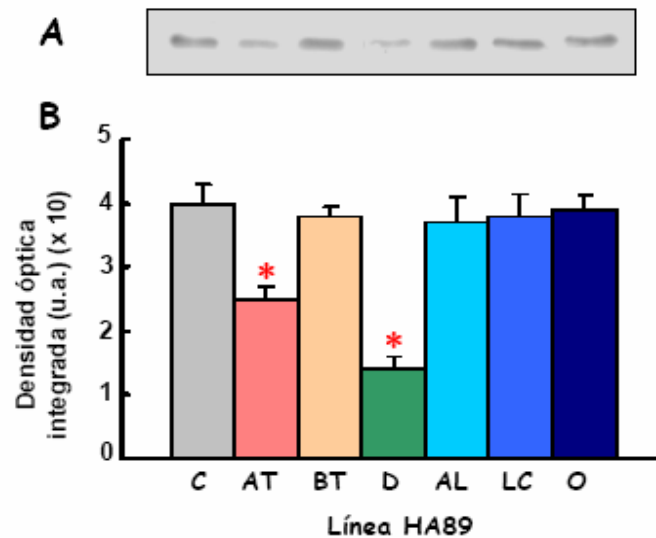


Figura 114. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína GSNOR en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89. **Panel A:** muestras conteniendo 20 μ g de proteínas se sometieron a SDS-PAGE, posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la GSNOR diluido 1/50. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.). Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad. (*): $p < 0,05$.

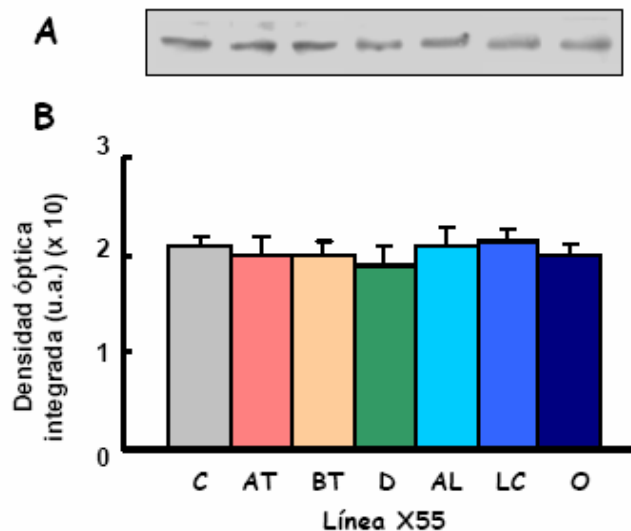


Figura 115. Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína GSNOR en extractos crudos de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55. **Panel A:** muestras conteniendo 20 μ g de proteínas se sometieron a SDS-PAGE, posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo policlonal frente a la GSNOR diluido 1/50. **Panel B:** densitometrado de las bandas observadas en el panel A usando el programa TotalLab v1.11, expresado en unidades arbitrarias (u.a.). Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. **C:** control, **AT:** alta temperatura, **BT:** baja temperatura, **D:** daño de los hipocótilos y recogida del material a las 4 horas, **AL:** alta intensidad luminosa, **LC:** luz continua y **O:** oscuridad.

4.12.4.4. Detección de la GSNOR mediante microscopía láser confocal

La inmunolocalización de la S-nitrosoglutation reductasa en secciones de hipocótilos de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55 se muestra en la **figura 116**. En plántulas control pertenecientes a las líneas HA89 y X55 (Paneles A y D, respectivamente) la GSNOR se inmunolocalizaba fundamentalmente en células parenquimáticas y haces vasculares. En el tratamiento con alta temperatura el inmunomarcaje frente a GSNOR desaparecía en células parenquimáticas y redujo en haces vasculares de plántulas pertenecientes a la línea HA89 (Panel B), mientras que, el daño mecánico (4 horas) redujo la intensidad de inmunomarcaje tanto en células parenquimáticas como en haces vasculares de la misma líneas (Panel C). En plántulas pertenecientes a la línea X55, no se observó diferencias significativas con el tratamiento por alta temperatura o daño mecánico (Paneles E y F, respectivamente).

4.12.5. EFECTO DE cPTIO SOBRE EL CONTENIDO EN RNAm DE *GSNOR* Y *Ha-PR5*

Mediante PCR a tiempo real se analizaron el efecto de cPTIO (secuestrador de NO) sobre los niveles de RNA mensajero de *GSNOR* y *Ha-PR5* en hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55 sin tratamiento (**Figura 117**). Los niveles del transcrito de la *GSNOR* incrementaron tanto con 0,1 μ M como con 1 μ M de cPTIO, mientras que, los niveles del transcrito de *Ha-PR5* se incrementaron sólo en presencia de 1 μ M de cPTIO.

4.12.6. DETECCIÓN DE 3-NITROTIROSINA MEDIANTE MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL

La inmunolocalización de 3-nitrotirosina en cortes de hipocótilos de girasol se muestra en la **figura 118**. En plántulas control la n-Tyr se inmunolocalizaba fundamentalmente en epidermis, parénquima y haces vasculares de las líneas HA89 y X55 (Paneles A y D, respectivamente) siendo en esta última el marcaje es más intenso. En la línea HA89, el estrés por alta temperatura o daño mecánico (4 horas) (Paneles B y C, respectivamente) ocasionó un incremento extensivo en la intensidad del inmunomarcaje en todas las zonas anteriormente comentadas. Sin embargo, en la línea X55, los tratamientos descritos anteriormente no ocasionaron variaciones significativas en el inmunomarcaje frente a n-Tyr (Paneles E y F).

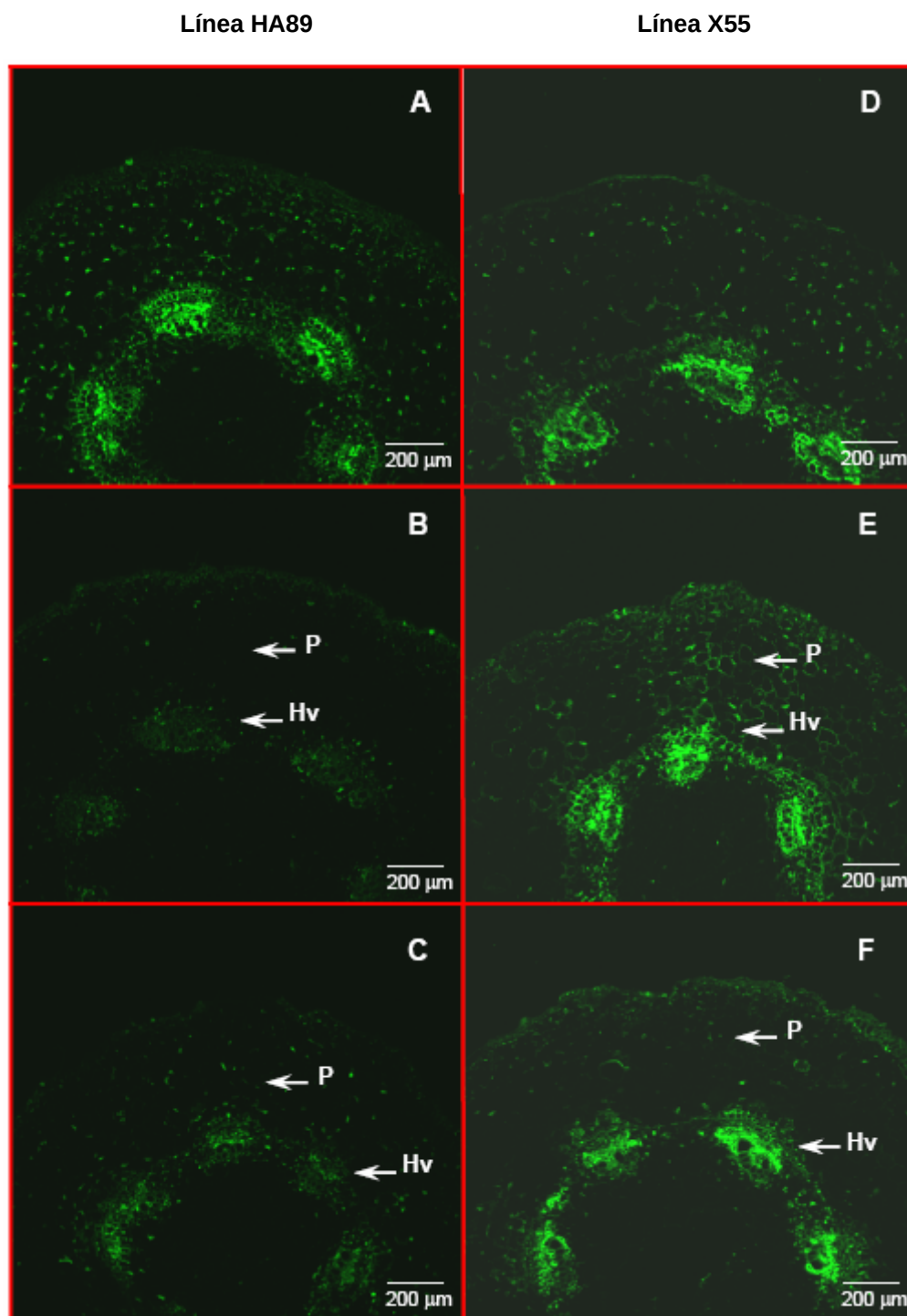


Figura 116. Inmunolocalización de la GSNOR en secciones de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55. En color verde: inmunomarcaje del fluoróforo: **Paneles A, B y C:** línea HA89, plántulas control y plántulas sometidas a estrés por alta temperatura y daño mecánico (4 horas), respectivamente. **Paneles D, E y F:** línea X55, plántulas control y plántulas sometidas a estrés por alta temperatura y daño mecánico (4 horas), respectivamente. **P:** parénquima y **Hv:** haces vasculares.

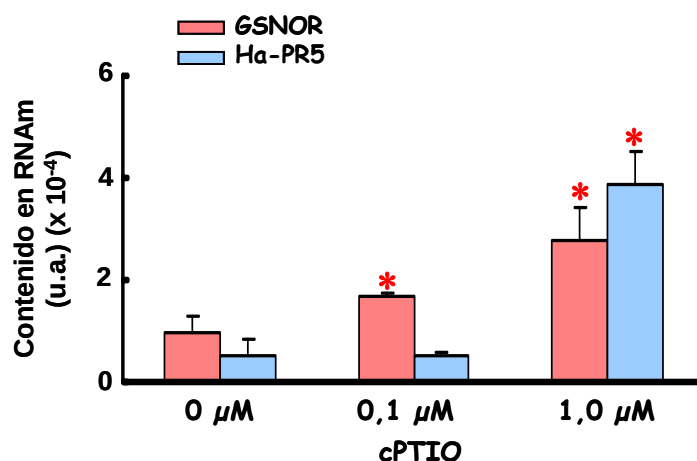


Figura 117: Efecto de diferentes concentraciones de cPTIO sobre el contenido en RNA mensajero de GSNOR y Ha-PR5 en hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55 sin tratamiento, expresado en unidades arbitrarias (u.a.). Cada valor representa la media de $\pm$ EEM de al menos tres réplicas. (*): $p < 0,05$.

4.12.7. INMUNOLocalIZACIÓN SUBCELULAR MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE S-NITROSOGLUTATION Y S-NITROSOGLUTATION REDUCTASA

Se estudió la localización subcelular de GSNO y GSNOR en cortes de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55 sin tratamiento mediante microscopía electrónica de transmisión.

4.12.7.1. Inmunolocalización de S-nitrosoglutation

La inmunolocalización de GSNO en cortes de hipocótilos de la línea X55 sin tratamiento se muestra en la **figura 119**. El inmunomarcaje frente a GSNO se detectó fundamentalmente en mitocondria, peroxisoma, citosol, pared celular y lamina media (Paneles A y B).

4.12.7.2. Inmunolocalización de S-nitrosoglutation reductasa

La inmunolocalización de la S-nitrosoglutation reductasa en hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55 sin tratamiento se muestra en la **figura 120**. La GSNOR se detectó principalmente en peroxisoma, mitocondria y proplastidio (Paneles A, B y C).

En ambos casos se hicieron controles negativos usando suero preimmune no obteniéndose ningún marcaje significativo.

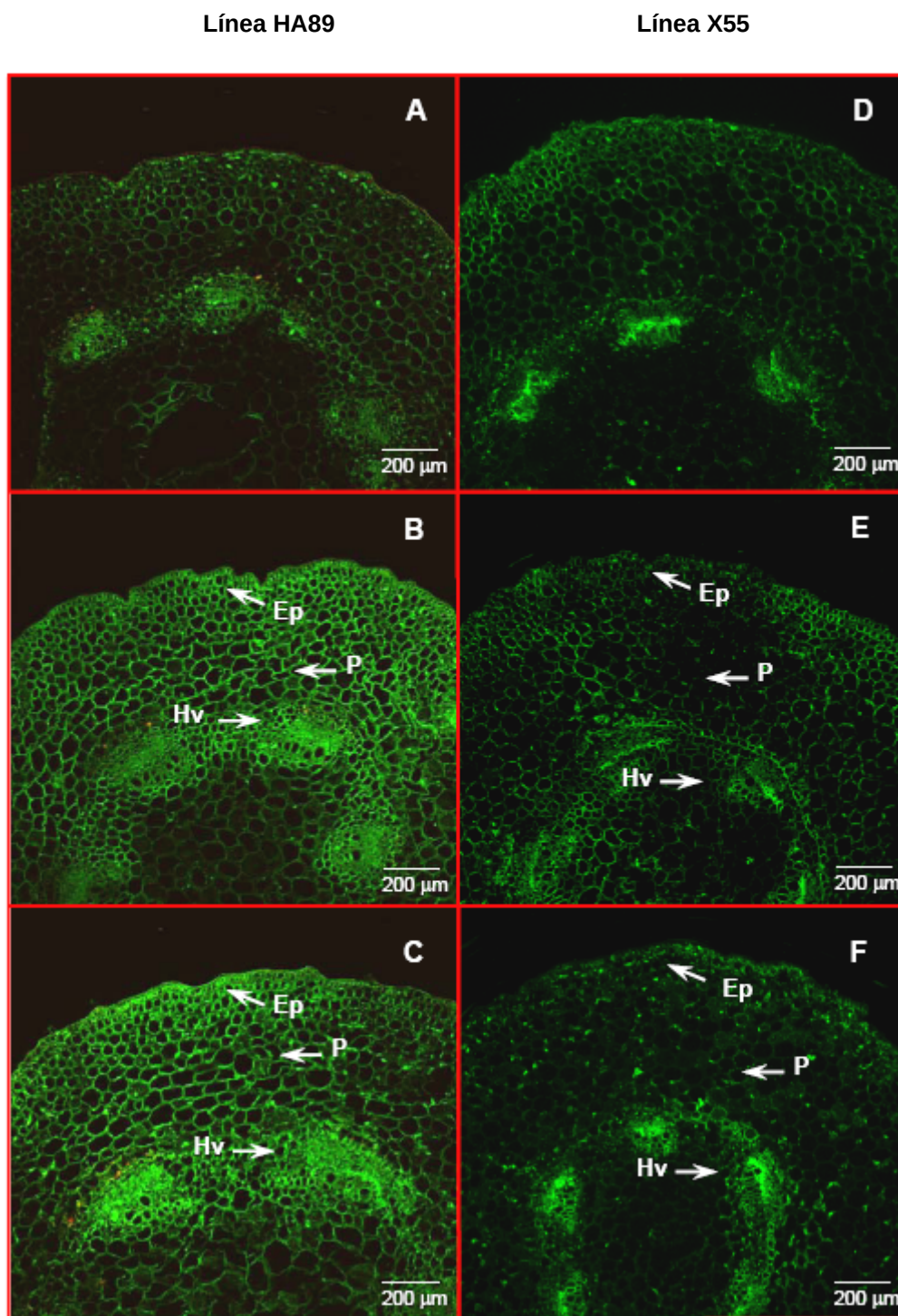


Figura 118. Inmunolocalización de n-Tyr en secciones de hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a las líneas HA89 y X55. En color verde: inmunomarcage del fluoróforo: **Paneles A, B y C:** línea HA89, plántulas control y plántulas sometidas a estrés por alta temperatura y daño mecánico (4 horas), respectivamente. **Paneles D, E y F:** línea X55, plántulas control y plántulas sometidas a estrés por alta temperatura y daño mecánico (4 horas), respectivamente. **Ep:** epidermis, **P:** parénquima y **Hv:** haces vasculares.

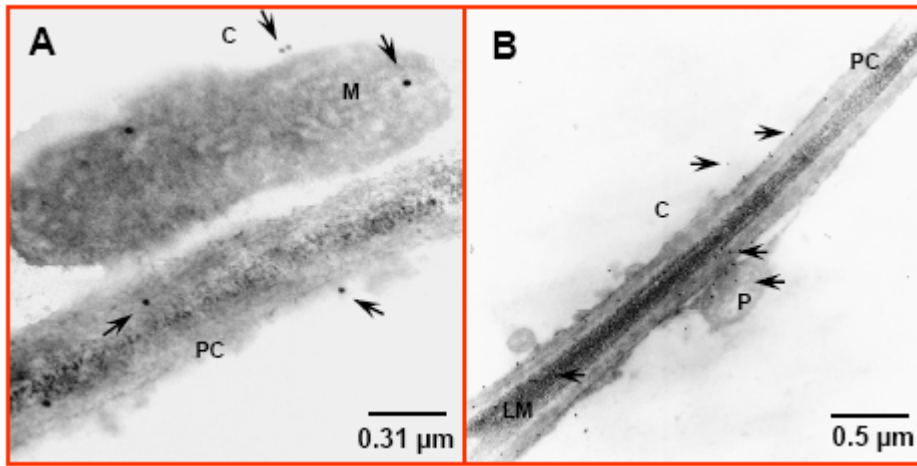


Figura 119. Inmumolocalización de GSNO en hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea X55 sin tratamiento. **M:** mitocondria, **P:** peroxisoma, **C:** citosol, **PC:** pared celular y **LM:** lamina media. Las flechas indican la posición de las partículas de oro coloidal.

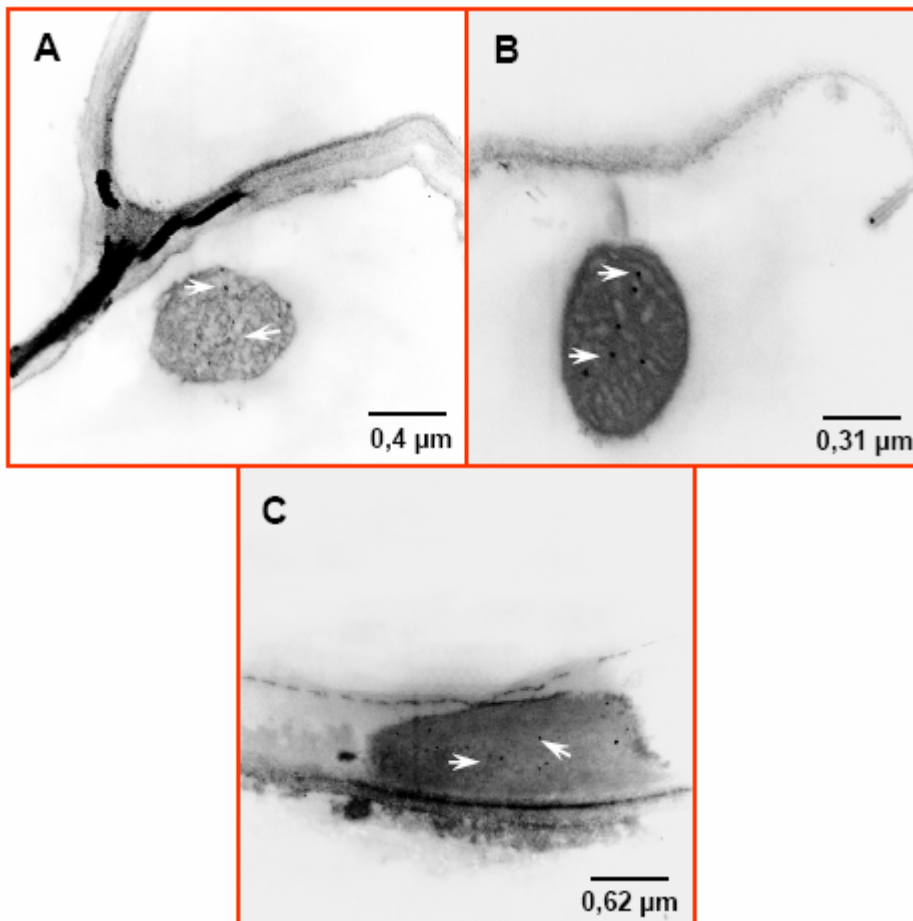


Figura 120. Inmumolocalización de la GSNOR en hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea X55 sin tratamiento. **Panel A:** peroxisoma, **Panel B:** mitocondria y **Panel C:** proplastidio. Las flechas indican la posición de las partículas de oro coloidal.

DISCUSIÓN

El objetivo principal del trabajo que se presenta en esta Memoria Doctoral ha consistido en el estudio de la posible implicación de las especies de nitrógeno reactivo (RNS) tanto en la inducción de daños celulares, sino también en procesos de transducción de señales, en respuesta al estrés generado tras la inoculación por el hongo biotrofo *Plasmopara halstedii* en hipocótilos de plántulas de girasol con diferente susceptibilidad al patógeno. Paralelamente, se ha estudiado la implicación de NO y otras RNS como el S-nitrosoglutation y S-nitrosotioles, como componentes relevantes del fenómeno de estrés nitrosativo, en el mecanismo de daño celular producido por diferentes situaciones de estrés abiótico, como alta y baja temperatura, daño mecánico, alta intensidad luminosa, luz continua y oscuridad. El análisis conjunto de estas situaciones permitirá definir y caracterizar patrones de comportamiento de las principales especies de oxígeno y nitrógeno reactivo (RONS) frente a procesos de estrés biótico y abiótico.

Estudio de la interacción girasol-mildiu

El mildiu es una de las principales enfermedades de los cultivos de girasol en los que causan pérdidas enormes (Brahm *et al.*, 2000). La interacción entre *Helianthus annuus* y el hongo biotrofo *Plasmopara halstedii* es un modelo ampliamente estudiado. El desarrollo del hongo *P. halstedii* en plántulas de girasol sensible (HA89) y resistente (X55) ha sido descrito por varios autores (Viranyi y Mohamed, 1985; Mouzeyar *et al.*, 1993; Radwan *et al.*, 2005). El hongo se localiza principalmente en raíces y en el área de transición entre raíces e hipocótilo de las plántulas. En plantas sensibles, Mouzeyar *et al.* (1993) observaron una colonización sistémica a la que la planta reacciona con una producción débil de calosa y lignina, mientras que, en hipocótilos de plántulas resistentes se ha observado una reacción hipersensible con división celular alrededor del parásito, seguido de lignificación y desarrollo de zonas necróticas que aíslan al hongo impidiendo su desarrollo y propagación, esta reacción se ha detectado en todas las interacciones incompatibles analizadas (Mouzeyar *et al.*, 1994; Radwan *et al.*, 2005).

En esta memoria se han usado dos líneas de girasol HA89 y X55, sensible y resistente al hongo biotrofo *P. halstedii*, respectivamente (Roldán-Serrano *et al.*, 2007). La inoculación por *P. halstedii* provoca una reducción significativa en el tamaño y el peso, tanto del hipocótilo como de la plántula entera de la variedad sensible (HA89), debido a la incapacidad de la planta para activar los mecanismos de defensa, por el contrario, en plántulas resistentes no produjo cambios significativos en la biomasa vegetal.

Inducción de genes de defensa frente a *P. halstedii*

La inoculación por *P. halstedii* incrementó los niveles del transcrito de la quitinasa en hipocótilos de plántulas de girasol sensible (HA89) y resistente (X55). Se ha descrito que en la interacción incompatible los niveles de RNAm de quitinasa se inducen de forma rápida tras la inoculación, probablemente debido al reconocimiento del patógeno por la planta (Mazeyrat *et al.*, 1999). De hecho, la actividad quitinasa aumentó en hipocótilos de plántulas de girasol inoculadas por *P. halstedii* antes en la interacción incompatible que en la interacción compatible (Cachinero *et al.*, 1996). Se ha descrito que el desarrollo de la actividad quitinasa en la variedad sensible (HA89) inoculada por *P. halstedii* no es una respuesta de defensa sino una consecuencia de la alteración del metabolismo de la planta inoculada (Roldán Serrano *et al.*, 2007).

Los genes relacionados con la patogénesis (genes *PR*) son genes que codifican un amplio y complejo grupo de proteínas intra y extracelulares que se acumulan en los tejidos de la planta tras el ataque del patógeno o bajo determinadas condiciones de estrés abiótico (Van Loon, 1985). Estos genes se han clasificado en varios grupos atendiendo a sus propiedades bioquímicas e inmunológicas (Kombrink y Somssich, 1997). Se detectaron por primera vez a principios de los años 70 (Van Loon y Van Kammen, 1970), concretamente en los estudios realizados sobre la infección de tabaco con el virus del mosaico del tabaco (MTV), y tienen en común una serie de características fisicoquímicas que ayudan a su detección y aislamiento (Stintzi *et al.*, 1993). Los genes *PR* tienen una gran estabilidad a pHs ácidos y son relativamente resistentes a la acción de enzimas proteolíticas, tanto de origen endógeno como exógeno, lo que supone que, probablemente, estén sometidos a un bajo nivel de recambio.

En este trabajo se han estudiado los niveles del transcrito del gen *Ha-PR5*, que codifica una proteína con actividad antifúngica. En la interacción planta-patógeno, se ha visto que la inducción de los genes *PR* esta relacionada con la sensibilidad de la planta al patógeno (Linthorst, 1991). La inoculación con el hongo biotrofo *P. halstedii* incrementó los niveles del transcrito de *Ha-PR5* en hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la variedad resistente (X55). Sin embargo, en la variedad sensible (HA89) los niveles del transcrito fueron indetectables tanto en plántulas control como en plántulas inoculadas. Resultados similares han sido obtenidos en hipocótilos de la variedad resistente de girasol (QIR8) inoculada por *P. halstedii*, donde los niveles del transcrito de *Ha-PR5* alcanzaron su máximo a los 9 días tras la inoculación, sin embargo, en las plántulas sensibles (CAY), la activación del gen apareció a las 12 días tras la inoculación (Radwan *et al.*, 2005). La expresión diferencial de los genes de defensa durante las interacciones compatibles e

incompatibles planta-patógeno ha sido observada por diversos autores (Hammond-Kosak y Jones, 1996; Knogge, 1996).

Inducción de estrés oxidativo en plántulas de girasol sometidas a situaciones de estrés biótico y abiótico

Las especies de oxígeno reactivo, principalmente el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido desempeñan un doble papel. Cuando se generan en exceso producen un daño oxidativo, sin embargo, a niveles moderados activan las defensas de la planta, favoreciendo su adaptación a diferentes situaciones de estrés. La toxicidad de H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ se atribuye a su capacidad de iniciar cascadas de reacciones que producen radicales hidroxilo y otras especies destructivas como peróxidos lipídicos (Noctor y Foyer, 1998). Las especies de oxígeno reactivo también pueden actuar como moléculas mensajeras en la vía de transducción de señales celulares (Saran y Bors, 1989; Levine *et al.*, 1994; Prasad *et al.*, 1994; del Río *et al.*, 1996; Karpinski *et al.*, 1997).

En hipocótilos de plántulas de girasol, el hongo biotrofo *Plasmopara halstedii* indujo un incremento significativo en los niveles de H_2O_2 en las variedades sensible (HA89) y resistente (X55) a la inoculación, lo cual indica la generación de un fenómeno de estrés oxidativo mediado por ROS, probablemente, debido a que la tasa de producción de éstas supera su velocidad de eliminación por los sistemas antioxidantes. Mellersh *et al.* (2002) han demostrado que la generación localizada de H_2O_2 es una de las primeras respuestas de defensa detectadas a nivel de la pared celular de la planta frente a la penetración del hongo. La producción de H_2O_2 ha sido detectada en la interacción compatible del virus del moteado clorótico de girasol (SuCMoV) con girasol (Arias *et al.*, 2005), y del mildiu con cebada (Thordal-Christensen *et al.*, 1997), también se detectó tanto en la interacción compatible de lechuga con *Pseudomonas syringae* (Bestwick *et al.*, 1997, 1998) como en la interacción incompatible (Hammond-Kosack y Jones, 1996). Mediante microscopía láser confocal se ha corroborado que *P. halstedii* provoca un aumento en los niveles de ROS en las dos variedades de girasol, en la variedad sensible (HA89) el marcaje se localizó en células parenquimáticas y haces vasculares, mientras que, en la variedad resistente (X55) se localizó en epidermis, cortex y haces vasculares. Se ha descrito que durante la interacción incompatible, la generación de ROS participa en el desarrollo de la respuesta de hipersensibilidad (Levine *et al.*, 1994), también induce la resistencia sistémica adquirida (SAR) en plantas de *Arabidopsis* inoculadas con *Pseudomonas syringae* (Alvarez *et al.*, 1998). Sin embargo, no está claro como participa en la interacción compatible planta-patógeno. Además, en esta memoria se ha detectado un aumento en los niveles del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en la variedad sensible (HA89) inoculada por *Plasmopara halstedii* a pesar

del incremento observado tanto en los niveles de la Cu/Zn-SOD como en la expresión del transcrito de la *Mn-SOD* en estas plantas que, probablemente, fueron insuficientes para controlarlo, debido a las mayores cantidades generadas con el estrés, mientras que, en la variedad resistente (X55) no se observaron cambios en los niveles del $O_2^{\cdot-}$ tras la inoculación por *P. halstedii*, debido a que estos podrían estar controlados por los niveles del transcrito de la *Mn-SOD*. Resultados opuestos se han observado en patata, donde el $O_2^{\cdot-}$ sólo se genera durante la interacción incompatible con *Phytophthora infestans* (Doke, 1983).

Los hidroperóxidos lipídicos son los primeros productos de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, por lo que también son utilizados como indicadores de estrés oxidativo. La peroxidación lipídica en las membranas biológicas puede afectar severamente a la funcionalidad e integridad de las mismas (Bhaumik *et al.*, 1995), y puede producir daños celulares irreversibles. La peroxidación lipídica puede iniciarse por especies de oxígeno reactivo como el $O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$ y 1O_2 , o por acción de la lipoxigenasa (Halliwell y Gutteridge, 2000).

Entre las diferentes situaciones de estrés abiótico analizadas, los tratamientos con alta temperatura y alta intensidad luminosa incrementaron los niveles de hidroperóxidos lipídicos en hipocótilos de plántulas pertenecientes a ambas líneas de girasol, mientras que, el daño mecánico sólo incrementó los niveles de hidroperóxidos lipídicos en hipocótilos de plántulas pertenecientes a la línea HA89. En el resto de estreses no se produjeron cambios significativos en los niveles de hidroperóxidos lipídicos con respecto al control. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores que detectaron peroxidación lipídica en plantas sometidas a estreses por alta temperatura y alta intensidad luminosa (Mishra y Singhal, 1992; Davidson y Schiestl, 2001; Larkindale y Knight, 2002; Vacca *et al.*, 2004; Gechev *et al.*, 2002). En plantas de guisante, se ha visto que la alta temperatura, la alta intensidad luminosa y las heridas mecánicas producen un estrés oxidativo por la inducción de un desequilibrio en los sistemas antioxidantes (Sandalio *et al.*, 2001; Leterrier *et al.*, 2004).

La inoculación por el hongo biotrofo Plasmopara halstedii provoca alteraciones en la defensa antioxidante de hipocótilos de plántulas de girasol

El control preciso de los niveles de ROS se lleva a cabo, en células vegetales, mediante una compleja cadena de metabolitos y enzimas antioxidantes con propiedades redox, entre las que se destacan diferentes isoformas de superóxido dismutasa (SOD), catalasa, enzimas del ciclo ascorbato-glutation y deshidrogenasas dependientes de NADP.

Las SODs y la catalasa son las enzimas antioxidantes más efectivas en la prevención del daño celular (Scandalios, 1993), aunque ciertos autores también incluyen en

este grupo a la enzima ascorbato peroxidasa (APX) (Asada, 1999) e incluso la señalan como la más importante en la detoxificación de H_2O_2 (Benavides *et al.*, 2000), puesto que su afinidad hacia el peróxido de hidrógeno es mayor que la de la catalasa (Asada, 1992). En hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la variedad sensible (HA89) se produjo un incremento en los niveles de proteína Cu/Zn-SOD y de la expresión del transcrito de la *Mn-SOD* tras la inoculación por *P. halstedii*. El aumento de las dos isoformas de la SOD podría ser inducido por el aumento de los niveles de aniones superóxido observado en esta variedad. Este incremento en las SODs se interpreta como un mecanismo de defensa frente al estrés oxidativo causado por el patógeno. En la variedad resistente (X55), sólo el nivel del transcrito de la *Mn-SOD* aumentó tras la inoculación, probablemente ésta sea la enzima clave en la activación de la respuesta hipersensible en esta variedad. Sin embargo, otros autores han propuesto a la Cu/Zn-SOD como una enzima clave en la activación de la respuesta hipersensible en la resistencia al ataque del patógeno (Delledonne *et al.*, 2001; Beers y McDowell, 2001).

La catalasa es la principal enzima secuestradora de peróxido de hidrógeno de los peroxisomas vegetales (Willenkens *et al.*, 1997; Corpas *et al.*, 1999). Además, tiene un papel importante en la respuesta de defensa frente a un amplio rango de patógenos (Yi *et al.*, 1999). El contenido en proteína catalasa aumentó en la variedad sensible (HA89) tras la inoculación por *P. halstedii*, este incremento es debido a la sobreproducción de H_2O_2 observado en hipocótilos de estas plántulas. La catalasa posee una gran relevancia entre los mecanismos de defensa de la variedad sensible (HA89), sugiriendo su incremento tras la inoculación la participación de los peroxisomas en la respuesta de plántulas de girasol a la inoculación por *P. halstedii*. Resultados similares se obtuvieron durante la interacción compatible del virus del mosaico del pepino con pepino (Riedle-Bauer, 2000), del virus amarillo del calabacín con calabacín (Riedle-Bauer, 2000) y del virus del moteado clorótico del girasol con girasol (Arias *et al.*, 2005). Sin embargo, en la variedad resistente (X55) los niveles de la catalasa no variaron tras la inoculación por *P. halstedii*.

El ciclo ascorbato-glutation constituye uno de los principales sistemas de detoxificación de peróxido de hidrógeno en distintos compartimentos celulares y está compuesto básicamente por las enzimas APX, MDAR, DHAR y GR.

En la variedad sensible (HA89) los niveles de la ascorbato peroxidasa (APX) disminuyeron tras la inoculación por *P. halstedii*, probablemente debido a que la detoxificación de H_2O_2 en esta situación está sustentada fundamentalmente por la catalasa. No obstante, otros autores han observado resultados opuestos durante la interacción compatible del virus del mosaico de pepino con pepino (Riedle-Bauer, 2000) y del virus del moteado clorótico del girasol con girasol (Arias *et al.*, 2005). Mientras que, los niveles de la

monodeshidroascorbato reductasa (MDAR) incrementaron tras la inoculación. La elevación de los niveles de la MDAR responde a la necesidad de las células de mantener el ascorbato en su forma reducida.

En la variedad resistente (X55), los niveles de proteína APX incrementaron tras la inoculación por *P. halstedii*, ya que la respuesta hipersensible esta acompañada de un incremento en la producción de ROS, probablemente la finalidad del aumento en la APX sea descomponer el exceso de H_2O_2 generado para compensar la ausencia de modulación de la catalasa en esta situación. Resultados similares se obtuvieron durante la respuesta hipersensible de plantas de tabaco infectadas con el virus del mosaico del tabaco en los que los niveles del transcrito de la APX citosólica aumentaron (Mittler *et al.*, 1999). Mientras que, en esta variedad el contenido en proteína MDAR se redujo tras la inoculación. Otros trabajos han mostrado un incremento en la actividad MDAR, aunque sólo en la primera etapa de la interacción planta-patógeno, suprimiéndose posteriormente la actividad de esta enzima con la aparición de los síntomas de la enfermedad (Kuoźniak y Skłodowska, 2005).

Finalmente, los niveles de la glutathion reductasa (GR) no variaron tras la inoculación en ninguna de las dos líneas de girasol. Las diferencias en la respuesta de estas tres enzimas del ciclo ascorbato-glutathion parecen indicar una regulación diferencial de estas enzimas antioxidantes según el tipo de interacción analizada.

Las peroxirredoxinas (Prx) son una familia de proteínas con actividad peroxidasa que utilizan residuos de cisteína como elementos catalíticos y cuyo donador de electrones es normalmente la tioredoxina. Las peroxidases tienen un papel importante en la regulación de la concentración de ROS en la célula a través de activación y desactivación de H_2O_2 (Elstner, 1987). Mediante western blot se detectó un incremento en los niveles de proteína Prx en la variedad sensible (HA89) inoculada, este incremento podría responder al aumento en el contenido de H_2O_2 que se detectó en esta variedad tras la inoculación por *P. halstedii*. Aunque el H_2O_2 normalmente es degradado por la APX o la catalasa, la Prx representa una peroxidasa alternativa que participa en la defensa frente al estrés oxidativo generado por *Plasmopara halstedii*. Por el contrario, en la variedad resistente (X55) inoculada, el contenido en proteína Prx se redujo, posiblemente debido a que el peróxido de hidrógeno generado es eliminado por la enzima APX, aumentada en esta variedad.

En los últimos años se ha hecho cada vez más evidente la naturaleza antioxidante de las deshidrogenasas dependientes de NADP, debido a su función de reciclaje del NADPH, lo que es esencial para la operatividad del ciclo ascorbato-glutathion (Noctor y Foyer, 1998). Mediante western blot se ha estudiado en hipocótilos de plántulas de girasol los niveles de proteína de los tres sistemas generadores de NADPH. En la variedad sensible (HA89) inoculada por *P. halstedii* los niveles de proteína enzima málico (EM) incrementaron,

mientras que, los niveles de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) e isocitrato deshidrogenasa (ICDH) no cambiaron, y en la variedad resistente (X55) inoculada, el contenido en proteína G6PDH se redujo tras la inoculación, sin embargo, los niveles de EM e ICDH aumentaron. Las diferencias en la respuesta de G6PDH, EM e ICDH parecen indicar una regulación diferencial de estas enzimas en respuesta a la inoculación por *P. halstedii*. La EM es, de las tres deshidrogenasas productoras de NADP estudiadas en esta memoria, la que presentó mayores niveles tras la inoculación en las dos variedades de girasol, lo que indica que esta enzima podría ser clave en la respuesta celular frente al estrés oxidativo causado por *Plasmopara halstedii*, siendo la enzima que aportaría la mayor parte del poder reductor. Schaaf *et al.* (1995) mostraron que las enzimas EM-NADP citosólica y plastídica incrementaban en respuesta al estrés por hongos.

Durante el estrés oxidativo se produce un aumento en la degradación de proteínas, por lo que la degradación de proteínas ha sido propuesta como un índice de estrés oxidativo. La exoproteasa leucina aminopeptidasa es una de las enzimas que participan en este proceso.

El análisis mediante western blot de la leucina aminopeptidasa (Leu-AP) reveló un tamaño molecular aparente de 55 kDa, lo cual está dentro del rango descrito en otras especies de plantas. El hongo biotrofo *P. halstedii* no produjo cambios en los niveles de proteína Leu-AP en ninguna de las dos variedades. Resultados opuestos se han observado en plantas de tomate donde la leucina aminopeptidasa se induce en respuesta a la inoculación por *Pseudomonas syringae* (Pautot *et al.*, 1993) lo que indica que, a diferencia de lo observado en tomate, en hipocótilos de girasol este sistema no representa un mecanismo relevante en la respuesta frente al patógeno.

Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína Cu/Zn-SOD y expresión de la Mn-SOD

Las superóxido dismutasas (SODs), que llevan a cabo la dismutación del anión superóxido con formación de peróxido de hidrógeno y oxígeno, son enzimas clave en la protección de las células frente al estrés oxidativo (Alscher *et al.*, 2002). La Cu/Zn-SOD es la isoforma más abundante en muchas especies de plantas (Asada *et al.*, 1980; Bridges y Salin, 1981; Schinkel *et al.*, 2001; Alscher *et al.*, 2002) y la única descrita hasta la fecha en plantas girasol (Corpas *et al.*, 1998). En este trabajo se observó como los niveles de proteína Cu/Zn-SOD incrementaron con el tratamiento por baja temperatura y alta intensidad luminosa en hipocótilos de ambas líneas de girasol, y con oscuridad en la línea HA89, este incremento en los niveles de la Cu/Zn-SOD podría tener como objetivo el secuestro del exceso de aniones superóxido generados como consecuencia de estos

estreses. Además, el aumento de la Cu/Zn-SOD podría ser inducido por el incremento de los niveles de hidroperóxidos lipídicos observados por alta intensidad luminosa en ambas líneas de girasol. Resultados similares fueron observados con baja temperatura en cultivo celular de mandioca (Shin *et al.*, 2005) y en plantas de garbanzo (Hernández-Nistal *et al.*, 2002). Por otro lado, la sobreexpresión de la Cu/Zn-SOD cloroplastídica en plantas transgénicas de tabaco mostró un incremento en la resistencia al estrés causado por alta intensidad luminosa y baja temperatura (Gupta *et al.*, 1993a, 1993b). Además, existen evidencias sobre la inducción de los genes que codifican la Cu/Zn-SOD citosólica en plantas sometidas a estrés por baja temperatura (Tsang *et al.*, 1991; Kaminaka *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999).

Por el contrario, los niveles de proteína Cu/Zn-SOD disminuyeron con el tratamiento por daño mecánico (4 y 8 horas) en ambas líneas de girasol, y con luz continua y oscuridad en la línea X55. Esta reducción en el contenido de proteína puede ser debida a la inhibición de esta enzima por el peróxido de hidrógeno (Kanematsu y Asada, 1994). Resultados diferentes han sido descritos con el estrés por luz o daño mecánico, en los que los niveles del transcrito de la Cu/Zn-SOD aumentan (Perl-Treves y Galun, 1991).

El estrés por alta temperatura no produjo cambios en los niveles de proteína Cu/Zn-SOD en ninguna de las dos líneas de girasol. Sin embargo, en plantas de mandioca, la Cu/Zn-SOD se induce con el choque térmico (Lee *et al.*, 1999), y en plantas de tabaco se induce con alta temperatura (Tsang *et al.*, 1991). No obstante, esta disparidad de resultados en la literatura podría ser debida a la especie de planta utilizada, al tiempo de exposición al estrés, o a la severidad del mismo.

En hipocótilos de plántulas de girasol se han identificado dos nuevos genes para dos superóxido dismutasas que contienen manganeso como metal prostético denominados *Mn-SOD1* y *Mn-SOD2*, que codifican para dos proteínas de 226 y 228 residuos de aminoácidos, respectivamente, las dos isoformas tienen una secuencia señal de partida de 14 residuos que las dirige a la mitocondria con una probabilidad de 81% y 95%, respectivamente. En ambas líneas de girasol la *Mn-SOD1* es la isoforma que tiene mayores niveles de expresión del transcrito y demostró una modulación significativa frente a todas las condiciones de estrés.

En plántulas pertenecientes a las dos líneas, los tratamientos con alta o baja temperatura, o daño mecánico (4 y 8 horas) redujeron los niveles del transcrito de la *Mn-SOD1*, mientras que, los niveles del transcrito de la *Mn-SOD2* incrementaron con el tratamiento por daño mecánico (4 horas) en la línea X55. Resultados similares se obtuvieron en mitocondrias de hojas de guisante, donde la actividad Mn-SOD se reduce con la senescencia (Jiménez *et al.*, 1998). Posiblemente esta reducción de la Mn-SOD sea debida

a la inactivación de la enzima en estos estreses como resultado de una modificación oxidativa de la proteína y/o su degradación proteolítica (del Río *et al.*, 2003). Durante la purificación de la Mn-SOD a partir de hojas de guisante, se ha encontrado que la enzima es sensible a la oxidación (Sevilla *et al.*, 1980a, 1982; Palma *et al.*, 1998), y en plantas de guisante sometidas a estrés oxidativo por cadmio, la proteína Mn-SOD se modificaba oxidativamente, siendo ésta probablemente la causa responsable de la reducción observada en su actividad (Romero-Puertas *et al.*, 2002).

Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína catalasa

La catalasa, que se localiza exclusivamente en peroxisomas (Corpas *et al.*, 1999), tiene un papel importante en la regulación de la concentración de ROS en las células a través de activación y inactivación de H_2O_2 (Elstner, 1987). La actividad catalasa se inhibe por el radical O_2^- (Kono y Fridovich, 1982; Shimizu *et al.*, 1984; Halliwell y Gutteridge, 2000), NO y peroxinitrito (Klessig *et al.*, 2000). El contenido en proteína catalasa aumentó en hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89 sometidas a tratamiento con baja temperatura, alta intensidad luminosa u oscuridad, y en plántulas pertenecientes a la línea X55 sometidas a tratamiento con baja temperatura, alta intensidad luminosa o luz continua. Un comportamiento similar se obtuvo en plántulas pertenecientes a la línea HA89 tras la inoculación por *P. halstedii*. Varios trabajos han descrito un aumento de la actividad catalasa en respuesta a una serie de estreses abióticos (McClung, 1997; Romero-Puertas *et al.*, 1999; Dat *et al.*, 2000; Sofo *et al.*, 2004). Este incremento en la actividad catalasa podría ser inducido por el aumento de la concentración de H_2O_2 que ocurre en plantas sometidas a estos estreses (Mittler, 2002; Karpinski *et al.*, 1997; O'Kane *et al.*, 1996). Resultados similares fueron observados en maíz y en tubérculo de patata sometidos a baja temperatura (Prasad, 1996, 1997; Reverberi *et al.*, 2001) y en hojas de guisante sometidas a estrés por alta intensidad luminosa (Leterrier *et al.*, 2007).

El daño mecánico no produjo variaciones en el contenido de proteína catalasa en ninguna de las dos líneas de girasol, por el contrario, en embrión inmaduro de maíz la expresión de los tres genes de catalasa y en las hojas la expresión de *cat1* y *cat3* aumentan con el daño, lo que demuestra que hay diferentes procesos de transducción de señales de respuesta al daño en embrión y en hojas de maíz (Guan y Scandalios, 2000).

Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína de enzimas del ciclo ascorbato-glutation

El análisis mediante western blot de extractos crudos de hipocótilos de girasol muestra que las enzimas del ciclo ascorbato-glutation responden a las diferentes

condiciones de estrés abiótico de forma diferencial. El tratamiento con alta temperatura incrementó los niveles de proteína APX en ambas líneas de girasol, este incremento podría ser inducido por el aumento observado en los niveles de hidroperóxidos lipídicos en estas condiciones. Mientras que, el tratamiento con baja temperatura o daño mecánico (4 y 8 horas) incrementó los niveles de proteína sólo en la línea HA89. El incremento de APX con daño mecánico (4 horas) probablemente sea debido a la sobreproducción de hidroperóxidos lipídicos detectados en esta línea.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en hojas de guisante en las que se detecta una sobreproducción del transcrito de la APX citosólica en estreses abióticos similares a los estudiados en esta memoria (Leterrier *et al.*, 2007), y en plántulas de pino silvestre, tubérculo de patata, y hojas de *Arabidopsis* sometidas a estrés por baja temperatura (Tao *et al.*, 1998; Mizuno *et al.*, 1998; Kubo *et al.*, 1999). Los niveles de los transcritos de las APX citosólica y peroxisomal aumentan con baja temperatura en plantas de arroz y *Arabidopsis*, respectivamente (Sato *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 1997). En el tratamiento con baja temperatura, la APX muestra una alta afinidad hacia el H₂O₂, por lo que el incremento de la APX observado en el tratamiento con baja temperatura puede formar parte del mecanismo de protección frente a H₂O₂.

En plantas de *Arabidopsis*, la APX citosólica (APX1) incrementa con alta temperatura, y se ha visto que en la región 5' de su promotor tiene un elemento de choque térmico (HSE) (Storozhenko *et al.*, 1998). También, en cebada y batata el gen APX1 se induce con alta temperatura (Shi *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2004), en guisante, los genes *cAPX* se inducen con alta temperatura (Mittler y Zilinskas, 1994). Además, en maíz, alfalfa y trigo la actividad APX incrementa con alta temperatura (Gong *et al.*, 1998; Almeselmani *et al.*, 2006). Se ha descrito que la alta temperatura causa un daño oxidativo en plantas (Dat *et al.*, 1998a, 1998b, Gong *et al.*, 1998; Larkindale y Knight, 2002), por lo que, probablemente, la APX podría estar implicada en limitar este daño oxidativo.

En plantas de tomate Orozco-Cárdenas *et al.* (2001) han descrito que el peróxido de hidrógeno actúa como segundo mensajero en la inducción de genes de defensa en respuesta a las heridas. El incremento de los niveles de proteína APX que cataliza la eliminación de H₂O₂ podría indicar la implicación de esta ROS en la inducción de la misma. En este sentido, en batata, el nivel de expresión del gen *swAPX1* incrementa con el estrés por heridas (Park *et al.*, 2004) y en hojas de *Arabidopsis* la APX citosólica se induce en plantas sometidas a estrés por heridas (Chang *et al.*, 2004).

En la línea X55, el contenido en proteína APX se redujo con luz continua. Por el contrario, se ha demostrado que el estrés por luz incrementa la actividad APX en tabaco (Gechev *et al.*, 2003), y en *Arabidopsis* el nivel del transcrito de APX peroxisomal aumenta con luz ultra violeta (Zhang *et al.*, 1997).

El tratamiento con alta intensidad luminosa no produjo variaciones en los niveles de proteína APX en ninguna de las dos líneas de girasol, probablemente debido a que el H₂O₂ generado durante el estrés era eliminado por la catalasa, cuyos niveles están aumentados en este estrés. Resultados similares se obtuvieron en hojas de *Arabidopsis* (Kubo *et al.*, 1999).

La APX es esencial para mantener el estado redox de ascorbato y glutatión (Foyer y Mullineaux, 1994). Además, es la principal enzima secuestradora de H₂O₂ en cloroplastos y citosol de células vegetales usando el ascorbato como donador de electrones para reducir el H₂O₂ (Asada, 1992), por lo tanto esta enzima protege a la planta en los momentos iniciales del estrés cuando otros sistemas de defensa no son aún activos (Badawi *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha descrito que la sobreexpresión del gen de la APX en plantas incrementa la protección frente al estrés oxidativo (Wang *et al.*, 1999).

El contenido en proteína MDAR sólo aumentó con oscuridad en hipocótilos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89, y con baja temperatura, alta intensidad luminosa y luz continua en la línea X55, resultados similares se han obtenido en esta memoria tras la inoculación de plántulas pertenecientes a la línea HA89 por *P. halstedii*. Los niveles del transcrito de la MDAR aumentan en plantas de guisante sometidas a baja temperatura (Leterrier *et al.*, 2007). También, la actividad MDAR se incrementa en plantas de arroz, guayule y pino silvestre sometidas a baja temperatura (Oidaira *et al.*, 2000; Sundar *et al.*, 2004; Tao *et al.*, 1998), en plantas de tomate y guisante sometidas a alta intensidad luminosa (Gechev *et al.*, 2003; Leterrier *et al.*, 2005) y en plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés por luz ultravioleta (Kubo *et al.*, 1999). La elevación en los niveles de la MDAR responde a la necesidad de las células de mantener el ascorbato en estado reducido. Por otro lado, el nivel de proteína MDAR se redujo con el daño mecánico (8 horas) en la línea HA89, mientras que, el efecto opuesto se ha observado en plantas de tomate y guisante, donde los niveles del transcrito incrementan con las heridas (Grantz *et al.*, 1995; Ben Rejeb *et al.*, 2004; Leterrier *et al.*, 2007). La actividad MDAR se redujo en hojas de guisante con la senescencia y con el herbicida 2,4-D (Jiménez *et al.*, 1998; Leterrier *et al.*, 2005).

En cloroplastos de hojas de guisante tratadas con NaCl se detecta una reducción en la actividad MDAR (Gómez *et al.*, 1999), mientras que, en mitocondrias de hojas de observó un efecto opuesto (Gómez *et al.*, 1999), indicando que la regulación de esta enzima podría asociarse con su localización subcelular.

El tratamiento con alta temperatura o daño mecánico (4 horas) no produjo cambios en el contenido en proteína MDAR en ninguna de las dos líneas de girasol, estos datos concuerdan con los obtenidos en hojas de *Arabidopsis* sometidas a alta temperatura (Kubo *et al.*, 1999) y de guisante sometidas a heridas mecánicas (Leterrier *et al.*, 2005), lo que indica que la actividad MDAR responde de forma diferencial a las distintas condiciones de estrés (Leterrier *et al.*, 2005).

La GR tiene un papel importante bajo condiciones de estrés abiótico (Romero-Puertas *et al.*, 1999; Mittova *et al.*, 2003; 2004), suministrando glutation reducido al ciclo de ascorbato-glutation. En plántulas de girasol pertenecientes a la línea HA89 sometidas a tratamiento con baja temperatura, luz continua u oscuridad y en plántulas pertenecientes a la línea X55 sometidas a tratamiento con baja temperatura o alta intensidad luminosa se detectó un aumento en los niveles de proteína GR. La actividad GR aumenta en plantas de *Arabidopsis*, pino silvestre y maíz sometidas a estrés por baja temperatura (Kubo *et al.*, 1999; Tao *et al.*, 1998; Prasad, 1996, 1997), y en hojas de guisante sometidas a estrés por baja temperatura, alta intensidad luminosa y luz continua (Romero-Puertas *et al.*, 2006). El nivel del transcrito de la GR citosólica aumenta en plantas de guisante tratadas con baja temperatura (Stevens *et al.*, 1997; Leterrier *et al.*, 2007). El incremento en los niveles de GR mantiene el glutation en su forma reducida, y juega un papel importante en la protección de la homeostasis celular frente al daño producido por baja temperatura en plantas de té (Vyas y Kumar, 2005).

La inducción de la GR en hipocótilos de girasol por efecto de los tratamientos con baja temperatura, alta intensidad luminosa, luz continua y oscuridad representa un incremento en la tasa de reducción de glutation oxidado y una elevada relación GSH/GSSG, lo cual es muy importante para mantener los niveles de ROS bajo control (Noctor y Foyer, 1998).

Los estreses por alta temperatura y daño mecánico (4 y 8 horas), no cambiaron los niveles en proteína GR en ambas líneas de girasol. El estrés biótico por *P. halstedii* tenía un comportamiento similar a estos estreses abióticos en ambas líneas de girasol.

La regulación diferencial de las tres enzimas del ciclo ascorbato-glutation podría ser debida a la presencia de diferentes isoformas de estas enzimas en diferentes compartimentos subcelulares.

Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína peroxirredoxina

En plantas, las peroxirredoxinas tienen un papel importante en la detoxificación de especies de oxígeno reactivo originados a partir del metabolismo del oxígeno durante la

fotosíntesis (Horling *et al.*, 2002). En la línea HA89, el contenido en proteína Prx incrementó con alta o baja temperatura, y en la línea X55 aumentó con alta o baja temperatura, o alta intensidad luminosa, y se redujo con oscuridad. En hojas de *Arabidopsis*, el estrés por salinidad incrementa los niveles de la Prx (Kong *et al.*, 2000). Una elevación en el contenido en Prx podría responder al aumento de las especies de oxígeno reactivo generadas como consecuencia del estrés.

Las deshidrogenasas dependientes de NADP presentan un comportamiento diferencial frente a distintas condiciones de estrés abiótico

La G6PDH-NADP cataliza la primera etapa de la vía de las pentosas fosfato y regula el flujo de carbono a través de este ciclo. La función principal de la vía de las pentosas fosfato es el suministro de NADPH (Levy, 1979). Diferentes estudios han mostrado el papel de G6PDH-NADP en el mecanismo de protección frente al estrés oxidativo en levaduras (Izawa *et al.*, 1998) y tabaco (Debnam *et al.*, 2004). El contenido en proteína G6PDH-NADP se ha inducido con alta temperatura en ambas líneas de girasol, y con alta intensidad luminosa o luz continua en la línea X55. Estos resultados son similares a los obtenidos en plantas de guisante y pimiento sometidas a estrés por cadmio (Romero-Puertas *et al.*, 1999; León *et al.*, 2002), y en plantas de *Mesembryanthemum crystallinum* sometidas a estrés por salinidad (Popova *et al.*, 2002). Por el contrario, el estrés biótico por *P. halstedii* redujo los niveles de proteína G6PDH-NADP en la línea X55.

Los estreses por luz continua, oscuridad o daño mecánico (4 y 8 horas) redujeron los niveles de proteína G6PDH-NADP en la línea HA89. En este sentido, se ha encontrado que la isoforma cloroplástica de la G6PDH-NADP se inactiva por efecto de luz con el sistema ferredoxina-tiorredoxina (Scheibe, 1990; Buchanan, 1991), en hojas de espinaca (Lendzian y Ziegler, 1970) y en extractos de hojas de guisante (Fickenscher y Scheibe, 1986).

Por otro lado, el contenido en proteína EM-NADP se ha inducido en los tratamientos con alta intensidad luminosa y oscuridad en ambas líneas de girasol, y con baja temperatura y luz continua en la línea X55, resultados similares se obtuvieron en ambas líneas de girasol tras la inoculación por *P. halstedii*. Se ha descrito que el nivel de expresión de la EM-NADP citosólica y plastídica se incrementa en respuesta al estrés por luz ultravioleta (Andreo, 1999). También, en plantas de *Eucalyptus* la EM-NADP se induce con salinidad (Farias De Aragao *et al.*, 1997). Por el contrario, los tratamientos con alta y baja temperatura redujeron los niveles de esta proteína en la línea HA89.

En hipocótilos de girasol pertenecientes a la línea HA89, el contenido en proteína ICDH-NADP aumentó con baja temperatura u oscuridad, y redujo con luz continua o daño

mecánico (8 horas), y en la línea X55, aumentó con baja temperatura y redujo con daño mecánico (4 y 8 horas). Estos datos demuestran que la enzima tiene una regulación diferencial dependiendo del tipo del estrés (Leterrier *et al.*, 2007). En cereales (Kar y Feierabend, 1984), patata (Fieuw *et al.*, 1995) y rábano (Sood *et al.*, 1998) se ha visto que los niveles de proteína ICDH-NADP dependen de la luz. Además, en hojas de guisante, los niveles del transcrito de la *ICDH-NADP* citosólica se inducen con alta y baja temperatura, y heridas mecánicas, mientras que, la actividad y la expresión de proteína se inducen sólo con alta intensidad luminosa (Leterrier *et al.*, 2007). La actividad ICDH-NADP aumenta en plantas de guisante y pimiento sometidas a estrés por cadmio (Romero-Puertas *et al.*, 1999; León *et al.*, 2002), y en *Mesembryanthemum crystallinum* sometidas a estrés por salinidad (Popova *et al.*, 2002). Trabajos recientes han demostrado que la ICDH-NADP tiene un papel importante en la defensa frente al estrés oxidativo en bacterias (Choi *et al.*, 2003) y levadura (Contreras-Shannon y McAlister-Henn, 2004; Minard y McAlister-Henn, 2001), y también en mamíferos (Jo *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002), y que el NADPH derivado de la ICDH-NADP es importante para la regeneración de glutatión usado en la eliminación de ROS.

En ambas líneas de girasol, las tres enzimas generadoras de NADPH estudiadas responden a las diferentes condiciones de estrés abiótico descritas en esta memoria de forma diferencial tal y como se ha descrito en hojas de olivo donde las tres enzimas generadoras de NADPH fueron inducidas por salinidad (Valderrama *et al.*, 2006). De hecho, la G6PDH-NADP y la ICDH-NADP se podrían considerar como sistemas clave en la respuesta celular de plántulas de girasol frente a diferentes situaciones de estrés por temperatura, mientras que, la EM-NADPH estaría implicada fundamentalmente en procesos de estrés mediado por variaciones en la intensidad luminosa.

Efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico sobre el contenido en proteína leucina aminopeptidasa

Los niveles de proteína leucina aminopeptidasa incrementaron con baja temperatura en ambas líneas de girasol, mientras que, el resto de los estreses no afectaron de forma significativa los niveles de esta proteína, de igual forma el estrés biótico por *P. halstedii* no afectó el contenido en proteína leucina aminopeptidasa en ambas líneas de girasol indicando que, de forma general, este sistema caree de relevancia en los mecanismos de respuesta de la planta frente a situaciones de daño celular.

Producción de óxido nítrico a partir de L-arginina en hipocótilos de plántulas de girasol

El NO es una molécula relevante en la fisiología de la planta, esta implicada en un gran abanico de procesos metabólicos y del desarrollo de la planta (Lamattina *et al.*, 2003; Neill *et al.*, 2003; del Río *et al.*, 2004; Shapiro, 2005). Dependiendo de su concentración en la célula, puede tener efectos tóxicos o actuar como molécula señal (Lamattina *et al.*, 2003; Neill *et al.*, 2003; del Río *et al.*, 2004). Hasta la fecha, es escasa la información sobre el metabolismo de NO endógeno y otras especies de nitrógeno reactivo en células de plantas en condiciones fisiológicas y de estrés.

La producción enzimática de NO en plantas es todavía un cuestión controvertida (Corpas *et al.*, 2007b). Por lo tanto, se ha llevado a cabo la caracterización bioquímica de la actividad NOS dependiente de L-arginina en hipocótilos de girasol por un método de quimioluminiscencia de ozono establecido para tejidos de plantas, que ha demostrado ser muy sensible (Corpas *et al.*, 2008). En la variedad sensible de girasol, La actividad NOS fue de 0,634 nmol NO mg⁻¹ protein⁻¹. Esta actividad fue inhibida por L-NMMA y aminoguanidina, dos inhibidores de las NOSs en células animales (Griffith y Kilbourm, 1996; Laszlo *et al.*, 1995), era dependiente de L-arginina y requería NADPH, calcio y diferentes cofactores (FAD, FMN y BH₄). Su actividad específica era mayor a la actividad NOS descrita en altramuza blanca (Cueto *et al.*, 1996), hojas de olivo (Valderrama *et al.*, 2007), raíces y hojas de guisante (Corpas *et al.*, 2006b) y hojas de *Arabidopsis* (Modolo *et al.*, 2005; Feechan *et al.*, 2005), y menor que la actividad NOS en peroxisomas de hojas de guisante (Corpas *et al.*, 2004b). Por lo tanto, se puede confirmar que los hipocótilos de girasol tienen una actividad óxido nítrico sintasa (NOS) constitutiva dependiente de L-arginina.

El análisis de la actividad NOS en las dos variedades de girasol reveló que la variedad sensible (HA89) tenía una actividad NOS dos veces mas alta que la variedad resistente (X55) en plantas no inoculadas. Por el contrario, tras la inoculación por *P. halstedii* la actividad NOS se redujo en la variedad sensible (HA89) pero se indujo en la resistente (X55). Esto indica que ambas variedades tienen un comportamiento diferencial tras la inoculación. Sin embargo, en otras especies de plantas bajo diferentes estreses bióticos se observa un aumento en la actividad NOS. En cotiledones de soja se ha mostrado que la actividad NOS mediaba la acumulación de fitoalexinas en respuesta a *Diaporthe phaseolorum* (Modolo *et al.*, 2002). También se ha demostrado que la aplicación de lipopolisacáridos (LPS) de diferentes bacterias activa la actividad óxido nítrico sintasa en *Arabidopsis* e induce genes de defensa (Zeider *et al.*, 2004). En hojas de *Arabidopsis*, tras la inoculación por *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (Psm) o *tomato* (Pst), la actividad NOS se indujo 4 o 5 veces (Modolo *et al.*, 2005; Feechan *et al.*, 2005). También, mediante

aproximaciones farmacológicas se ha demostrado la implicación de la actividad NOS en la respuesta hipersensible en plantas de *Arabidopsis* (Delledonne *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2003).

Por otro lado, se determinó el contenido en $\dot{\text{NO}}$ mediante microscopía láser confocal usando el fluoróforo DAF-2DA. Se observaron cambios en el marcaje de $\dot{\text{NO}}$ similares a los observados anteriormente mediante quimioluminiscencia de ozono en ambas variedades de girasol. En este sentido, se han descrito distintos tipos de respuesta con respecto a la síntesis de $\dot{\text{NO}}$ en diferentes interacciones planta-patógeno. De hecho, se ha detectado una acumulación de $\dot{\text{NO}}$ durante la respuesta a una bacteria avirulenta en plantas de soja, en una suspensión celular de *Arabidopsis* (Delledonne *et al.*, 1998; Clarke *et al.*, 2000) y en plantas de *Arabidopsis* (Zhang *et al.*, 2003). En cultivos de tabaco tratados con criptogeína, un inductor de necrosis de *Phytophthora cryptogea* provoca una inducción rápida de $\dot{\text{NO}}$ (Foissner *et al.*, 2000). La inoculación de hojas de tabaco con *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* produce un incremento en la producción de $\dot{\text{NO}}$ después de 40 minutos, con reducción de los niveles después de 1 hora (Mur *et al.*, 2005). En hojas de la variedad sensible de *Pelargonium peltatum* sólo se produjo un débil estallido de $\dot{\text{NO}}$ a las 3 horas de la inoculación con *Botritis cinerea*, en comparación con el fuerte estallido de $\dot{\text{NO}}$ producido en la variedad resistente (Floryszak-Wieczorek *et al.*, 2007).

Además, la localización celular de $\dot{\text{NO}}$ en ambas variedades fue muy similar, se detectó principalmente en células epidérmicas y haces vasculares de los hipocótilos. De hecho, la localización de $\dot{\text{NO}}$ es similar a la descrita en otros órganos de diferentes especies de plantas como células epidérmicas de hojas de *Arabidopsis* (Huang *et al.*, 2004), hojas, tallo y raíces de plantas de guisante (Corpas *et al.*, 2006b), tallo de plantas de pimiento (Requena *et al.*, 2005) y hojas de olivo (Valderrama *et al.*, 2007).

La expresión de la S-nitrosoglutation reductasa, el contenido en S-nitrosotioles, y S-nitrosoglutation confiere protección frente al estrés nitrosativo durante la interacción planta-patógeno

En los últimos años ha crecido el interés por el estudio de los S-nitrosotioles (RSNOs) debido a que la vida media de óxido nítrico *in vivo* es muy corta, mientras que, los RSNOs son generalmente más estables en disolución, y se consideran una fuente relevante de $\dot{\text{NO}}$. Recientemente, se ha descrito que los RSNOs juegan un papel importante en la regulación de múltiples modos de resistencia a la enfermedad durante la interacción planta-patógeno (Feechan *et al.*, 2005; Rusterucci *et al.*, 2007). No obstante, en organismos vegetales existe poca información disponible sobre el metabolismo de RSNOs y su modulación bajo condiciones de estrés.

La S-nitrosoglutation reductasa (GSNOR) cataliza la reducción de GSNO dependiente de NADH, a glutathion oxidado (GSSG) y amoníaco (NH₃) (Liu *et al.*, 2001; Lamotte *et al.*, 2005), controlando de esta forma los niveles intracelulares de GSNO, la biodisponibilidad de NO, y limitando así su toxicidad (Kotchoni y Gachomo, 2006). Se ha descrito que la GSNOR de *Arabidopsis* (*AtGSNOR1*), esta implicada en la formación y el recambio del contenido en GSNO y de S-nitrosotioles celulares (Feechan *et al.*, 2005). Sin embargo, existe controversia acerca de la modulación de los niveles de RSNOs con respecto a la protección que ejercen en la planta. De hecho, en plantas transgénicas de *Arabidopsis* con una expresión disminuida de la *AtGSNOR1* y unos niveles elevados de RSNOs, se ha mostrado una mayor resistencia frente al patógeno *Peronospora parasitica*, (Rusterucci *et al.*, 2007). No obstante, estos datos difieren de los obtenidos por Feechan *et al.* (2005), también utilizando el mismo sistema experimental, que observaron como la pérdida de función de la *AtGSNOR*, incrementaba igualmente los niveles de RSNOs, pero en este caso inhabilitaba los diferentes mecanismos de respuesta de la planta a nivel de los genes de defensa R. Por el contrario, el incremento en la actividad *AtGSNOR1* produjo una disminución en el contenido de RSNOs, con un incremento concomitante en los niveles de protección frente a patógenos bacterianos virulentos. Estos datos están de acuerdo con los resultados obtenidos en esta memoria. En este trabajo, al analizar en condiciones fisiológicas, el efecto que la inoculación con el hongo biotrofo *P. halstedii* ejercía sobre el contenido de RSNOs totales en hipocótilos de girasol, se observó un comportamiento diferencial en ambas variedades, apreciándose un incremento significativo del contenido en RSNOs en la variedad sensible (HA89) y una reducción en la variedad resistente (X55). En hipocótilos de girasol la actividad GSNOR incrementó en las variedades sensible (HA89) y resistente (X55) inoculadas por *P. halstedii*, sin embargo, el nivel del transcrito de la *GSNOR* sólo se indujo en la variedad resistente inoculada, evidenciando una modulación similar a la observada con el gen *Ha-PR5*. Este comportamiento concuerda con la modulación observada en los niveles de RSNOs en ambas variedades tras la inoculación con el hongo. Además, se apreció que los niveles constitutivos de RSNOs totales en plántulas control de la variedad resistente (X55) eran dos veces superiores a los de la variedad sensible (HA89). De hecho, estos altos niveles en el contenido de S-nitrosotioles podrían ser una de las características de la variedad resistente para combatir la infección, y la disminución del contenido en RSNOs y GSNO, mediado por incrementos en la expresión de GSNOR, la señal que dispara la cascada de señalización de procesos de defensa en la que están implicados los genes R. El contenido de RSNOs totales en la variedad sensible (HA89) de girasol es 24 veces superior al contenido detectado en plantas de *Arabidopsis* (Feechan *et al.*, 2005).

Por otra parte, hay que destacar como las variaciones observadas en el contenido de RSNOs son independientes de la producción de NO tal y como se desprende del análisis de la actividad NOS, lo que sugiere que los RSNOs pueden mediar la bioactividad de NO en las plantas después de sufrir la infección por el patógeno, indicando que el NO y los RSNOs pueden desempeñar funciones distintas durante el establecimiento de la enfermedad en la planta.

Mediante microscopía láser confocal se han corroborado los datos obtenidos. En la variedad sensible (HA89) los RSNOs se localizaban principalmente en haces vasculares, mientras que, tras la inoculación por *P. halstedii* mostraban una distribución generalizada, sin embargo, en la variedad resistente (X55) se detectaban en la mayoría de los tejidos y tras la inoculación por *P. halstedii* se localizaban principalmente en epidermis y haces vasculares.

El S-nitrosoglutation (GSNO) es el más abundante de los S-nitrosotioles de bajo peso molecular. Los RSNOs, y en particular el S-nitrosoglutation, puede funcionar como un sistema de transporte de NO tanto a nivel intracelular como a lo largo de toda la planta a través del floema (Arasimowicz y Floryszak-Wieczore, 2007). Mediante microscopía láser confocal se detectó que el GSNO presentaba un comportamiento similar al de los RSNOs totales en ambas variedades de girasol. En la variedad sensible (HA89), el GSNO se localizaba exclusivamente en células epidérmicas y cortex, presentando una distribución generalizada tras la inoculación por *P. halstedii*. Por el contrario, en la variedad resistente (X55) el GSNO se localizaba en todas las células, y tras la inoculación se redistribuyó, localizándose casi exclusivamente en células epidérmicas y cortex. De igual forma al contenido en S-nitrosotioles totales, los altos niveles de GSNO en la variedad resistente podrían estar relacionados con la resistencia a la infección. Además, tras la inoculación en la variedad sensible (HA89) la síntesis *de novo* de GSNO tenía una extensión generalizada a todos los tejidos. Por el contrario, en la variedad resistente (X55) el GSNO parece estar redistribuido y movilizado hacia las células epidérmicas y cortex ya que normalmente son los sitios de crecimiento de *Plasmopara halstedii* hacia la parte superior de plántulas de girasol (Radwan *et al.*, 2005).

Además, mediante microscopía láser confocal se detectó un ligero marcaje de la GSNOR en células parenquimáticas y haces vasculares en ambas variedades de girasol, y tras la inoculación por *P. halstedii*, se observó una distribución generalizada en todas las células de la variedad resistente (X55), mientras que, en la variedad sensible (HA89) no se observaron cambios tras la inoculación por *P. halstedii*. De hecho, el análisis de estos datos junto con la presencia y distribución observada de RSNOs y GSNO en haces vasculares y epidermis, sugiere un papel relevante para la GSNOR en la regulación del contenido en

GSNO y RSNOs como señales celulares móviles a lo largo de la planta a través del floema y como refuerzo en el proceso de defensa de la planta al impedir la propagación del patógeno a nivel epidérmico.

El S-nitrosoglutation es requerido en el proceso de resistencia mediado por genes R.

Plántulas de girasol pertenecientes a la variedad resistente (X55) no inoculada, con altos contenidos de GSNO y RSNOs totales fueron incubadas con un secuestrador de NO (cPTIO) durante 3 horas, observándose una inducción significativa en la expresión de los genes *GSNOR* y *Ha-PR5* conforme aumentaba la concentración del secuestrador de NO . Este comportamiento sugiere que bajos niveles de NO , y como consecuencia de GSNO, pueden ser la señal que desencadena la inducción en la expresión de ambos genes *GSNOR* y *Ha-PR5*, proponiendo la inclusión de la *GSNOR* como un nuevo gen marcador dentro de la categoría de genes marcadores relacionados con patogénesis.

Generación de estrés nitrosativo durante la interacción compatible planta-patógeno

La nitración en tirosina de proteínas es una modificación covalente de las proteínas por adición de un grupo nitro ($-\text{NO}_2$) en posición *orto* del anillo de un residuo de tirosina formando 3-nitrotirosina (Gow *et al.*, 2004). En células animales, esta modificación de proteínas es considerada como un marcador de estrés nitrosativo (Ischiropoulos, 2003) y se ha propuesto que esta modificación post-transduccional podría ser también un marcador útil en plantas (Valderrama *et al.*, 2007; Corpas *et al.*, 2007c). Utilizando una suspensión de células de tabaco BY-2 tratadas con un inductor fúngico, se ha demostrado una inducción en la nitración en tirosina con una masa molecular entre 20 y 50 kDa (Saito *et al.*, 2006). En este trabajo, se ha analizado en condiciones fisiológicas el patrón de nitración de proteínas en extractos crudos de hipocótilos de girasol pertenecientes a la variedad resistente (X55). En este caso, y mediante western blot, usando un anticuerpo frente a 3-nitrotirosina se detectaron siete polipéptidos inmunorreactivos con un tamaño molecular aparente comprendido entre 15 y 68 kDa. Además, mediante electroforesis bidimensional usando el mismo anticuerpo, se detectaron nueve proteínas inmunorreactivas que han sufrido nitración en tirosina, con un tamaño molecular aparente comprendido entre 18 y 63 kDa.

- Entre las enzimas identificadas como posibles dianas para la S-nitrosilación en plantas se encuentra la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Lindermayr *et al.*, 2005). Esta proteína está implicada en la regulación del metabolismo de especies de oxígeno y nitrógeno reactivo. En células animales, se han localizado proteínas modificadas

por nitración de residuos de tirosina en mitocondria y retículo endoplasmático (Heijnen *et al.*, 2006). También, Van der Loo *et al.* (2000) han observado proteínas nitradas en citoplasma, núcleo y mitocondria de ratas viejas. Sin embargo, en plantas no existen datos descritos sobre la implicación del proceso de nitración en la regulación celular de plantas en condiciones fisiológicas. En este trabajo, por primera vez, hemos identificado proteínas nitradas en tirosina en hipocótilos de girasol en condiciones fisiológicas lo que indica que el metabolismo de ROS y RNS puede estar regulado a nivel de GAPDH no sólo por S-nitrosilación sino también por nitración.

- S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa, esta implicada en la biosíntesis de metionina, por lo tanto, participa en la regulación de procesos como la biosíntesis de proteínas, etileno y poliaminas. La metionina tiene dos destinos principales, o se incorpora en las proteínas o se convierte en S-adenosilmetionina (SAM). SAM es un donador de metilo usado en la modificación de DNA y RNA, y en la síntesis de componentes estructurales de plantas, incluyendo precursores de lignina, colina y sus derivados, y pectina. El esqueleto de carbono de metionina de la SAM también se utiliza como precursor de las hormonas de planta, etileno y poliaminas. De hecho, la implicación de NO en la biosíntesis de etileno se refleja en la S-nitrosilación descrita de la metionina adenosiltransferasa. En este caso, la nitración de S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa implica un mecanismo más de regulación en el que participa el NO en la biosíntesis de etileno.

- Citocromo P450 monooxigenasa, es un grupo de hemoproteínas que utilizan el NADPH como donador de electrones para catalizar la activación de oxígeno molecular, esta presente en microorganismos, plantas y animales. Esta proteína está implicada en el metabolismo oxidativo de compuestos endógenos como esteroides, ácidos grasos o vitaminas liposolubles, y en el metabolismo de xenobióticos. Una de las características más significativas de los P-450 que metabolizan xenobióticos es su baja especificidad, lo que permite que sean capaces de metabolizar un número casi ilimitado de sustratos, principalmente a través de reacciones de oxidación, pero también de reducción e hidrólisis.

- Riboflavina quinasa es una proteína que regula muchos procesos fisiológicos en plantas y microbios (Gastaldi *et al.*, 1999; Gregory, 1998; Wolinsky y Driskell, 1997), cataliza la síntesis de flavina mononucleótido (FMN) a partir de riboflavina y ATP. En la célula la riboflavina está en forma de flavina mononucleótido (FMN) o flavina adenina dinucleótido (FAD), estas flavinas son cofactores importantes para las reacciones de oxido-reducción necesarias para muchas reacciones metabólicas, incluido la producción de energía (Chazot y Kopple, 2004). La aplicación foliar de riboflavina controla eficazmente varias enfermedades del tabaco (Dong *et al.*, 1995), y reduce mildiu de las plantas de fresa en

combinación con metionina e iones metálicos. Así, la riboflavina puede funcionar como un inductor de resistencia sistémica y un activador de procesos de señalización en plantas.

- Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), es la enzima del ciclo de Calvin que cataliza la fijación de CO₂ durante la fotosíntesis. En esta reacción la Rubisco funciona como carboxilasa, añadiendo el CO₂ atmosférico a ribulosa-1,5-bisfosfato para formar dos moléculas de 3-fosfoglicerato. También, actúa como oxigenasa catalizando una reacción competitiva que divide ribulosa-1,5-bisfosfato a una molécula de 3-fosfoglicerato y otra de 2-fosfoglicolato. Además, es la proteína más abundante en plantas (Johansson *et al.*, 2004), esto justifica la extensión del inmunomarcaje de 3-nitrotirosina detectado en condiciones fisiológicas.

- Proteína de resistencia NBS-LRR, es una clase de proteínas R que representa en gran medida la función de la mayoría de los genes de resistencia (genes R). La presencia del gen R NBS-LRR confiere la resistencia a diferentes hongos. Posiblemente los genes de resistencia de girasol al mildiu (*PI*) (Vranceanu y Stoenescu, 1970) pueden estar codificados por LRR (leucine-rich repeat) o por los genes como NBS (nucleotide binding site). Las proteínas que tienen el dominio LRR están generalmente implicadas en varios aspectos del desarrollo, como regulación de la morfogénesis de las raíces y su elongación (Baumberger *et al.*, 2001), desarrollo de órganos (Taguchi-Shiobara *et al.*, 2001), regulación de la formación de endosperma y desarrollo de polen (Li y Wurtzel, 1998; Muschietti *et al.*, 1998).

Estos resultados sugieren que, de forma general, la regulación ejercida por el NO en los procesos fisiológicos en las que participa esta molécula debería de considerarse no sólo a nivel de S-nitrosilación sino también de nitración.

La localización celular de 3-nitrotirosina se analizó mediante microscopía láser confocal apreciándose una distribución extensiva del inmunomarcaje en todos los tejidos. Tras la inoculación por *P. halstedii*, en la variedad sensible (HA89) se observó una inducción clara en la nitración en tirosina, por el contrario, en la variedad resistente (X55) no se observaron variaciones significativas con respecto al control. En base a estos datos, y considerando esta modificación post-transduccional como un potencial marcador de estrés nitrosativo (Corpas *et al.*, 2007c), se puede sugerir que en la variedad sensible (HA89), y a diferencia de lo que ocurre en la variedad resistente (X55), la inoculación por el hongo biotrofo *P. halstedii* ha generado un fenómeno de estrés nitrosativo sustentado fundamentalmente por el incremento observado en los niveles de RSNOs e independiente de la generación enzimática de NO. De hecho, la ausencia de estrés tras la inoculación por el hongo en las plantas resistentes puede estar mediada por la disminución en el contenido de GSNO y RSNOs.

Estrés abiótico y óxido nítrico

En la actualidad, existe una información limitada en la literatura sobre la función de las especies de nitrógeno reactivo en la respuesta de las plantas frente a distintas condiciones de estrés abiótico. La implicación de NO en los mecanismos de respuesta frente a procesos de estrés abiótico se ha descrito en diferentes especies vegetales. Sin embargo, la mayor parte de los datos disponibles se han obtenido a partir de estudios indirectos mediante aproximaciones farmacológicas que implican la utilización de donadores de NO. Además, no se ha determinado cuál es la fuente endógena de NO, lo que dificulta el establecimiento de interrelaciones entre determinadas condiciones de estrés abiótico y procesos de señalización por RNS.

En este trabajo, se ha analizado la producción de NO endógeno a partir de L-arginina en hipocótilos de girasol sometidos a distintas condiciones de estrés abiótico. Los datos obtenidos indican que el estrés por alta temperatura y el daño mecánico modulan la producción de NO endógeno en hipocótilos de girasol, originando una reducción en la actividad NOS en la línea HA89, y un incremento en la línea X55. De hecho, ambas líneas de girasol han presentado un comportamiento similar frente a distintas situaciones de estrés biótico y abiótico. Estos resultados fueron corroborados mediante microscopía láser confocal usando el fluoróforo DAF-2DA. En la línea HA89, el NO se detectó en epidermis, floema y xilema, mientras que, el tratamiento con alta temperatura o daño mecánico (4 horas) redujo la intensidad del marcaje en las zonas anteriormente comentadas. En la línea X55, el NO se localizó de forma ligera en epidermis y xilema, mientras que, el tratamiento con alta temperatura o daño mecánico (4 horas) incrementó la intensidad del marcaje en epidermis y se extendió en haces vasculares. La localización celular de NO durante las situaciones de estrés abiótico analizadas es similar a la observada en el estrés biótico por *P. halstedii* en ambas líneas de girasol y a la descrita en otras especies de plantas como células epidérmicas de hojas heridas de *Arabidopsis* (Huang *et al.*, 2004). El tratamiento con alta temperatura incrementó los niveles de NO en plántulas de alfalfa, hojas de tabaco (Leshem *et al.*, 1998; Gould *et al.*, 2003) y células de lucerna (Neill *et al.*, 2003), y lo redujo en hojas de trigo, orquídea y áloe (Xu y Zhao, 2003). Las heridas incrementaron la producción de NO en plantas de *Arabidopsis* (Huang *et al.*, 2004) y batata (Jih *et al.*, 2003), pero no tienen efecto sobre el nivel de NO en hojas de tabaco y tomate (Gould *et al.*, 2003; Orozco-Cárdenas y Ryan, 2002). En cualquier caso, la diferente respuesta de las distintas especies vegetales frente a alta temperatura y daño mecánico podría ser debida a la especie de planta o al tiempo de exposición al estrés utilizado.

La inducción de S-nitrosoglutation y del contenido de S-nitrosotioles totales participa en el proceso de estrés nitrosativo generado por distintas condiciones de estrés abiótico en hipocótilos de girasol

Los tratamientos con alta temperatura y daño mecánico produjeron un incremento en el contenido de RSNOs totales en la línea HA89. Por el contrario, en la línea X55 estas situaciones no modificaron el contenido de RSNOs, debido fundamentalmente a los altos niveles de RSNOs constitutivos. En trabajos previos, se ha descrito un incremento en el contenido de RSNOs totales en hojas de olivo sometidas a estrés por salinidad (Valderrama *et al.*, 2007), así como en plantas de guisante sometidas a tratamientos con alta temperatura y heridas mecánicas (Corpas *et al.*, 2007d). Estos datos, junto con los obtenidos en esta memoria, indican que el contenido en RSNOs totales se induce bajo determinadas condiciones de estrés abiótico participando en la generación de un proceso de estrés nitrosativo y al igual que ocurría durante el estrés biótico por *P. halstedii*.

Por otra parte, y al igual que en el comportamiento descrito durante el proceso de interacción planta-patógeno, hay que destacar que las variaciones en el contenido de RSNOs son independientes de la producción enzimática de NO, lo que sugiere que los RSNOs pueden mediar la bioactividad del NO en las plantas durante la generación del estrés nitrosativo, e indicando que el NO y los RSNOs pueden desempeñar funciones diferentes durante el establecimiento del estrés nitrosativo en el proceso de daño en la planta.

Al analizar la modulación de GSNO en diferentes situaciones estudiadas se apreció un comportamiento similar a los RSNOs en ambas líneas de girasol. En la línea X55, el inmunomarcaje frente a GSNO y la expresión del transcrito de la *GSNOR* no se modificaron durante las situaciones de alta temperatura y daño mecánico. Sin embargo, en la línea HA89 los estreses señalados anteriormente incrementaron el inmunomarcaje frente a GSNO y el contenido de RSNOs, y redujeron la expresión del transcrito de la *GSNOR*. En plantas de guisante se ha mostrado que el estrés por cadmio (50 μ M) reduce la expresión del transcrito de la *GSNOR* (Barroso *et al.*, 2006). Por otro lado, en plantas de *Arabidopsis*, la expresión de la *GSNOR* se reduce con heridas e incrementa con ácido salicílico, mientras que, en plantas de tabaco los niveles de la *GSNOR* y la actividad enzimática se reducen tras el tratamiento con ácido jasmónico y aumentan en respuesta a ácido salicílico (Díaz *et al.*, 2003). Estos resultados evidenciaban que la *GSNOR* se regula de forma diferencial dependiendo del tipo de estrés.

En este trabajo, el GSNO se localizó mediante microscopía láser confocal en epidermis, células parenquimáticas y haces vasculares de la línea HA89, sin embargo, tras el tratamiento con alta temperatura o daño mecánico el GSNO mostraba una extensión del

inmunomarcaje en todos los tejidos, comportamiento similar al observado durante la inoculación por *P. halstedii*. Sin embargo, en la línea X55, el GSNO se localizó en todos los tipos celulares, y ni el tratamiento con alta temperatura ni con daño mecánico produjeron cambios en el inmunomarcaje. En hojas de guisante, el GSNO se localizó en colénquima, y su distribución se reduce en plantas crecidas con concentraciones tóxicas de cadmio (Barroso *et al.*, 2006), mientras que, en hojas de olivo se detecta en tejidos vasculares y mesófilo, y con la salinidad el marcaje se reduce en tejidos vasculares y aumenta en mesófilo (Valderrama *et al.*, 2007).

La GSNOR se detectó principalmente en parénquima y haces vasculares de plántulas pertenecientes a las líneas HA89 y X55. Los tratamientos con alta temperatura y daño mecánico (4 horas) redujeron la intensidad del inmunomarcaje tanto en células parenquimáticas como en haces vasculares de plántulas pertenecientes a la línea HA89. El análisis de estos resultados sugiere la expresión diferencial de la GSNOR según el tipo de estrés ensayado y su participación en el mecanismo de respuesta frente al daño celular modulando la generación del proceso de estrés nitrosativo mediante la regulación del contenido en GSNO y RSNOs, al contrario de lo observado con el inmunomarcaje para el GSNO y el contenido en RSNOs totales. Mientras que, en la línea X55, no se observaron diferencias significativas con los tratamientos por alta temperatura y daño mecánico.

Los estreses abióticos por alta temperatura y daño mecánico inducen estrés nitrosativo en hipocótilos de plántulas pertenecientes a la línea HA89

Se ha analizado la localización celular de 3-nitrotirosina a nivel de microscopía láser confocal. En ambas líneas de girasol, la 3-nitrotirosina se detectó en todas las células. Los estreses por alta temperatura y daño mecánico produjeron una inducción clara en los niveles de 3-nitrotirosina en plántulas pertenecientes a la línea HA89. En la línea X55 los estreses señalados anteriormente no modificaron los niveles de 3-nitrotirosina con respecto al control. En ambas líneas de girasol, la 3-nitrotirosina tenía un comportamiento semejante al estrés biótico por *P. halstedii* y los estreses abióticos por alta temperatura y daño mecánico. Por lo tanto, considerando esta modificación post-transduccional como un potencial marcador de estrés nitrosativo (Corpas *et al.*, 2007c), se puede sugerir que la línea HA89 ha sufrido un proceso de estrés nitrosativo. Sin embargo, la línea X55 no, debido a los altos niveles de GSNO y RSNOs endógenos generados en estas situaciones, los cuales pueden actuar como unos factores más de protección frente a los estreses abióticos por alta temperatura y daño mecánico.

En una suspensión celular de tejo japonés se ha demostrado un incremento de un 31% en el contenido de 3-nitrotirosina durante el estrés por cizallamiento (Gong y Yuan,

2005), en hojas de olivo, la salinidad induce un incremento en el número de proteínas entre 44-60 kDa que han sufrido nitración en tirosina. El incremento de 3-nitrotirosina estaba acompañado del incremento de $\cdot\text{NO}$, RSNOs y GSNO indicando que la salinidad induce un estrés nitrosativo (Valderrama *et al.*, 2007). La mayoría de estas proteínas no se han identificado aún, pero el incremento en el número o intensidad de proteínas que han sufrido nitración en tirosina puede considerarse como marcador de estrés nitrosativo (Corpas *et al.*, 2007c). Además, la nitración en tirosina de proteínas puede participar en otras funciones importantes como el recambio proteico y la transducción de señales celulares (Ischiropoulos, 2003).

CONCLUSIONES

1. La inoculación de plántulas de girasol con el hongo biotrofo *Plasmopara halstedii* causa una reducción significativa en la tasa de crecimiento de las plántulas pertenecientes a la variedad sensible (HA89), pero no en la de las resistentes (X55). Además, el estrés biótico origina un estrés oxidativo en ambas líneas, mediado por un incremento en la generación de especies de oxígeno reactivo (ROS) tales como H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$, a juzgar por el desequilibrio observado en la actividad y expresión de enzimas antioxidantes y deshidrogenasas dependientes de NADP.
2. La producción de especies de nitrógeno reactivo (RNS) y ROS en general, en haces vasculares de hipocótilos de girasol pertenecientes a las dos variedades inoculadas con *Plasmopara halstedii*, sugiere la participación de estos tejidos en procesos de señalización celular en plantas en situaciones de estrés biótico. De hecho, la distribución de RSNOs y GSNO en haces vasculares y epidermis, sugiere un papel relevante para la GSNOR en la regulación de su contenido como señales celulares móviles a lo largo de la planta a través del floema y como refuerzo en el proceso de defensa al impedir la propagación del patógeno.
3. La disminución en los niveles de $^{\cdot}NO$, y como consecuencia de GSNO, inducen la expresión de *GSNOR* y *Ha-PR5* en la variedad resistente no infectada, permitiendo considerar a la GSNOR como un nuevo gen marcador dentro de la categoría de genes relacionados con patogénesis.
4. El estrés abiótico causado por alta temperatura y alta intensidad luminosa induce un estrés oxidativo en hipocótilos de plántulas pertenecientes a ambas líneas de girasol, mientras que, el estrés causado por daño mecánico induce estrés oxidativo sólo en hipocótilos de plántulas pertenecientes a la línea HA89. En este cultivar, el estrés biótico y el estrés abiótico por alta temperatura y daño mecánico también generan un proceso de estrés nitrosativo, independiente de la generación enzimática de $^{\cdot}NO$, y mediado por un incremento de la nitración proteica y del contenido de RSNOs, lo que pone de manifiesto la existencia de fenómenos de comunicación celular y tisular entre especies del metabolismo oxidativo, nitrosativo y del metabolismo redox. Además, la modulación de las RNS en la línea HA89 sigue un patrón de comportamiento similar en la generación del proceso de estrés nitrosativo frente a situaciones de estrés biótico y abiótico.

5. En hipocótilos de girasol, se han identificado dos nuevos genes que codifican para dos superóxido dismutasas que contienen Mn como metal prostético denominados Mn-SOD1 y Mn-SOD2 y que presentan una localización mitocondrial. Durante diferentes situaciones de estrés biótico y abiótico, la Mn-SOD1 presenta el nivel más alto de expresión siendo el de la Mn-SOD2 prácticamente indetectable, aunque esta isoforma se induce fuertemente en situaciones de daño mecánico lo que indica un papel específico para esta isoforma en esa situación de estrés.

BIBLIOGRAFÍA

- Achkor H., Díaz M., Fernández M.R., Biosca J.A., Parés X. y Martínez M.C.** (2003) Enhanced formaldehyde detoxification by overexpression of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 132: 2248-2255.
- Adinolfi A., Adinolfi M. y Hopkinson D.A.** (1984) Immunological and biochemical characterization of the human alcohol dehydrogenase chi-ADH isozyme. *Ann. Hum. Genet.* 48: 1-10.
- AH-Mackerness S., John C.F., Jordan B. y Thomas B.** (2001) Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Lett.* 489: 237-242.
- Akhand A.A., Pu M., Senga T., Kato M., Suzuki H., Miyata T., Hamaguchi M. y Nakashima I.** (1999) Nitric oxide controls src kinase activity through a sulfhydryl group modification-mediated Tyr-527-independent and Tyr-416-linked mechanism. *J. Biol. Chem.* 274: 25821-25826.
- Albrecht T., Kehlen A., Stahl K., Knofel H.D., Sembdner G. y Weiler E.W.** (1993) Quantification of rapid, transient increases in jasmonic acid in wounded plants using a monoclonal antibody. *Planta* 191: 86-94.
- Alderton W.K., Cooper C.E. y Knowles R.G.** (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357: 593-615.
- Almeselmani M., Deshmukh P.S., Sairam R.K., Kushwaha S.R. y Singh T.P.** (2006) Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. *Plant Science* 171: 382-388.
- Alonso L.C.** (1988). *Enfermedades y daños de herbicidas en el cultivo del girasol*. Koipesol. Madrid.
- Alscher R.G., Erturk N. y Heath L.S.** (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53: 1331-1341.
- Alvarez M.E., Pennell R.I., Meijer P.J., Ishikawa A., Dixon R.A. y Lamb C.** (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92: 773-784.
- An L.Z., Liu Y.H., Zhang M.X., Chen T. y Wang X.L.** (2005) Effects of nitric oxide on growth of maize seedling leaves in the presence or absence of ultraviolet-B radiation. *J. Plant Physiology* 162: 317-326.
- Anderson L. y Mansfield T.A.** (1979) The effects of nitric oxide pollution on the growth of tomato. *Environmental Pollution* 20: 113-121.
- Angel Torres M., Jones J.D.G. y Dangl J.L.** (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant J. Physiol.* 141: 373-378.

- Apel K. y Hirt H.** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 55: 373-399.
- Apóstol I., Heinsteins P.F. y Low P.** (1989) Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant-cells: role in defense and signal transduction. *Plant Physiol.* 90: 109-116.
- Arasimowicz M. y Floryszak-Wieczore J.** (2007) Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Sci.* 172: 876-887.
- Arias M.C., Luna C., Rodríguez M., Lenardon S. y Taleisnik E.** (2005) *Sunflower chlorotic mottle* virus in compatible interactions with sunflower: ROS generation and antioxidant response. *Euro. J. Plant Pathology.* 113: 223-232.
- Arnell D.R. y Stamler J.S.** (1995) NO⁺, NO, and NO⁻ donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch. Biochem. Biophys.* 318: 279-285.
- Aro E.M., Virgin I. y Andersson B.** (1993) Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta.* 1143: 113-134.
- Asada K., Kanematsu S., Okada S. y Hayakawa T.** (1980) Phylogenetic distribution of three types of superoxide dismutase in organisms and in cell organelles. In *Chemical and Biochemical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutase*. Edited by Bannister, J.V. pp. 136-153. Elsevier, Amsterdam.
- Asada K.** (1992) Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Plant* 85: 235-241.
- Asada K.** (1994) Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. En: *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*. Foyer CH y Mullineaux PM (Eds.), págs: 77-104. C. R. C. Press, Boca Ratón.
- Asada K.** (1999) The water-water cycle in chloroplast: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 601-639.
- Asada K. y Takahashi M.** (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. En Kyle D.L., Osmond C.B., Arntzen C.J. (Eds.). *Photoinhibition (Topics in Photosynthesis, Vol. 9)*. Elsevier Scientific Publishers, Amsterdam, pp: 227-287.
- Attucci S., Rivoal J., Brouquisse R., Carde J.P., Pradet A. y Raymond P.** (1994) Characterization of a mitochondrial NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in axes of germinating sunflower seeds. *Plant Sci.* 102: 49-59.
- Badawi G.H., Kawano N., Yamauchi Y., Shimada E., Sasaki R., Kubo A. y Tanaka K.** (2004) Over-expression of ascorbate peroxidase in tobacco chloroplasts enhances the tolerance to salt stress and water deficit. *Physiol. Plant.* 121: 231-238.

- Bannister J.V., Bannister W.H. y Rotilio G.** (1987) Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *CRC. Crit. Rev. Biochem.* 22: 111-180.
- Barroso J.B., Corpas F.J., Carreras A., Rodríguez-Serrano M., Esteban F.J., Fernández-Ocaña A., Chaki M., Romero-Puertas M.C., Valderrama R., Sandalio L.M. y del Río L.A.** (2006) Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *J. Exp. Bot.* 57: 1785-1793.
- Barroso J.B., Corpas F.J., Carreras A., Sandalio L.M., Valderrama R., Palma J.M., Lupiáñez J.A. y del Río L.A.** (1999) Localization of nitric oxide synthase in plant peroxisomes. *J. Biol. Chem.* 274: 36729-36733.
- Bartels D.** (2001) Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance? *Trends Plant Sci.* 6: 284-286.
- Bartesaghi S., Valez V., Trujillo M., Peluffo G., Romero N., Zhang H., Kalyanaraman B. y Radi R.** (2006) Mechanistic studies of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration in membranes using the hydrophobic probe N-t-BOC-L-tyrosine tert-butyl ester. *Biochem.* 45: 6813-6825.
- Bartosz G.** (1997) Oxidative stress in plants. *Acta Physiol. Plant.* 19: 47-64.
- Baum J.A. y Scandalios J.G.** (1981) Isolation and characterization of the cytosolic and mitochondrial superoxide dismutases of maize. *Arch. Biochem. Biophys.* 206: 249-264.
- Baumberger N., Ringli C. y Keller B.** (2001) The chimeric leucine-rich repeat/extensin cell wall protein LRX1 is required for root hair morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* 15: 1128-1139.
- Beckman, J. S.** (1996) Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* 9: 836-844.
- Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A. y Freeman B.A.** (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 1620-1624.
- Beckman J.S. y Koppenol W.H.** (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* 271(5 Pt 1): C1424-C1437.
- Beers E.P. y McDowell J.M.** (2001) Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 561-567.
- Belenghi B., Romero-Puertas M.C., Vercammen D., Bracke A., Inze D., Delledonne M. y Van Breusegem F.** (2007) Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *J. Biol. Chem.* 282: 1352-1358.

- Beligni M.V. y Lamattina L.** (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* 210: 215-221.
- Beligni M.V. y Lamattina L.** (2001) Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth. *Trends Plant Sci.* 6: 508-509.
- Ben Rejeb I., Lenne C., Leblanc N., Julien J.L., Ammar S., Bouzid S., Ayadi A.** (2004) Iron-superoxide dismutase and monodehydroascorbate reductase transcripts accumulate in response to internode rubbing in tomato. *C. R. Biol.* 327: 679-686.
- Benavides M.P., Marconi P.L., Gallego S.M., Comba M.E. y Tomaro M.L.** (2000) Relationship between antioxidant defence systems and salt tolerance in *Solanum tuberosum*. *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 273-278.
- Benhar M., Forrester M.T. y Stamler J.S.** (2006) Nitrosative stress in the ER: a new role for S-nitrosylation in neurodegenerative diseases. *ACS Chemical Biology* 1: 355-358.
- Berlett B.S. y Stadtman E.R.** (1997) Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272: 20313-20316.
- Berna B. y Bernier F.** (1999) Regulation by biotic and abiotic stress of a wheat germin gene encoding oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme. *Plant Mol. Biol.* 39: 539-549.
- Bestwick C.S., Brown I.R. y Mansfield J.W.** (1998) Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a nonhost hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiol.* 118: 1067-1078.
- Bestwick C.S., Brown I.R., Bennett M.H. y Mansfield J.W.** (1997) Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Cell* 9: 209-221.
- Bethke P.C., Badger M.R. y Jones R.L.** (2004a) Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* 16: 332-341.
- Bethke P.C., Gubler F., Jacobsen J.V. y Jones R.L.** (2004b) Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta* 219: 847-855.
- Bhaumik G., Srivastava K.K., Selvamurthy W. y Purkayastha S.S.** (1995) The role of free radicals in cold injuries. *Int. J. Biometeorol.* 38: 171-175.
- Bielski B.H., Richter H.W. y Chan P.C.** (1975) Some properties of the ascorbate free radical. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 258: 231-237.
- Björn L.O.** (1969) Photoinactivation of catalases from mammal liver, plant leaves and bacteria. Comparison of inactivation cross sections and quantum yields at 406 nm. *Photochem. Photobiol.* 10: 125-129.
- Bolwell G.P.** (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 287-294.

- Boucher J.L., Genet A., Vadon S., Delaforge M., Henry Y. y Mansuy D.** (1992b) Cytochrome P450 catalyzes the oxidation of N^W-hydroxy-L-arginine by NADPH and O₂ to nitric oxide and citrulline. *Biochem. Biophys. Res. Communications* 187: 880-886.
- Boucher J.L., Genet A., Vadon S., Delaforge M., Henry Y. y Mansuy D.** (1992a) Formation of nitrogen oxides and citrulline upon oxidation of N^W-hydroxy-L-arginine by heme proteins. *Biochem. Biophys. Res. Communications* 184: 1158-1164.
- Bowditch M.L. y Donaldson R.P.** (1990) Ascorbate Free-Radical Reduction by Glyoxysomal Membranes. *Plant Physiol.* 94: 531-537.
- Bowler C., Van Montagu M. e Inzé D.** (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 83-116.
- Bowler C. y Fluhr R.** (2000) The role of calcium and activated oxygen as signals for controlling cross-tolerance. *Trends Plant Sci.* 5: 241-246.
- Bowles D.J.** (1990) Defence-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 873-907.
- Boyer J.S.** (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-448.
- Bradford M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Bradshaw R.A., Brickey W.W. y Walker K.W.** (1998) N-terminal processing: the methionine aminopeptidase and N alpha-acetyl transferase families. *Trends Biochem. Sci.* 23: 263-267.
- Brahm L., Rocher T. y Friedt W.** (2000) PCR-based markers facilitating marker assisted selection in sunflower for resistance to downy mildew. *Crop Science* 40: 676-682.
- Bray E.A., Bailey-Serres J. y Weretilnyk E.** (2000) Response to abiotic stress. In: Buchanan B., Gruissen W. y Jones R (eds) *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of plant Physiologists, Rockville, MD, pp 1158-1203.
- Breeuwer P., Drocourt J.L., Bunschoten N., Zwietering M.H., Rombouts F.M. y Abee T.** (1995) Characterisation of uptake and hydrolysis of fluorescein and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae* which result in accumulation of fluorescent product. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1614-1619.
- Bridges S.M. y Salin M.L.** (1981) Distribution of Iron-Containing Superoxide Dismutase in Vascular Plants. *Plant Physiol.* 68: 275-278.
- Broillet M.C.** (1999) S-nitrosylation of proteins. *Cell Mol. Life Sci.* 55: 1036-1042.
- Brown G.C.** (1999) Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochem. Biophys. Acta.* 1411: 351-369.

- Brul S., Nussbaum S.K. y Dielbandhosing S.K.** (1997) Fluorescent probes for wall porosity and membrana integrity in filamentous fungi. *J. Microbiol. Methods* 28: 169-178.
- Bryk R, Griffin P. y Nathan C.** (2000) Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* 407: 211-215.
- Buchanan B.B.** (1991) Regulation of CO₂ assimilation in oxygenic photosynthesis - the ferredoxin thioredoxin system—perspective on its discovery, present status, and future-development. *Arch. Biochem. Biophys.* 288: 1-9.
- Bundy R.E., Marczin N., Chester A.H. y Yacoub M.** (2000) A redox-based mechanism for nitric oxide-induced inhibition of DNA synthesis in human vascular smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol. Sci.* 129: 1513-1521.
- Bunkelmann J.R. y Trelease R.N.** (1996) Ascorbate peroxidase: a prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes. *Plant Physiol.* 110: 589-598.
- Butterfield D.A. y Stadtman E.R.** (1997) Protein oxidation processes in aging brain. *Adv. Cell Aging Gerontol.* 2: 161-191.
- Cachinero J.M., Cabello F., Jorin J. y Tena M.** (1996) Induction of different chitinase and β -1,3-glucanase isoenzymes in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedling in response to infection by *Plasmopara halstedii*. *Eur. J. Plant Pathology.* 102: 401-405.
- Canino S., Nieri B., Pistelli L., Alpi A. y De Bellis L.** (1996) NADP⁺-isocitrate dehydrogenase in germinating cucumber cotyledons: purification and characterization of a cytosolic isoenzyme. *Physiol. Plant* 98: 13-19.
- Chang C.C., Ball L., Fryer M.J., Baker N.R., Karpinski S., Mullineaux P.M.** (2004) Induction of ascorbate peroxidase 2 expression in wounded Arabidopsis leaves does not involve known wound-signalling pathways but is associated with changes in photosynthesis. *Plant J.* 38: 499-511.
- Chatterjee S., Noack H., Possel H. y Wolf G.** (2000) Induction of nitric oxide synthesis lowers intracellular glutathione in microglia of primary glial cultures. *Glia.* 29: 98-101.
- Chaudiere J. y Ferrari-Iliou R.** (1999) Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem. Toxicol.* 37: 949-962.
- Chazot C. y Kopple J.D.** (2004) Vitamin metabolism and Requirements in Renal Disease and Renal Failure. En Kopple J.D., Massry S.G., eds. *Nutricional Management of Renal Disease*. Philadelphia. Lippincott Williams and Wilkins. 4: 315-356.
- Chen R., Bismuth E., Chapigny M.L. y Gadal P.** (1989) Chromatographic and immunological evidence that chloroplastic and cytosolic pea (*Pisum sativum* L.) NADP-isocitrate dehydrogenases are distinct isoenzymes. *Planta* 178: 157-163.

- Chen R., Maréchal P., Vidal J., Jacquot J.P. y Gadal P.** (1988) Purification and comparative properties of the cytosolic isocitrate dehydrogenases (NADP) from pea (*Pisum sativum*) roots and green leaves. *Eur. J. Biochem.* 175: 565-572.
- Choi I.Y., Sup K.I., Kim H.J. y Park J.W.** (2003) Thermosensitive phenotype of *Escherichia coli* mutant lacking NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *Redox Rep.* 8: 51-56.
- Chomczynski P. y Sacchi N.** (1987) Single-step method for RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Ckless K., Reynaert N.L., Taatjes D.J., Lounsbury K.M., van der Vliet A. y Janssen-Heininger Y.** (2004) In situ detection and visualization of S-nitrosylated proteins following chemical derivatization: identification of Ran GTPase as a target for S-nitrosylation. *Nitric Oxide.* 11: 216-227.
- Clark D., Durner J., Navarre D.A. y Klessig D.F.** (2000) Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13: 1380-1384.
- Clarke A., Desikan R., Hurst R.D., Hancock J.T. y Neill S.J.** (2000) NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant J.* 24: 667-677.
- Cohen H.P., Sarath G., Lee K. y Wagner F.W.** (1986) Soybean root nodule ultrastructure during dark-induced stress and recovery. *Protoplasma* 132: 69-75.
- Cohen Y. y Sackston W.E.** (1973) Factors affecting infection of sunflowers by *Plasmopara halstedii*. *Can. J. Bot.* 51: 15-22.
- Collins N.C., Thordal-Christensen H., Lipka V., Bau S., Kombrink E., Qiu J.L., Huckelhoven R., Stein M., Freialdenhoven A., Somerville S.C. y Schulze-Lefert P.** (2003) SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature.* 425: 973-977.
- Comhair S.A., Xu W., Ghosh S., Thunnissen F.B., Almasan A., Calhoun W.J., Janocha A.J., Zheng L., Hazen S.L. y Erzurum S.C.** (2005) Superoxide dismutase inactivation in pathophysiology of asthmatic airway remodeling and reactivity. *Am. J. Pathol.* 166: 663-674.
- Contreras-Shannon V. y McAlister-Henn L.** (2004) Influence of compartmental localization on the function of yeast NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenases. *Arch. Biochem. Biophys.* 423: 235-246.
- Cooney R.V., Harwood P.J., Custer L.J. y Franke A.A.** (1994) Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environ. Health Persp.* 102: 460-462.
- Corpas F.J., Barroso J.B., Carreras A., Quirós M., León A.M., Romero-Puertas M.C., Esteban F.J., Valderrama R., Palma J.M., Sandalio L.M., Gómez M. y del Río L.A.**

- (2004b) Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiol.* 136: 2722-2733.
- Corpas F.J., Barroso J.B., Carreras A., Valderrama R., Palma J.M., León A.M., Sandalio L.M. y del Río L.A.** (2006b) Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta* 224: 246-254.
- Corpas F.J., Fernandez-Ocana A., Carreras A., Valderrama R., Luque F., Esteban F.J., Rodriguez-Serrano M., Chaki M., Pedrajas J.R., Sandalio L.M., del Río L.A. y Barroso J.B.** (2006a) The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant Cell Physiol.* 47: 984-994.
- Corpas F.J., Barroso J.B., Sandalio L.M., Palma J.M., Lupiáñez J.A. y del Río L.A.** (1999) Peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase. Characterization and activity regulation during natural senescence. *Plant Physiol.* 121: 921-928.
- Corpas F.J., Carreras A., Esteban F., Chaki M., Valderrama R., del Río L.A. y Barroso J.B.** (2008) Localization of S-Nitrosothiols and assay of nitric oxide synthase and Snitrosogluthathione reductase activity in plants. *Methods in Enzymology.* 437: (doi: 10.1016/S0076-6879(07)37028-6) en prensa.
- Corpas F.J., Carreras A., Valderrama R., Chaki M., Palma J.M., del Río L.A. y Barroso J.B.** (2007b) Reactive nitrogen species and nitrosative stress in plants. *Plant Stress* 1: 37-41.
- Corpas F.J., Carreras A., Palma J.M., Chaki M., Valderrama R., Leterrier M., del Río L.A. y Barroso J.B.** (2007d) Arginine-dependent nitric oxide synthase (NOS) and S-nitrosogluthathione reductase activities (GSNOR) in pea plants under stress conditions. Low temperature triggers nitrosative stress. *Plant Physiology.* Sometido a publicación.
- Corpas F.J., Barroso J.B. y del Río L.A.** (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci.* 6: 145-150.
- Corpas F.J., Sandalio L.M., del Río L.A. y Trelease R.N.** (1998) Copper-zinc superoxide dismutase is a constituent enzyme of the matrix of peroxisomes in the cotyledons of oilseed plants. *New Phytologist* 138: 307-314.
- Corpas F.J., Barroso J.B. y del Río L.A.** (2004a) Enzymatic sources of nitric oxide in plant cells -beyond one protein-one function. *New Phytologist.* 162: 246-248.
- Corpas F.J., del Río L.A. y Barroso J.B.** (2007c) Need of biomarkers of nitrosative stress in plants. *Trends Plant Sci* 12(10): (doi: 10.1016/j.tplants.2007.08.013) en prensa.
- Corpas F.J. y Trelease R.N.** (1998a) Differential expression of ascorbate peroxidase and a putative molecular chaperone in the boundary membrane of differentiating cucumber seedling peroxisomes. *J. Plant Physiol.* 153: 332-338.

- Costa-Pereira A.P. y Cotter T.G.** (1999) Metabolic alterations associated with apoptosis. En: G.P. Studzinski (Ed.), Apoptosis: a practical approach, págs: 141-156. Oxford University Press, New York.
- Crawford J.H., Chacko B.K., Pruitt H.M., Piknova B., Hogg N. y Patel R.P.** (2004) Transduction of NO-bioactivity by the red blood cell in sepsis: novel mechanisms of vasodilation during acute inflammatory disease. *Blood* 2004-03.
- Crawford N.M. y Guo F.Q.** (2005) New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends Plant Sci.* 10: 195-200.
- Creissen G., Firmin J., Fryer M., Kular B., Leyland N., Reynolds H., Pastori G., Wellburn F., Baker N., Wellburn A. y Mullineaux P.** (1999) Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *Plant Cell.* 11: 1277-1292.
- Cueto M., Hernández-Perera O., Martín R., Bentura M.L., Rodrigo J., Lamas S. y Golavano M.P.** (1996) Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Lett.* 398: 159-164.
- Dalton D.A., Baird L.M., Langeberg L., Taugher C.Y., Anyan W.R., Vance C.P. y Sarath G.** (1993) Subcellular localization of oxygen defense enzymes in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) root nodules. *Plant Physiol* 102: 481-489.
- Dalton D.A., Langeberg L. y Robbins M.** (1992) Purification and characterization of monodehydroascorbate reductase from soybean root nodules. *Arch. Biochem. Biophys.* 292: 281-286.
- Dangl, J.L., Dietrich R.A. y Richberg M.H.** (1996) Death Don't Have No Mercy: Cell Death Programs in Plant-Microbe Interactions. *Plant Cell.* 8: 1793-1807.
- Dat J., Vandenabeele S., Vranová E., Van Montagu M., Inzé D., Van Breusegem F.** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol. Life Sci.* 57: 779-795.
- Dat J.F., Lopez-Delgado H., Foyer C.H. y Scott I.M.** (1998b) Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiol.* 116: 1351-1357.
- Dat J.F., Foyer C.H. y Scott I.M.** (1998a) Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. *Plant Physiol.* 118: 1455-1461.
- Davidson J.F. y Schiestl R.H.** (2001) Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 21: 8483-8489.
- Davies D.D. y Patil K.D.** (1974) Regulation of malic enzyme of *Solanum tuberosum* by metabolites. *Biochem. J.* 137: 45-53.

- Davies K.J.** (1999) The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life*. 48: 41-47.
- de Gara L., Paciolla C., de Tullio M.C., Motto M. y Arrigoni O.** (2000) Ascorbate-dependent hydrogen peroxide detoxification and ascorbate regeneration during germination of a highly productive maize hybrid. Evidence of an improved detoxification mechanism against reactive oxygen species. *Physiol. Plant* 109: 7-13.
- De Jesús-Barríos M., Liu L., Nussbaun J.C., Cox G.M., Stamler J.S. y Heitman J** (2003) Enzymes that counteract nitrosative stress promote fungal virulence. *Curr. Biol.* 13: 1963-1968.
- de Pinto M.C., Tommasi F. y De Gara L.** (2002) Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiol.* 130: 698-708.
- de Pinto M.C., Tommasi F. y de Gara L.** (2000) Enzymes of the ascorbate biosynthesis and ascorbate-glutathione cycle in cultured cells of tobacco Bright Yellow-2. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 541-550.
- de Pinto M.C., Francis D. y de Gara L.** (1999) The redox state of ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco TBV-2 cells. *Protoplasma* 209: 90-97.
- Dean J.V. y Harper J.E.** (1988) The Conversion of Nitrite to Nitrogen Oxide(s) by the Constitutive NAD(P)H-Nitrate Reductase Enzyme from Soybean. *Plant Physiol.* 88: 389-395.
- Debnam P.M., Fernie A.R., Leisse A., Golding A., Bowsher C.G., Grimshaw C., Knight J.S. y Emes M.J.** (2004) Altered activity of the P2 isoform of plastidic glucose 6-phosphate dehydrogenase in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) causes changes in carbohydrate metabolism and response to oxidative stress in leaves. *Plant J.* 38: 49-59.
- Debnam P.M. y Emes M.J.** (1999) Subcellular distribution of enzymes of the oxidative pentose phosphate pathway in root and leaf tissues. *J. Exp. Bot.* 50: 1653-1661.
- Degousee N., Triantaphylides C. y Montillet J.L.** (1994) Involvement of Oxidative Processes in the Signaling Mechanisms Leading to the Activation of Glyceollin Synthesis in Soybean (*Glycine max*). *Plant Physiol.* 104: 945-952.
- del Río L.A., Sandalio L.M., Altomare D.A. y Zilinskas B.A.** (2003) Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 54: 923-933.

- del Río L.A., Corpas F.J., Sandalio L.M., Palma J.M., Gómez M. y Barroso J.B.** (2002) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J. Exp. Bot.* 53: 1255-1272.
- del Río L.A., Palma J.M., Sandalio L.M., Corpas F.J., Pastori G.M., Bueno P. y López-Huertas E.** (1996) Peroxisomes as a source of superoxide and hydrogen peroxide in stressed plants. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 434-438.
- del Río L.A., Sandalio L.M., Corpas F.J., López-Huertas E., Palma J.M. y Pastori G.M.** (1998) The activated oxygen-mediated metabolic functions of leaf peroxisomes. *Physiologia Plantarum*. 104: 673-680.
- del Río L.A., Sandalio L.M., Palma J.M., Bueno P. y Corpas F.J.** (1992) Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Rad. Biol. Med.* 13: 557-580.
- del Río L.A., Corpas F.J. y Barroso J.B.** (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry*. 65: 783-792.
- del Río L.A., Lyon D.S., Olah I., Glick B. y Salin M.L.** (1983) Immunocytochemical evidence for a peroxisomal localization of manganese superoxide dismutase in leaf protoplasts from a higher plant. *Planta* 158: 216-224.
- Delanoe D. y Hamant C.** (1972). *Proc. 5th Int. Sunflower Conf.* Pp 152-155. Clermont-Ferrand, France.
- Delledonne M., Zeier J., Marocco A. y Lamb C.** (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 13454-13459.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A. y Lamb C.J.** (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588.
- Desikan R., Cheung M.K., Bright J., Henson D., Hancock J.T. y Neill S.J.** (2004) ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *J. Exp. Bot.* 55: 205-212.
- Desikan R., Griffiths R., Hancock J. y Neill S.** (2002) A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99:16314-16318.
- Desikan R., A-H-Mackerness S., Hancock J.T. y Neill S.J.** (2001) Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* 127: 159-172.
- Desikan R., Neill S.J. y Hancock J.T.** (2000) Hydrogen peroxide-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 773-778.

- Díaz M., Achkor H., Titarenko E. y Martínez M.C.** (2003) The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase /GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. *FEBS Letters* 543: 136-139.
- Dietz K. J., Jacob S., Oelze M. L., Laxa M., Tognetti V., de Miranda S.M., Baier M. y Finkemeier I.** (2006) The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *J. Exp. Bot.* 57: 1697-709.
- Dipierro S. y Borranccino G.** (1991) Dehydroascorbate reductase from potato tubers. *Phytochem.* 30: 427-429.
- Doke N.** (1983) Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infectans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Phys. Plant Pathol.* 23: 345-357.
- Doke N.** (1997) The oxidative burst: roles in signal transduction and plant stress. In: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, pp. 785-813, Scandalios J. G. (ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Dong H., Liu A., Wang Y., Liu B., Fan H., Liu G., Wang R., Chen J., Sun Y., Zhang L., Qian Y., Gao Z., Xu Q., Sun X. y Sang C.** (1995) Preparation SRS2, its functions to control the disease and to improve in: *Induced Resistance Against Diseases in Plants*. H. Dong, ed. Science Press, Beijing.
- Draper J.** (1997) Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defence. *Trends Plant. Sci.* 2: 162-165.
- Droillard M.J. y Paulin A.** (1990) Isozymes of superoxide dismutase in mitochondria and peroxisomes isolated from petals of carnation (*Dianthus caryophyllus*) during senescence. *Plant Physiol.* 94: 1187-1192.
- Duley J.A., Harris O. y Holmes R.S.** (1985) Analysis of human alcohol- and aldehyde-metabolizing isozymes by electrophoresis and isoelectric focusing. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 9: 263-271.
- Dunaeva M. y Adamska I.** (2001) Identification of genes expressed in response to light stress in leaves of *Arabidopsis thaliana* using RNA differential display. *Eur. J. Biochem.* 268: 5521-5529.
- Durner J., Gow A.J., Stamler J.S. y Glazebrook J.** (1999) Ancient origins of nitric oxide signaling in biological systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 14206-14207.
- Durner J., Wendehenne D. y Klessig D.F.** (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 10328-10333.

- Durner J. y Klessig D.F.** (1999) Nitric oxide as a signal in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 369-374.
- Edwards E.A., Rawsthorne S. y Mullineaux P.M.** (1990) Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 180: 278-284.
- Eiserich J.P., Hristova M., Cross C.E., Jones A.D., Freeman B.A., Halliwell B. y van der Vliet A.** (1998) Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature*. 391: 393-397.
- Elstner E.F.** (1987) Metabolism of activated oxygen species. In: Davies D.D., ed. *Biochemistry of plants*, vol. 11. London: Academic Press, 253-315.
- Farias De Aragao M.E., Silva Lima M.G., Fernandes De Melo D. y Dizengremel P.** (1997) NaCl-induced changes of NAD (P) malic enzyme activities in *Eucalyptus citriodora* leaves. *Trees* 12: 66-72.
- Feechan A., Kwon E., Yun B.W., Wang Y., Pallas J.A. y Loake G.J.** (2005) A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 8054-8059.
- Feelisch M. y Stamler J.S.** (1996) En: Feelisch M. y Stamler J.S. (Eds.). *Methods in nitric oxide research*, págs.: 71-118. Donors of nitrogen oxides. Wiley, New York.
- Feierabend J. y Engel S.** (1986) Photoinactivation of catalase in vitro and in leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 251: 567-576.
- Fernández M.R., Biosca J.A. y Parés X.** (2003) S-nitrosogluthathione reductase activity of human and yeast glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and its nuclear and cytoplasmic localisation. *Cell Mol. Life Sci.* 60: 1013-1018.
- Fernández V.M., Sevilla S., López-Gorgé J. y del Río L.A.** (1982) Evidence of manganese (III) binding to the mangano superoxide dismutase from a higher plant (*Pisum sativum* L.). *J. Inorganic Biochem.* 16: 79-84.
- Ferrer M.A. y Ros-Barceló A.** (1999) Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H₂O₂ production by the xylem of *Zinnia elegans*. *Plant Cell Environ.* 22: 891-897.
- Fickenscher K. y Scheibe R.** (1986) Purification and properties of the cytoplasmic glucose-6-phosphate dehydrogenase from pea leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 247:393-402.
- Fieuw S., Müller-Röber B., Gálvez S. y Willmitzer L.** (1995) Cloning and expression analysis of the cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase from potato. Implications for nitrogen metabolism. *Plant Physiol.* 107: 905-913.
- Finkel T.** (2000) Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett.* 476: 52-54.
- Flor H.H.** (1947) Inheritance of reaction to rust in flax. *J. Agric. Res.* 74: 241-262.

- Floryszak-Wieczorek J., Arasimowicz M., Milczarek G., Jelen H. y Jackowiak H. (2007)** Only an early nitric oxide burst and the following wave of secondary nitric oxide generation enhanced effective defence responses of pelargonium to a necrotrophic pathogen. *New Phytol.* 175: 718-730.
- Foissner I., Wendehenne D., Langebartels C. y Dürner J. (2000)** In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *Plant J.* 23: 817-824.
- Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H., Mylona P., Miedema H., Torres M.A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J.D., Davies J.M. y Dolan L. (2003)** Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature.* 422: 442-446.
- Foster M.W., McMahon T.J. y Stamler J.S. (2003)** S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol. Med.* 9: 160-168.
- Foyer C.H., López-Delgado H., Dat J.F. y Scott I.M. (1997)** Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plant.* 100: 241-254.
- Foyer C.H. (2001)** Prospects for enhancement of the soluble antioxidants, ascorbate and glutathione. *Biofactors* 15: 75-78.
- Foyer C.H. y Halliwell B. (1976)** The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21-25.
- Foyer C.H. y Halliwell B. (1977)** Purification and properties of dehydroascorbate reductase from spinach leaves. *Phytochem.* 16: 1347-1350.
- Foyer C.H. y Harbinson J. (1994)** Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In C.H. Foyer and P.M. Mullineaux, (eds), *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, CRC Press, Boca Raton, pp. 1-42.
- Foyer C.H. y Mullineaux P.M. (1994)** En: Foyer C.H. y Mullineaux P.M. (Eds.) Cause of photooxidative stress and amelioration of defense systems of plants. Boca Ratón, F.L., CRC Press.
- Foyer C.H. y Noctor C. (2000)** Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytologist.* 146: 359-388.
- Foyer C.H. y Noctor G. (2005)** Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866-1875.
- Fridovich I. (1986)** Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 247: 1-11.
- Fridovich I. (1995)** Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64:97-112.

- Gálvez S. y Gadal P.** (1995) On the function of the NADP-dependent isocitrate dehydrogenase isoenzymes in living organisms. *Plant Sci.* 105: 1-14.
- Garcia-Mata C., Gay R., Sokolovski S., Hills A., Lamattina L. y Blatt M.R.** (2003) Nitric oxide regulates K^+ and Cl^- channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 11116-11121.
- Garcia-Mata C. y Lamattina L.** (2002) Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant. Physiol.* 128: 790-792.
- Gastaldi G., Laforenza U., Casirola D., Ferrari G., Tosco M. y Rindi G.** (1999) Energy depletion differently affects membrane transport and intracellular metabolism of riboflavin taken up by isolated rat enterocytes. *J. Nutr.* 129: 406-409.
- Gaston B., Reilly J., Drazen J.M., Fackler J., Ramdev P., Arnette D., Mullins M.E., Sugarbaker D.J., Chee C., Singel D.J., Loscalzo J. y Stamler J.S.** (1993) Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 10957-10961.
- Gechev T., Gadjev I., Van Breusegem F., Inze D., Dukiandjiev S., Toneva V. y Minkov I.** (2002) Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cell Mol. Life Sci.* 59: 708-714.
- Gechev T., Willekens H., Van Montagu M., Inze D., Van Camp W., Toneva V. y Minkov I.** (2003) Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *J. Plant Physiol.* 160: 509-515.
- Glazebrook J.** (1999) Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 280-286.
- Gómez J.M., Hernández J.A. Jiménez A., del Río L.A. y Sevilla F.** (1999) Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants. *Free Rad. Res.* 31: S11-18.
- Gong M., Li Y.J. y Chen S.Z.** (1998) Abscisic acid-induced thermotolerance in maize seedling is mediated by calcium and associated with antioxidant system. *J. Plant Physiol.* 153: 488-496.
- Gong Y.W. y Yuan Y.J.** (2005) Nitric oxide mediates inactivation of glutathione S-transferase in suspension culture of *Taxus cuspidata* during shear stress. *J. Biotechnology* 123: 185-192.
- Gonzalez-Villasenor L.I. y Powers D.A.** (1986) A multilocus system for studying tissue and subcellular specialization. The pH and temperature dependence of the two major NADP-dependent isocitrate dehydrogenase isozymes of the fish *Fundulus heteroclitus*. *J. Biol. Chem.* 261: 11471-11477.

- Goodman R.N. y Novacky A.J.** (1994) The hypersensitive reaction in plants to pathogens: A resistance Phenomenon. American Phytopathological Society Press, St. Paul.
- Gorren A.C.F., Schrammel A., Schmidt K. y Mayer B.** (1996) Decomposition of S-nitrosogluthathione in the presence of copper ions and glutathione. Archives of Biochemistry and Biophysics 330: 219-228.
- Gould K.S., Lamotte O., Klinguer A., Pugin A. y Wedehenne D.** (2003) Nitric oxide production in tobacco leaf cell: a generalized stress response? Plant Cell Environ. 26: 1851-1862.
- Gow A.J., Farkouh C.R., Munson D.A., Posencheg M.A. y Ischiropoulos H** (2004) Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. American J. Physiol. Lung Cellular Mol. Physiol. 287: L262-268.
- Gow A.J., Luchsinger B.P., Pawloski J.R., Singel D.J. y Stamler J.S.** (1999) The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 9027-9032.
- Grace S.C. y Logan B.A.** (1996) Acclimation of Foliar Antioxidant Systems to Growth Irradiance in Three Broad-Leaved Evergreen Species. Plant Physiol. 112:1631-1640.
- Grant J.J. y Loake G.J.** (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signalling in disease resistance. Plant Physiol. 124: 21-29.
- Grantz A.A., Brummell D.A. y Bennett A.B.** (1995) Ascorbate free radical reductase mRNA levels are induced by wounding. Plant Physiol. 108: 411-418.
- Greenacre S.A. y Ischiropoulos H.** (2001) Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. Free Radic. Res. 34: 541-581.
- Greenberg J.T.** (1996) Programmed cell death: a way of life for plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 12094-12097.
- Gregory J.F. 3rd.** (1998) Nutritional Properties and significance of vitamin glycosides. Annu. Rev. Nutr. 18: 277-296.
- Griffith O.W. y Kilbourn R.G.** (1996) Nitric oxide synthase inhibitors: amino acids. Methods Enzymol. 268:375-392.
- Grün S., Lindermayr C., Sell S. y Durner J.** (2006) Nitric oxide and gene regulation in plants. J. Exp. Bot. 57: 507-516.
- Guan L., Zhao J. y Scandalios J.G.** (2000) Cis-elements and trans-factors that regulate expresión of the maize *Cat1* antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H₂O₂ is the likely intermediary signalling molecule for the response. Plant J. 22: 87-95.
- Guan L. y Scandalios J.G.** (1996) Molecular evolution of maize catalases and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic catalases. J. Mol. Evol. 42: 570-579.

- Guan L.M. y Scandalios J.G.** (2000) catalase transcript accumulation in response to dehydration and osmotic stress in leaves of maize viviparous mutants. *Redox Rep.* 5: 377-383.
- Gulya T.J., Sackston W.E., Viranyi F., Masirevic S. y Rashid K.Y.** (1991) New races of the sunflower downy mildew pathogen (*Plasmopara halstedii*) in Europe and North and South America. *J. Phytopathol.* 132: 303-311.
- Guo Y.Q., Pautot V., Holzer F.M. y Walling L.L.** (1996) A complex array of proteins related to the multimeric Leucine Aminopeptidase of tomato. *Plant Physiol.* 110: 1257-1266.
- Gupta S.A., Heinen J.L., Holaday A.S., Burke J.J. y Allen R.D.** (1993a) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 1629-1633.
- Gupta S.A., Webb R.P., Holaday A.S. y Allen R.D.** (1993b) Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. *Plant Physiology* 103: 1067-1073.
- Haendeler J., Hoffmann J., Tischler V., Berk B.C., Zeiher A.M. y Dimmeler S.** (2002) Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine. *Nat. Cell Biol.* 4: 743-749.
- Halliwell B. y Gutteridge J.M.C.** (1989) *Free radicals in biology and medicine* (Oxford: Clarendon Press).
- Halliwell B. y Gutteridge J.M.C.** (2000) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Hamilton G.A.** (1991) Chemical and biochemical reactivity of oxygen. En: *Active oxygen/oxidative stress in plant metabolism*. Pell E.J. y Steffen S.K. (Eds.), págs: 6-12. American Society of Plant Physiologist, Rockville.
- Hammond-Kosack K.E. y Jones J.D.G.** (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant cell.* 8: 1773-1791.
- Hanafy K.A., Krumenacker J.S. y Murad F.** (2001) NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med. Sci. Monit.* 7: 801-819.
- Haqqani A.S., Do S.K. y Birnboim H.C.** (2003) The role of a formaldehyde dehydrogenase-glutathione pathway in protein S-nitrosation in mammalian cells. *Nitric Oxide* 9: 172-181.
- Hardy E., Santana H., Sosa A., Hernandez L., Fernandez-Patron C. y Castellanos-Serra L.** (1996) Recovery of biologically active proteins detected with imidazole-sodium dodecyl sulfate-zinc (reverse stain) on sodium dodecyl sulfate gels. *Anal. Biochem.* 240: 150-152.
- Haselbeck R.J. y McAlister-Henn L.** (1991) Isolation, nucleotide sequence, and disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding mitochondrial NADP(H)-specific isocitrate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 266: 2339-2345.

- Hassan H.M.** (1989) Microbial superoxide dismutases. En: Advances in genetic. Scandalios J.G. (Ed.), págs: 65-97. Academia Press, San Diego.
- Hausladen A. y Stamler I.S.** (1999) Nitrosative stress. Methods Enzymol. 300: 389-395.
- He Y., Tang R.H., Hao Y., Stevens R.D., Cook C.W., Ahn S.M., Jing L., Yang Z., Chen L., Guo F., Fiorani F., Jackson R.B., Crawford N.M. y Pei Z.M.** (2004) Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. Science 305: 1968-1971.
- Heber U., Hudson M.A. y Hillier U.W.** (1967) Lokalisation von Enzymen des Reduktiven und des oxidativen Pentosephosphatzklus in den Chloroplasten und Permeabilität der Chloroplastenmembranen gegenüber Metaboliten. Z Naturforsch 22b: 1200-1215.
- Heijnen H.F., van Donselaar E., Slot J.W., Fries D.M., Blachard-Fillion B., Hodara R., Lightfoot R., Polydoro M., Spielberg D., Thomson L., Regan E.A., Crapo J. y Ischiropoulos H.** (2006) Subcellular localization of tyrosine-nitrated proteins is dictated by reactive oxygen species generating enzymes and by proximity to nitric oxide synthase. Free Radic. Biol. Med. 40: 1903-1913.
- Henry Y.A., Ducastel B. y Guissani A.** (1997) Basic chemistry of nitric oxide and related nitrogen oxides. In: Henry, Y.A., Guissani, A., Ducastel, B., eds., Nitric Oxide Research from Chemistry to Biology, págs: 15-46. Landes Co. Biomed. Publ., Austin, USA.
- Hernandez-Nistal J., Dopico B. y Labrador E.** (2002) Cold and salt stress regulates the expression and activity of a chickpea cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase. Plant Science 163: 507-514.
- Hill A.C. y Bennet J.H.** (1970) Inhibition of apparent photosynthesis by nitrogen oxides. Atmos Environ. 4: 341-348.
- Hofmann B., Hecht H.J. y Flohé L.** (2002) Peroxiredoxins. Biological Chemistry 383: 347-364.
- Hogg N., Singh R.J., Konorev E., Joseph J. y Kalyanaraman B.** (1997) S-Nitrosoglutathione as a substrate for gamma-glutamyl transpeptidase. Biochem. J. 323 (Pt 2): 477-481.
- Hogg N.** (2000) Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. Free Rad. Biol. Med. 28: 1478-1486.
- Holmes A.J. y Williams D.L.H.** (2000). Reaction of ascorbic acid with S-nitrosothiols: clear evidence for two distinct reaction pathways. J. Chem. Society Perkin Transactions 2: 1639-1644.
- Horling H., Köning J. y Dietz K.J.** (2002) Type II peroxiredoxin C, a member of the peroxiredoxin family of *Arabidopsis thaliana*: its expression and activity in comparison with other peroxiredoxins. Plant Physiol. Biochem. 40: 491-499.

- Hossain M.A., Nakano Y. y Asada K.** (1984) Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. *Plant Cell Physiol.* 25: 385-395.
- Hossain M.A. y Asada K.** (1984) Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant Cell Physiol.* 25: 85-92.
- Hossain M.A. y Asada K.** (1985) Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme. *J. Biol. Chem.* 260:12920-12926.
- Huang J., Sommers E.M., Kim-Shapiro D.B. y King S.B.** (2002) Horseradish peroxidase catalyzed nitric oxide formation from hydroxyurea. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 3473-3480.
- Huang X., Stettmaier K., Michel C., Hutzler P., Mueller M.J. y Durner J.** (2004) Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218: 938-946.
- Huften C.A., Besford R.T. y Wellburn A.R.** (1996) Effects of NO (+NO₂) pollution on growth, nitrate reductase activities and associated protein contents in glasshouse lettuce grown hydroponically in winter CO₂ enrichment. *New Phytologist* 133: 495-501.
- Hughes M.A., Dunn M.A., Pearce R.S., White A.J. y Zhang L.** (1992) An abscisic-acid-responsive, low temperature barley gene has homology with a maize phospholip transfer protein. *Plant Cell Environ.* 15: 861-865.
- Hughes M.A. y Dunn M.A.** (1996) The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *J. Exp. Bot.* 47: 291-305.
- Hughes M.N.** (1999) Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxynitrite. *Biochem. Biophys. Acta.* 1411: 263-272.
- Igamberdiev A.U. y Gardeström P.** (2003) Regulation of NAD and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases by reduction levels of pyridine nucleotides in mitochondria and cytosol of pea leaves. *Biochem. Biophys. Acta.* 1606: 117-125.
- Ignarro L.J., Edwards J.C., Gruetter D.Y., Barry B.K. y Gruetter C.A.** (1980) Possible involvement of S-nitrosothiols in the activation of guanylate cyclase by nitroso compounds. *FEBS Lett.* 110: 275-278.
- Illingworth J.A. y Tipton K.F.** (1970) Purification and properties of the nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-dependent isocitrate dehydrogenase from pig liver cytoplasm. *Biochem. J.* 118: 253-258.
- Inoue K., Akaike T., Miyamoto Y., Okamoto T., Sawa T., Otagiri M., Suzuki S., Yoshimura T. y Maeda H.** (1999) Nitrosothiol formation catalyzed by ceruloplasmin. Implication for cytoprotective mechanism in vivo. *J. Biol. Chem.* 274: 27069-27075.
- Ischiropoulos H.** (2003) Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305: 776-783.

- Ishikawa T., Takeda T. y Shigeoka S.** (1996) Purification and characterization of cytosolic ascorbate peroxidase from Komatsuna (*Brassica rapa*). *Plant Sci.* 120: 11-18.
- Izawa S., Maeda K., Miki T., Mano J., Inoue Y. y Kimura A.** (1998) Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptive response to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal* 330: 811-817.
- Jablonski P.P. y Anderson J.W.** (1981) Light-dependent reduction of dehydroascorbate by ruptured pea chloroplasts. *Plant Physiol.* 67: 1239-1244.
- Jensen D.E., Belka G.K. y Du Bois G.C.** (1998) S-nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochem. J.* 331: 659-668.
- Jiang M. y Zhang J.** (2001) Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of Maize seedlings. *Plant Cell Physiology* 42: 1265-1273.
- Jih P.J., Chen Y.C. y Jeng S.T.** (2003) Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide in expression of the ipomoelin gene from sweet potato. *Plant Physiol.* 132: 381-389.
- Jiménez A., Hernández J.A., Pastori G., del Río L.A. y Sevilla F.** (1998) Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiol.* 118: 1327-1335.
- Jiménez A., Hernández J.A., del Río L.A. y Sevilla F.** (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol.* 114: 275-284.
- Jo S.H., Son M.K., Koh H.J., Lee S.M., Song I.H., Kim Y.O., Lee Y.S., Jeong K.S., Kim W.B., Park J.W., Song B.J. y Huh T.L.** (2001) Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP-dependent isocitrate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 276: 16168-16176.
- Johansson E., Olsson O. y Nyström T.** (2004) Progression and Specificity of Protein Oxidation in the Life Cycle of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biological Chemistry* 279: 22204-22208.
- Johnson M.A., Macdonald T.L., Mannick J.B., Conaway M.R. y Gaston B.** (2001) Accelerated s-nitrosothiol breakdown by amyotrophic lateral sclerosis mutant copper,zinc-superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 276: 39872-39878.
- Jourd'heuil D., Jourdeuil F.L., Lowery A.M., Hughes J. y Grisham M.B.** (2005) Detection of nitrosothiols and other nitroso species *in vitro* and in cells. *Methods Enzymology.* 396: 118-131.
- Jourd'heuil D., Laroux F.S., Miles A.M., Wink D.A. y Grisham M.B.** (1999) Effect of superoxide dismutase on the stability of S-nitrosothiols. *Arch. Biochem. Biophys.* 361: 323-330.

- Kaminaka H., Morita S., Tokumoto M., Masumura T. y Tanaka K.** (1999) Differential gene expressions of rice superoxide dismutase isoforms to oxidative and environmental stresses. *Free Radic. Res. Suppl.* S219-25.
- Kampinga H.H., Brunsting J.F., Stege G.J., Burgman P.W. y Konings A.W.** (1995) Thermal protein denaturation and protein aggregation in cells made thermotolerant by various chemicals: role of heat shock proteins. *Exp. Cell Res.* 219: 536-546.
- Kanematsu S. y Asada K.** (1979) Ferric and manganic superoxide dismutases in *Euglena gracilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 195: 535-545.
- Kanematsu S. y Asada K.** (1989) CuZn-superoxide dismutases from the fern *Equisetum arvense* and the green alga *Soirogyra* sp.: occurrence of chloroplast and cytosol types of enzyme. *Plant Cell Physiol.* 30: 717-727.
- Kanematsu S. y Asada K.** (1991) Chloroplast and cytosol isozymes of CuZn-superoxide dismutase: their characteristic amino acid sequences. *Free Radic. Res. Commun.* 1: 383-390.
- Kanematsu S. y Asada K.** (1994) Superoxide dismutase. En: Fukui T. y Soda K. (Eds.). *Molecular aspects of enzyme catalysis*, págs.: 191-210. Kodansha Ltd., Tokyo.
- Kar M. y Feierabend J.** (1984) Changes in the activities of enzymes involved in amino-acid metabolism during the senescence of detached wheat leaves. *Physiol. Plant* 62: 39-44.
- Karpinski S., Escobar C., Karpinska B., Creissen G. y Mullineaux P.M.** (1997) Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress. *Plant Cell* 9: 627-640.
- Karpinski S., Reynolds H., Karpinska B., Wingsle G., Creissen G. y Mullineaux P.** (1999) Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* 284: 654-657.
- Katiyar-Agarwal S., Agarwal M. y Grover A.** (2003) Heat-tolerant basmati rice engineered by over-expression of hsp101. *Plant Mol. Biol.* 51: 677-686.
- Katoh S. y San Pietro A.** (1967) Ascorbate-supported NADP photoreduction by heated *Euglena* chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 122: 144-152.
- Kim E.J., Chung H.J., Suh B., Hah Y.C. y Roe J.H.** (1998) Transcriptional and post-transcriptional regulation by nickel of *sod N* gene encoding Ni-containing SOD from *Streptomyces coelicolor* Müller. *Mol. Microbiol.* 27: 187-195.
- Kirkman H.N., Galiano S. y Gaetani G.F.** (1987) The function of catalase-bound NADPH. *J. Biol. Chem.* 262: 660-666.
- Kirkman H.N. y Gaetani G.F.** (1978) Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4343-4347.

- Klatt P. y Lamas S.** (2000) Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur. J. Biochem.* 267: 4928-4944.
- Klepper L.** (1975) Evolution of nitrogen oxide gases from herbicide treated plant tissues. *WSSA Abstracts* 184: 70.
- Klessig D.F., Durner J., Noad R., Navarre D.A., Wendehenne D., Kumar D., Zhou J., Shah J., Zhang S., Kachroo P., Trifa Y., Pontier D., Lam E. y Silva H.** (2000) Nitric oxide and salicylic acid signalling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8849-8855.
- Knogge W.** (1996) Fungal Infection of Plants. *Plant Cell* 8: 1711-1722.
- Koeck T., Stuehr D.J. y Aulak K.S.** (2005) Mitochondria and regulated tyrosine nitration. *Biochem. Soc. Trans.* 33(Pt 6): 1399-1403.
- Kojima H., Sakurai K., Kikuchi K., Kawaraha S., Kirino Y., Nagoshi H., Hirata Y. y Nagano T.** (1998) Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chem. Pharm. Bull.* 46: 373-375.
- Kombrink E. y Somssich I.E.** (1997) Pathogenesis-related proteins and plant defense. En: *The Mycota V., Part A. Plant Relationships*, (Carroll G., Tudzynski P., eds), pp 107-128. Berlin: Springer-Verlag.
- Kong W., Shiota S., Shi Y., Nakayama H. y Nakayama K.** (2000) A novel peroxiredoxin of the plant *Sedum lineare* is a homologue of *Escherichia coli* bacterioferritin co-migratory protein (Bcp). *Biochem. J.* 351: 107-114.
- Kono Y. y Fridovich I.** (1982) Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 257: 5751-5754.
- Koppal T., Drake J. y Butterfield D.A.** (1999) In vivo modulation of rodent glutathione and its role in peroxynitrite-induced neocortical synaptosomal membrane protein damage. *Biochim. Biophys. Acta.* 1453: 407-411.
- Koppenol W.H., Moreno J.J., Pryor W.A., Ischiropoulos H. y Beckman J.S.** (1992) Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem. Res. Toxicol.* 5: 834-842.
- Kotchoni O.S., Kuhns C., Ditzer A., Kirch H.H. y Bartels D.** (2006) Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress. *Plant Cell Environ.* 29: 1033-1048.
- Kotchoni S.O. y Gachomo E.W.** (2006) The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. *J. Biosci.* 31: 389-404.

- Kovtun Y., Chiu W.L., Tena G. y Sheen J.** (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 2940-2945.
- Kröniger W., Rennenberg H., Tadros M.H. y Polle A.** (1995) Purification and properties of manganese superoxide dismutase from Norway spruce (*Picea abies* L. Karst). *Plant Cell Physiology* 36: 191-196.
- Kubo A., Aono M., Nakajima N., Saji H., Tanaka K. y Kondo N.** (1999) Differential responses in activity of antioxidant enzymes to different environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.* 112: 279-290.
- Kumar D. y Klessig D.F.** (2000) Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene and jasmonic acid. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13: 347-351.
- Kuzniak E. y Sklodowska M.** (2005) Fungal pathogen-induced changes in the antioxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. *Planta* 222: 192-200.
- Kwak J.M., Mori I.C., Pei Z.M., Leonhardt N., Torres M.A., Dangl J.L., Bloom R.E., Bodde S., Jones J.D. y Schroeder J.I.** (2003) NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 22: 2623-2633.
- Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lalk I. y Dorffling K.** (1985) Hardening, abscisic acid, proline, and freezing resistance in two winter wheat varieties. *Physiol. Plant.* 63: 297-292.
- Lamattina L., García-Mata C., Graziano M. y Pagnussat G.** (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 109-136.
- Lamb C. y Dixon R.A.** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 251-275.
- Lamotte O., Curtois C., Barnavon L., Pugin A. y Wendehenne D.** (2005). Nitric oxide in plants: the biosynthesis and cell signalling properties of a fascinating molecule. *Planta* 221: 1-4.
- Lamotte O., Gould K., Lecourieux D., Sequeira-Legrand A., Lebrun-Garcia A., Durner J., Pugin A. y Wendehenne D.** (2004) Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol.* 135: 516-529.
- Langebartels C., Ernst D., Kangasjärvi J. y Sandermann H.** (2000) Ozone effects on plant defense. In L. Packer y H. Sies (eds), *Singlet Oxygen, UV-A and Ozone* (Methods in Enzymology, Vol. 319), Academic Press, San Diego, pp. 520-535.

- Larkindale J. y Knight M.R.** (2002) Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiol.* 128: 682-695.
- Laszlo F., Evans S.M. y Whittle B.J.** (1995) Aminoguanidine inhibits both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in rat intestinal microvasculature in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 272: 169-175.
- Lee H.S., Kim K.Y., You S.H., Kwon S.Y. y Kwak S.S.** (1999) Molecular characterization and expression of a cDNA encoding copper/zinc superoxide dismutase from cultured cells of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Mol. Gen. Genet.* 262: 807-814.
- Lee S.M., Koh H.J., Park D.C., Song B.T., Huh T.L. y Park J.W.** (2002) Cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells, *Free Radic. Biol. Med.* 1185-1196.
- Lendzian K. y Bassham J.A.** (1975) Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in spinach chloroplasts by ribulose 1,5-diphosphate and NADPH/NADP⁺ ratios. *Biochem. Biophys. Acta.* 396: 260-275.
- Lendzian K. y Ziegler H.** (1970) Über die Regulation der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in Spinachchloroplasten durch Licht. *Planta* 94: 27-36.
- León A.M., Palma J.M., Corpas F.J., Gómez M., Romero-Puertas M.C., Chatterjee D., Mateos R.M., del Río L.A. y Sandalio L.M.** (2002) Antioxidative enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 813-820.
- Leshem Y.Y., Wills R.B.H. y Ku V.V.V.** (1998) Evidence for the function of the free radical gas –nitric oxide (NO) as an endogenous maturation and senescence regulation factor in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* 36: 825-833.
- Leshem Y.Y. y Harnamty E.** (1996) The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage. *J. Plant Physiol.* 148: 258-263.
- Leterrier M., Corpas F.J., Barroso J.B., Sandalio L.M. y del Río L.A.** (2005) Peroxisomal monodehydroascorbate reductase: genomic clone characterization and functional analysis under environmental stress conditions. *Plant Physiol.* 138: 2111-2123.
- Leterrier M., Del Río L.A. y Corpas F.J.** (2007) Cytosolic NADP-isocitrate dehydrogenase of pea plants: genomic clone characterization and functional analysis under abiotic stress conditions. *Free Radic. Res.* 41: 191-199.
- Leterrier M., León A.M., Corpas F.J. y del Río L.A.** (2004) Functional analysis of cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase: cloning and expression under abiotic stress conditions. *Free Radic. Biol. Med. (Suppl 1)* 36: S136.

- Levine A., Tenhaken R., Dixon R. y Lamb C.** (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.
- Levine A.** (2004) Programmed cell death in plant response to biotic stress (pathogen attack). In: Gray J. ed. *Programmed cell death in plants*. Blackwell Publishing 213-250.
- Levy R.** (1979) Glucose-6-phosphate dehydrogenases. *Adv. Enzymol.* 48: 97-192.
- Li Z. y Wurtzel E.T.** (1998) The Itk gene family encodes novel receptor-like kinases with temporal expression in developing maize endosperm. *Plant Mol. Biol.* 37: 749-761.
- Lin C.C. y Kao C.H.** (2001) Abscissic acid induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings. *Plant Sci.* 160: 323-329.
- Lindermayr C., Saalbach G., Bahnweg G. y Durner J.** (2006) Differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *J. Biol. Chem.* 281: 4285-4291.
- Lindermayr C., Saalbach G. y Durner J.** (2005) Proteomic identification of Snitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 137: 921-930.
- Linthorst H.J.M.** (1991) Pathogenesis-related proteins of plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10: 123-150.
- Lisenbee C.S., Lingard M.J. y Trelease R.N.** (2005) *Arabidopsis* peroxisomes possess functionally redundant membrane and matrix isoforms of monodehydroascorbate reductase. *Plant J.* 43: 900-914.
- Liu L., Hausladen A., Zeng M., Que L., Heitman J. y Stamler J.S.** (2001) A metabolic enzyme for S-nitrosotiol conserved from bacteria to humans. *Nature* 410: 490-494.
- Liu L., Yan Y., Zeng M., Zhang J., Hanes M.A., Ahearn G., McMahon T.J., Dickfeld T., Marshall H.E., Que L.G. y Stamler J.S.** (2004) Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. *Cell* 116: 617-628.
- Logan B.A., Demming-Adams B., Adams W.W. y Grace S.C.** (1998a) Antioxidants and xanthophyll cycle-dependent energy dissipation in *Curcubita pepo* and *Vinca major* acclimated to four growth PFDs in the field. *J. Exp. Bot.* 49: 1869-1879.
- Logan B.A., Grace S.C., Adams W.W. y Demmig-Adams B.** (1998b) Seasonal differences in xanthophyll cycle characteristics and antioxidants in *Mahonia repens* growing in different light environments. *Oecologia* 116: 9-17.
- López-Huertas E., Sandalio L.M. y del Río L.A.** (1996) Superoxide radical generation in plant peroxisomal membranes: characterization of redox proteins involved. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 195S.
- Lucotte G. y Baneyx F.** (1993) *Introduction to molecular cloning techniques*. VCH Publishers, Inc. New York.

- MacRobbie E.A.** (2000) ABA activates multiple Ca^{2+} fluxes in stomatal guard cells, triggering vacuolar K^{+} (Rb^{+}) release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 12361-12368.
- Mannick J.B., Hausladen A., Liu L., Hess D.T., Zeng M., Miao Q.X., Kane L.S., Gow A.J. y Stamler J.S.** (1999) Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* 284: 651-654.
- Mannick J.B., Schonhoff C., Papeta N., Ghafourifar P., Szibor M., Fang K. y Garon B.** (2001) S-nitrosylation of mitochondrial caspases. *J. Cell Biol.* 154: 1111-1116.
- Martínez M.C., Achkor H., Persson B., Fernández M.R., Shafqat J., Farrés J., Jörnvall H. y Parés X.** (1996) *Arabidopsis* formaldehyde dehydrogenase. Molecular properties of plant class III alcohol dehydrogenase provide further insights into the origins, structure and function of plant class P and liver class I dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* 241: 849-857.
- Martínez-Ruiz A. y Lamas S.** (2004) S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovasc. Res.* 62: 43-52.
- Matamoros M.A., Baird L.M., Escuredo P.R., Dalton D.A., Minchin F.R., Iturbe-Ormaetxe I., Rubio M.C., Moran J.F., Gordon A.J. y Becana M.** (1999) Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, biochemical, and structural alterations. *Plant Physiol.* 121: 97-112.
- Maxwell K., Marrison J.L., Leech R.M., Griffiths H. y Horton P.** (1999) Chloroplast acclimation in leaves of *Guzmania monostachia* in response to high light. *Plant Physiol.* 121: 89-96.
- Mazeyrat F., Mouzeyar S., Courbou I., Badaoui S., Patricia Roeckel-Drevet P., Denis Tourvieille de Labrouhe D. y Ledoigt G.** (1999) Accumulation of Defense Related Transcripts in Sunflower Hypocotyls (*Helianthus annuus* L.) Infected with *Plasmopara halstedii*. *Eur. J. Plant Pathology.* 105: 333-340.
- McClung C.R.** (1997) Regulation of catalases in *Arabidopsis*. *Free Radic. Biol. Med.* 23: 489-496.
- McCord J.M. y Fridovich I.** (1969) Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.
- McDowell J.M. y Dangi J.L.** (2000) Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem. Sci.* 25: 79-82.
- McKersie B.D. y Leshem Y.Y.** (1994) Stress and stress coping in cultivated plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Mellersh D.G., Foulds I.V., Higgins V.J. y Heath M.C.** (2002) H_2O_2 plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. *Plant J.* 29: 257-268.

- Minard K.I. y McAlister-Henn L.** (2001) Antioxidant function of cytosolic sources of NADPH in yeast. *Free Radic. Biol. Med.* 31: 832-843.
- Minetti M., Forte T., Soriani M., Quaresima U., Menditto A. y Ferrari M.** (1992) Iron-induced ascorbate oxidation in plasma as monitored by ascorbate free radical formation. *FEBS Lett.* 352: 159-162.
- Mishra R.K. y Singhal G.S.** (1992) Function of Photosynthetic Apparatus of Intact Wheat Leaves under High Light and Heat Stress and Its Relationship with Peroxidation of Thylakoid Lipids. *Plant Physiol.* 98: 1-6.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. y Van Breusegem F.** (2004) The reactive oxygen gene network of plants. *Trends plant Sci.* 9: 490-498.
- Mittler R., Lam E., Shulaev V. y Cohen M.** (1999) Signals controlling the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 39: 1025-1035.
- Mittler R.** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant. Sci.* 7: 405-410.
- Mittler R. y Zilinskas B.A.** (1991) Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiol.* 97: 962-968.
- Mittler R. y Zilinskas B.A.** (1994) Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *Plant J.* 5: 397-405.
- Mittova V., Guy M., Tal M. y Volokita M.** (2004) Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *J. Exp. Bot.* 55: 1105-1113.
- Mittova V., Tal M., Volokita M. y Guy M.** (2003) Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Plant Cell Env.* 26: 845-856.
- Mittova V., Tal M., Volokita M. y Guy M.** (2002) Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiol. Plant.* 115: 393-400.
- Miyake C. y Asada K.** (1992) Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant Cell Physiol.* 34: 541-553.
- Mizuno M., Kamei M. y Tsuchida H.** (1998) Ascorbat peroxidase and catalase cooperate for protection against hydrogen peroxide generated in potato tubers during low-temperature storage. *Biochem. Mol. Biol. International* 44: 717-726.

- Modelo L.V., Augusto O., Almeida I.M., Magalhaes J.R. y Salgado I.** (2005) Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. FEBS Lett. 579: 3814-3820.
- Modelo L.V., Cunha F.Q., Braga M.R. y Salgado I.** (2002) Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *diaporthe phaseolorum f. sp. Meridionalis* elicitor. Plant Physiol. 130: 1288-1297.
- Møller I.M. y Rasmusson A.G.** (1998) The role of NADP in the mitochondrial matrix. Trends Plant Science 3: 21-27.
- Moncada S., Palmer R.M.J. y Higgs E.A.** (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol. Rev. 43: 109-142.
- Morell S., Follmann H., de Tullio M. y Häberlein I.** (1997) Dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase are phantom indicators of oxidative stress in plants. FEBS Lett. 414: 567-570.
- Morimura Y., Ohya T. e Ikawa T.** (1996) Presence of ascorbate-peroxidizing enzymes in roots of *Brassica campestris* L. cv Komatsuna. Plant Sci. 117: 55-63.
- Mouzeyar S., Tourvieille de Labrouhe D. y Vear F.** (1994) Effect of host-race combination on resistance of sunflower, *Helianthus annuus* L. to downy mildew *Plasmopara halstedii*. J. Phytopathol. 141: 249-258.
- Mouzeyar S., Tourvieille De Labrouhe D. y Vear F.** (1993) Histopathological studies of resistance of sunflower (*Helianthus annuus* L) to downy mildew (*Plasmopara halstedii*). J. Phytopathology 139: 289-297.
- Mullineaux P. y Karpinski S.** (2002) Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast. Curr. Opin. Plant. Biol. 5: 43-48.
- Mur L.A., Santosa I.E., Laarhoven L.J., Holton N.J., Harren F.J. y Smith A.R.** (2005) Laser photoacoustic detection allows in planta detection of nitric oxide in tobacco following challenge with avirulent and virulent *Pseudomonas syringae* Pathovars. Plant Physiol. 138: 1247-1258.
- Murthy S.S. y Zilinskas B.A.** (1994) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding pea monodehydroascorbate reductase. J. Biol. Chem. 269: 31129-31133.
- Muschietti J., Eyal Y. y McCormick S.** (1998) Pollen tube localization implies a role in pollen-pistil interactions for the tomato receptor-like protein kinases LePRK1 and LePRK2. Plant Cell. 10: 319-330.
- Nagase S., Takemura K., Ueda A. y Hirayama A.** (1997) A novel nonenzymatic pathway for the generation of nitric oxide by the reaction of hydrogen peroxide and D- or L-arginine. FEBS Lett. 233: 150-153.

- Nakatsubo N., Kojima H., Kikuchi K., Nagoshi H., Hirata Y., Maeda D., Imai Y., Irimura T. y Nagano T.** (1998) Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. *FEBS Lett.* 427: 263-266.
- Nappi A.J. y Vass E.** (1998) Hydroxyl radical formation resulting from the interaction of nitric oxide and hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Acta* 1380: 55-63.
- Navarre D.A., Wendehenne D., Durner J., Noad R. y Klessig D.F.** (2000) Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. *Plant Physiol.* 122: 573-582.
- Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D. y Hancock J.T.** (2002b) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J. Exp. Bot.* 53: 1237-1247.
- Neill S.J., Desikan R. y Hancock J.T.** (2003) Nitric signalling in plants. *New Phytologist* 159: 11-35.
- Neill S.J., Desikan R., Clarke A. y Hancock J.T.** (2002a) Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signalling in stomatal guard cells. *Plant Physiol.* 128: 13-16.
- Nie G.Y., Robertson E.J., Fryer M.J., Leech R.M. y Baker N.R.** (1995) Response of the photosynthetic apparatus in maize leaves grown at low temperature on transfer back to normal growth temperature. *Plant Cell Env.* 18: 1-12.
- Nie G.Y., Long S.P. y Baker N.R.** (1992) The effects of development at sub-optimal growth temperatures on photosynthetic capacity and susceptibility of chilling dependent photoinhibition in *Zea mays*. *Physiologia Plantarum* 85: 554-560.
- Nie G.Y. y Baker N.R.** (1991) Modifications to Thylakoid Composition during Development of Maize Leaves at Low Growth Temperatures. *Plant Physiol.* 95: 184-191.
- Nikitovic D. y Holmgren A.** (1996) S-nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 271: 19180-19185.
- Niyogi K.K.** (1999) Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 333-359.
- Noctor G. y Foyer C.H.** (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 249-279.
- O'Donnell P.J., Calvert C., Atzorn R., Wasternack C., Leyser H.M.O. y Bowles D.J.** (1996) Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* 274: 1914-1917.
- O'Kane D., Gill V., Boyd P. y Burdon R.** (1996) Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. *Planta*. 198: 371-377.

- Ogawa K., Kanematsu S. y Asada K.** (1997) Generation of superoxide anion and localization of CuZn-superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls: their association with lignification. *Plant Cell Physiol.* 38: 1118-1126.
- Oidaira H., Sano S., Koshiba T. y Ushimaru T.** (2000) Enhancement of antioxidative enzyme activities in chilled rice seedlings. *J. Plant Physiol.* 156: 811-813.
- Orozco-Cárdenas M.L., Narvaez-Vasquez J. y Ryan C.A.** (2001) Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell.* 13: 179-191.
- Orozco-Cárdenas M.L. y Ryan C.A.** (1999) Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 6553-6557.
- Orozco-Cárdenas M.L. y Ryan C.A.** (2002) Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiol.* 130: 487-493.
- Pacher P., Obrosova I.G., Mabley J.G. y Szabo C.** (2005) Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies. *Curr. Med. Chem.* 12: 267-275.
- Packer L. y Glazer A.N.** (1990) Oxygen radicals in biological systems. Part B. Oxygen radicals and antioxidants. *Methods Enzymol.* 186: Academic Press, San diego, CA.
- Padgett C.M. y Whorton A.R.** (1995) S-nitrosoglutathione reversibly inhibits GAPDH by S-nitrosylation. *Am. J. Physio.* 269: C739-749.
- Pagnussat G.C., Simontacchi M., Puntarulo S. y Lamattina L.** (2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol.* 129: 954-956.
- Palma J.M., López-Huertas E., Corpas F.J., Sandalio L.M., Gómez M. y del Río L.A.** (1998) Peroxisomal manganese superoxide dismutase: purification and properties of the isozyme from pea leaves. *Physiol. Plant.* 104: 720-726.
- Palma J.M., Sandalio L.M., Corpas F.J., Romero-Puertas M.C., McCarthy I. y del Río L.A.** (2002) Plant proteases, protein degradation and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 521-530.
- Palomo J., Gallardo F., Suarez M.F. y Canovas F.M.** (1998) Purification and characterization of NADP-linked isocitrate dehydrogenase from scots pine. Evidence for different physiological roles of the enzyme in primary development. *Plant Physiol.* 118: 617-626.
- Park S.Y., Ryu S.H., Jang I.C., Kwon S.Y., Kim J.G. y Kwal S.S.** (2004) Molecular cloning of a cytosolic ascorbate peroxidase cDNA from cell cultures of sweetpotato and its expression in response to stress. *Mol. Gen Genomics* 271: 338-346.

- Pautot V., Holzer F.M., Reisch B. y Walling L.L.** (1993) Leucine Aminopeptidase: An inducible component of the defense response in *Lycopersicon esculentum* (Tomato). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 9906-9910.
- Pedrajas J.R., Miranda-Vizuete A., Javanmardy N., Gustafsson J.A. y Spyrou G.** (2000) Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. J. Biol. Chem. 275: 16296-16301.
- Pedroso M.C., Magalhaes J.R. y Durzan D.** (2000) A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues. J. Exp. Bot. 51: 1027-1036.
- Pei Z.M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klüsener B., Allen G.J., Grill E. y Schroeder J.I.** (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. Nature 406: 731-734.
- Peinado M.A., Torres M.I., Thompson R.P. y Esteban F.J.** (2000) Immunolocalization of the HNK-1 epitope in the autonomic innervation to the liver and upper digestive tract of the developing rat embryo. Histochemical J. 32: 439-446.
- Pennell R.I. y Lamb C.** (1997) Programmed Cell Death in Plants. Plant Cell. 9: 1157-1168.
- Peña-Cortés H., Albercht T., Prat S., Weller E.W. y Willmitzer L.** (1993) Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. Planta 191: 123-128.
- Perl-Treves R. y Galun E.** (1991) The tomato Cu,Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. Plant Mol. Biol. 17: 745-60.
- Perl-Treves R. y Perl A.** (2002) Oxidative stress: an introduction. En: Oxidative stress in plants. Inzé D. y Van Montagu M. (Eds.). Págs.: 1-32. Taylor y Francis, London.
- Popova O.V., Ismailov S.F., Popova T.N., Dietz K.J. y Gollidack D.** (2002) Salt-induced expression of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase and ferredoxin-dependent glutamate synthase in *Mesembryanthemum crystallinum*. Planta 215: 906-913.
- Potikha T.S., Collins C.C., Johnson D.I., Delmer D.P. y Levine A.** (1999) The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers. Plant Physiol. 119: 849-58.
- Potters G., de Gara L., Asard H. y Horemans N.** (2002) Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? Plant Physiol. Biochem. 40: 537-548.
- Prado A.M., Porterfield D.M. y Feijo J.A.** (2004) Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. Development 131: 2707-2714.
- Prasad T.** (1996) Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. Plant J. 10: 1017-1026.

- Prasad T.K., Anderson M.D., Martin B.A. y Steward C.R.** (1994) Evidence for chilling induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant cell* 6: 65-74.
- Prasad T.K.** (1997) Role of catalase in inducing chilling tolerance in pre-emergence maize seedlings. *Plant Physiology* 114: 1369-1376.
- Prasil O., Adir N. y Ohad I.** (1992) Dynamics of photosystem II: Mechanism of photoinhibition and recovery process. *Topics Photosynth.* 11: 295-348.
- Prescott S.M.** (1999) A thematic series on oxidation of lipids as a source of messengers. *J. Biol. Chem.* 274: 22901.
- Puppo A., Groten K., Bastian F., Carzaniga R., Soussi M., Lucas M.M., De Felipe M.R., Harrison J., Vanacker H. y Foyer C.H.** (2005) Legume nodule senescence: roles for redox and hormonal signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytol.* 165: 683-701.
- Queitsch C., Hong S.W., Vierling E. y Lindquist S.** (2000) Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 479-492.
- Radi R., Denicola A., Alvarez B., Ferrer-Sueta G. y Rubbo H.** (2000) The biological chemistry of peroxynitrite. In *Nitric Oxide*, ed. Ignarro, L. (Academic, San Diego), pp. 57-82.
- Radi R., Cassina A., Hodara R., Quijano C. y Castro L.** (2002) Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 1451-1464.
- Radi R.** (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 4003-4008.
- Radomski M.W., Rees D.D., Dutra A. y Moncada S.** (1992) S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 107: 745-749.
- Radwan O., Mouzeyar S., Venisse J.S., Nicolas P. y Bouzidi M.F.** (2005) Resistance of sunflower to the biotrophic oomycete *Plasmopara halstedii* is associated with a delayed hypersensitive response within the hypocotyls. *J. Exp. Bot.* 56: 2683-2693.
- Ramanjulu S. y Bartels D.** (2002) Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environ.* 25: 141-151.
- Randall D.D. y Givan C.V.** (1981) Subcellular location of NADP⁺-isocitrate dehydrogenase in *Pisum sativum* leaves. *Plant Physiol.* 68: 70-73.
- Rasmusson A. y Möller I.M.** (1990) NADP-utilizing enzymes in the matrix of plant mitochondria. *Plant Physiol.* 94: 1012-1018.
- Requena M.E., Egea-Gilabert C. y Candela M.E.** (2005) Nitric oxide generation during the interaction with *Phytophthora capsici* of two *Capsicum annuum* varieties showing different degrees of sensitivity. *Physiologia Plantarum* 124: 50-60.

- Reverberi M., Picardo M., Ricelli A., Camera E., Fanelli C. y Fabbri A.A.** (2001) Oxidative stress, growth factor production and budding in potato tubers during cold storage. *Free Radic. Res.* 35: 833-841.
- Rhee S.G., Chae H.Z. y Kim K.** (2005) Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 38: 1543-1552.
- Ribeiro E.A., Cunha F.Q., Tamashiro W.M.S.C. y Martins I.S.** (1999) Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Lett.* 445: 283-286.
- Riedle-Bauer M.** (2000) Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in systemic virus infection of plants. *J. Phytopathology* 148: 297-302.
- Rizhsky L., Liang H., Shuman J., Shulaev V., Davletova S. y Mittler R.** (2004) When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol.* 134: 1683-1696.
- Rockel P., Strube F., Rockel A., Wildt J. y Kaiser W.M.** (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Bot.* 53: 103-110.
- Roldán-Serrano A., Luna del Castillo J., Jorrín-Novo J., Fernández-Ocaña A. y Gómez-Rodríguez M.** (2007) Chitinase and peroxidase activities in sunflower hypocotyls: Effects of BTH and inoculation with *Plasmopara halstedii*. *Biologia Plantarum* 51: 149-152.
- Romeo A.A., Capobianco J.A. y English A.M.** (2003) Superoxide dismutase targets NO from GSNO to Cysbeta93 of oxyhemoglobin in concentrated but not dilute solutions of the protein. *J Am Chem Soc.* 2003 Nov 26; 125(47):14370-8.
- Romero-Puertas M.C., Corpas F.J., Sandalio L.M., Leterrier M., Rodríguez-Serrano M., del Río L.A. y Palma J.M.** (2006) Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal. *New Phytol.* 170: 43-52.
- Romero-Puertas M.C., McCarthy I., Sandalio L.M., Palma J.M., Corpas F.J., Gómez M. y del Río L.A.** (1999) Cadmium toxicity and oxidative metabolism of pea leaf peroxisomes. *Free Rad. Res.* 31: S25-S31.
- Romero-Puertas M.C., Palma J.M., Gómez M., del Río L.A. y Sandalio L.M.** (2002) Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant Cell Environ* 25: 677-686.
- Rusterucci C., Espunya M.C., Diaz M., Chabannes M. y Martinez M.C.** (2007) S-nitrosogluthathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiol.* 143: 1282-1292.

- Sagi M. y Fluhr R.** (2001) Superoxide production by plant homologues of the gp91^{phox} NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* 126: 128-1290.
- Saito S., Yamamoto-Katou A., Yoshioka H., Doke N. y Kawakita K.** (2006) Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiology* 47: 689-697.
- Sakamoto A., Ueda M. y Morikawa H.** (2002) *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Lett.* 515: 20-24.
- Sandalio L.M., Dalurzo H.C., Gómez M., Romero-Puertas M.C. y del Río L.A.** (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.* 52: 2115-2126.
- Sandalio L.M., López-Huertas E., Bueno P. y del Río L.A.** (1997) Immunocytochemical localization of copper, zinc superoxide dismutase in peroxisomes from watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.) cotyledons. *Free Radic. Res.* 26: 187-194.
- Sandalio L.M., Palma J.M. y del Río L.A.** (1987) Localization of manganese superoxide dismutase in peroxisomes isolated from *Pisum sativum* L. *Plant Science* 51: 1-8.
- Sandalio L.M. y del Río L.A.** (1988) Introrganellar distribution of superoxide dismutase in plant peroxisomes (glyoxysomes and leaf peroxisomes). *Plant Physiol.* 88: 1215-1218.
- Sano S., Miyake C., Mikami B. y Asada K.** (1995) Molecular characterization of monodehydroascorbate radical reductase from cucumber highly expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270: 21354-21361.
- Sano S. y Asada K.** (1994) cDNA cloning of monodehydroascorbate radical reductase from cucumber: a high degree of homology in terms of amino acid sequence between this enzyme and bacterial flavoenzymes. *Plant. Cell. Physiol.* 35: 425-437.
- Saran M. y Bors W.** (1989) Oxygen radicals acting as chemical messengers: a hypothesis. *Free. Radic. Res. Commun.* 7: 213-20.
- Sato Y., Murakami T., Funatsuki H., Matsuba S., Saruyama H. y Tanida M.** (2001) Heat shock-mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings. *J. Exp. Bot.* 52: 145-151.
- Satoh Y.** (1972) Studies on NADP-isocitrate dehydrogenase from maturing castor bean seeds. *Plant cell Physiol.* 13: 493-503.
- Saviani E.E., Orsi C.H., Oliveira J.F.P., Pinto-Maglio C.A.F. y Salgado I.** (2002) Participation of the mitochondrial permeability transition pore in nitric oxide induced plant cell death. *FEBS Lett.* 510: 136-140.
- Scandalios J.G.** (1993) Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 101: 7-12.

- Schaaf J., Walter M.H. y Hess D.** (1995) Primary Metabolism in Plant Defense (Regulation of a Bean Malic Enzyme Gene Promoter in Transgenic Tobacco by Developmental and Environmental Cues). *Plant Physiol.* 108: 949-960.
- Scheibe R.** (1990) Light/dark modulation: regulation of chloroplast metabolism in a new light. *Bot. Acta.* 103: 327-334.
- Schinkel H., Hertzberg M. y Wingsle G.** (2001) A small family of novel CuZn-superoxide dismutases with high isoelectric points in hybrid aspen. *Planta* 213: 272-279.
- Schnarrenberger C., Oeser A. y Tolbert N.E.** (1973) Two isoenzymes each of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in spinach leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 154: 438-448.
- Schopfer F.J., Baker P.R. y Freeman B.A.** (2003) NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem. Sci.* 28: 646-654.
- Sevilla F., López-Gorgé J. y del Río L.A.** (1982) Characterization of a manganese superoxide dismutase from the higher plant *Pisum sativum* L. *Plant Physiol.* 70: 1321-1326.
- Sevilla F., López-Gorgé J. y del Río L.A.** (1980a) Manganese superoxide dismutase from a higher plant. Purification of a new Mn-containing enzyme. *Planta* 150: 153-157.
- Sevilla F., López-Gorgé J. y del Río L.A.** (1980b) Preliminary characterization of a Mn-containing superoxide dismutase from a higher plant (*Pisum sativum* L). In: Bennister J.V., Hill H.A.O., eds. *Chemical and biochemical aspects of superoxide and superoxide dismutase*. New York: Elsevier/North-Holland 185-195.
- Sexton D.J., Muruganandam A., McKenney D.J. y Mutus B.** (1994) Visible light photochemical release of nitric oxide from S-nitrosoglutathione: potential photochemotherapeutic applications. *Photochem. Photobiol.* 59: 463-467.
- Seymour J.L. y Lazarus R.A.** (1989) Native gel activity stain and preparative electrophoretic method for the detection and purification of pyridine nucleotide-linked dehydrogenases. *Anal. Biochem.* 178: 243-247.
- Shafqat J., El-Ahmad M., Danielsson O., Martínez M.C., Persson B., Pares X. y Jornvall H.** (1996) Pea formaldehyde-active class III alcohol dehydrogenase: common derivation the plant and animal forms but not of the corresponding ethanol-active form (classes I and P). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5595-5599.
- Shapiro A.D.** (2005) Nitric oxide signaling in plants. *Vitamins and Hormones* 72: 339-398.
- Shi W.M., Muramoto Y., Ueda A. y Takabe T.** (2001) Cloning of peroxisomal ascorbate peroxidase gene from barley and enhanced thermotolerance by overexpressing in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*. 273: 23-27.

- Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y. y Yoshimura K.** (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. Exp. Bot.* 53: 1305-1319.
- Shimizu N., Kobayashi K. y Hayashi K.** (1984) The reaction of superoxide radical with catalase. Mechanism of the inhibition of catalase by superoxide radical. *J. Biol. Chem.* 259: 4414-4418.
- Shimoda Y., Nagata M., Suzuki A., Abe M., Sato S., Kato T., Tabata S., Higashi S. y Uchiumi T.** (2005) Symbiotic rhizobium and nitric oxide induce gene expression of non-symbiotic hemoglobin in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiology* 46: 99-107.
- Shin S.Y., Lee H.S., Kwon S.Y., Kwon S.T. y Kwak S.S.** (2005) Molecular characterization of a cDNA encoding copper/zinc superoxide dismutase from cultured cells of *Manihot esculenta*. *Plant Physiol. Biochem.* 43: 55-60.
- Siebert G., Carsiotis M. y Plaut G.W.E.** (1957) The enzymatic properties of isocitric dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 262: 10422-10425.
- Sies H. y Stahl W.** (1995) Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* 62 (6 Suppl): 1315S-1321S.
- Simontacchi M., Jasid S. y Puntarulo S.** (2004) Nitric oxide generation during early germination of sorghum seeds. *Plant Science* 167: 839-847.
- Smith J.N. y Dasgupta T.P.** (2000) Kinetics and mechanism of the decomposition of S-nitrosoglutathione by L-ascorbic acid and copper ions in aqueous solution to produce nitric oxide. *Nitric Oxide* 4: 57-66.
- Sofo A., Dichio B., Xiloyannis C. y Masia A.** (2004) Antioxidant defences on olive tree during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. *Functional Plant Biology* 32: 45-53.
- Soll J., Schultz G., Joyard J., Douce R. y Block M.A.** (1984) Localization and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 238: 290-299.
- Song F. y Goodman R.M.** (2001) Activity of nitric oxide is dependent on, but is partially required for function of, salicylic acid in the signaling pathway in tobacco systemic acquired resistance. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14: 1458-1462.
- Sood C.R., Chanda S.V. y Singh Y.D.** (1998) Effect of plant growth regulators and different nitrogen sources on NADP-isocitrate dehydrogenase activity of radish cotyledons. *Acta Physiol Plant* 20: 353-357.
- Souza J.M., Choi I., Chen Q., Weisse M., Daikhin E., Yudkoff M., Obin M., Ara J., Horwitz J. y Ischiropoulos H.** (2000) Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 380: 360-366.

- Squadrito G.L. y Pryor W.A.** (1998a) Oxidative chemistry of nitric oxide: The roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Rad. Biol. Med.* 25: 392-403.
- Squadrito G.L. y Pryor W.A.** (1998b) The nature of reactive species in systems that produce peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* 11: 718-719.
- Squier T.C.** (2001) Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp. Gerontol.* 36: 1539-1550.
- Stallings W.C., Patridge K.A., Strong R.K. y Ludwig M.L.** (1984) Manganese and iron superoxide dismutases are structural homologs. *J. Biol. Chem.* 259: 10695-10699.
- Stamler J.S., Taber R.L. y Califf R.M.** (2003) Translation of academic discovery into societal benefit: proposal for a balanced approach-part 1. *Am. J. Med.* 115: 596-599.
- Stamler J.S., Lamas S. y Fang F.C.** (2001) Nitrosylation: the prototypic redox-based signalling mechanism. *Cell* 106: 675-683.
- Stamler J.S., Singel D.J. y Loscalzo J.** (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258: 1898-1902.
- Stamler J.S.** (1994) Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell.* 78: 931-936.
- Stamler J.S. y Toone E.J.** (2002) The decomposition of thionitrites. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6: 779-785.
- Steffen M., Sarkela T.M., Gybina A.A., Steele T.W., Trasseth N.J., Kuehl D. y Giulivi C.** (2001) Metabolism of S-nitrosoglutathione in intact mitochondria. *Biochem. J.* 356: 395-402.
- Steinberg D.** (1997) Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* 272: 20963-20966.
- Stevens R.G., Creissen G.P. y Mullineaux P.M.** (1997) Cloning and characterisation of a cytosolic glutathione reductase cDNA from pea (*Pisum sativum* L.) and its expression in response to stress. *Plant Mol. Biol.* 35: 641-654.
- Stintzi A., Heitz T., Prasad V., Wiedemann-Merdinoglu S., Kauffmann S., Geoffroy P., Legrand M. y Fritig B.** (1993) Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie.* 75: 687-706.
- Stöhr C., Strube F., Marx G., Ullrich W.R. y Rockel P.** (2001) A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* 21: 835-841.
- Stöhr C. y Ullrich W.R.** (2002) Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *J. Exp. Bot.* 53: 2293-2303.

- Storozhenko S., De Pauw P., Van Montagu M., Inze D. y Kushnir S.** (1998) The heat-shock element is a functional component of the *Arabidopsis* APX1 gene promoter. *Plant Physiol.* 118: 1005-1014.
- Streller S., Kromer S. y Wingsle G.** (1994) Isolation and purification of mitochondrial Mn-superoxide dismutase from the gymnosperm *Pinus sylvestris* L. *Plant Cell Physiol.* 35: 859-867.
- Strittmatter P. y BALL E.G.** (1955) Formaldehyde dehydrogenase, a glutathione dependent enzyme system. *J. Biol. Chem.* 213: 445-461.
- Sundar D., Chaitanya K.V., Jutur P.P. y Ramachandra Reddy A.** (2004) Low temperature-induced changes in antioxidative metabolism in rubber-producing shrub, guayule *Parthenium argentatum* Gray. *Plant Growth Regulation* 44: 175-181.
- Swidzinski J.A., Sweetlove L.J. y Leaver C.J.** (2002) A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 30: 431-446.
- Taguchi-Shiobara F., Yuan Z., Hake S y Jackson D.** (2001) The fasciated ear2 gene encodes a leucine-rich repeat receptor-like protein that regulates shoot meristem proliferation in maize. *Genes Dev.* 15: 2755-2266.
- Takahama U., Hirotsu M. y Oniki T.** (1999) Age-dependent changes in levels of ascorbic acid and chlorogenic acid, and activities of peroxidase and superoxide dismutase in the apoplast of tobacco leaves: mechanism of the oxidation of chlorogenic acid in the apoplast. *Plant cell Physiol.* 40: 716-724.
- Tanaka K., Takeuchi E., Kubo A., Sasaki T., Haraguchi K. y Kawamura Y.** (1991) Two immunologically different isoenzymes of ascorbate peroxidase from spinach leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 286: 371-375.
- Tao D.L., Oquist G. y Wingsle G.** (1998) Active oxygen scavengers during cold acclimation of Scots pine seedlings in relation to freezing tolerance. *Cryobiology* 37: 38-45.
- Thomas D.D., Liu X., Kantrow S.P. y Lancaster J.R.** (2001) The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 355-360.
- Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wei Y. y Collinge D.B.** (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.* 11: 1187-1194.
- Thorpe G.H., Kricka L.J., Moseley S.B. y Whitehead T.P.** (1985) Phenols as enhancers of the chemiluminiscent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in the luminescence-monitored enzyme immunoassays. *Clin. Chem.* 31: 1335-1341.

- Tien M., Berlett B.S., Levine R.L., Chock P.B. y Stadtman E.R.** (1999) Peroxynitrite-mediated modification of proteins at physiological carbon dioxide concentration: pH dependence of acrbonyl formation, tyrosine nitration, and methionine oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 7809-7814.
- Torel J., Cillard J. y Cillard P.** (1986) Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy redicals. *Phytochemistry* 25: 383-385.
- Torres M.A., Dangl J.L. y Jones J.D.** (2002) Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 517-522.
- Torres M.A. y Dangl J.L.** (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 397-403.
- Trumper S., Follmann H. y Haberlein Y.** (1994) A novel dehydroascorbate reductase from spinach chloroplast homologous to plant trypsin inhibitor. *FEBS Lett.* 352: 159-162.
- Tsang E.W., Bowler C., Herouart D., Van Camp W., Villarroel R., Genetello C., Van Montagu M. y Inze D.** (1991) Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *Plant Cell* 3: 783-792.
- Tun N.N., Holk A. y Scherer G.F.** (2001) Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin. *FEBS Lett.* 509: 174-176.
- Turko I.V., Li L., Aulak K.S., Stuehr D.J., Chang J.Y. y Murad F.** (2003) Protein tyrosine nitration in the mitochondria from diabetic mouse heart. Implications to dysfunctional mitochondria in diabetes. *J. Biol. Chem.* 278: 33972-33977.
- Turko I.V. y Murad F.** (2002) Protein nitration in cardiovascular diseases. *Pharmacol Rev.* 54: 619-634.
- Uotila L. y Koivusalo M.** (1979) Purification of formaldehyde and formate dehydrogenases from pea seeds by affinity chromatography and S-formylglutathione as the intermediate of formaldehyde metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 196: 33-45.
- Uttenthal L.O., Alonso D., Fernández A.P., Campbell R.O., Moro M.A., Leza J.C., Lizasoain I., Esteban F.J., Barroso J.B., Valderrama R., Pedrosa J.A., Peinado M.A., Serrano J., Richart A., Bentura M.L., Santacana M., Martínez-Murillo R. y Rodrigo J.** (1998) Neuronal and inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine immunoreactivities in the cerebral cortex of the aging rat. *Microsc. Res. Tech.* 43: 75-88.
- Vacca R.A., de Pinto M.C., Valenti D., Passarella S., Marra E. y De Gara L.** (2004) Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiol.* 134: 1100-1112.

- Valderrama R., Corpas F.J., Carreras A., Gómez-Rodríguez M.V., Chaki M., Pedrajas J.R., Fernández-Ocaña A., del Río L.A. y Barroso J.B.** (2006) The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant Cell Environ.* 29:1449-1459.
- Valderrama R., Corpas F.J., Carreras A., Luque F., Fernández-Ocaña A., Chaki M., Gómez-Rodríguez M.V., del Río L.A. y Barroso J.B.** (2007) Nitrosative stress in plants. *FEBS Letters* 581: 453-461.
- Valverde A.M., Benito M. y Lorenzo M.** (1992) Hormonal regulation of malic enzyme and glucose-6-phosphate dehydrogenase expression in fetal brown adipocyte primary cultures under non-proliferative conditions. *Eur. J. Biochem.* 203: 313-319.
- van der Loo B., Labugger R., Skepper J.N., Bachschmid M., Kilo J., Powell J.M., Palacios-Callender M., Erusalimsky J.D., Quaschnig T., Malinski T., Gygi D., Ullrich V. y Luscher T.F.** (2000) Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J. Exp. Med.* 192: 1731-744.
- Van Loon L.C.** (1985) Patogenesis-related proteins. *Trends Mol. Biol.* 4: 111-116.
- Van Loon L.C. y Van Kammen A.** (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble proteins from *Nicotiana tabacum* var. Samsun and Samsun, N.N. II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40: 199-211.
- Vear F., Gentzbittel L., Philippon J., Mouzeyar S., Mestries E., Roeckel-Drevet P., Tourvieille de Labrouhe D. y Nicolas P.** (1997) The genetics of resistance to five races of downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L). *Theor Appl Genet* 93: 584-589.
- Veljovic-Jovanovic S.D., Pignocchi C., Noctor G. y Foyer C.H.** (2001) Low ascorbic acid in the *vtc-1* mutant of *Arabidopsis* is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system. *Plant Physiology* 127: 426-435.
- Verdoucq L., Vignol F., Jacquot J.P., Chartier Y. y Meyer Y.** (1999) *In vivo* characterization of a thioredoxin h target protein defines a new peroxiredoxin family. *J. Biol. Chem.* 274: 19714-19722.
- Vierling E.** (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Ann. Rev. Plant Physiology Plant Mol. Biology.* 42: 579-620.
- Villalba J.M., Córdoba F. y Navas P.** (1995) Ascorbate and the plasma membrane: a new view of cell growth control. En: *Ascorbic acid: biochemistry and biomedical biology* 4. Harris J.R. (Ed.), págs: 57-81. Plenum Press, New York.
- Virányi F. y Dobrovolszky A.** (1980). Systemic development of *Plasmopara halstedii*, in sunflower seedlings resistant and susceptible to downy mildew. *Phytopathology* 97: 179-185.

- Viranyi F. y Mohamed S.A.** (1985) Factors associated with downy mildew resistance in sunflower. *Acta Phytopathologica Academica Scientia Hungaria* 20: 137-139.
- Vranceanu V. y Stoenescu F.** (1970) Immunity to sunflower downy mildew due to a single dominant gene. *Probl. Agric.* 22: 34-40.
- Vyas D. y Kumar S.** (2005) Tea *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze clone with lower period of winter dormancy exhibits lesser cellular damage in response to low temperature. *Plant Phys. Biochem.* 43: 383-388.
- Walker D.A.** (1962) Pyruvate carboxylation and plant metabolism. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 37: 215-256.
- Wang J., Zhang H. y Allen R.D.** (1999) Overexpression of an *Arabidopsis* peroxisomal ascorbate gene increases protection against oxidative stress. *Plant Cell Physiol.* 40: 725-732.
- Wang Y., Yun B.W., Kwon E., Hong J.K., Yoon J. y Loake G.J.** (2006) S-nitrosylation: an emerging redox-based post-translational modification in plants. *J. Exp. Bot.* 57: 1777-1784.
- Weiser C.J.** (1970) Cold resistance and injury in woody plants. *Science* 169: 1269-1278.
- Weitzberg E. y Lundberg J.** (1998) No enzymatic nitric oxide production in humans. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 2: 1-7.
- Wendehenne D., Durner J. y Klessig D.F.** (2004) Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr. Op. Plant Biol.* 7: 449-455.
- Wendehenne D., Pugin A., Klessig D.F. y Durner J.** (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.* 6:177-183.
- Wessel D. y Flugge U.I.** (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138: 141-143.
- Whiteman M., Chua Y.L., Zhang D., Duan W., Liou Y.C. y Armstrong J.S.** (2006) Nitric oxide protects against mitochondrial permeabilization induced by glutathione depletion: role of S-nitrosylation? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339: 255-262.
- Willekens H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels C., Van Montagu M., Inze D. y Van Camp W.** (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stresses defence in C₃ plants. *EMBO J.* 16: 4806-4816.
- Willekens H., Villarroel R., Van Montagu M., Inze D. y Van Camp W.** (1994) Molecular identification of catalases from *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *FEBS Lett.* 352: 79-83.
- Wojtaszek P.** (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322: 681-692.
- Wojtaszek P.** (2000) Nitric oxide in plants: To NO or not to NO. *Phytochemistry* 54: 1-4.

- Wolinsky I. y Driskell J.A.D.** (1997) Sports Nutrition: Vitamins and Trace Elements. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Xu Y.C. y Zhao B.L.** (2003) The main origin of endogenous NO in higher non-leguminous plants. *Plant Physiol. Biochem.* 41: 833-838.
- Yamaguchi J. y Nishimura M.** (1984) Purification of glyoxysomal catalase and immunochemical comparison of glyoxysomal and leaf peroxisomal catalase in germinating pumpkin cotyledons. *Plant Physiol.* 262: 261-267.
- Yamakura F., Taka H., Fujimura T. y Murayama K.** (1998) Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *J. Biol. Chem.* 273: 14085-14089.
- Yamasaki H., Sakihama Y. y Takahashi S.** (1999) An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends Plant Sci.* 4: 128-129.
- Yang H.C., Nemoto Y., Homma T., Matsuoka H., Yamada S., Sumita O., Takatori K. y Kurata H.** (1995) Rapid viability assessment of spores of several fungi by an ionic intensified fluorescein diacetate method. *Curr. Microbiol.* 30: 173-176.
- Yi S.Y., Yu S.H. y Choi D.** (1999) Molecular cloning of a catalase cDNA from *Nicotiana glutinosa* L. and its repression by tobacco mosaic virus infection. *Mol. Cells.* 9: 320-325.
- Yu B.P.** (1994) Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74: 139-162.
- Zeidler D., Zahringer U., Gerber I., Dubery I., Hartung T., Bors W., Hutzler P. y Durner J.** (2004) Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 15811-15816.
- Zhang C., Czymbek K.J. y Shapiro A.D.** (2003) Nitric oxide does not trigger early programmed cell death events but may contribute to cell-to-cell signaling governing progression of the *Arabidopsis* hypersensitive response. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 962-972.
- Zhang H., Wang J., Nickel U., Allen R.D. y Goodman H.M.** (1997) Cloning and expression of an *Arabidopsis* gene encoding a putative peroxisomal ascorbate peroxidase. *Plant Mol. Biol.* 34: 967-971.
- Zhang Y., Keszler A., Broniowska K.A. y Hogg N.** (2005) Characterization and application of the biotin-switch assay for the identification of S-nitrosated proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 38: 874-881.
- Zhang Y. y Hogg N.** (2004) Formation and stability of S-nitrosothiols in RAW 264.7 cells. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 287: L467-674.

Zottini M., Formentin E., Scattolin M., Carimi F., LoSchiavo F. y Terzi M. (2002) Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality in vivo. FEBS Lett. 515: 75-78.

ANEXO I

Tabla 18. Resumen de la modulación de RNS en plántulas de girasol inoculadas por *P. halstedii*

	Línea HA89		Línea X55	
	Control	Inoculada	Control	Inoculada
Ha-PR5 (Unidades arbitrarias x 10 ⁻⁵)	5	4	47	230 *
Quitinasa (Unidades arbitrarias x 10 ⁻⁴)	1,8	5,3 *	0,2	1,3 *
Actividad NOS (nmol NO mg ⁻¹ prot.min ⁻¹)	0,634	0,451 *	0,294	0,502 *
Contenido en RSNOS (nmol NO mg ⁻¹ prot)	1,22	4,22 *	2,24	1,32 *
Actividad GSNOR (nmol NADH mg ⁻¹ prot min ⁻¹)	450	675 *	271	740 *
RNAm de GSNOR (Unidades arbitrarias x 10 ⁻²)	0,2	1,0	0,04	7,2 *
Localización celular				
NO	Epidermis y haces vasculares	Similar al control	Epidermis y haces vasculares	Similar al control
RSNOS	Haces vasculares	Incremento del marcaje en todas las células	Todas las células	Reducción del marcaje en parénquima
GSNO	Epidermis y cortex	Todas las células	Todas las células	El marcaje incremento en epidermis y se redujo en parénquima
GSNOR	parénquima y haces vasculares	Similar al control	parénquima y haces vasculares	Todas las células
3-nitrotirosina	Todas las células	Incremento del marcaje en todas las células	Todas las células	Similar al control

Tabla 19. Resumen de la modulación de RNS en plántulas de girasol sometidas a estreses por alta temperatura (AT) y daño mecánico (D)

	Línea HA89		Línea X55	
	Control	• Alta temperatura • Daño mecánico	Control	• Alta temperatura • Daño mecánico
Actividad NOS (nmol NO mg ⁻¹ prot.min ⁻¹)	0,634	AT: 0,426 * D: 0,293 *	0,294	AT: 0,659 * D: 0,524 *
Contenido en RSNOs (nmol NO mg ⁻¹ prot)	1,21	AT: 3,39 * D: 5,42 *	2,24	AT: 2,24 D: 1,82
Actividad GSNOR (nmol NADH mg ⁻¹ prot min ⁻¹)	450	AT: 336 * D: 227 *	271	AT: 281 D: 238
RNAm de GSNOR (Unidades arbitrarias x 10 ⁻³)	0,5	AT: 0,3 * D: 0,2 *	0,25	AT: 0,25 D: 0,28
Localización celular				
NO	Epidermis, floema y xilema	Reducción del marcaje en epidermis, floema y xilema	Ligero marcaje en epidermis y xilema	Incremento del marcaje en epidermis, floema y xilema
GSNO	Todas las células	Incremento del marcaje en todas las células	Todas las células	Similar al control
GSNOR	Parénquima y haces vasculares	Reducción del marcaje en parénquima y haces vasculares	Parénquima y haces vasculares	Similar al control
3-nitrotirosina	Todas las células	Incremento del marcaje en todas las células	Todas las células	Similar al control

ANEXO II

S-Nitrosoglutathione protects against nitrosative stress in the plant–pathogen interaction

Mounira Chaki, Alfonso Carreras, Raquel Valderrama, Francisco J. Esteban, Ana M. Fernández-Ocaña, María V Gómez-Rodríguez, Francisco Luque, Francisco J. Corpas^{1*}, Juan B. Barroso

Grupo de Señalización Molecular y Sistemas Antioxidantes en Plantas, Unidad Asociada al CSIC (EEZ), Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Jaén, Spain. ¹Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, Spain.

ABSTRACT

Plants response against biotic stress with the activation of a wide variety of localized and systemic defences to prevent pathogen replication and spreading. Nitric oxide has been showed to participate in the mechanism of plant response, however, less it is known on the participation of other NO-derived molecules designated as reactive nitrogen species (RNS). Using two sunflower cultivars with different sensitivity to the infection by the pathogen downy mildew, it is studied at biochemical, molecular and cellular levels key components involved in the metabolism of RNS including nitric oxide synthase and S-nitrosoglutathione reductase activities, nitric oxide, S-nitrosothiols, S-nitrosoglutathione and protein 3-nitrotyrosine. Taken together, these findings showed that RSNOs and GSNO are key elements in the mechanism of resistant in the incompatible interaction avoiding the process of nitrosative stress observed in the compatible interaction. A pharmacological approach demonstrated that the low level of $\cdot\text{NO}$, and consequently of GSNO, induced both *GSNOR* and *HaPR5* genes in the uninfected resistant cultivar. This allows proposing that *GSNOR* gene could be included in the category of pathogenesis-related (*PR*) genes.

INTRODUCTION

Plant–pathogen interactions are regulated by specific relations between pathogen *avr* (avirulence) gene loci and alleles of the corresponding plant disease resistance (*R*) locus. When corresponding *R* and *avr* genes are present in both host and pathogen, the result is disease resistance (Dangl and Jones, 2001; Thordal-Christensen, 2003). Downy mildew of sunflower (*Helianthus annuus* L.), caused by *Plasmopara halstedii*, can lead to economic

crop losses due to primary infection through the roots (Allard, 1979) and early secondary infection (aerial) which result in systemic infection of plants by the fungus (Mazeyrat et al., 1999). This obligate parasite is specific to sunflower and there are an important number of physiological races which can be distinguished by their differential virulence on sunflower genotypes (Gulya et al., 1991). Nitric oxide ($\cdot\text{NO}$) is a gaseous radical with a wide spectrum of physiological/pathological implications in animal and plant cells (Neill et al., 2003; Lamattina et al., 2003; del Río et al 2004; Shapiro 2005; Pacher et al., 2007). The generation of nitric oxide ($\cdot\text{NO}$) and reactive oxygen species (ROS) has been reported to be an early defence mechanism taking place during the plant biotic stress induced by a pathogen infection (Hancock et al, 2002; Romero-Puertas and Delledonne, 2003; Wendehenne et al., 2004; Mur et al., 2006; Zaninotto et al., 2006; Kotchoni and Gachomo, 2006; Arasimowicz and Floryszak-Wierzore, 2007). When elicited by an avirulent pathogen (or in a resistant plant variety), the disease resistance mechanism involving $\cdot\text{NO}$ and ROS culminate in the named hypersensitive response (HR) (Delledonne et al., 2001; 2003; García-Brugger et al., 2006). Nitric oxide has a family of related molecules designated as reactive nitrogen species (RNS) (Corpas et al 2007b) but the functions of these RNS in the interaction between plant-pathogen is not clear so far. Among these RNS, the S-nitrosoglutathione (GSNO) is resulted of the reaction between $\cdot\text{NO}$ with reduced glutathione (GSH) being the GSNO a more stable molecule, which is considered a reservoir/transporter of $\cdot\text{NO}$ to exert its effect in places far a way of where it is generated. Therefore, the knowledge of GSNO metabolism and its localization in the cells will be very important to understand the $\cdot\text{NO}$ function.

In this work, we provided evidence for the differential presence and modulation of S-nitrosoglutathione in sunflower hypocotyls with different susceptible to the infection by downy mildew. The results demonstrate that S-nitrosogluthathione (GSNO) mediates the response against biotic stress in sunflower hypocotyls and it showed that the *GSNOR* gene is regulated by $\cdot\text{NO}$ level.

RESULTS

In previous studies have been analysed the time course in the activation of defence genes during the sunflower-*Plasmopara halstedii* interactions from 1.5 d post infection (dpi) to 15 dpi (Radwan et al., 2005). Figure 1 shows the appearance of the seedlings after 9 days of the two lines of sunflower with different sensitivity to the pathogen *Plasmopara halstedii* race 2. The sunflower seedlings line HA89 (susceptible cultivar) in 9 d post infection (9 dpi) showed a significant reduction in size of the seedlings compared with the control seedlings (Fig. 1A). In contrast, the sunflower seedlings line X55 (resistant cultivar) did not shown any apparent difference in the size after 9 dpi with *P. halstedii* (Fig. 1B).

Expression of the defence-related *Ha-PR5* gene

In order to investigate whether the infection by *P. halstedii* caused the induction of defence-related genes in our system, the *Ha-PR5* gene expression was studied by real time quantitative RT-PCR transcript analysis using specific primers (Table I). In the susceptible cultivar after 9 dpi, the *Ha-PR5* transcripts were almost undetected in both infected and not infected hypocotyls. By contrast, in the resistant cultivar the *Ha-PR5* gene was induced around 5-folds in the infected hypocotyls (Fig. 2).

Enzymatic production of $\cdot\text{NO}$ from L-arginine (nitric oxide synthase activity)

The biochemical characterization of the enzymatic production of $\cdot\text{NO}$ from L-arginine (NOS activity) in hypocotyl extracts, measured by ozone chemiluminescence, is shown in Fig. 3. The $\cdot\text{NO}$ production was strictly dependent on the L-Arg concentration, BH₄, calmodulin and calcium, and the NOS activity was strongly reduced (63-85%) in the absence of NADPH, FAD and FMN. Moreover, when the samples were preincubated with the animal NOS inhibitors aminoguanidine (AG) or L-NMMA, the NOS activity was reduced a 95%. On the other hand, the analysis of the L-arginine-dependent NOS activity after the infection by *P. halstedii* in both cultivars is showed in Fig. 4. In the susceptible cultivar the NOS activity was reduced 1.4-folds after infection, whereas it was induced 1.7-folds in the resistant cultivar after infection.

Cellular analysis of Reactive Nitrogen Species (RNS)

The cellular localization and level of nitric oxide ($\cdot\text{NO}$), GSNO, RSNOs and tyrosine nitration of proteins were analyzed in both lines of sunflower hypocotyl sections using either fluorescent probes or specific antibodies (Figs. 5, 7 and 9).

The analysis of $\cdot\text{NO}$ was done by CLSM with the fluorescent probe DAF-2 DA (Fig. 5) and the green fluorescence corresponds to the presence of endogenous $\cdot\text{NO}$. In susceptible and resistant cultivars the $\cdot\text{NO}$ was clearly localized in the epidermal cells being the green fluorescence more intense in susceptible cultivar independently if the hypocotyls were infected or not infected by *Plasmopara halstedii* (Fig. 5 panels A, B, E and F).

On the other hand, S-nitrosothiols (RSNOs) were detected using the fluorescent probe Alexa Fluor 488 Hg-link (AF) that can react with nitrosylated thiols (RSNOs) via the Saville reaction (Valderrama et al., 2007; Corpas et al., 2007a). In the susceptible cultivar, the level of RSNOs was almost undetectable (Fig. 5C) and after infection the RSNOs showed a very significant increased almost in all cell types including epidermis, parenchyma cells of cortex, vascular tissues and parenchyma cells of pith (Fig. 5 D). In the resistant cultivar, the RSNOs had a different behaviour, it means the RSNOs were present in all cell

types in not infected hypocotyls (Fig. 5G) and after infection the RSNOs were detected in epidermal cells and vascular tissue (Fig. 5H). To corroborate these results, it was quantified the total content of RSNOs by a chemiluminescence method (Jourf'heuil et al., 2005). Figure 6 showed that after infection the total content of RSNOs was increased 3.5-folds in the susceptible cultivar. However, in the resistant cultivar after infection the total content of RSNOs was reduced 1.5-folds such as it was observed by CLSM (Fig. 5). It is important to remark that the total content of RSNOs in not infected hypocotyls was 1.8-folds higher in the resistant cultivar.

Immunolocalization of S-nitrosogluthathione (GSNO) and S-nitrosogluthathione reductase (GSNOR) in sunflower hypocotyls

To study the immunolocalization of GSNOR, previously it was obtained a polyclonal antibody against a conserved polypeptide among different plant species (see Material and Methods). This antibody was evaluated by western-blot which recognized a immunoreactive band of approximately 47 kDa which it is similar to that described in different organs of Arabidopsis (Espunya et al., 2006) (Fig. 11, supplemental material). Figure 7 showed the immunolocalization of GSNO and GSNO reductase in both susceptible and resistant cultivars without infections and 9 dpi with *P. halstedii*. The green fluorescence is attributed to GSNO and GSNOR in the corresponding panels. Thus, in the not infected susceptible cultivar (Fig. 7A to C), the GSNO was localized in the epidermal cells of hypocotyls (Fig. 7B) and a low amount of GSNO reductase was localized throughout the cortex cells (Fig. 7C). After infection with *Plasmopara halstedii* (Fig. 7D to F), the GSNO content was increased in both epidermal and cortex cells (Fig. 7E). However, the GSNO reductase did not show any significant induction (Fig. 7F). In the not infected resistant cultivar (Fig. 7G to I), the GSNO was also present in the epidermal and cortex cells of hypocotyls (panel G) and low amount of GSNO reductase was localized in the cortex cells (panel I). After infection with *Plasmopara halstedii* (Fig. 7J to L), the GSNO was exclusively localized in a layer of cells closer to epidermal cells (Fig. 7K) and the GSNO reductase was induced in both cortex and epidermal cells (Fig. 7L). The panels A, D, G, and J of Fig. 7 showed the autofluorescence (blue colour) which corresponds to the same field of panels B, E, H and K, respectively.

To get deeper knowledge on the metabolism of GSNO, it was study the activity and expression level of GSNO reductase (Fig. 8). To analyse the mRNA expression of *GSNOR* in sunflower hypocotyls by quantitative real time PCR, first it was necessary to obtain a partial cDNA of the sunflower GSNOR (accession number AY941250). Thus, a cDNA was obtained which coded for a protein fragment of 100 amino acids. This cDNA showed an 85% identity with the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase, which has been

demonstrated to have GSNOR activity (Sakamoto et al., 2002), of *Arabidopsis thaliana* (NM_123761), 82% with *Hordeum vulgare* (AY895936) and 80% with *Solanum tuberosum* (DQ268847). With this sequence information it was possible to design specific primers (Table I) to study the mRNA expression of GSNOR by quantitative real time PCR. Figure 8A shows that GSNOR activity was induced a 46% in the susceptible cultivar after infection with *Plasmopara halstedii* whereas this activity was induced a 118% in the resistant cultivar. This last result is in agreement with the data observed in Fig. 7 panels I and L. Figure 8B shows the mRNA expression of GSNOR. Thus, in the susceptible cultivar the gene was induced 5-folds in the infected sunflower hypocotyls whereas in the resistant cultivar the GSNOR gene was induced 180-folds in the infected hypocotyls.

Figure 9 shows the cellular localization of tyrosine nitration of proteins using an antibody against nitrotyrosine (nTyr) which recognized the nitrosylated proteins (Uttenthal et al., 1998). In the not infected susceptible cultivar, the green fluorescence corresponding to nTyr was observed mainly in vascular tissues and cortex cells (Fig. 9A), however, in the infected hypocotyls the green fluorescence was present in almost all cell types with a clear green fluorescence intensification in vascular tissues and cortex cells (Fig. 9B). On the other hand, in the not infected resistant cultivar the green fluorescence was also present in vascular tissue and cortex cells (Fig. 9C), similar to the susceptible cultivar. However, in the infected resistant cultivar the nTyr localization was very similar to the not infected without any intensification of the green fluorescence (Fig. 9D).

To get deeper insight in the mechanism of induction of GSNOR gene by $\cdot\text{NO}$, the sunflower seedlings of not infected resistant cultivar, which has a higher content of RSNOs (Fig. 6), were incubated with 0.1 μM and 1.0 μM cPTIO (a $\cdot\text{NO}$ scavenger) for 3 h. Then, it was determined the gene expression of GSNOR and *Ha-PR-5* in hypocotyls. Figure 10 shows that 1.0 μM cPTIO, which scavenged $\cdot\text{NO}$, provoked a significant induction of both genes that they were inversely correlated to the concentration of the $\cdot\text{NO}$ scavenger. Indicating that the low disponibility of $\cdot\text{NO}$ acts as signal to induce both genes.

Discussion

Downy mildew is one of the principal diseases causing economic losses in the cultivation of sunflowers (Brahm et al., 2000). There are a certain numbers of sunflower lines that they can show resistant to the infection by *P.halstedii*. Thus, it can be distinguished between susceptible sunflower lines where the pathogen can develop (compatible interaction) and resistant sunflower lines where the pathogen cannot develop (incompatible interaction). In this study, it has been selected two sunflower lines HA89 and X55 which correspond to the compatible and incompatible interactions, respectively (Roldán-Serrano et al., 2007). Figure

1 showed how the infection by *P.halstedii* affected the development of the sunflower seedlings in the susceptible line but not in the resistant line. This behaviour was corroborated using the gene *Ha-PR5* (Jung et al., 1993; Radwan et al., 2005), a typical pathogenesis-related (*PR*) gene, which was strongly induced in resistance line but it was not affected in the susceptible line (Fig. 2A).

With these two models of compatible and incompatible interactions, the main goal of this study was to obtain a deeper knowledge of $\cdot\text{NO}$ metabolism considering several reactive nitrogen species (RNS) with a special emphasis in S-nitrosoglutathione (GSNO) as putative natural reservoir of $\cdot\text{NO}$. Thus, several elements were studied, such as the enzymatic generation of $\cdot\text{NO}$ by a nitric oxide synthase (NOS) activity, the enzymatic decomposition of GSNO by the GSNO reductase (GSNOR), the cellular localization of $\cdot\text{NO}$, GSNO and S-nitrosothiols (RSNO), as well the cellular distribution of GSNOR and nitrotyrosine (nTyr) as a marker of nitrosative stress (Ischiropoulos 2003; Corpas et al., 2007c).

The enzymatic production of $\cdot\text{NO}$ in plants is still a controversial question (Corpas et al., 2007b). Therefore, it was carried out the biochemical characterization of L-arginine dependent NOS activity in sunflower hypocotyls by an ozone chemiluminescence method, set up for plant tissues, which has been demonstrated to be very sensitive (Corpas et al., 2007a). In the sunflower resistant cultivar, the NOS activity was 0.294 nmol NO mg⁻¹ protein min⁻¹. This activity was inhibited by LNMMA and aminoguanidine, two well-known inhibitors of NOS activities in animal cells (Griffith and Kilbourn, 1996; Laszlo et al., 1995), it was dependent on L-arginine and required NADPH, calcium and different cofactors (FAD, FMN and BH₄). These biochemical requirements are similar to the NOS activity detected in pea leaf peroxisomes (Barroso et al., 1999; Corpas et al., 2004) and olive leaves (Valderrama et al., 2007). On the other hand, this specific activity was similar to the NOS activity reported in white lupinus (Cueto et al., 1996), olive leaves (Valderrama et al., 2007) and pea roots (Corpas et al., 2006); lower than the NOS activity in soybean leaf chloroplast (Jasid et al., 2006) and pea leaf peroxisomes (Corpas et al., 2004); and higher than the NOS activity in *Arabidopsis* leaf (Modolo et al., 2005; Feechan et al., 2005). Therefore, it can be confirmed that sunflower hypocotyls had a constitutive L-arginine-dependent nitric oxide synthase (NOS) activity.

Considering this characterization, the analysis of NOS activity in compatible and incompatible interactions revealed that the susceptible cultivar had a NOS activity 2- folds higher than the resistant cultivar in non-infected plants. Conversely, after infection the NOS activity was reduced in the susceptible cultivar but was induced in the resistant cultivar. This indicates that both cultivars had an opposite behaviour after the infection. However, in other plant species under different biotic stresses are observed an increase of NOS activity. For

examples, in soybean cotyledons, it was showed that the NOS activity mediated phytoalexin accumulation in response to the *Diaporthe phaseolorum* (Modolo et al., 2002). It has been also demonstrated that the application of lipopolysaccharides (LPS) from different bacteria activates nitric oxide synthase activity in *Arabidopsis* and induce defence genes (Zeider et al., 2004). In *Arabidopsis* leaves after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*Psm*) or tomato (*Pst*) the NOS activity was induced 4 to 5-folds (Modolo et al., 2005; Feechan et al. 2005). Also in the *Arabidopsis* hypersensitive response (HR) has been shown by pharmacological approaches the involvement of a NOS activity (Delledonne et al 1998; Zhang et al., 2003).

On the other hand, the $\cdot\text{NO}$ content, evaluated by CLSM (Fig. 5), change in the same manner after 9 dpi in both susceptible and resistant cultivars. This contract with other plantpathogen interactions, for example $\cdot\text{NO}$ accumulation has been observed following inoculation of avirulant (i.e eliciting a HR) but not virulent bacterial strains into *Gycine max* (Delledonne et al., 1998) and *Arabidopsis thaliana* suspension cultures (Clarke et al 2000). In tobacco peels treated with the necrosis-inducing elicitor crytoein from *Phytophthora crytoea* also provoked a rapid $\cdot\text{NO}$ production (Foissner et al., 2000). Inoculation of tobacco leaves with *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* resulted in a rapid increase in $\cdot\text{NO}$ production after approximately 40 min, but after 1 h, this was markedly reduced (Mur et al. 2005). However, in a susceptible cultivar of *Pelargonium peltatum*, the leaves infection by the fungus *Botritis cinerea* caused a weak $\cdot\text{NO}$ burst after 3 h infection compared with the strong $\cdot\text{NO}$ burst observed in the resistant cultivar (Floryszak-Wieczorek et al., 2007). In contrast, in *Arabidopsis* leaves infected with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 carrying either *avrB* or *avrPrt2* did not shown $\cdot\text{NO}$ accumulation, between 3 h to 5.5 h post-inoculation, that trigger early programmed cell death, however, it was detected low level of $\cdot\text{NO}$ that it could involved in the cell signalling (Zhang et al., 2003). In *Hypericum perforatum* suspension cells treated with a fungal elicitor prepared from the cell walls of *Aspergillum niger* induced $\cdot\text{NO}$ generation between 2 h to 9 h. This was co-related with an induction of NOS activity and accompanied with jasmonic acid (JA) biosynthesis, and hypericin production (Xu et al., 2005). In two varieties of pepper (*Capsicum annuum*) which both developed a hypersensitive reaction and generated $\cdot\text{NO}$ in response to the pathogen *Phytophthora capsici*, were reported that the resistant variety showed 3 days after infection the highest $\cdot\text{NO}$ production (Requena et al., 2005). On the other hand, the treatment of tomato cell cultures with the fungal elicitor xylanase resulted in a rapid and dose-dependent $\cdot\text{NO}$ accumulation which was also required for the production of the lipid second messenger phosphatidic acid (PA) via the activation of the phospholipase C (PLC) and diacylglycerol kinase (DGK) pathway (Laxalt et al., 2007).

In addition, the $\cdot\text{NO}$ cellular localization in both cultivars was also very similar because it was detected mainly in epidermal cells and vascular tissues of hypocotyls. This $\cdot\text{NO}$ localization is similar to that described in other organs of different plant species such as epidermal cells of *Arabidopsis* leaves (Huang et al., 2004); leaf, stem and root of pea plants (Corpas et al., 2004, 2006); stem of pepper plants (Requena et al. 2005) and olive leaves (Valderrama et al., 2007).

S-Nitrosothiols (RSNOs), and particularly S-nitrosoglutathione (GSNO), may function both as an intracellular $\cdot\text{NO}$ vehicle transporters and for a long distance transported throughout the plant via phloem bundles (Singh et al., 1996a,b; Arasimowicz and Floryszak-Wieczore, 2007). Under physiological conditions, S-nitrosothiols (RSNOs) are considered to provide protection against cellular damages induced by oxidative and nitrosative stress (Sun et al., 2006; Valderrama et al., 2007). In the compatible interaction between *Arabidopsis thaliana* Col-0 and *Pseudomonas syringae* DC3000 (*avrB*), the total content of RSNOs increased after infection (Feechan et al., 2005). In our experimental models, the total content of RSNOs increased in the compatible interaction but it was down in the incompatible interaction (Fig. 5 and 6). In this sense, it is important to remark that the resistant cultivar before the infection had double content of RSNO that susceptible cultivar (Fig. 6) and these RSNOs had also a general distribution in almost all cell types (Fig. 5G). Thus, this higher RSNOs content can be a feature of the resistant cultivar to prevent infection spread. When the GSNO content was evaluated by CLSM (Fig 7, panels B, E, H and K), it was observed a similar behaviour that the total content of RSNOs determined in the compatible and incompatible interactions (Fig. 6). Moreover, in the compatible interaction the GSNO was located almost exclusively in epidermis cells (Fig. 7 B); however, after infection it had a general distribution (Fig. 7E). On the contrary, in the incompatible interaction the GSNO was localized in almost cell types (Fig. 7H) and after the infection the GSNO was redistributed and localized exclusively in the epidermal cells (Fig. 7K) As well as the RSNOs content, the resistant cultivar had higher GSNO content that can be related with the infection resistance. Additionally, after the infection in the sensitive cultivar the synthesis *de novo* of GSNO had a general distribution. On the contrary, in the resistant cultivar the GSNO seems to be redistributed and mobilized to the epidermis cells because usually it is the place of growth of *Plasmopara halstedii* towards the upper part of the sunflower seedlings (Radwan et al., 2005). In this context, it has been described that at subcellular level there is a redistribution of Golgi bodies and peroxisomes that become preferentially localized at the infection site (Hardhman, 2007) This redistribution of peroxisomes could be very significant considering that these organelles possess a nitric oxide synthase activity (Barroso et al., 1999; Corpas et

al., 2004) and therefore they are a source of $\cdot\text{NO}$ and GSNO (Corpas et al., 2001; del Río et al., 2006).

The enzyme GSNOR seems to regulate the cellular level of GSNO because this enzyme catalyzed the NADH-dependents reduction of GSNO to oxidized glutathione (GSSG) and NH_3 (Liu et al., 2001; Sakamoto et al., 2002). Thus, it has been reported that mutations of *AtGSNOR1*, an *Arabidopsis thaliana* GSNOR, modulate the extent of cellular S-nitrosothiol formation and turnover, which seems to regulate multiple modes of plant disease resistance (Feechan et al., 2005). Similarly, in transgenic *Arabidopsis* with decreased amount of GSNOR (using antisense strategy) also showed more resistant against the pathogen *Peronospora parasitica*, which was correlated with a higher levels of intracellular RSNOs (Rusterucci et al., 2007). These data contrast with the results obtained in sunflower hypocotyls because the GSNOR activity increased in both sensitive and resistant cultivars after infection (Fig. 8) which it was well correlated with the increase of GSNOR protein level detected by CLSM (Fig. 7). However, the *GSNOR* gene was strongly induced only in the resistant cultivar (Fig. 8). These seem to indicate that after infection there is an induction of GSNOR activity in both but the gene was only induced in the resistant cultivar which is a similar behaviour observed with the *Ha-PR5* gene (Fig. 2). In the case of pea plants exposed to abiotic stress (50 μM cadmium), it has been showed that both activity and transcript expression of GSNOR were reduced around a 31% (Barroso et al., 2006). On the other hand, the *GSNOR* gene was downregulated by wounding and activated by salicylic acid in *Arabidopsis* but in tobacco, the GSNOR expression and enzymatic activity decreased after jasmonate treatment, and increased in response to salicylic acid (Díaz et al., 2003). These data indicates the complex interactions among the different signals under biotic and abiotic stresses.

Protein tyrosine nitration is being used as marker of nitrosative stress in animal cells (Ischiropoulos, 2003) and it has been proposed that this post-translational modifications could be also useful marker of nitrosative stress in plants (Valderrama et al., 2007; Corpas et al., 2007c). Thus, in leaves from olive plants under salt stress conditions an increase in the number of proteins of 44-60 kDa that experimented tyrosine nitration has been described. This increase of nTyr was accompanied by a general rise of $\cdot\text{NO}$, RSNO and GSNO indicating that salinity provoked a nitrosative stress (Valderrama et al. 2007). Moreover, in tobacco BY-2 suspension cells treated with a fungal elicitor, the induction of tyrosine nitration in proteins with molecular masses in the range 20-50 kDa has been also demonstrated (Saito et al. 2006). Thus, in the compatible interactions (Fig. 9 A and B) was observed a clear induction of the proteins which suffered tyrosine nitration, however, an opposite situation was observed in incompatible interaction (Fig. 9 C and D). Therefore, considering

this posttranslational modification as potential marker of nitrosative stress (Corpas et al., 2007c), it can be suggested that the susceptible cultivar (compatible interaction) suffers a nitrosative stress. However, the resistant cultivar (incompatible interaction) did not suffer nitrosative stress. The reason can be related with the fact that the resistant cultivar has a high content of GSNO and RSNOs which can contribute, among other factors, to confer protection against pathogens. A summary of the main effects on reactive nitrogen species (RNS) in hypocotyls of both sunflower cultivars after infection with *Plasmopara halstedii* is showed in Table II.

With the goal to get deeper knowledge in the $\cdot\text{NO}$ gene regulation a pharmacological approach was used. Thus, not infected sunflower seedlings of resistant cultivar, which had high content of RSNOs and GSNO, were incubated with a $\cdot\text{NO}$ scavenger and both *GSNOR* and *Ha-PR5* genes were strongerly induced (Fig. 10). It is very interesting to remark that both genes had similar behaviour because they were induced with an increase concentration of $\cdot\text{NO}$ scavenger. Therefore, we can deduce that the low level of $\cdot\text{NO}$ can be the switch to induce the expression of both *GSNOR* and *Ha-PR5* genes and it could be proposed that the *GSNOR* could be included in the category of pathogenesis-related genes.

In summary, the results described in this work apart from providing new insights in the metabolism of RNS during the compatible and incompatible interactions, also evidence that the higher content of RSNOs and GSNO, and its redistribution to the hypocotyl epidermal cells after infection seems to be factors that must contribute to the resistant during the incompatible interaction. However, the compatible interaction suffers a nitrosative stress due to the increase level of protein tyrosine nitration considering this post-translational modification as a marker of this type of stress (Corpas et al., 2007c). Additionally, it is also proposed that the *GSNOR* gene, that it is induced by low disponibility of $\cdot\text{NO}$ and consequently of GSNO, can be considered a new pathogen related gene similar to the *Ha-PR5*. This suggests that Snitrosoglutathione, the most abundant intracellular S-nitrosothiol (RSNOs), is a modulator of the mechanism of defence against pathogen and provides protection against pathogen.

MATERIAL AND METHODS

Sunflower genotypes and growth conditions

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds were obtained from Koipesol seeds SA (Sevilla, Spain). Sunflower lines X55 (resistant to *Plasmopara halstedii* races 1 to 10) and HA89 (Peredovick variety and susceptible to *Plasmopara halstedii* infection) were used during this study. Seedlings were sown in wet vermiculite, and grown in a growth chamber for 9 days, with 16/8 h light/dark at 20 °C.

Infection procedure with *Plasmopara halstedii* race 2

Sunflower seeds were surface sterilized with 70% ethanol for 4 min, rinsed with distilled water, then immersed in 10% household bleach (0.5 % sodium hypochlorite) for 20 min, rinsed three times with distilled water. For germination, seeds were rolled up in wet double filter paper, covered with aluminum foil and kept at 28°C for 48 hours. Inoculation was made following the whole seedling immersion method (Cohen and Sackston, 1973) with a suspension of *Plasmopara halstedii* race 2 containing 90,000 zoospores ml⁻¹. Seedlings were sown in wet vermiculite, and grown in a growth chamber, with 16/8 h light/dark at 20 °C. After 9 days, they were covered with transparent plastic bags for 2 days in order to allow *P. halstedii* sporulation. Spores collected from Peredovick plants were used as inoculum source.

Resistant and susceptible sunflower seeds were germinated as described before, and then divided into two groups: one of them was inoculated and the other one was immersed in distilled water and kept under the same conditions as the inoculated seedlings. Both inoculated and non-inoculated seedlings were sown in four pots of 15 plants each and grown as described before. After 9 days, hypocotyls were cut and used as plant material.

Crude extract of sunflower hypocotyls

Hypocotyls were ground using a mortar and pestle in liquid nitrogen. The resulting coarse powder was transferred into 1/5 (p/v) extraction buffer which was different depending of the activity to be assayed. For nitric oxide synthase activity was 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 0.1M NaCl, 7% (w/v) PVPP, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 15 mM DTT and protease inhibitors cocktail (2x from Sigma). For S-nitrosoglutathione activity was 0.1M Tris-HCl, buffer, pH 7.6, containing 5% sucrose, 7% (w/v) PVPP; 0.05% Triton X-100, 0.1 mM EDTA, 15 mM DTT, 1 mM PMSF and protease inhibitors cocktail (2x). Then the crude extracts were centrifuged at 3000 g for 6 min (4°C) and the supernatants were passed through Sephadex G-25 gel filtration columns (NAP-10 from Amersham) to remove salts and low molecular weight components.

Nitric oxide synthase activity assay

Nitric oxide production from L-arginine was estimated by ozone-chemiluminescence methods using a Nitric Oxide Analyzer (Sievers NOATM 280i) according to Corpas et al (2007a). For this activity assay, the supernatants were filtered throughout a NAP-10 column to remove salts and low molecular weight components but the columns were equilibrated and washed with 40 mM HEPES buffer (pH 7.2) containing 0.2 mM CHAPS. NOS activity

were performed in triplicate for each sample for 30 min at 37 °C in the elution medium containing 40 mM HEPES buffer (pH 7.2), 0.2 mM CHAPS, 10 µM FAD, 10 µM FMN, 10 µM BH₄, 10 µg/ml CaM, 1.25 mM CaCl₂, 1 mM β-NADPH and using a concentration of 1 mM L-Arg. The production of ·NO was computed after subtracting to the blank value (time zero min), which represented the non enzymatic production. The activity was expressed as nmole of NO mg⁻¹ protein min⁻¹. To validate this method to determine the NOS activity of plant samples, commercial rat neuronal NOS from Calbiochem (2.9 U) was assayed separately as positive control. The NOS activity was also determined using a concentration of 0.1 M L-Arg, in the absence of cofactors and in the presence of the animal NOS inhibitors such as 1mM L-NGmonomethyl arginine citrate (L-NMMA) and 5 mM aminoguanidine (AG) which are irreversible inhibitors of both constitutive and inducible NOS activities in animal cells (Griffith and Kilbourn, 1996; Laszlo et al., 1995).

Chemiluminescence detection of total S-nitrosothiols (RSNOs)

Total S-nitrosothiols (RSNOs) were estimated by a chemiluminescence method, as described by Jourdain et al. (2005) with some modifications (Corpas et al., 2007a). The detection of RSNOs is based on the reductive decomposition of nitroso species by an iodine/triiodide mixture to release ·NO, which is subsequently measured by gas phase chemiluminescence upon reaction with ozone. RSNOs are sensitive to mercury induced decomposition, contrary to other nitroso species including nitrosamines (RNNOs) and nitrosyl hemes. The samples were homogenized and suspended in 0.1M Tris-HCl buffer, (pH 7.5) containing 5% (w/v) sucrose, 7% (w/v) PVPP, 0.05% (v/v) Triton X-100, 0.1 mM EDTA, 15 mM DTT, 1 mM PMSF, 100 µM DTPA (diethylenetetraminepentaacetic acid) and protease inhibitors cocktail (1/5; FW/V), and centrifuged at 20,000 g for 10 min. Then, the supernatants were incubated with 10 mM NEM (N-ethylmaleimide) for 15 min at 4°C, and with 10 mM sulfanilamide for 15 min at 4°C, to eliminate nitrite. Then, these samples were analysed in a Nitric Oxide Analyser (NOA 280i, Sievers Instruments, Boulder, CO, USA). The whole procedure was done under red safety light to protect RSNOs from light-dependent decomposition.

S-Nitrosoglutathione reductase (GSNOR) activity

GSNOR activity was assayed spectrophotometrically at 25 °C by monitoring the oxidation of NADH at 340 nm as described by Barroso et al (2006). The hypocotyl extracts were incubated in an assay mixture containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.2 mM NADH and 0.5 mM EDTA, the reaction was started by adding 400 µM GSNO (Calbiochem). The activity was expressed as nmol NADH consumed per min per mg protein ($\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Protein concentration was determined with the Bio-Rad Protein Assay (Hercules, CA), using bovine serum albumin as standard.

Production of antibody to GSNO reductase (GSNOR) and IgG purification

The service of polyclonal antibody production of Sigma-Genosys (UK) from a selected peptide was used to obtain the antibody against GSNOR. A peptide of 14 amino acids (ESVGEGVTEVQPGD) which corresponds to the residues between Glu78 and Asp91 of the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase of *Oryza sativa* (accession number A2XAZ3) was selected. This peptide was conserved among different plant GSNOR, was hydrophilic and contained one predicted β -turn. The selected peptide was conjugated to a carrier protein, the keyhole limpet hemocyanin (KLH) which is derived from marine molluscs via the thiol group of a Cys residue added to the C-terminus of the selected peptide using MBS (maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester) chemistry. Thus the construction ESGVGEVTEVQPGD-[C]-KLH- was used for the immunization of two rabbits according to the protocol of six immunizations per rabbit (Sigma-Genosys, UK). The IgG fraction of serum was isolated using an Econ-Pac Serum IgG purification kit (Bio-Rad).

RNA isolation and cloning of a sunflower GSNOR cDNA

Total RNA was isolated from hypocotyls with the Trizol Reagent Kit (Gibco BRL) as described in the manufacturer's manual. RNA was quantified spectrophotometrically. One μ g of total RNA was used as a template for the reverse transcriptase (RT) reaction. It was added to a mixture containing 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTPs, 3,2 μ g random primer p(dN)₆, 1X RT-Buffer, 50 U RNase inhibitor, 20 U AMV reverse transcriptase (FIZZYMES). The reaction was carried out at 25 °C for 10 min, 42 °C followed by a 5 min step at 99°C, and then by cooling to 4°C. Using the protein sequence of the pea glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase (accession number P80572), oligonucleotides were designed for conserved regions (see Table I) and by RT-PCR a partial cDNA of 302 bp was obtained (accession no. AY941250).

The polymerase chain reaction (PCR) was as follows: 1 μ l of the produced cDNA diluted 1/20 was added to 250 μ M dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 1X PCR buffer, 1.25 U of Hot Start Taq polymerase (Eppendorf) and 0.5 μ M of each primer (see Table I) in a final volume of 20 μ l. Reactions were carried out in a Master Cyclor (Eppendorf). A first step of 2 min at 94°C was followed by 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C and 1 min at 65°C with a final extension of 10 min at 65°C. Amplified PCR products were detected after electrophoresis in 1% agarose gels stained with ethidium bromide. The PCR reaction was loaded on a 1% agarose gel and the visualized bands were cut and extracted from the gel

(Qiaex II gel extraction kit, Qiagen). The purified fragments were cloned into the pGEM-T easy vector (Promega) and sequenced.

Real-Time quantitative PCR

The Real-Time quantitative PCR was performed in 20 μ l of reaction mixture, composed of 1 μ l of different cDNAs and master mix IQTM SYBR® Green Supermix with a final concentration of 0.5 unit of hot-start iTaq™ DNA Polymerase (Bio-Rad), 20 mM KCl, 16 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.16 mM each dNTPs, 2.4 mM MgCl₂, 0.5 μ M gene-specific primers (see Table I) and SYBR Green I, 8 nM fluorescein, using a iCycler iQ system (Bio-Rad). Amplifications were performed under the following conditions: initial polymerase activation: 95 °C, 4 min; then 30 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 60 °C and 1 min at 72 °C.

The specific primers for the sunflower *Ha-PR5* and *GSNO reductase* (see Table I) were designed to anneal at different exons at distances large enough to avoid the appearance of false positive bands caused by co-amplification of contaminating DNA based in the partial cDNA previously obtained, using the RNA 18S as an internal control.

Detection of $\cdot$ NO, and S-nitrosothiols (RSNOs) by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Nitric oxide was detected in hypocotyls transversal sections of approximately 25 mm² that were incubated for 1 h at 25°C, in darkness, with 10 μ M 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2 DA, Calbiochem) prepared in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), according to Corpas et al. (2006). After incubation, samples were washed twice in the same buffer for 15 min each. Then, hypocotyl sections were embedded in a mixture of 15% acrylamide-bisacrylamide stock solution as described elsewhere (Corpas et al., 2006), and 80-100 μ m-thick sections, as indicated by the vibratome scale, were cut under 10 mM phosphate-buffered saline (PBS). Sections were then soaked in glycerol:PBS (containing azide) (1:1 v/v) and mounted in the same medium for examination with a confocal laser scanning microscope system (Leica TCS SL), using standard filters and collection modalities for DAF-2 green fluorescence (excitation 495 nm; emission 515 nm) and chlorophyll autofluorescence (chlorophyll *a* and *b*, excitation 429 and 450 nm, respectively; emission 650 nm and 670 nm, respectively) as orange. Background staining, routinely negligible, was controlled with hypocotyl sections unstained. As control, sections were preincubated 30 min at 25°C with 200 μ M 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO), an $\cdot$ NO scavenger.

S-Nitrosothiols (RSNOs) were detected using the fluorescent reagent Alexa fluor 488 Hg-link phenylmercury. Sunflower hypocotyls segments of approximately 25 mm² were

incubated at 25 °C for 1 h, in darkness, with 10 mM N-ethyl-maleimide (NEM) prepared in ethanol, and then were washed three times in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, for 15 min each. Then, they were incubated with 10 µM Alexa fluor 488 Hg-link phenylmercury (Molecular Probes, cat. no H30462) for 1 h at 25°C, in darkness. After washing three times in the previous buffer, hypocotyl sections were embedded in a mixture of 15% acrylamide-bisacrylamide stock solution and were processed as described above. The sections were analysed with a confocal laser scanning microscope system using standard filters for Alexa fluor 488 green fluorescence (excitation 495 nm; emission 519 nm).

Immunolocalization of GSNO, GSNOR and nitrotyrosine by CLSM

Sunflower hypocotyls (n=5 for each experimental group) were cut into 4-5 mm pieces and fixed in 4% (w/v) *p*-formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4, for 3 h at room temperature. Then they were cryoprotected by immersion in 30% (w/v) sucrose in PB overnight at 4°C. Serial sections, 60-µm thick, were obtained by means of a cryostat (2800 Frigocut E, Reichert-Jung, Vienna, Austria).

Immunohistochemistry was carried out by confocal analysis of immunofluorescence-stained sections as described by Corpas et al. (2004). Free floating sections were incubated overnight at room temperature with GSNO rat antisera (Calbiochem, cat no. 487932) diluted 1:2,500 in 5 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2, 0.9% (w/v) NaCl, containing 0.05% (w/v) sodium azide, 0.1% (w/v) bovine serum albumin and 0.1% (v/v) Triton X-100 (TBSA-BSAT). After several washes with TBSA-BSAT, sections were incubated with biotinylated goat anti-rat IgG (Pierce), diluted 1:1000 in TBSA-BSAT, for 1 h at room temperature. Then, sections were washed again and incubated with Cy2-streptavidin (Amersham), diluted 1:1,000 in TBSA-BSAT, for 1.5 h at room temperature, this and the following steps being carried out in the dark. After several washes, sections were then mounted in PBS:glycerol 1:1. Hypocotyl sections were examined with a laser confocal scanning microscope (Leica TCS SL).

For the immunolocalization of GSNOR purified IgGs of a rabbit polyclonal antibody against GSNOR diluted 1:50 was used. For the immunolocalization of protein 3- nitrotyrosine a rabbit polyclonal antibody against 3-nitrotyrosine (Uttenthal et al. 1998) diluted 1:300 was used. Controls for background staining, which was usually negligible, were performed replacing the primary antibody with an equivalent concentration either of the incubation buffer or of normal rabbit or rat serum.

Acknowledgements

M.C. acknowledges PhD fellowships from University of Jaén. This work was supported by grant from the Ministry of Education and Science (BIO2006-14949-C02-01) and Junta de Andalucía (group CVI 0286 and CVI 192). Sunflower seeds were kindly provided by María I. Rodríguez (Koipesol seeds SA). The valuable technical help of Miss Emperatriz Córdoba is also appreciated. Confocal laser scanning microscopy analyses were carried out at the Technical Services of the University of Jaén, and special thanks are given to Miss Nieves de la Casa-Adán for her technical assistance in confocal laser scanning microscopy analyses.

Reference

Arasimowicz M, Floryszak-Wierczore J (2007) Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Sci* **172**: 876-887.

Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A, Sandalio LM, Valderrama R, Palma JM, Lupiáñez JA, del Río LA (1999) Localization of nitric oxide synthase in plant peroxisomes. *J Biol Chem* **274**: 36729-36733.

Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A, Rodríguez-Serrano M, Esteban FJ, Fernández- Ocaña A, Chaki M, Romero-Puertas MC, Valderrama R, Sandalio LM, del Río LA (2006) Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *J Exp Bot* **57**: 1785-1793.

Brahm L, Rocher T, Friedt W (2000) PCR-based markers facilitating marker assisted selection in sunflower for resistance to downy mildew. *Crop Science* **40**: 676-682.

Cachinero JM, Cabello F, Jorin J and Tena M (1996) Induction of different chitinase and β -1,3-glucanase isoenzymes in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedling in response to infection by *Plasmopara halstedii*. *Eur J Plant Pathology* **102**: 401-405.

Clarke A, Desikan R, Hurst RD, Hancock JT, Neill SJ (2000) NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant J* **24**: 667-677.

Cohen Y, Sackston WE (1973) Factors affecting infection of sunflowers by *Plasmopara halstedii*, *Canadian Journal of Botany* **51**: 15-22.

Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Quirós M, León AM, Romero-Puertas MC, Esteban FJ, Valderrama R, Palma JM, Sandalio LM, Gómez M, del Río LA (2004) Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiology* **136**: 2722-2733

Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Valderrama R, Palma JM, León AM, Sandalio LM, del Río LA (2006) Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta* **224**, 246-254.

Corpas FJ, Barroso JB, del Río LA (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci.* **6**: 145-150

Corpas FJ, Carreras A, Esteban F, Chaki M, Valderrama R, del Río LA, Barroso JB (2007a) Localization of S-Nitrosothiols and assay of nitric oxide synthase and Snitrosoglutathione reductase activity in plants. *Methods in Enzymology* **437**: (in press).

Corpas FJ, Carreras A, Valderrama R, Chaki M, Palma JM, del Río LA Barroso JB (2007b) Reactive nitrogen species and nitrosative stress in plants. *Plant Stress* 1(1): 37-41.

Corpas FJ, del Río LA, Barroso JB (2007c) Need of biomarkers of nitrosative stress in plants. *Trends Plant Sci* 12(10): (doi: 10.1016/j.tplants.2007.08.013) in press.

Dangl JL, Jones JDG (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826-833.

Delledonne M, Polverari A, Murgia I (2003) The functions of nitric oxide-mediated signaling and changes in gene expression during the hypersensitive response. *Antioxid Redox Signal.* **5**: 33-41.

Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585–588.

Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C (2001). Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (23), 13454-13459.

Díaz M, Achkor H, Titarenko E, Martínez MC (2003) The gene encoding glutathione dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. *FEBS Letters* **543**: 136-139.

Espunya MC, Diaz M, Moreno-Romero J, Martinez MC (2006) Modification of intracellular levels of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase alters glutathione homeostasis and root development. *Plant Cell Environ.* **29**: 1002-1011.

Floryszak-Wieczorek J, Arasimowicz M, Milczarek G, Jelen H, Jackowiak H (2007) Only an early nitric oxide burst and the following wave of secondary nitric oxide generation enhanced effective defence responses of pelargonium to a necrotrophic pathogen. *New Phytol* **175**: 718-730

Feechan A, Kwon E, Yun BW, Wang Y, Pallas JA, Loake GJ (2005). A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 8054–8059.

Foissner ID, Wendehenne D, Langebartels C, Dürner J (2000) In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *Plant J* **23**: 817–824.

Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 711-24

Griffith OW, Kilbourn RG (1996) Nitric oxide synthase inhibitors: Amino acids. *Methods Enzymol* **268**: 375-392.

Gulya TJ, Sackston WE, Viranyi F, Masirevic S and Rashid KY (1991) New races of the sunflower downy mildew pathogen (*Plasmopara halstedii*) in Europe and North and South America. *American Journal of Phytopathology* **132**: 303–311

Hancock JT, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Neill SJ (2002) Cell signalling following plant/pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 611-617.

Hardham AR (2007) Cell biology of plant-oomycete interactions. *Cell Microbiol.* **9**: 31-39.

He Y, Tang RH, Hao Y, Stevens RD, Cook CW, Ahn SM, Jing L, Yang Z, Chen L, Guo F, Fiorani F, Jackson RB, Crawford NM, Pei ZM (2004) Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* **305**: 1968-71

Herbette S, Lenne C, Tourvieille de Labrouhe D, Drevet J.R, Roeckel-Drevet P (2003) Transcripts of sunflower antioxidant scavengers of the SOD and GPX families accumulate differentially in response to downy mildew infection, phytohormones, reactive oxygen species, nitric oxide, protein kinase and phosphatase inhibitors. *Physiologia Plantarum* **119**: 418-428.

Hogg N (2000) Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. *Free Rad Biol Med* **28**: 1478-1486.

Hu X, Bidney DL, Yalpani N, Duvick JP, Crasta O, Folkerts O, Lu G (2003) Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiol* **133**: 170-81.

Huang X, Stettmaier K, Michel C, Hutzler P, Mueller MJ, Durner J (2004) Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **218**: 938-946.

Ischiropoulos H (2003) Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Commun* **305**: 776-783.

Jourd'heuil D, Jourd'heuil FL, Lowery AM, Hughes J, Grisham MB (2005) Detection of nitrosothiols and other nitroso species *in vitro* and in cells. *Methods Enzymology* **396**, 118-31.

Jung JL, Fritig B, Hahne G (1993) Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Pathogenesis- Related proteins (induction by aspirin (acetylsalicylic acid) and characterization). *Plant Physiol* **101**: 873-880

Klessig DF, Durner J, Noad R, Navarre DA, Wendehenne D, Kumar D, Zhou JM, Shah J, Zhang S, Kachroo P, Trifa Y, Pontier D, Lam E, Silva H (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 8849-8855.

Kotchoni SO, Gachomo EW (2006) The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. *J Biosci.* **31**: 389-404

Lamattina L, García-Mata C, Graziano M, Pagnussat G (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol* **54**:109-136

Laszlo F, Evans SM, Whittle BJ (1995) Aminoguanidine inhibits both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in rat intestinal microvasculature in vivo. *Eur J Pharmacol* **272**: 169-175.

Laxalt AM, Raho N, Have AT, Lamattina L (2007) Nitric oxide is critical for inducing phosphatidic acid accumulation in xylanase-elicited tomato cells. *J Biol Chem* **282**: 21160-21168.

Liu L, Hausladen A, Zeng M, Que L, Heitman J, Stamler J S (2001) A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**: 490-494.

Liu L, Zeng M., Zhang J, Hanes MA, Ahearn G, McMahon TJ, Dickfeld T, Marshal HE, Que LG, Stamler JS (2004) Essential Roles of S-Nitrosothiols in Vascular Homeostasis and Endotoxic Shock. *Cell* **116**: 617–628,

Mazeyrat F, Mouzeyar S, Courbou I, Badaoui S, Patricia Roeckel-Drevet P, Denis Tourvieille de Labrouhe D, Ledoigt G (1999) Accumulation of Defense Related Transcripts in Sunflower Hypocotyls (*Helianthus annuus* L.) Infected with *Plasmopara halstedii*. *Eur J Plant Pathology* **105**: 333-340

Modolo LV, Cunha FQ, Braga MR, Salgado I (2002) Nitric oxide synthase mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. meridionalis elicitor. *Plant Physiol* **130**: 1288-1297

Modolo LV, Augusto O, Almeida IM, Magalhaes JR, Salgado I (2005) Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. *FEBS Lett.* **579**: 3814-3820.

Mur LA, Carver TL, Prats E (2006) NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. *J Exp Bot* **57**: 489-505.

Mur LA, Santosa IE, Laarhoven LJ, Holton NJ, Harren FJ, Smith AR (2005) Laser photoacoustic detection allows in planta detection of nitric oxide in tobacco following challenge with avirulent and virulent *Pseudomonas syringae* Pathovars. *Plant Physiol* **138**:1247-58.

Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hancock JT (2003) Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol* **159**:11-35.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews* **87**, 315-424

Radwan O, Mouzeyar S, Venisse JS, Nicolas P, Bouzidi MF (2005) Resistance of sunflower to the biotrophic oomycete *Plasmopara halstedii* is associated with a delayed hypersensitive response within the hypocotyls. *J Exp Bot* **56**: 2683-2693.

Requena ME, Egea-Gilabert C, Candela ME (2005) Nitric oxide generation during the interaction with *Phytophthora capsici* of two *Capsicum annuum* varieties showing different degrees of sensitivity. *Physiologia Plantarum* **124**: 50-60.

del Río LA, Corpas FJ, Barroso JB (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* **65**:783–792.

del Río LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Barroso JB (2003) Plant peroxisomes, reactive oxygen metabolism and nitric oxide. *IUBMB Life* 55: 71-81.

del Río LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gómez M, Barroso JB (2002). Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J. Exp.Bot.* **53**: 1255-1272.

del Río LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB (2005) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiol* **141**: 330-335.

Roldán-Serrano A, Luna del Castillo J, Jorrín-Novo J, Fernández-Ocaña A, Gómez-Rodríguez M (2007) Chitinase and peroxidase activities in sunflower hypocotyls: Effects of BTH and inoculation with *Plasmopara halstedii*. *Biologia Plantarum* **51**: 149-152.

Romero-Puertas MC, Delledonne M (2003) Nitric oxide signaling in plant-pathogen interactions. *IUBMB Life* **55**: 579-583.

Sakamoto A, Ueda M, Morikawa H (2002) Arabidopsis glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosogluthathione reductase. *FEBS Letters* **515**: 20-24.

Saito S, Yamamoto-Katou A, Yoshioka H, Doke N, Kawakita K (2006) Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol* **47**: 689-697.

Shapiro AD (2005) Nitric oxide signaling in plants. *Vitamins and Hormones* **72**:339-398.

Singh RJ, Hogg N, Joseph J, Kalyanaraman B (1996a). Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *J Biol Chem* **271**: 18596-18603.

Singh S P, Wishnok JS, Keshive M, Deen W M, Tannenbaum S R (1996b) The chemistry of the S-nitrosogluthathione/glutathione system. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:14428-14433.

Sun J, Steenbergen C, Murphy E (2006) S-nitrosylation: NO-related redox signaling to protect against oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling* **8**: 1693-1705.

Rusterucci C, Espunya MC, Diaz M, Chabannes M, Martinez MC (2007) SNitrosogluthathione reductase affords protection against pathogens in Arabidopsis, both locally and systemically. *Plant Physiol* **143**: 1282-1292.

Thordal-Christensen H (2003) Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 351-357.

Uttenthal LO, Alonso D, Fernández AP, Campbell RO, Moro MA, Leza JC, Lizasoain I, Esteban FJ, Barroso JB, Valderrama R, Pedrosa JA, Peinado MA, Serrano J, Richard A, Bentura ML, Santacana M, Martinez-Murillo R, Rodrigo J (1998) Neuronal and inducible

nitric oxide synthase and nitrotyrosine immunoreactivities in the cerebral cortex of the aging rat. *Microsc. Res. Tech.* **43**: 75–88.

Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Fernández-Ocaña A, Chaki M, Luque F, Gómez-Rodríguez MV, Colmenero-Varea P, del Río LA, Barroso JB (2007) Nitrosative stress in plants. *FEBS Letters*, **581**: 453-461

Wendehenne D, Durner J, Klessig DF (2004) Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 449-55.

Xu MJ, Dong JF, Zhu MY (2005) Nitric oxide mediates the fungal elicitor-induced hypericin production of *Hypericum perforatum* cell suspension cultures through a jasmonic-acid-dependent signal pathway. *Plant Physiol* **139**: 991-998.

Zaninotto F, La Camera S, Polverari A, Delledonne M (2006) Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response. *Plant Physiol* **14**: 379-83

Zeidler D, Zahringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P, Durner J (2004) Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**: 15811-15816.

Zeier J, Delledonne M, Mishina T, Severi E, Sonoda M, Lamb C (2004) Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant-pathogen interactions. *Plant Physiol* **136**: 2875-2886.

Zhang C, Czymmek KJ, Shapiro AD (2003) Nitric oxide does not trigger early programmed cell death events but may contribute to cell-to-cell signaling governing progression of the *Arabidopsis* hypersensitive response. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 962-972.

Figure legends

Figure 1 Phenotype of sunflower seedlings of 9 days old. A, Sunflower line HA89 (susceptible cultivar) not infected and 9 d post infection (dpi) by *Plasmopara halstedii*. B, Sunflower line X55 (resistant cultivar) not infected and 9 dpi *Plasmopara halstedii*.

Figure 2 Accumulation of *Ha-PR5* transcripts in two cultivars of sunflower hypocotyls with different sensitivity to the pathogen *Plasmopara halstedii*. The gene expression was studied

by real time quantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR). Data are mean $\pm$ SEM, at least, three independent RNA samples. *Differences from control values were significant at $P < 0.05$.

Figure 3 Characterization of L-arginine-dependent nitric oxide synthase (NOS) activity in sunflower (resistant cultivar) hypocotyl extracts by ozone chemiluminescence. Reaction mixtures containing hypocotyl extracts were incubated in the absence and presence of L-Arg (1 mM or 0.1 mM), NADPH (1 mM), EGTA (0.5 mM), cofactors (10 μ M FAD, 10 μ M FMN and 10 μ M BH₄), 1mM L-NMMA and 5 mM AG (animal NOS inhibitors). Results are means of samples from at least three different experiments.

Figure 4 Analysis of NOS activity by ozone chemiluminescence in susceptible and resistant sunflower hypocotyls not infected and infected by *Plasmopara halstedii*. Data are mean $\pm$ SEM, at least, three independent RNA samples. *Differences between not infected and infected values were significant at $P < 0.05$. **Differences between control (not infected) values were significant at $P < 0.05$

Figure 5 Representative images illustrating the confocal laser scanning microscopy (CLSM) detection of $\cdot$ NO and S-nitrosothiols (RSNO) in transversal sections of two cultivars of sunflower hypocotyls with different sensitivity to the pathogen *Plasmopara halstedii*. NO was detected with 10 μ M DAF-FM DA and RSNO was detected with the fluorescent Alexa fluor (AL) 488 Hg-link reagent such as it has been described in Material and Methods. Panels A to D correspond to sunflower hypocotyls from the line HA89 (susceptible cultivar to the infection) and panels E to H correspond to sunflower hypocotyls from the line X55 (resistant to the infection). Panels A and B, detection of $\cdot$ NO in susceptible cultivar not infected and infected with *Plasmopara halstedii*, respectively. Panels C and D, detection of RSNO in susceptible cultivar not infected and infected with *Plasmopara halstedii*, respectively. Panels E and F, detection of $\cdot$ NO in resistant cultivar not infected and infected with *Plasmopara halstedii*, respectively. Panels G and H, detection of RSNO in resistant cultivar not infected and infected with *Plasmopara halstedii*, respectively. The bright green fluorescence corresponds to either $\cdot$ NO or RSNO in the corresponding panels. The red color is due to the autofluorescence. Each picture was prepared from 30-40 cross-sections of sunflower hypocotyls which were analyzed by CLSM. X, xylem

Figure 6 Total S-nitrosothiols (RSNOs) determined by ozone chemiluminescence in two cultivars of sunflower hypocotyls not infected and infected with the pathogen *Plasmopara halstedii*. Results are mean of four different experiments $\pm$ SEM. *Differences between not infected and infected values were significant at $P < 0.05$. **Differences between control (not infected) values were significant at $P < 0.05$

Figure 7 Representative images illustrating the confocal laser scanning microscopy detection of GSNO and GSNO reductase in transversal sections of two cultivars of sunflower hypocotyls with different sensitivity to the pathogen *Plasmopara halstedii*. Panels A to F correspond to the line HA89 (susceptible to the infection) and panels G to L correspond to the line X55 (resistant to the infection). The bright green fluorescence corresponds to the detection of GSNO (panels B, E, H and K) and GSNOR (panels C, F, I and L) using specific antibodies with a dilution of 1:2,500 and 1:50, respectively as it was described in Material and Methods. Autofluorescence appears as blue colour in the panels A, D, G and J.

Figure 8 S-Nitrosoglutathione reductase (GSNOR) activity and gene expression in two cultivars of sunflower hypocotyls with different sensitivity to the pathogen *Plasmopara halstedii*. A, GSNOR activity. Results are showed as mean $\pm$ SEM (n=3). *p<0.05. B, Gene expression of *GSNOR* was analysed by real time quantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR). Data are mean $\pm$ SEM, at least, three independent RNA samples.

Figure 9 Representative images illustrating the confocal laser scanning microscopy detection of protein 3-nitrotyrosine (n-Tyr) in transversal sections of sunflower hypocotyls. Protein 3-nitrotyrosine (n-Tyr) was detected using a specific antibody with a dilution 1:300 as described in Materials and Methods. Panels A and B correspond to sunflower line HA89 (susceptible cultivar) not infected and infected with *Plasmopara halstedii*, respectively. Panels C and D correspond to sunflower line X55 (resistant cultivar) not infected and infected with *Plasmopara halstedii*, respectively. The bright green fluorescence corresponds to the detection of n-Tyr. Bar = 200 μ m

Figure 10 Accumulation of *GSNO reductase* and *HaPR5* transcripts in sunflower hypocotyls of the resistant cultivar. Sunflower seedlings were incubated for 3 h with 0 μ M, 0.1 μ M and 1 μ M cPTIO ($\cdot$ NO scavenger). Then, the gene expression of *GSNOR* and *HaPR5* in hypocotyls was studied by real time quantitative reverse transcription PCR (RT-PCR). Data are mean $\pm$ SEM, at least, three independent RNA samples. *Differences from control values were significant at P<0.05.

Supplemental material

Figure 11 Immunoblot of hypocotyls crude extracts probed with purified IgGs of a rabbit polyclonal antibody GSNO reductase (dilution 1:200). Proteins (10 μ g protein) were separated by 10% SDS-PAGE and transferred onto a PVDF membrane.

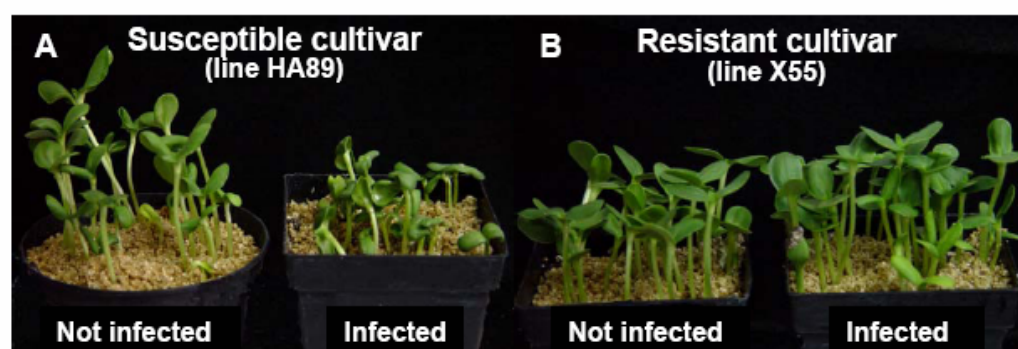


Figure 1

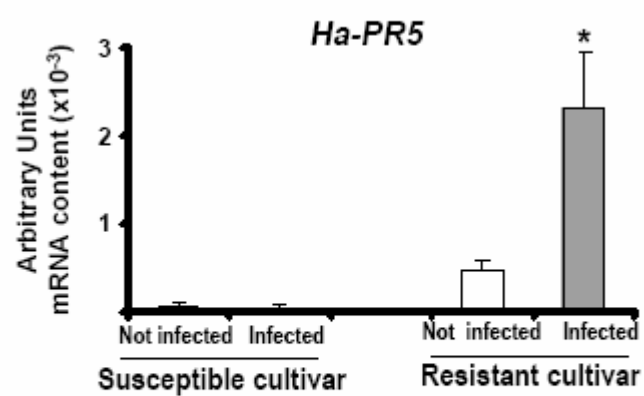


Figure 2

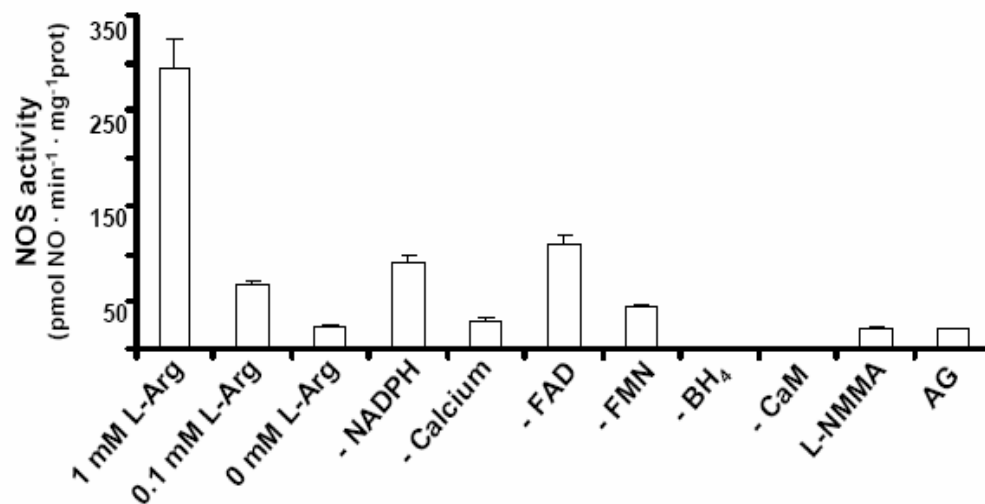


Figure 3

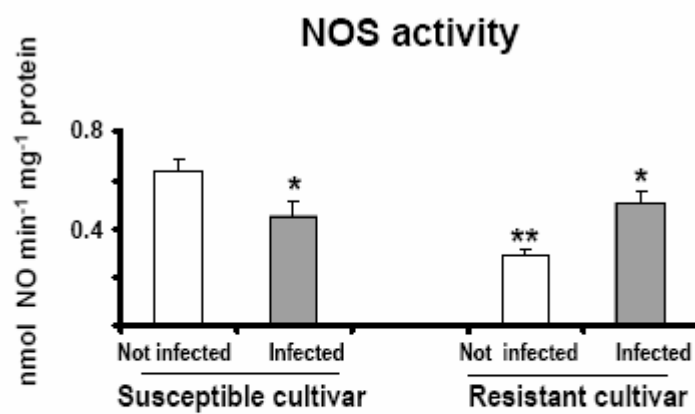


Figure 4

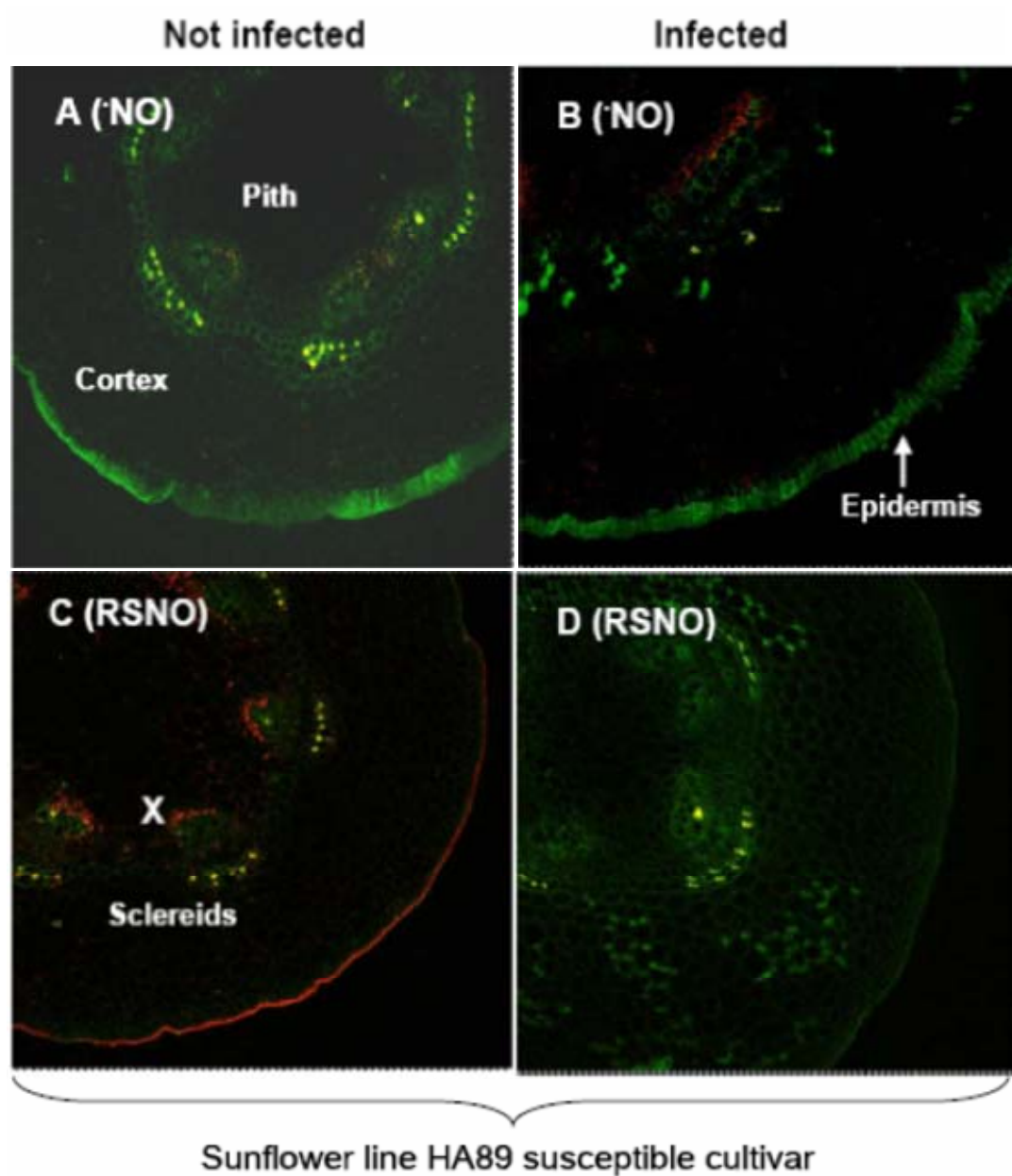


Figure 5

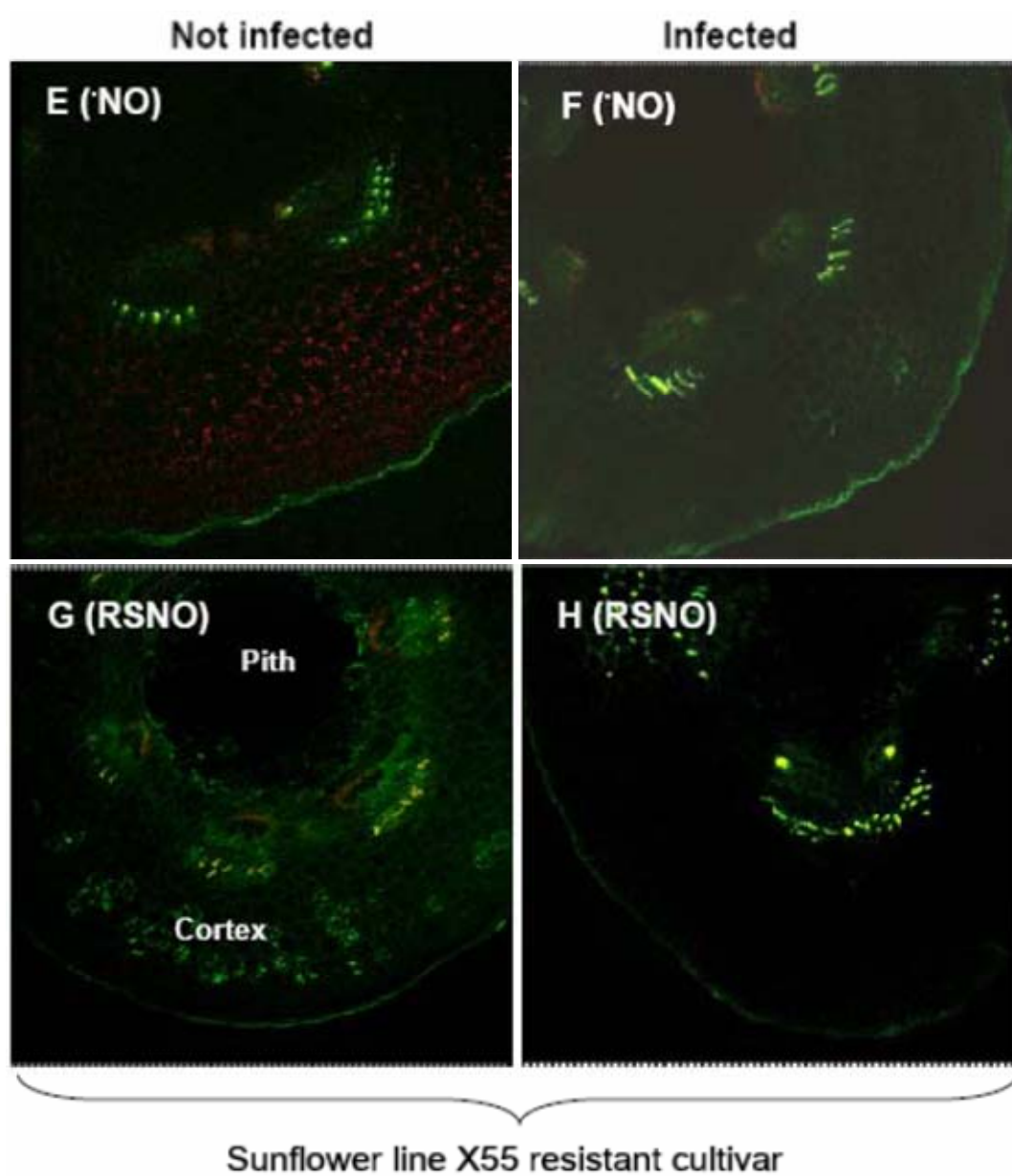


Figure 5

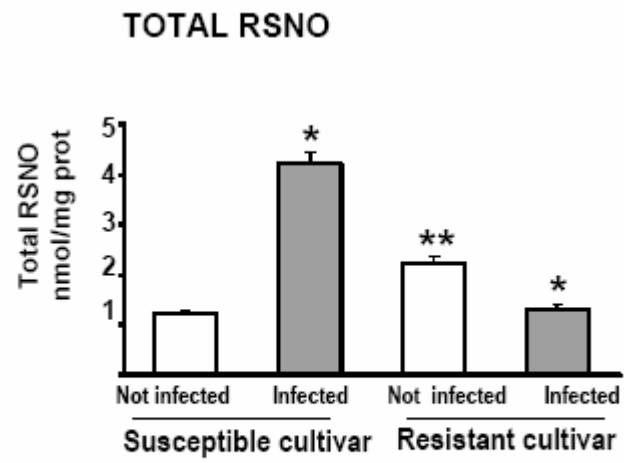


Figure 6

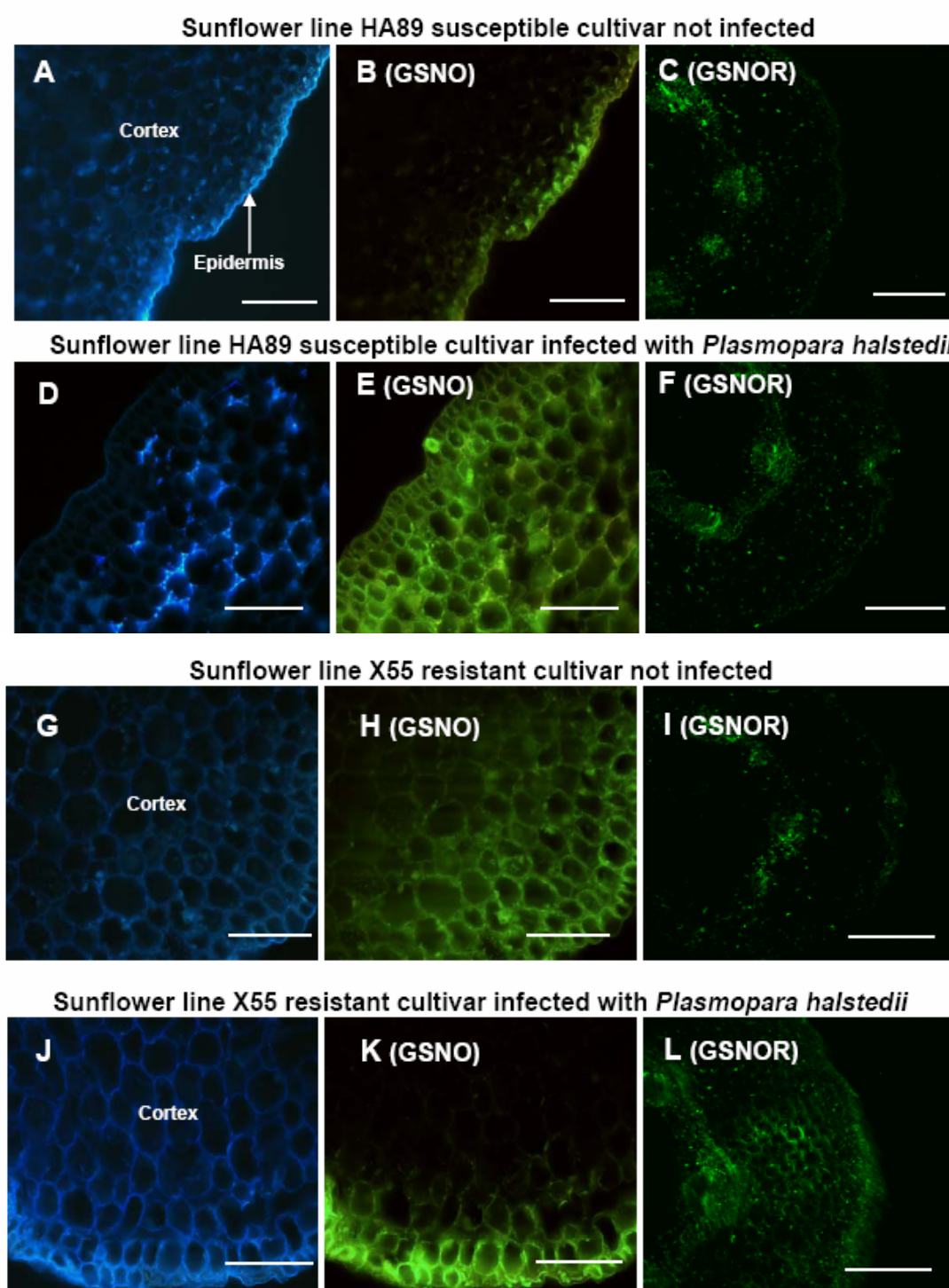
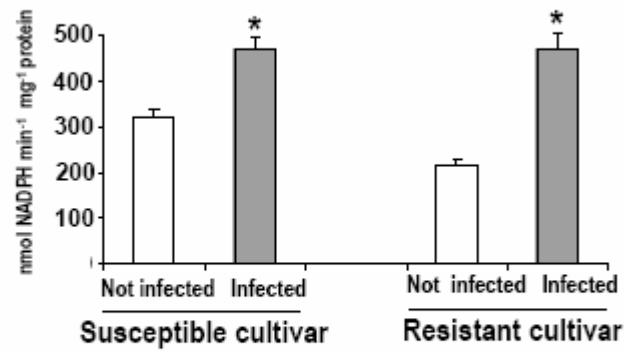


Figure 7

A) GSNOR activity



B) mRNA GSNOR

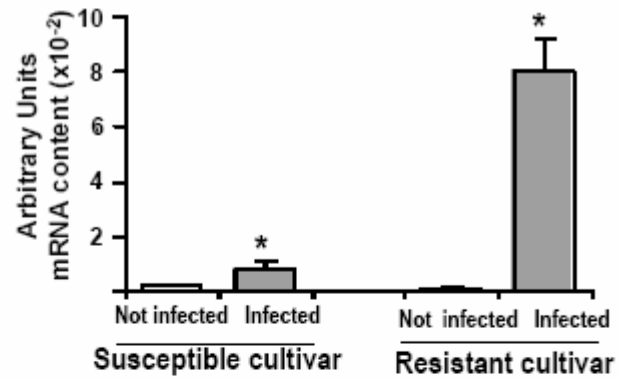
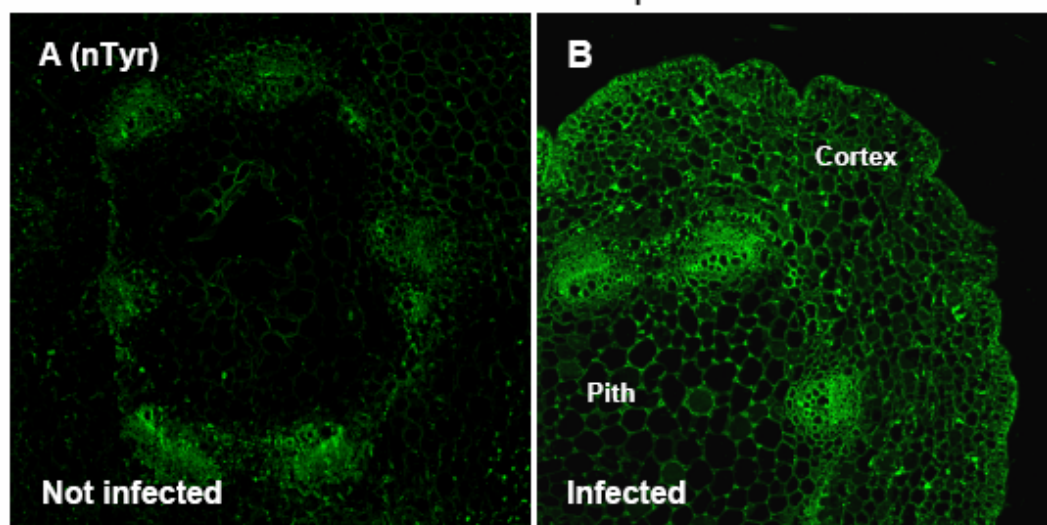


Figure 8

Sunflower line HA89 susceptible cultivar



Sunflower line X55 resistant cultivar

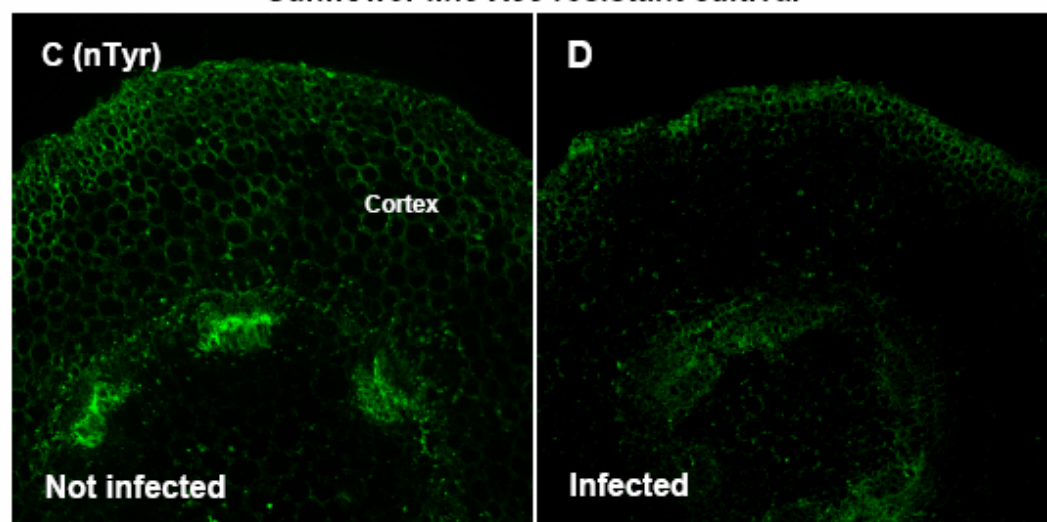


Figure 9

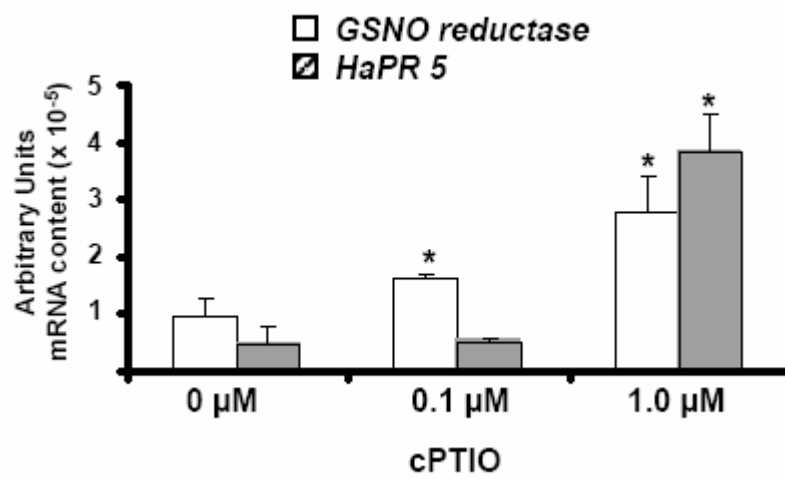


Figure 10

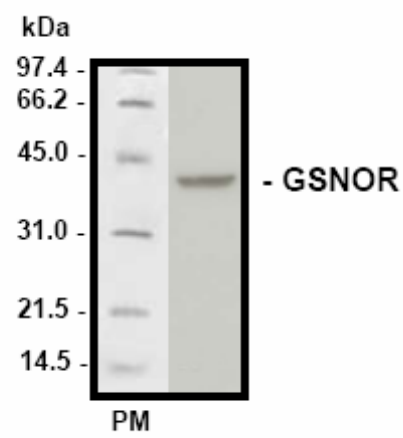


Figure 11

Table I. Oligonucleotides used for the cloning and real-time quantitative RT-PCR analysis of the GSNO reductase. “f” and “r” correspond to forward and reverse oligonucleotides, respectively. For the degenerated oligonucleotides the letters mean: M=A,C; R=A,G; Y=C,T; K=G,T.

Name	Oligonucleotide sequence (5' to 3')	Product size (bp)	GenBank accession no.
cDNA cloning			
GSNOR-f1	ATC ACY TGC AAA GCK GCG GT	302	
GSNOR-r1	GRA ACA CCR GTK CCA AGM AG		
Q-PCR			
GSNOR-f2	TCTTGGTCATGAGGCTGCTGGGATTGTTG	160	AY941250
GSNOR-r2	TGGCTCCCCTAATTTTGCCACACAGGTTG		
Ha-PR5-f	ACGCTTTGAACCAGTTCAACAATCTTG	241	AF364864
Ha-PR5-r	TAAATCAGTTGGTCCACAATTTCCAGA		
RNA 18S-f1	TTT GAT GGT ATC T TGC TAC TCG GAT ACC	273	AF107577
RNA 18S-r1	CTC TCC GGA ATC GAA CCC TAA TTC TCC		

Table II. Summary of the main effects on RNS in susceptible and resistant cultivars of sunflower hypocotyls after 9 dpi with the pathogen *Plasmopara halstedii*. Dpi, days post infection.

Parameters	Susceptible Cultivar (compatible interaction)		Resistant Cultivar (incompatible interaction)	
	Control	9 dpi	Control	9dpi
<i>Ha-PR5</i> (Arbitrary Units x 10 ⁻⁵)	5	4	47	230 (increase 5-folds)
NOS activity ($\mu\text{mol NO mg}^{-1} \text{ protein} \cdot \text{min}^{-1}$)	0.634	0.451 (decrease 1.4-folds)	0.294	0.502 (increase 1.7-folds)
RSNOs content ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ protein}$)	1.2	4.22 (increase 3.5-folds)	2.24	1.32 (decrease 1.7-folds)
GSNOR activity ($\mu\text{mol NADPH mg}^{-1} \text{ protein} \cdot \text{min}^{-1}$)	322	470 (increase 1.4-folds)	216	470 (increase 2.2-folds)
GSNOR mRNA (Arbitrary Units x 10 ⁻³)	0.2	1.0 (increase 5-folds)	0.04	7.2 (increase 180-foldss)
Cellular localizations by CLSM				
NO	Epidermal cells and vascular tissue	Similar to control	Epidermal cells and vascular tissue	Similar to control
RSNOs	Low fluorescence in epidermal and cortex cells	Increase in all cell types	Epidermal and cortex cells	Decrease fluorescence in epidermal and cortex cells
GSNO	Epidermal cells	Increase content in all cell types	Epidermal and cortex cells	Decrease total fluorescence with a redistribution in different cell types (increase content in epidermal cells and disappear in cortex cells)
GSNOR protein	Cortex cells	Similar to control	Cortex cells	Increase in epidermal and cortex cells
Protein tyrosine nitration (nTyr)	Epidermal and cortex cells	Increase labelling in epidermal and cortex cells	Epidermal and cortex cells	Similar to control

Currículum Vitae



Comisión Interministerial de Ciencia y
Tecnología

Curriculum vitae

Nombre: MOUNIRA CHAKI

Fecha: Noviembre de 2007

Plan Nacional de I+D+I (2000-2003)

Idiomas (R = regular, B = bien, C = correctamente)

Idioma	Habla	Lee	Escribe
Árabe	C	C	C
Francés	C	C	C
Español	C	C	C
Inglés	R	B	B

Participación en Proyectos de I+D financiados en Convocatorias públicas.
(nacionales y/o internacionales)

Nº1

Título del proyecto: "Caracterización molecular de los principales sistemas productores de NADPH en cultivos *in vitro* de olivo (*olea europaea* L. cv picual). Implicaciones en el fenómeno de estrés oxidativo en condiciones de salinidad"

Entidad financiadora: Universidad de Jaén

Entidades participantes:

Duración, desde: 2002 hasta: 2004 Cuantía de la subvención: 1.850.000 pts

Investigador responsable: Dr. Juan Bautista Barroso Albarracín

Número de investigadores participantes:

Nº2

Título del proyecto: Acción Coordinada: "Implicaciones de las especies de nitrógeno reactivo en procesos de estrés oxidativo en plantas" (Acción coordinada con el grupo del Dr. L.A. del Río Legazpi CVI 192 de la EEZ-CSIC- Granada)

Entidad financiadora: Junta de Andalucía

Duración, desde: 2002 hasta: 2004 Cuantía de la subvención: 8634 €

Investigador responsable: Dr. Juan Bautista Barroso Albarracín

Número de investigadores participantes: 17

Nº3

Título del proyecto: Grupo de Investigación "Bioquímica y señalización celular" (CVI 286) del Plan Andaluz de Investigación (PAI)

Entidad financiadora: Junta de Andalucía

Duración, desde: 2003 hasta: actualidad Cuantía de la subvención:

Investigador responsable: Dr. Juan Bautista Barroso Albarracín

Número de investigadores participantes: 7

Nº4

Título del proyecto: "Función de las especies reactivas de nitrógeno (RNS) en la modulación de sistemas antioxidantes en respuesta al estrés abiótico en plantas"

Entidad financiadora: DGES, nº AGL2003-05524

Duración, desde: 2004 hasta: Noviembre 2006 Cuantía de la subvención: 87.000 €

Investigador responsable: Dr. Juan Bautista Barroso Albarracín

Número de investigadores participantes: 5

Nº5

Título del proyecto: "Análisis y caracterización funcional de dianas celulares de especies de nitrógeno reactivo (RNS) durante la germinación, desarrollo y estrés abiótico en plantas"

Entidad financiadora: DGI, BIO2006-14949-C02-00 Plan Nacional I+D+I (2006-2008)

Duración desde: 2006 hasta: 2008 Cuantía de la subvención: 225.060 €

Número de investigadores participantes: 11

Investigador responsable (Coordinador): Dr. Juan Bautista Barroso Albarracín

Nº6

Título del proyecto: "Caracterización y análisis funcional de las dianas celulares endógenas de óxido nítrico y especies de nitrógeno reactivo (RNS) durante la respuesta de la planta frente a procesos de estrés abiótico"

Entidad financiadora: DGI, BIO2006-14949-C02-01 Plan Nacional I+D+I (2006-2008)

Duración desde: 2006 hasta: 2008 Cuantía de la subvención: 121.000 €

Número de investigadores participantes: 6

Investigador responsable subproyecto: Dr. Juan Bautista Barroso Albarracín

Nº7

Título del proyecto: "Análisis funcional del óxido nítrico en la germinación de semillas y desarrollo de plantas"

Entidad financiadora: DGI, BIO2006-14949-C02-02 Plan Nacional I +D+ I (2006-2008)

Duración, desde: 2006 hasta: 2008 Cuantía de la subvención: 104.060€

Investigador responsable: Dr. Francisco Javier Corpas Aguirre

Número de investigadores participantes: 5

Nº8

Título del proyecto: "Aproximaciones biotecnológicas al incremento de la tolerancia de plantas a estreses abióticos mediante sistemas antioxidantes y especies de oxígeno y nitrógeno reactivo (ROS y RNS)"

Entidad financiadora: Junta de Andalucía Incentivos a proyectos de investigación de excelencia en equipos de investigación y a la actividad interanual de los grupos de investigación y desarrollo tecnológico andaluces.

Duración, desde: 2006 hasta: 2008 Cuantía de la subvención: 220.000 €

Investigador responsable: Dr. Luís Alfonso del Río Legazpi

Número de investigadores participantes: 12

Nº9

Título del proyecto: "Identificación, caracterización y determinación de compuestos orgánicos de interés biológico, medioambiental y agroalimentario mediante cromatografía-espectrometría de masa avanzada"

Entidad financiadora: Junta de Andalucía Incentivos a proyectos de investigación de excelencia en equipos de investigación y a la actividad interanual de los grupos de investigación y desarrollo tecnológico andaluces.

Duración, desde: 2006 hasta: 2008 Cuantía de la subvención: 240.227.62 €

Investigador responsable: Dr. Antonio Molina

Número de investigadores participantes:

Nº10

Título del proyecto: "Análisis y propiedades biológicas de los lípidos nitrados en el aceite de oliva"

Entidad financiadora: Fundación CEAS (Centro de excelencia del Aceite de Oliva y Salud)

Entidades participantes: Universidad de Jaén, Universidad de la Republica de Montevideo, Uruguay (Dr. Rafael Radi)

Duración, desde: 2007 hasta: 2008 Cuantía de la subvención: 45.000 €
(Uruguay)
Investigador responsable: Dr. Juan Bautista Barroso Albarracín
Número de investigadores participantes: 12

Nº11

Título del proyecto: "Actividad Interanual Grupo CVI 286"
Entidad financiadora: Junta de Andalucía
Duración, desde: 2007 hasta: 2008 Cuantía de la subvención: 10550 €
Investigador responsable: Dr. Juan Bautista Barroso Albarracín
Número de investigadores participantes:

Nº12

Título del proyecto: "Red de estrés abiótico en plantas"
Duración, desde: 2006 hasta: Actualidad
Investigador responsable:
Número de investigadores participantes: Grupo CVI 286

Nº13

Título del proyecto: Nitric Oxide in Plant Adaptation –NOPA (EU network "NO signaling in adaptation to stress")
Entidad financiadora: EU VII Programa Marco
Entidades participantes: Proyecto Coordinado (Francia, Italia, Alemania, España)
Duración, desde: 2007 hasta: 2010 Cuantía de la subvención:
Investigador responsable:
Número de investigadores participantes: Grupo CVI 286

Publicaciones o Documentos Científico-Técnicos

(CLAVE: L = libro completo, CL = capítulo de libro, A = artículo, R = "review", E = editor, S = Documento Científico-Técnico restringido.)

Nº1

Autores (p.o. de firma): Valderrama R., Carreras A., Gómez Rodríguez M.V., **Chaki M.**, Fernández-Ocaña A., Pedrajas J.R., Corpas F.J., Sandalio L.M., Esteban F.J., Barceló-Muñoz A., del Río L.A., Barroso J.B.
Título: Caracterización de marcadores moleculares del estatus antioxidante celular en cultivos de olivo sometido a estrés abiótico.
Ref. revista : Libro
Clave: CL Volumen: Páginas, inicial: 127 final: 179 Fecha: 2004
Editorial (si libro):
Lugar de publicación: Universidad de Jaén

Nº2

Autores (p.o. de firma): **Chaki M.**, Carreras A., Valderrama R., Esteban F.J., Gómez Rodríguez M.V., Pedrajas J.R., Fernández-Ocaña A., Barroso J.B.
Título: Estudio de las especies de nitrógeno reactivo en plantas durante el proceso de estrés biótico en la interacción girasol-mildiu.
Ref. ☐ revista: *Revista electrónica* ☐ Libro
Clave: R Volumen: Páginas, inicial: 1 final: 9 Fecha: 2006
Editorial (si libro):
Lugar de publicación: Servicio de publicación de la universidad de Jaén (España).

Nº3

Autores (p.o. de firma): Valderrama R., Corpas F.J., Carreras A., Gómez Rodríguez M.V., **Chaki M.**, Pedrajas J.R., Fernández-Ocaña A., del Río L.A., Barroso J.B.

Título: The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants

Ref. ☐ revista: *Plant Cell and Environment* ☐ Libro

Clave: A Volumen: 29 Páginas, inicial: 1449 final: 1459 Fecha: 2006

Editorial (si libro):

Lugar de publicación: Inglaterra

Nº4

Autores (p.o. de firma): Barroso J.B., Corpas F.J., Carreras A., Rodríguez-Serrano M., Esteban F.J., Fernández-Ocaña A., **Chaki M.**, Romero Puertas M.C., Valderrama R., Sandalio L.M., del Río L.A.

Título: Localization of S-nitrosoglutathione (GSNO) and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress.

Ref. ☐ revista: *Journal of Experimental Botany* ☐ Libro

Clave: A Volumen: 57 Páginas, inicial: 1785 final: 1793 Fecha: 2006

Editorial (si libro):

Lugar de publicación: Inglaterra

Nº5

Autores (p.o. de firma): Corpas F.J., Fernández-Ocaña A., Carreras A., Valderrama R., Luque F., Esteban F.J., Rodríguez-Serrano M., **Chaki M.**, Pedrajas J.R., Sandalio L.M., del Río L.A., Barroso J.B.

Título: The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves.

Ref. ☐ revista: *Plant Cell Physiology* ☐ Libro

Clave: A Volumen: 47 Páginas, inicial: 984 final: 994 Fecha: 2006

Editorial (si libro):

Lugar de publicación: Japón

Nº6

Autores (p.o. de firma): Valderrama R., Corpas F.J., Carreras A., Fernández-Ocaña A., **Chaki M.**, Luque F., Gómez Rodríguez M.V., Colmenero-Varea P., del Río L.A., Barroso J.B.

Título: Nitrosative stress in plants.

Ref. ☐ revista: FEBS Letters ☐ Libro

Clave: A Volumen: 581 Páginas, inicial: 453 final: 461 Fecha: 2007

Editorial (si libro):

Lugar de publicación: Holanda

Nº7

Autores (p.o. de firma): Corpas F.J., Carreras A., Valderrama R., **Chaki M.**, Palma J.M., del Río L.A., Barroso J.B.

Título: Reactive Nitrogen Species and Nitrosative Stress in Plants.

Ref. ☐ revista: *Plant Stress* ☐ Libro

Clave: R Volumen: 1 (1) Páginas, inicial: 37 final: 41 Fecha: 2007

Editorial (si libro):

Lugar de publicación: Japón

Nº8

Autores (p.o. de firma): Corpas F.J., Carreras A., Esteban F.J., **Chaki M.**, Valderrama R., del Río L.A., Barroso J.B.

Título: Localization of S-Nitrosothiols and assay of Nitric Oxide Synthase and S-Nitrosogluthathione Reductase Activity in Plants.

Ref. ☐ revista: *Methods in enzymology* en prensa (10.1016/S0076-6879(07)37028-6)

☐ Libro

Clave: A Volumen: 437 Páginas, inicial: final: Fecha: 2008

Editorial (si libro):

Lugar de publicación: Estados Unidos

Nº9

Autores (p.o. de firma): Corpas F.J., Carreras A., Palma J.M., **Chaki M.**, Valderrama R., del Río L.A., Barroso J.B.

Título: Arginine-dependent nitric oxide synthase (NOS) and S-nitrosogluthathione reductase activities (GSNOR) in pea plants under stress conditions. Low temperature triggers nitrosative stress.

Ref. ☐ revista: *Plant Physiology* (Sometido a publicación)

☐ Libro

Clave: A Volumen: Páginas, inicial: final: Fecha: 2007

Editorial (si libro):

Lugar de publicación: Estados Unidos

Nº10

Autores (p.o. de firma): **Chaki M.**, Carreras A., Valderrama R., Esteban F.J., Fernández-Ocaña A., Gómez Rodríguez M.V., Luque F., Corpas F.J., Barroso J.B.

Título: S-Nitrosogluthathione protects against nitrosative stress in the plant-pathogen interaction.

Ref. ☐ revista: *Plant Physiology* (Sometido a publicación)

☐ Libro

Clave: A Volumen: Páginas, inicial: final: Fecha: 2007

Editorial (si libro):

Lugar de publicación: Estados Unidos

Nº11

Autores (p.o. de firma): Valderrama R., Corpas F.J., Carreras A., Fernández-Ocaña A., Gómez Rodríguez M.V., **Chaki M.**, Luque F., Colmenero-Varea P., del Río L.A., Pedrajas J.R., Barroso J.B.

Título: Implicación de las especies de nitrógeno reactivo en los procesos de defensa antioxidante en plántulas de olivo.

Ref. ☐ revista ☐ Libro

Clave: CL Volumen: Páginas, inicial: final: Fecha: 2007

Editorial (si libro):

Lugar de publicación: Universidad de Jaén

Nuevas secuencias de nucleótidos publicadas en el Gen Bank

Nº1

Autores: Rodríguez-Serrano M., Fernández-Ocaña A., Gómez-Rodríguez M.V., **Chaki M.**, Luque F., Valderrama R., Carreras A., Barroso J.B., Sandalio L.M., del Río L.A., Corpas F.J.

Definición: *Helianthus annuus* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase mRNA, partial cds. (AY941250)

Título: Differential expression of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase in response to biotic stress induced during the interaction sunflower-downy mildew.

Referencia: Bases 1 hasta 302.

Ref. ☐ revista: Sometido a publicación

☐ Libro

Clave: Volumen: Páginas, inicial: final: Fecha: 2005
Lugar de publicación:

Nº2

Autores: Fernández-Ocaña A., **Chaki M.**, Colmenero-Varea P., Corpas F.J., Carreras A., Gómez Rodríguez M.V., del Río L.A., Barroso J.B., Luque F.

Definición: *Helianthus annuus* Mn-superoxide dismutase I mRNA, partial cds.(DQ812551)

Título: Two new isoforms of Mn-superoxide dismutase in sunflower hypocotyls.

Referencia: Bases 1 hasta 391.

Ref. ☐ revista: Sometido a publicación ☐ Libro

Clave: Volumen: Páginas, inicial: final: Fecha: 2006

Lugar de publicación:

Nº3

Autores: Fernández-Ocaña A., **Chaki M.**, Colmenero-Varea P., Corpas F.J., Carreras A., Gómez Rodríguez M.V., del Río L.A., Barroso J.B., Luque F.

Definición: *Helianthus annuus* Mn-superoxide dismutase I mRNA, partial cds.(DQ812552)

Título: Two new isoforms of Mn-superoxide dismutase in sunflower hypocotyls.

Referencia: Bases 1 hasta 391.

Ref. ☐ revista: Sometido a publicación ☐ Libro

Clave: Volumen: Páginas, inicial: final: Fecha: 2006

Lugar de publicación:

Nº4

Autores: Colmenero-Varea P., Fernández-Ocaña A., Corpas F.J., Carreras A., **Chaki M.**, del Río L.A., Barroso J.B., Luque F.

Definición: *Pisum sativum* glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH1) mRNA, complete cds.(DQ811790)

Título: Biochemical and molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase in pea plants.

Referencia: Bases 1 hasta 1817.

Ref. ☐ revista: Sometido a publicación ☐ Libro

Clave: Volumen: Páginas, inicial: final: Fecha: 2006

Lugar de publicación:

Participación en contratos de I+D de especial relevancia con Empresas y/o Administraciones

(nacionales y/o internacionales)

Título del contrato/proyecto: "Diseño de bioformulaciones eficientes de Trichoderma frente a la verticilosis del olivo"

Tipo de contrato: Titulada superior

Empresa/Administración financiadora: NUTESCA, S.A., Orden de incentivos al Fomento de la Innovación y desarrollo

Empresarial. Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía.

Entidades participantes: Universidad de Jaén, Universidad de Sevilla, IAS de Córdoba y CITOLIVA.

Duración, desde: 2005 hasta: 2008

Investigador responsable: Dr. Juan Bautista Barroso Albarracín

Número de investigadores participantes: 15

PRECIO TOTAL DEL PROYECTO: 324.129,64 €

Estancias en Centros extranjeros (Estancias continuadas superiores a un mes)

CLAVE: D = doctorado, P = postdoctoral, I = invitado, C = contratado, O = otras
(especificar).

Centro: Université de Nice - Sophia Antipolis (INRA)
Localidad: Niza País Francia Fecha: 2006 Duración (semanas): 13
Tema: Identification et caractérisation de NADPH oxydases lors de la symbiose (Medicago
truncatula / Sinorhizobium meliloti)
Clave: D

Contribuciones a Congresos

Nº1

Autores: Carreras A., **Chaki M.**, Corpas F.J., Valderrama R., Gómez-Rodríguez M.V., León A.M., Esteban F.J., Sandalio L.M., Pedrajas J.R., Fernández-Ocaña A.M., del Río L.A., Barroso J.B.

Título: Implicación de las especies de nitrógeno reactivo durante el proceso de estrés biótico en la interacción girasol-mildiu.

Tipo de participación: Póster

Congreso: XXVI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.

Publicación: Libro de resúmenes del congreso

Lugar celebración: A Coruña

Fecha: Septiembre de 2003

Nº2

Autores: Carreras A., **Chaki M.**, Corpas F.J., Valderrama R., Gómez-Rodríguez M.V., León A.M., Esteban F.J., Sandalio L.M., Pedrajas J.R., Fernández-Ocaña A.M., del Río L.A., Barroso J.B.

Título: Implication of reactive nitrogen species in the biotic stress of sunflower plants by downy mildew.

Tipo de participación: Póster

Congreso: XII Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International

Publicación: Libro de resúmenes del congreso

Lugar celebración: Buenos Aires (Argentina)

Fecha: Mayo de 2004

Nº3

Autores: Valderrama R., Carreras A., **Chaki M.**, Corpas F.J., Gómez-Rodríguez M.V., Esteban F.J., Sandalio L.M., Pedrajas J.R., Fernández-Ocaña A.M., del Río L.A., Barroso J.B.

Título: Modulación de sistemas antioxidantes durante el estrés abiótico en plántulas de olivo (*Olea europea* L.) cultivadas *in vitro*.

Tipo de participación: Comunicación oral

Congreso: XXVII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.

Publicación: Libro de resúmenes del congreso

Lugar celebración: Lleida

Fecha: Septiembre de 2004

Nº4

Autores: Valderrama R., Carreras A., Gómez-Rodríguez M.V., Corpas F.J., Fernández-Ocaña A.M., Luque F., **Chaki M.**, Pedrajas J.R., Córdoba E., Barroso J. B.

Título: La salinidad genera un estrés oxidativo y nitrosativo que afecta al crecimiento y productividad del olivo.

Congreso: XII Simposium Científico –Técnico EXPOLIVA.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Publicación: Libro de resúmenes del congreso

Lugar celebración: Jaén

Fecha: Mayo de 2005

Nº5

Autores: Valderrama R., Fernández-Ocaña A.M., Carreras A., Corpas F.J., Luque F., Rodríguez-Serrano M., **Chaki M.**, Sandalio L.M., del Río L.A., Barroso J.B.

Título: El estrés por salinidad genera un desequilibrio en la expresión de las diferentes isoformas de la superóxido dismutasa en hojas de olivo cultivadas *in vitro*.

Congreso: XXVIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.

Publicación: Libro de resúmenes del congreso

Lugar celebración: Zaragoza

Fecha: Septiembre de 2005

Nº6

Autores: Valderrama R., Corpas F.J., Carreras A., Luque F., Fernández-Ocaña A.M., **Chaki M.**, Gómez-Rodríguez M.V., Rodríguez-Serrano M., Pedrajas J.R., del Río L.A., Barroso J.B.

Título: Salinity induces nitrosative and oxidative stress in olive plants

Congreso: Association of Applied Biologists

Tipo de participación: Comunicación oral

Publicación: Libro de resúmenes del congreso

Lugar celebración: Bristol (Inglaterra)

Fecha: Diciembre de 2005

Nº7

Autores: del Río L.A., Barroso J.B., Carreras A., Rodríguez-Serrano M., Esteban F.J., Fernández-Ocaña A.M., **Chaki M.**, Romero-Puertas M.C., Valderrama R., Sandalio L.M., Corpas F.J.

Título: S-Nitrosogluthathione reductase of pea leaves: properties and expression under abiotic stress.

Congreso: Association of Applied Biologists

Tipo de participación: Comunicación oral.

Publicación: Libro de resúmenes del congreso

Lugar celebración: Bristol (Inglaterra)

Fecha: Diciembre de 2005

Nº8

Autores: Corpas F.J., Barroso J.B., Valderrama R., **Chaki M.**, Colmenero-Varea P., Carreras A., Bacarizo S., del Río L.A., Palma J.M.

Título: Nitric Oxide in pepper fruit ripening

Congreso: Association of Applied Biologists

Tipo de participación: Póster

Publicación: Libro de resúmenes del congreso

Lugar celebración: Bristol (Inglaterra)

Fecha: Diciembre de 2005

Nº9

Autores: Carreras A., Corpas F.J., Fernández-Ocaña A.M., Valderrama R., Luque F., **Chaki M.**, Gómez-Rodríguez M.V., Pedrajas J.R., Sandalio L.M., del Río L.A., Barroso J.B.

Título: Differential gene expression of superoxide dismutase isoforms in cells of olive leaves demonstrated by Laser Capture Microdissection.

Congreso: Association of Applied Biologists
Tipo de participación: Póster
Publicación: Libro de resúmenes del congreso
Lugar celebración: Bristol (Inglaterra)

Fecha: Diciembre de 2005

Nº10

Autores: **Chaki M.**, Carreras A., Corpas F.J., Esteban F.J., Fernández-Ocaña A.M., Gómez Rodríguez M.V., Valderrama R., Luque F., Colmenero-Varea P., Pedrajas J.R., Barroso J. B.
Título: Estrés biótico y abiótico en girasol: Implicación de la S-Nitrosoglutation reductasa (GSNOR).

Congreso: VIII Reunión de Biología Molecular de Plantas.

Tipo de participación: Póster

Publicación: Libro de resúmenes del congreso

Lugar celebración: Pamplona

Fecha: Junio de 2006

Nº11

Autores: Colmenero-Varea P., Fernández-Ocaña A.M., Luque F., Corpas F.J., **Chaki M.**, Carreras A., Valderrama R., Gómez-Rodríguez M.V., del Río L.A., Barroso J.B.

Título: Expresión de los sistemas antioxidantes de hojas de guisante en respuesta al estrés salino

Congreso: VIII Reunión de Biología Molecular de Plantas

Tipo de participación: Póster

Publicación: Libro de resúmenes del congreso

Lugar celebración: Pamplona

Fecha: Junio de 2006

Nº12

Autores: Colmenero-Varea P., Fernández-Ocaña A.M., Luque F., Corpas F.J., **Chaki M.**, Carreras A., Valderrama R., Gómez-Rodríguez M.V., del Río L.A., Barroso J.B.

Título: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) de hojas de guisante: clonación y expresión en condiciones de salinidad extrema.

Congreso: VIII Reunión de Biología Molecular de Plantas

Tipo de participación: Póster

Publicación: Libro de resúmenes del congreso

Lugar celebración: Pamplona

Fecha: Junio de 2006

Nº13

Autores: **Chaki M.**, Carreras A., Corpas F.J., Fernández-Ocaña A.M., Gómez-Rodríguez M.V., Valderrama R., Esteban F.J., Luque F., Pedrajas J.R., Begara J.C., Barroso J.B.

Título: Función de la S-nitrosoglutation reductasa durante el proceso de estrés biótico en girasol.

Congreso: VIII Reunión del grupo español de radicales libres.

Tipo de participación: Póster

Publicación: Libro de resúmenes del congreso

Lugar celebración: Valencia

Fecha: Febrero de 2007

Nº14

Autores: Valderrama R., Corpas F.J., Carreras A., Fernández-Ocaña A.M., **Chaki M.**, Luque F., Gómez-Rodríguez M.V., Colmenero-Varea P., Begara J.C., del Río L.A., Barroso J.B.

Título: Estrés nitrosativo en plantas.

Congreso: VIII Reunión del grupo español de radicales libres.

Tipo de participación: Póster

Publicación: Libro de resúmenes del congreso

Lugar celebración: Valencia

Fecha: Febrero de 2007

Nº15

Autores: Colmenero-Varea P., Corpas F.J., Fernández-Ocaña A.M., Carreras A., Luque F., **Chaki M.**, Valderrama R., Gómez-Rodríguez M.V., del Río L.A., Barroso J.B.

Título: Análisis de la expresión de sistemas antioxidantes en plantas de guisante sometidas a estrés abiótico por salinidad.

Congreso: VIII Reunión del grupo español de radicales libres.

Tipo de participación: Póster

Publicación: Libro de resúmenes del congreso.

Lugar celebración: Valencia

Fecha: Febrero de 2007

Nº16

Autores: Valderrama R., Corpas F.J., Carreras A., Fernández-Ocaña A.M., **Chaki M.**, Luque F., Gómez-Rodríguez M.V., Colmenero-Varea P., Begara J.C., del Río L.A., Barroso J.B.

Título: Salinidad y estrés nitrosativo en plantas de olivo cultivadas *in vitro*.

Congreso: XIII Symposium Científico Técnico de EXPOLIVA 2007. Feria Internacional del aceite de oliva e industrias afines.

Tipo de participación: Comunicación.

Publicación: Libro de resúmenes del Congreso.

Lugar celebración: Jaén

Fecha: Mayo de 2007

Nº17

Autores: **Chaki M.**, Fernández-Ocaña A.M., Carreras A., Luque F., Gómez-Rodríguez M.V., Valderrama R., Colmenero-Varea P., Pedrajas J.R., Begara J.C., Corpas F.J., Barroso J.B.

Título: Induction of nitrosothiols content as mechanism of response against abiotic stress conditions in sunflower hypocotyls.

Congreso: A SFFR Plant Oxygen Group meeting.

Tipo de participación: Póster

Publicación: Libro de resúmenes del Congreso.

Lugar celebración: Gante (Bélgica)

Fecha: Septiembre de 2007

Nº18

Autores: Corpas F.J., Fernández-Ocaña A.M., Carreras A., **Chaki M.**, Luque F., Valderrama R., Gómez-Rodríguez M.V., del Río L.A., Barroso J.B.

Título: S-nitrosogluthathione reductase is differentially expressed in xylem, epidermal and spongy mesophyll cells of Arabidopsis leaves.

Congreso: A SFFR Plant Oxygen Group meeting.

Tipo de participación: Póster

Publicación: Libro de resúmenes del Congreso.

Lugar celebración: Gante (Bélgica)

Fecha: Septiembre de 2007

Nº19

Autores: Fernández-Ocaña A.M., **Chaki M.**, Luque F., Gómez-Rodríguez M.V., Pedrajas J.R., Carreras A., Valderrama R., Corpas F.J., Barroso J.B.

Título: Identification of two new genes of manganese-superoxide dismutase in sunflower hypocotyls and functional analysis under biotic and abiotic stress conditions.

Congreso: 6 Plant Genomics European Meetings

Tipo de participación: Póster

Publicación: Libro de resúmenes del Congreso.

Lugar celebración: Tenerife

Fecha: Octubre de 2007

Nº20

Autores: Corpas F.J., Fernández-Ocaña A.M., Carreras A., **Chaki M.**, Luque F., Valderrama R., Gómez-Rodríguez M.V., del Río L.A., Barroso J.B.

Título: Study of cell-type specific expression of proteins in plants using a combination of laser capture micro-dissection and real time quantitative RT-PCR.

Congreso: 6 Plant Genomics European Meetings

Tipo de participación: Póster

Publicación: Libro de resúmenes del Congreso.

Lugar celebración: Tenerife

Fecha: Octubre de 2007

Otros méritos o aclaraciones que se desee hacer constar

(utilice únicamente el espacio equivalente a una página).

1997/1998

Curso de español con duración de tres meses (Marruecos).

1999/2000

Curso de procesamiento de textos con duración de seis meses (Marruecos).

1999/2000

Memorias de fin de estudios universitarios:

- Conservación post-cosecha de patata (Universidad Mohamed Primero, Marruecos).
- Relación sol-clima-vegetación a nivel de Marruecos Oriental y del Atlas Medio (Universidad Mohamed Primero, Marruecos).

2000/2001

Curso de español, centro público para la educación de adultos (Martos, España).

2001/2002

Cursos del periodo de docencia del tercer ciclo en la programa de doctorado "Biología Molecular y Celular " (Universidad de Jaén)

- Cultivo *in vitro* de olivo (Fundamental, 3 créditos).
- Implicaciones del óxido nítrico en los procesos de defensa celular (Fundamental, 3 créditos).
- Metabolismo y nutrición (Fundamental, 3 créditos).
- Ciclo celular, apoptosis y cáncer (Fundamental, 3 créditos).
- Regulación de la temperatura corporal como proceso homeostático. Bases fisiológicas y moleculares (Fundamental, 3 créditos).
- Papel funcional de las enzimas proteolíticas (Fundamental, 4 créditos).
- Purificación de proteínas (Metodológico, 3 créditos).

2002/2003

Curso de agentes para la salud con duración de 30 horas (Hospital Virgen de la Capilla, Jaén).

Curso de Inglés con duración de 30 horas (academia "First English Centre" Jaén).

2003/2004

Curso de inglés nivel III con duración de 84 horas (Universidad Popular Municipal, Jaén).

2004/2005

Curso de Inglés nivel preconversacional con duración de 84 horas (Universidad Popular Municipal, Jaén).

2005/2006

Beca de apoyo a la investigación con duración de 10 meses (Universidad de Jaén)

2006/2007

Curso de formación complementaria: técnicas y estrategias en expresión y purificación de proteínas recombinantes con duración de 25 horas (Universidad internacional de Andalucía).

Curso de creación de empresas de base tecnológica con duración de 40 horas (Universidad de Jaén).