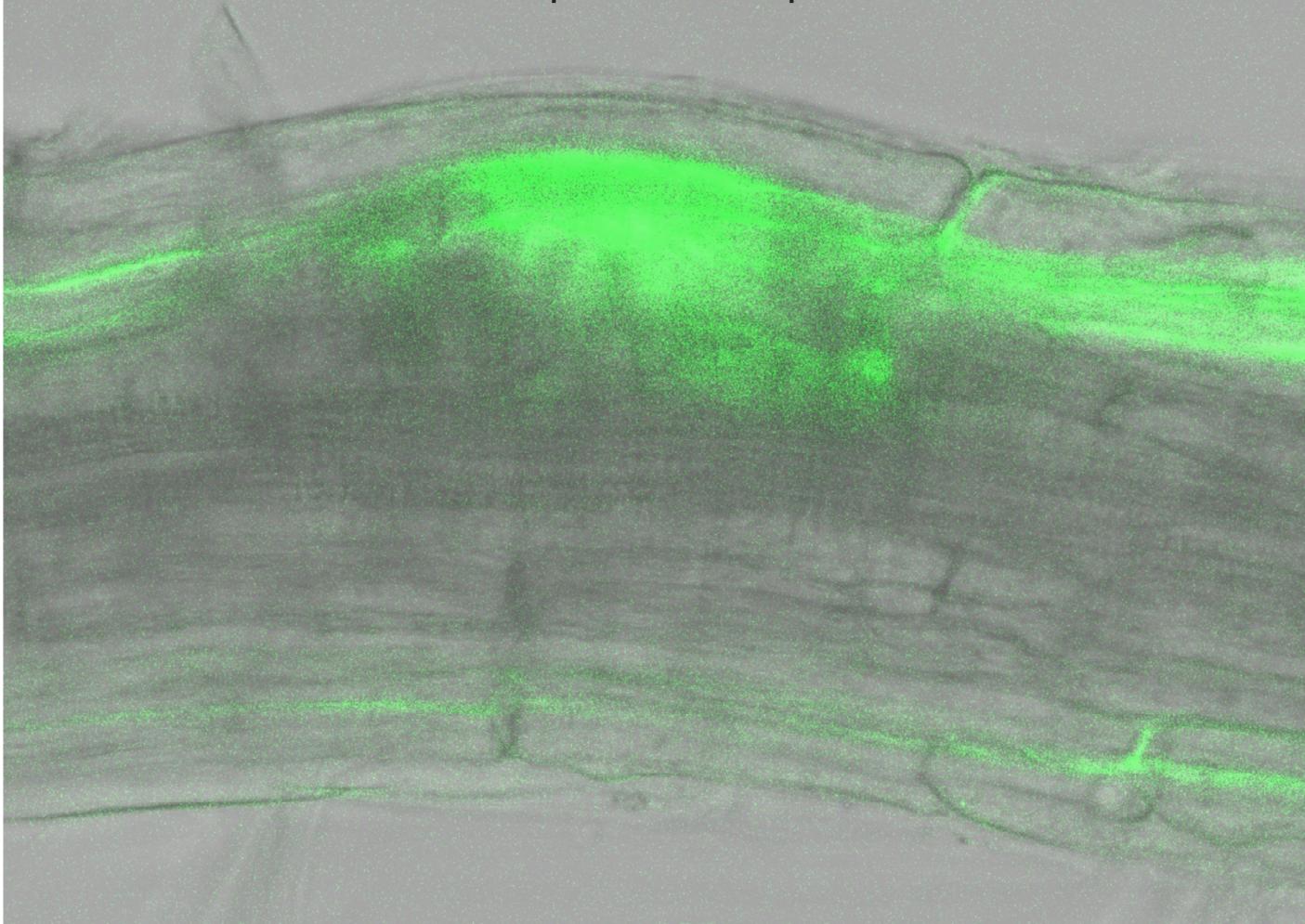


Señalización molecular de las respuestas a óxido nítrico (NO) en el desarrollo temprano de Arabidopsis.

Molecular signalling of nitric oxide (NO) during early Arabidopsis development.



MARÍA FERNÁNDEZ MARCOS
SALAMANCA
Enero 2011

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Departamento de Fisiología Vegetal
Facultad de Biología



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

**Señalización molecular de las
respuestas a óxido nítrico (NO) en
el desarrollo temprano de
Arabidopsis**

Tesis doctoral

MARÍA FERNÁNDEZ MARCOS
SALAMANCA
ENERO 2011

UNIVERSITY OF SALAMANCA
Department of Plant Physiology
Faculty of Biology



VNiVERSiDAD
Di SALAMANCA

**Molecular signalling of
nitric oxide (NO) during early
Arabidopsis development.**

PhD Thesis “Doctor Europeus”

MARÍA FERNÁNDEZ MARCOS
SALAMANCA
JANUARY 2011

Dña. EMILIA LABRADOR ENCINAS, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

CERTIFICO:

Que la presente Memoria titulada **“SEÑALIZACIÓN MOLECULAR DE LAS RESPUESTAS A ÓXIDO NÍTRICO (NO) EN EL DESARROLLO TEMPRANO DE Arabidopsis”** ha sido realizada por la licenciada **Dña. MARÍA FERNÁNDEZ MARCOS** en el Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología y el Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE) de la Universidad de Salamanca, bajo la dirección de los Dres. D. Oscar Lorenzo Sánchez y D. Luis Sanz Andreu, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas con Mención de “Doctor Europeus”,

Para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca a 12 de Noviembre de 2010.

Fdo: Dra. Dña. Emilia Labrador Encinas.

D. OSCAR LORENZO SÁNCHEZ, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y **D. LUIS SANZ ANDREU**, INVESTIGADOR CONTRATADO POSTDOCTORAL *MARIE CURIE* DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAMOS:

Que la presente Memoria titulada **“SEÑALIZACIÓN MOLECULAR DE LAS RESPUESTAS A ÓXIDO NÍTRICO (NO) EN EL DESARROLLO TEMPRANO DE *Arabidopsis*”** ha sido realizada por la licenciada **Dña. MARÍA FERNÁNDEZ MARCOS** en el Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología y el Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE) de la Universidad de Salamanca, bajo nuestra dirección, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas con Mención de “Doctor Europeus”,

Para que así conste, firmamos el presente certificado en Salamanca a 12 de Noviembre de 2010.

Fdo:

Dr. D. Oscar Lorenzo Sánchez

Dr. D. Luis Sanz Andreu

El Doctorando

FINANCIACIÓN Y ORGANISMOS IMPLICADOS

Durante el desarrollo de esta tesis, he disfrutado de una beca de Formación de Personal Investigador de la Junta de Castilla y León (EDU/918/2006). La concesión de una estancia breve en el centro de investigación “The integrative cell biology laboratory, School of Biological and Biomedical Science”, de la Universidad de Durham (UK), me ha permitido completar mi formación. Otras dos estancias en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) y Centro de Genómica del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), ambos en Valencia, fueron de gran ayuda para conocer nuevas técnicas.

La consecución de los experimentos ha sido posible gracias a los proyectos de investigación “Búsqueda de nuevos componentes implicados en la regulación hormonal y traduccional de la germinación de semillas de *Arabidopsis*” MEC (BIO2005-08473), "Respuestas a óxido nítrico en la germinación y el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*: caracterización fenotípica, molecular y genética” Junta de Castilla y León (SA065A07), "TRANSPLANTA: Function and biotechnological potential of transcription factors in plants" MEC CONSOLIDER (CSD2007-00057), "Señalización molecular de óxido nítrico (NO) en la germinación de semillas y el desarrollo temprano de *Arabidopsis*" MEC (BIO2008-04698) y "Bases moleculares y genéticas de las respuestas a óxido nítrico (NO) en la germinación y el desarrollo de *Arabidopsis*" Junta de Castilla y León (SA048A10-2), y finalmente, a la Acción Integrada Hispano-Italiana MICINN (IT2009-0041).



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA



**A MIS PADRES,
A RAQUEL Y ABEL,
A MI ABUELITA.**

“Las ciencias tienen las raíces amargas, pero muy dulces los frutos” (Aristóteles)

Ha sido un gran reto para mí plasmar en esta memoria todo el trabajo realizado en estos cinco años de investigación. Por ello, no quisiera dejar de agradecer a todos aquellos que, de forma directa o indirecta, me han ayudado a recorrer este camino. No sé si mi mano podrá expresar lo que mi corazón siente.

En primer lugar, me gustaría agradecer su dedicación a los directores de este trabajo. Al Dr. Oscar Lorenzo por darme la oportunidad de introducirme en el mundo de la investigación, por tu apoyo y confianza. Al Dr. Luis Sanz por todo el tiempo que me has dedicado y los conocimientos que me has transmitido, por tus consejos, amabilidad, bondad y buen corazón. A ambos, muchas gracias por brindarme la oportunidad de hacer realidad un sueño y por el esfuerzo realizado durante estos últimos meses.

Una especial mención se merecen los profesores Gregorio Nicolás y M^a Dolores Rodríguez. Sus clases me permitieron descubrir la Fisiología Vegetal y la Biología Molecular. Gracias por acogerme con los brazos abiertos para formar parte de vuestro grupo de investigación.

A todos los miembros del Lab 5, convertido en Lab 7 a nuestra llegada al CIALE. A todos aquellos que estuvieron y que ya no están, a los que pasaron fugazmente, a los que estuvieron y aún están, a los que acaban de llegar... a todos muchas gracias.

En especial, quiero agradecer a todos aquellos amigos que la ciencia me ha brindado y que nunca olvidaré. A M^a Paz, por apoyarme al inicio de este camino, por ser amiga y compañera de poyata, por las horas que hemos pasado juntas y todo lo que he aprendido contigo, tanto a nivel científico como a nivel personal. A José Luis y Álvaro “los Alvaritos”, y a Blanca, por los buenos momentos que he pasado con vosotros, os deseo todo lo mejor. Cuanto os he echado de menos en todo este tiempo. A Xandra, la alegría peruana, muchas gracias por tus consejos, por el ánimo que me brindabas cada día, por tu arte de hacerme sonreír hasta en los malos momentos, gracias por ser como eres, aún nos queda Perú y el Matchu Pichu. A Abe y a su pupila Patri, que haría yo sin vosotros para entenderme con los ordenadores. Abe, seguiré contribuyendo a aumentar tu colección de postales allá donde esté. A Daniel, por su acento cordobés y a Cristina, mi nueva compañera de poyata, me hubiera gustado compartir más tiempo contigo. Y como no, a Pablo, Pablete, Pableras... que te voy a decir, muchas gracias por ser cómo eres, tu honestidad, tu saber estar, tu cabeza bien amueblada aunque a veces un poco loca, por hacerme reír con tus bromas, por tu confianza y apoyo en los peores momentos, por no dejarte llevar por las corrientes y tener personalidad, por ser dueño de tus propias decisiones, por ser un buen amigo... no puedo decirte otra cosa que gracias y mil gracias.

A todo el Departamento de Fisiología Vegetal. A Heli, porque eres especial y nos brindabas una sonrisa cada día, sin ti el Lab 5 no hubiera sido lo mismo. Heli “el libro” ya está terminado.

A todos los que forman parte del CIALE y en especial a todos aquellos con los que he pasado muy buenos ratos a la hora de comer: Thais, Raúl, José Javier, Ilanit, Sara, Eugenia, Mariela, Jorge, Lina, Marta... Y muchas gracias a Tomás, Marlene y Susana por toda vuestra ayuda en las cuestiones técnicas (invernadero, pedidos y cocina).

También quisiera agradecer a mis chicos del confocal del CIC, a Ángel y Ángel Luis, por las horas que he pasado con vosotros y todo lo que me habéis enseñado. A Montse y al Dr. Celestino Santos Buelga, por su gran ayuda con la extracción y cuantificación de flavonoides. A Irene y al Dr. Roberto Solono, por su contribución en la hibridación del microarray.

A los Drs. Miguel Angel Blázquez y David Alabadí del IBMCP de Valencia, al Dr. Francisco Tadeo del IVIA de Valencia y al Prof. Keith Lindsey del School of Biological and Biomedical Science de la Universidad de Durham (UK) por acogerme en sus laboratorios y apoyarme en la investigación. A sus chicos, a Javi, Paco, Eugenio y Paz que hicieron muy agradables mis estancias en Valencia. A Jen, Kumari, Naomi, y Saher por su amabilidad durante mi estancia en la preciosa ciudad de Durham.

A Sofia, por tu incondicional amistad, por todos estos años y los que nos quedan. A Rui, por hacer feliz a mi amiga. Espero que juntos podamos recorrer toda la geografía portuguesa.

A los pucelanos: Rafa, Sara, Carlos, Elena, Luis, Adi, Jaime, Arantxa, Rodrigo, Patri, Jorge, Sara, Jose y Ester. Por los buenos momentos que hemos compartido y que nunca olvidaré, Paracuelles, Sanabria, los Carnavales de mi pueblo, nuestras casas rurales y ahora “las bodas”... muchas gracias. En especial a Elena, por ser la mejor compañera de habitación en “las molas”, la mejor compañera de piso... gracias por aquellos besos de buenas noches.

A mis amigas de la facultad, Inma, Isa, Marta, Pili y Ane, por aquellos maravillosos años “The Wonder Years”. Nos merecemos un viaje juntas para recordar viejos tiempos.

A Oscar, Manu y Felix, porque siempre me acuerdo de vosotros, de nuestros cafés en el Aromas, de las noches de fin de semana que acabábamos en el Espada... que tiempos aquellos.

Y aunque al final, no por ello menos importante, quiero agradecer a mis padres, Germán y Chelo, que han hecho de mí la persona que soy. Con vuestro cariño y apoyo incondicional me habéis permitido llegar hasta aquí, gracias por recorrer este camino conmigo. A mi hermana Raquel, que me brindas toda tu energía y vitalidad, y siempre estás cuando te necesito. A Abel, por las palabras de ánimo que recibo de ti cada día, por esa cerilla que encendiste hace ya ocho años y que aún sigue dando luz, no podría vivir mi vida sin ti. A mi querida tía y madrina, Dolores. A mis primos Jose y Rosi, Quique y Almudena, Chelo y

Carlos, Manolo y Loli, y los “peques” de la familia, Andrea, Ángel, Ismael, Alba, Elena, Carlos y el recién llegado, Jesús. A Amaia, por cuidar tanto de mi familia. A Rosa y Abel. A todos aquellos que me quieren, siento haberos robado tantos momentos para dedicárselos a la ciencia.

En especial a mi abuela Consuelo, mi ángel de la guarda. Se lo dedico a ella, porque me hubiera encantado estar a su lado en este momento. Espero que te sientas orgullosa de mi allá donde estés.

ÍNDICE

SUMMARY	vii
---------------	-----



INTRODUCCIÓN	1
1.- Introducción general	3
2.- Química del óxido nítrico	4
3.- El óxido nítrico en la biología de las plantas	5
3.1.- Biosíntesis de óxido nítrico en plantas	7
3.2.- Metabolismo del óxido nítrico en plantas	10
4.- Efectos fisiológicos del óxido nítrico en el crecimiento y desarrollo vegetal	12
4.1.- Dormición y germinación de semillas	13
4.2.- Desarrollo de raíces y arquitectura radicular	14
4.3.- Etiolación y desarrollo del hipocotilo	15
4.4.- Crecimiento del tubo polínico	16
4.5.- Transición floral	17
4.6.- Diferenciación del xilema	17
4.7.- Biosíntesis de celulosa	18
4.8.- Biosíntesis de clorofila	19
4.9.- Regulación de la percepción, homeostasis y disponibilidad de hierro	19
4.10.- Nodulación	20
4.11.- Gravitropismo	20
4.12.- Polaridad celular	21
4.13.- Senescencia de hojas y otros tejidos	21
5.- Papel del óxido nítrico en respuesta a estreses bióticos y abióticos	22
5.1.- Patógenos	22
5.2.- Estreses abióticos	24
5.2.1.- Papel del óxido nítrico en respuesta a sequía: regulación del cierre estomático ..	24
5.2.2.- Papel del óxido nítrico en respuesta a estrés salino	27
5.2.3.- Papel del óxido nítrico en respuesta a herida	28
5.2.4.- Papel del óxido nítrico en respuesta a temperaturas extremas	29
5.2.5.- Papel del óxido nítrico en respuesta a herbicidas	29
5.2.6.- Papel del óxido nítrico en respuesta a radiación UV-B	30
5.2.7.- Papel del óxido nítrico en respuesta al estrés provocado por metales pesados	30

6.- Regulación de la expresión génica por óxido nítrico: señalización y mecanismos de respuesta.	30
6.1.- Señalización mediada por cGMP, cADPR, Ca ²⁺ citosólico y MAPKS	33
6.2.- Modificaciones post-traduccionales del óxido nítrico: Nitrosilación y Nitración de proteínas	35
6.2.1.- Nitración	35
6.2.2.- Nitrosilación	36
6.2.3.- Nitrosilación de metales	37



ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	39
--------------------------------	----



MATERIALES Y TÉCNICAS	45
1.- Material biológico utilizado	47
1.1.- Semillas	47
1.2.- Microorganismos	49
1.3.- Vectores empleados	49
2.- Material no biológico	50
2.1.- Medios de cultivo	50
2.2.- Oligonucleótidos	51
2.3.- Kits	53
3.- Condiciones de germinación y crecimiento: tratamientos empleados	54
3.1.- Esterilización y estratificación de semillas	54
3.2.- Siembra de semillas	55
3.3.- Obtención de plántulas	55
3.4.- Tratamientos utilizados	56
4.- Manipulación de microorganismos	58
4.1.- Condiciones de crecimiento	58
4.2.- Conservación de cepas	58
4.3.- Transformación de células de <i>E. coli</i>	59
4.3.1.- Preparación de células competentes	59
4.3.2.- Transformación de células competentes	60
4.4.- Transformación de células de <i>A. Tumefaciens</i>	61
4.4.1.- Preparación de células competentes	61
4.4.2.- Transformación de células competentes	62
5.- Análisis de ácidos nucleicos	62
5.1.- Extracción y purificación de DNA genómico	62

5.2.- Extracción y purificación de DNA plasmídico	64
5.3.- Extracción y purificación de RNA total	66
5.4.- Cuantificación de ácidos nucleicos	68
5.5.- Tratamiento y modificación del DNA	68
5.5.1.- Digestión del DNA con enzimas de restricción	68
5.5.2.- Ligación: T4 DNA ligasa	69
5.5.3.- DNA Polimerasas	70
5.6.- Electroforesis de ácidos nucleicos	72
5.6.1.- Geles de DNA	72
5.6.2.- Geles de RNA	73
5.7.- Purificación de fragmentos de DNA	74
5.8.- Marcaje radiactivo del DNA	75
5.9.- Northern blot	76
5.9.1.- Transferencia de RNA	77
5.9.2.- Hibridación y autorradiografía	78
5.10.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	79
5.10.1.- Técnica de PCR	79
5.10.2.- TAIL PCR	80
5.10.3.- PCR cuantitativa	81
5.11.- Secuenciación del DNA	84
6.- Clonaje de los fragmentos de interés	84
7.- Análisis de proteínas	86
7.1.- Extracción de proteínas	86
7.2.- Cuantificación de proteínas	86
7.3.- Electroforesis de proteínas por SDS-PAGE	87
7.4.- Western blot	89
7.4.1.- Electrotransferencia de proteínas	89
7.4.2.- Inmunodetección de las proteínas de interés	90
8.- Análisis transcriptómico	91
8.1.- Síntesis de cRNA biotinilado	92
8.2.- Hibridación, lavado y escaneado	92
8.3.- Análisis de datos	93
9.- Identificación y cuantificación de flavonoides	94
9.1.- Extracción de flavonoides	94
9.2.- Identificación de flavonoides por HPLC-DAD-MS	95
9.3.- Cuantificación de flavonoles y antocianinas	96
10.-Obtención y manipulación de plantas transgénicas	97

10.1.- Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> mediante infiltración	97
10.1.1.- Construcción para la transformación de plantas de <i>A. thaliana</i>	97
10.1.2.- Infiltración de plantas de <i>A. thaliana</i> con <i>A. tumefaciens</i>	98
10.2.- Selección de plantas transgénicas	99
10.2.1.- Análisis de la segregación del marcador de resistencia a kanamicina en la generación T2	100
11.-Ensayo histológico de la actividad β -glucuronidasa	101
12.-Ensayo de fluorescencia con DAF-2DA	102
13.-Ensayo de fluorescencia con DPBA	102
14.-Fijación con cloralhidrato	103
15.-Microdissección por laser (LMPC)	104
15.1.- Preparación de las muestras	104
15.1.1.- Fijación de las muestras	105
15.1.2.- Tratamiento de crioprotección	105
15.1.3.- Congelación de las muestras	106
15.2.- Criodisección	106
15.3.- LMPC, extracción y amplificación de RNA	107
16.-Análisis y presentación de datos	110
16.1.- Fotografía	110
16.2.- Análisis informático	111
16.3.- Presentación de datos	112



RESULTADOS	113
1.- Detección del óxido nítrico endógeno durante el desarrollo temprano de <i>Arabidopsis thaliana</i>	115
2.- Búsqueda de mutantes alterados en la respuesta a óxido nítrico	116
2.1.- Determinación de las condiciones idóneas para la búsqueda de mutantes de respuesta a óxido nítrico	117
2.2.- Análisis de la colección de mutantes de inserción del transposón <i>Ds</i>	118
3.- El óxido nítrico promueve la salida de la dormición y la germinación de semillas	119
3.1.- Distintos ecotipos de <i>Arabidopsis</i> presentan diferente grado de sensibilidad a los tratamientos con óxido nítrico	119
3.2.- Implicación del gen <i>AtLecPK1</i> , inducible por óxido nítrico, en el proceso de dormición y germinación de semillas	120
3.2.1.- Identificación del gen mutado <i>NO11</i>	121
3.2.2.- Estudio de la expresión del gen <i>AtLecPK1</i>	127

3.2.3.- Análisis fenotípico del mutante <i>noi1</i> en procesos de germinación	128
4.- Papel del óxido nítrico en el crecimiento de la raíz primaria	129
4.1.- Altos niveles de óxido nítrico inhiben el crecimiento de la raíz primaria	129
4.2.- El óxido nítrico regula la elongación celular en raíces de Arabidopsis	132
4.3.- Altos niveles de óxido nítrico reducen la división celular en raíces de Arabidopsis	135
4.4.- Altos niveles de óxido nítrico reducen la elongación celular en la zona de diferenciación de la raíz	135
4.5.- Altos niveles de óxido nítrico alteran la respuesta a auxinas	138
4.6.- Altos niveles de óxido nítrico alteran el transporte basipétalo de auxinas	140
4.7.- Implicación del gen <i>AtPATL2</i> , reprimible por óxido nítrico, en el proceso de desarrollo de la raíz	143
4.7.1.- Identificación del gen mutado <i>NORI</i>	143
4.7.2.- Estudio de la expresión del gen <i>AtPATL2</i>	148
4.7.3.- Obtención de líneas mutantes de pérdida y ganancia de función en el gen <i>AtPATL2</i>	148
4.7.4.- Análisis fenotípico de las líneas mutantes de pérdida y ganancia de función en el gen <i>AtPATL2</i>	151
5.- Análisis transcriptómico y metabólico de las respuestas a óxido nítrico	153
5.1.- Análisis transcriptómico de plántulas	153
5.2.- Acumulación de flavonoides en plántulas tratadas con óxido nítrico	159
5.3.- Aislamiento de células de la epidermis de raíz	164
6.- Papel del óxido nítrico en el desarrollo del hipocotilo	165
6.1.- Caracterización genética del proceso de elongación del hipocotilo	167
6.2.- Reversión del efecto del óxido nítrico en el hipocotilo mediante la adición de giberelinas	168
6.3.- Caracterización fenotípica y molecular de mutantes <i>della</i> en presencia de óxido nítrico	169



DISCUSIÓN	173
1.- Presencia de óxido nítrico durante el desarrollo temprano del vegetal	176
2.- Aproximación experimental: fármacos y mutantes	177
3.- Identificación de genes marcadores de respuesta a óxido nítrico	178
3.1.- AtLecPK1 es una proteín-kinasa, inducible por óxido nítrico, que actúa como regulador negativo de las respuestas a ABA durante la germinación	179
3.2.- AtPATL2 es una patelina reprimible por óxido nítrico que actúa en el proceso	

de citocinesis	185
4.- La regulación transcripcional por óxido nítrico evidencia interacciones con fitohormonas y la regulación de fenilpropanoides	190
4.1.- Corregulación entre los genes inducidos por óxido nítrico y los genes inducibles por ABA y MeJA	191
4.2.- El óxido nítrico induce la acumulación de fenilpropanoides (flavonoles y antocianinas)	192
5.- Niveles elevados de óxido nítrico inhiben la división celular en el meristemo de la raíz primaria	195
6.- El óxido nítrico inhibe la elongación celular a través de la activación de proteínas DELLA	196
7.- Discusión general	198
	
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	201
	
APÉNDICE	207
1.- Abreviaturas y siglas	209
2.- Tablas suplementarias	211
3.- Figuras Suplementarias	223
	
BIBLIOGRAFÍA	225

SUMMARY

Research over the last decades has identified nitric oxide (NO) as a bioactive molecule that plays an essential role in different plant stress and developmental responses such as plant defence, programmed cell death (Delledonne et al., 1998, 2001; Durner et al., 1998; de Pinto et al., 2002; Romero-Puertas et al., 2004; Wendehenne et al., 2004), iron metabolism (Graciano et al., 2002), stomatal movements (Desikan et al., 2002; García-Mata y Lamattina, 2002; Neill et al., 2002a; Guo et al., 2003), flowering (He et al., 2004), among others. In our lab we are focused on the role of NO in early plant developmental processes, such as seed dormancy and germination, root organogenesis and hypocotyl elongation. The molecular bases of NO action in early plant development that allow the plant to respond are currently unknown. The identification of the elements involved in this response is, thus essential to understand the NO perception and signalling by the plant, which is a prerequisite for its genetic improvement.

To get insight into NO action during early seedling growth we have performed a phenotypical, cellular, genetic and molecular analysis of NO responses using NO gas and different NO donors, such as sodium nitroprusside (SNP), S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine (SNAP) and S-nitrosoglutathione (GSNO), and the NO scavenger cPTIO (2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3 oxide). Since there is a controversy related to the use of NO donors to elucidate NO function in plants (Murgia et al., 2004a), we have also tested genetic mutants affected in NO accumulation such as *atnoa1*, *nia1;nia2*, *cue1/nox1*, *argah1.2* and *argah2.1* (Wilkinson y Crawford, 1993; Guo et al., 2003; Crawford, 2006; Moreau et al., 2008; Streatfield et al., 1999; He et al., 2004; Flores et al., 2008).

An important task to understand NO function in plant is the identification of NO-sites production. It have been previously reported that the fluorescence indicator DAF-2DA (4,5-diaminofluorescein diacetate) is an useful tool to detect the places where NO is accumulated (Kojima et al., 1998; Pedroso et al., 2000; Foissner et al., 2000; Garcês et al., 2001; Desikan et al., 2002; Neill et al., 2002a; Gould et al., 2003; Jih et al., 2003; Pagnussat et al., 2003; Xin et al., 2003; Huang et al., 2004; Prado et al., 2004, 2008; Tada et al., 2004; Kolbert et al., 2008). Using DAF-2DA, we identified, that NO

abundance was specifically detected at different stages of plant development, such as seed dormancy and germination, root organogenesis and hypocotyl elongation, processes in which NO has been previously described to be involved (Bethke et al., 2004b, 2006, 2007; Libourel et al., 2006; Liu et al., 2009; Lozano-Juste y León 2010a; 2010b; Lombardo et al., 2006; Beligni y Lamattina, 2000; Lamattina et al., 2003; Tonón et al., 2010). During *Arabidopsis thaliana* germination, NO is accumulated in the aleurone layer and it leads promotes the vacuolation of aleurone cells that is an early marker for dormancy lost (Bethke et al., 2007). NO is a key player in reducing seed dormancy and promoting germination. Our results confirm that NO promotes the germination of ecotypes with a strong dormancy (Emkheim and NIL DOG17-1) (Figure R.3.). We also identified NO production in the epidermal cell at the basal meristem and elongation zone in emerging roots in *A. thaliana* (Figure R.1.). Moreover a maximum of fluorescence signal is detected in external layers of hypocotyl (Figure R.1.). Since the specific site of NO production may be important to understand NO action in these precise sites, we performed a laser microdissection (LM) assay to isolate epidermis cells (where NO was mainly accumulated) from the basal meristem and transition zone in roots of control plants and cPTIO-treated plants. We optimized the number of cells collected by LM to obtain a proper amount of cell-specific RNAs that will be used for transcriptional profiling.

Additionally, a gene-trap approach has been used to identify NO reporter gene expression. We checked 2500 T-DNA insertion gene-trap lines from the EXOTIC collection (Exon Trapping Insert Consortium, Fifth Framework programme, European Union), which include β -*GUS* as a reporter gene. The population have been screened for GUS expression pattern under different treatments with the NO donor SNP and the NO scavenger cPTIO. We have isolated several T-DNA insertion lines with an altered GUS expression pattern with or without NO. (Table. R.1.). Some of the corresponding mutated genes have been identified by TAIL-PCR and they will provide useful marker lines to determine the role of NO in early plant development. Among these marker lines we have characterized two genes coding for AtLecPK1 and AtPATL2.

AtLecPK1 is a NO-induced receptor-like protein kinase with a lectin-like domain (Figure R.7.) (Figure R.4. and R.9.), probably involved in signalling pathways through protein phosphorylation. This protein seems to be localized in the plasma membrane

because it has a transmembrane domain (Figure R.7.). Loss-of-function analysis suggest that AtLecPK1 is a negative regulator of ABA response in seed germination (Figure R.10. and Figure D.1.) (Xin et al., 2009).

AtPATL2 (Patellin 2) is a NO-repressed phosphatidylinositol transfer protein-like, which functions in transporter activity, (Figure R.20. and R.24.). It belongs to a small family of Arabidopsis proteins which contains a Sec14 lipid-binding domain and a Golgi dynamics (GOLD) domain (Figure R.23.). GOLD domains are found in a diverse group of proteins involved in Golgi function and vesicle traffic, and they seem to participate in protein-protein interactions (Anantharaman and Aravind, 2002). Amino acid sequence alignment with others Arabidopsis PATLs (specifically AtPATL1) (Figure R.22.) suggests a putative role for AtPATL2 in membrane trafficking events associated with cell-plate expansion or maturation (Peterman et al., 2004). It has been recently described that AtPATL3 interacts with SCR (Scarecrow) by using yeast two-hybrid method (Cui and Benfey, 2009). Loss-of-function and gain-of-function analysis of *AtPATL2* suggest that AtPATL2 could be playing a role during the activation of asymmetric cell divisions that occur in the endodermis, generating a second layer cortex, termed the middle cortex (Figure R.28. and D.2.) .It has been previously described that NO is able to diminish primary root (PR) growth and to promote lateral root (LR) in tomato (Correa-Aragunde et al., 2004). In this work we demonstrate that wild type plants show inhibition of PR growth after treatments with NO. The inhibition was dose-dependent since a gradual decrease in the length of PR was observed while the levels of NO were increased. Remarkably, the NO scavenger, cPTIO, rescued the length of PR after treatment with both, the NO and the scavenger, pointing to a pivotal role of NO in this process (Figure R.11.). Based on these previous results, we performed a microarray analysis to find novel genes differentially regulated in the presence or absence of NO and responsible for the root phenotypes.

Gene Ontology analysis of differentially expressed genes in the microarray using FatiGO (<http://fatiGO.bioinfo.cipf.es>) and the Bio-Array Resource for Arabidopsis functional genomic (BAR, <http://www.bar.utoronto.ca>) revealed an overrepresentation of abscisic acid (ABA) and methyl jasmonate (MeJA)-related genes among those induced by NO. (Figure R.30.). Out of these genes, about 1/4 (25%) of the genes induced after

SNP treatment have also been described to be regulated by ABA and nearly to 1/5 (20%) have been associated with JA responsiveness. Among the ABA-induced cluster, representative genes are *ABII* (*ABSCISIC ACID INSENSITIVE 1*) and several other stress-related response genes, such as *RD20* (*RESPONSIVE TO DESSICATION 20*), *RD22* (*RESPONSIVE TO DESSICATION 22*), *ERD3* (*EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 3*) and *P5CS2* (*DELTA 1-PYRROLINE-5-CARBOXYLASE SYNTHASE 2*). Among the JA-induced cluster, representative genes are *JRI* (*JASMONATE RESPONSIVE 1*), *VSP1* (*VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 1*), JA biosynthesis-related genes *LOX2* (*LIPOXYGENASE 2*) and *AOC1* (*ALLEN OXIDE CYCLASE 1*), and several *MBP* (*MYROSINASE-BINDING PROTEIN*) (*MBP1*, At1g52000 y At3g16390). Other JA-regulated genes are the coronatine induced *CORII* (*CORONATINE-INDUCED PROTEIN 1*) and *CORIII* (*CORONATINE-INDUCED PROTEIN 3*), and several other genes involved in the synthesis and regulation of flavonols and anthocyanins. Taken together, these data highlight the similarities between NO-response and ABA and JA- stress responses.

Remarkably, among the NO up-regulated genes there are some of them involved in the synthesis and regulation of flavonols and anthocyanins (MapMan, <http://www.gabi.rzpd.de/projects/MapMan/>): *DFR* (dihydroflavonol 4-reductase), *ANS* (anthocyanidin synthase), *UFGT* (udp-glucose:flavonoid 3-o-glucosyltransferase), *AAC* (anthocyanin 5-aromatic acyltransferase 1), *GSTF12* (glutathione S-transferase-like protein) and UDP-glucosa (anthocyanin 5-O-glucosyltransferase). In addition, NO also up-regulates the expression of *PAP1/MYB75* (anthocyanin 2), encoding a transcriptional regulator of flavonoids pathway (Figure R.31.). To test whether these phenylpropanoids were also differentially accumulated in NO-treated plants, flavonoids accumulation was monitored by diphenilboric acid-2-aminoethyl ester (DPBA) staining (Figure R.32.). To further confirm differential flavonoids accumulation, these compounds were measured by HPLC-MS analysis. The amount of these metabolites in wild type plants treated with NO donor was significantly higher than in control plants and in plants grown in the presence of cPTIO (Figure R.31.). Flavonoids are phenylpropanoids that function in many different ecological and physiological situations in plants. Under UV light and excess visible light they are accumulated, and function as free radical (ROS) scavengers by neutralizing radicals before producing damage (Jordan, 1996; Jansen et al., 1998). During

hypersensitive response, it has been reported that the accumulation of flavonoids is necessary for the detoxification of high levels of NO and ROS (Delledonne et al., 2005). Both of them, NO and ROS, are induced under biotic and abiotic stress conditions and they are responsible of protein tyrosine nitration, which is nitrosative stress-marker (Valderrama et al., 2007; Corpas et al., 2008; Chaki et al., 2009).

Since flavonols have been previously described as modulators of polar auxin transport (Murphy et al., 2000; Brown et al., 2001; Peer et al., 2004; Peer and Murphy, 2006; reviewed by Peer and Murphy, 2007), we confirmed that auxin response and auxin transport were also affected after NO-treatment. Using the auxin-responsive marker *DR5:GUS/GFP*, we observed that GUS expression pattern was highly altered after NO-application with the NO-donor SNP (Figure R.17.). Similarly, time course analysis strongly reduced the PIN1:GFP signal upon treatment with SNP (Figure R.19.). To further confirm whether overaccumulation of flavonols were responsible of NO-related root growth inhibition, we checked the sensitivity of *tt3;tt7* mutants (overaccumulates flavonols) upon treatment with SNP. Remarkably, double *tt3;tt7* mutant showed hypersensitivity to NO-donor, SNP, suggesting that accumulation of flavonols under NO-treatment contributes to some extent to the NO-related primary root growth inhibition. It has been previously *reported* that *PIN1* expression does not change in the presence of high levels of flavonols (Peer et al., 2004), but these compounds do alter the localization of PIN1 and PIN2 (Santelia et al., 2008). However our results indicate that PIN1 disappears under NO-treatment and this disappearance may involve a translational modification. Taken together, these observations suggest that the disappearance of PIN1 protein could be independent of flavonol accumulation and we propose that either directly or indirectly downregulation of PIN1 levels is due to an independent-proteasome mechanism.

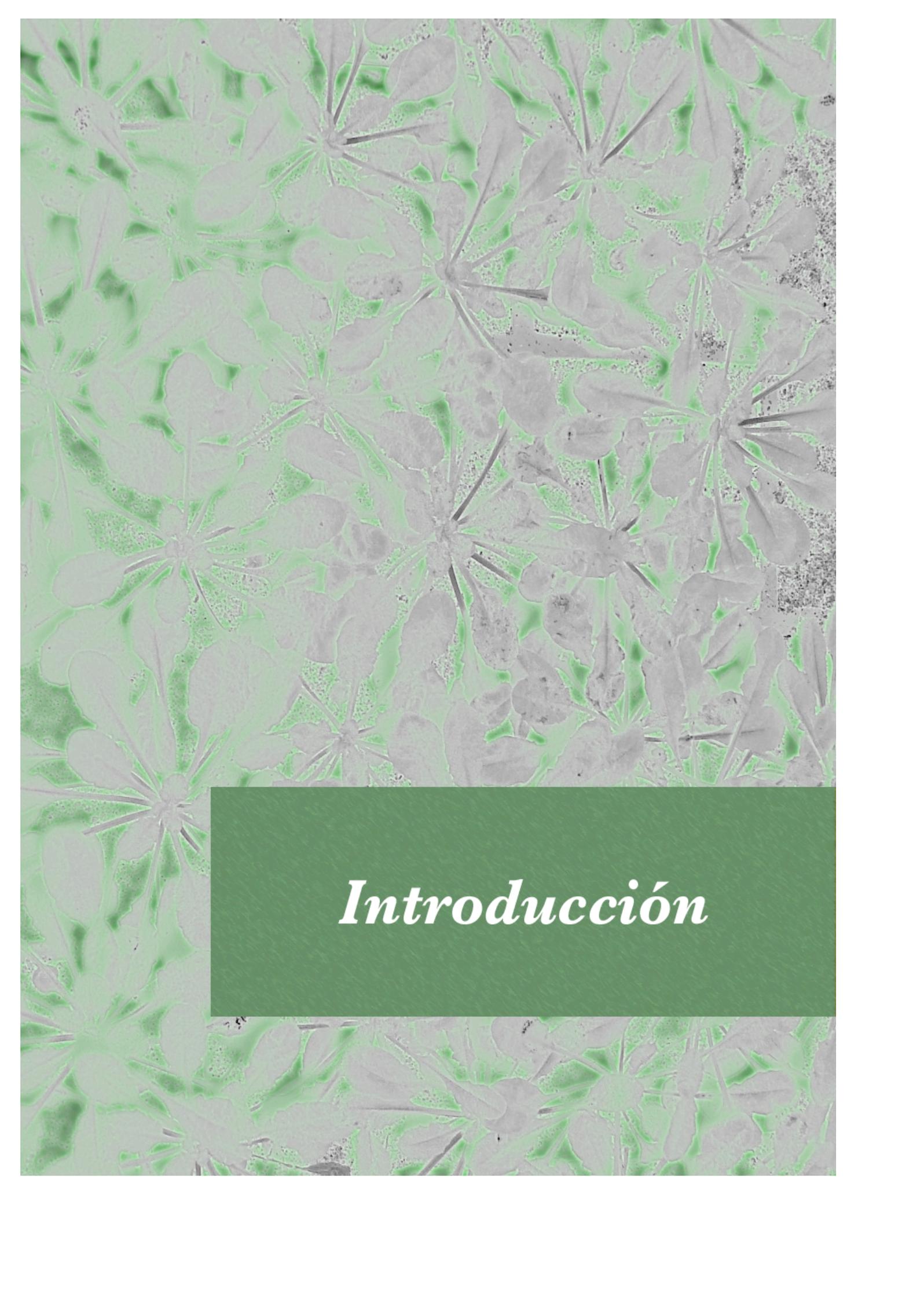
Analysis of the cell number and cell size in the root meristem (Figure R.12.) reveals that NO application reduces root meristem size. The total number of cells between the quiescent center (QC) and the start of the rapid elongation in the cortex layer is significantly changed as the inflection point on the cell length curve marking the transition into the rapid elongation zone occurs around cell numbers 17, 33, 28 in SNP, cPTIO and control respectively (Figure R.12.). It is noticeable that analysis of *cue1/nox1*

mutant showed similar results to those obtained after SNP treatment with an inflection point around cell numbers 17-18 (Figure R.12.). Interestingly, significant differences in cell sizes in the apical root meristem were also detected at this stage (cells 1-10 and cells 11-20, Figure R.12.). As shown in Figure R.12., NO scavenged by cPTIO partially blocked the action of the NO specific releasing compound SNAP, clearly establishing that NO is a contributing element in the promotion of cell elongation (Figure R.12.). Hence, in the initial phases of root growth after germination, NO reduces root meristem size by promoting cell elongation in the root meristem and therefore decreasing the number of dividing cells. Remarkably, long-term treatments with NO-donor SNP (up to 5 days) almost abolished the pool of dividing cells by enhancing cell elongation in all cell types of the root meristem (Figure R.13.). Using the *CycB1;1:GUSDB* reporter (Colón-Carmona et al., 1999), marking cells in the G2 stage of the cell cycle, we have compelling evidence that over-accumulation of NO decreases the pool of dividing cells (Figure R.14.).

Moreover, microarray analysis reveals that NO induces the expression of several cell-wall remodelling enzymes (CWRs) (Table R.4.). Mining the spatiotemporal distribution of transcripts by means of the eFP browser (<http://bar.utoronto.ca>), Winter et al., 2007) reveals that transcripts of these genes mostly reach their highest levels throughout the root apical meristem (Supplemental Figure S.1.) and suggests that these enzymes could be important for cell wall loosening during the elongation of cells in the meristem (Figure R.12. and R.13.). Intriguingly, NO also represses a distinct set of CWRs (Table R.5.), most probably reflecting cell wall tightening during the inhibition of cell elongation in the differentiation zone (Figure R.15.) since they are mostly expressed in that part of the root (Supplemental Figure S.1.). Interestingly, NO treatment decreases cell elongation to some extent in differentiation zone (Figure R.15.). Previously, Hu et al., (2005) reported that gravistimulation induces the asymmetric NO generation in the lower half of horizontally orientated roots that generate an inhibition of cell elongation.

Auxin promotes root growth by modulating gibberellin (GAs) response (Fu and Harberd, 2003), and GAs are plant hormones that regulates root growth controlling both cell division and cell elongation (de Lucas et al., 2008; Ubeda-Tomás et al., 2008, 2009; Achard et al., 2009). GAs promote etiolated growth in plants (characterized by increased hypocotyl growth) by degradation of DELLA proteins (GAI, RGA, RGL1, RGL2,

RGL3). DELLA proteins act as a negative regulator of PIFs (Phytochrome interacting factors) that mediate cell elongation (de Lucas et al., 2008; reviewed by Davière et al., 2008). NO is able to inhibit hypocotyl elongation during dark growth (Figure R.36.) (Beligni and Lamattina, 2000). Remarkably, NO-overproducer mutants (*nox1/cue1, argah1.2 y argah 2.1*) display significantly shorter hypocotyls than the wild-type (Figure R.37.). Our results suggest that GAs action reverts to some extent the NO-related inhibition of hypocotyls growth (Figure R.38.) and also cell elongation in the differentiation zone (Figure R.16.). In this work, we propose that NO interacts with the GAs pathway in the regulation of hypocotyl growth in etiolated seedlings NO-treated seedlings induce the expression of DELLA repressor genes (Figure R.40.) and furthermore *quadruple* and *global DELLA* mutants (impaired in GAs signalling) show high levels of insensitiveness to the NO-mediated inhibition of hypocotyl elongation in dark-grown plants (Figure R.39.). Taken together, these findings suggest that NO could be playing a main role in GA regulation of hypocotyl growth.



Introducción

1.- INTRODUCCIÓN GENERAL.

La historia del óxido nítrico (NO, del inglés *nitric oxide*) como una molécula importante en la fisiología de los organismos comenzó durante los primeros veinticinco años del siglo XX. Sin embargo, el NO es un gas utilizado por el hombre desde el principio de la civilización. Los antiguos sumerios usaban las sales de nitrato para curar carnes, ya que estas sales liberan NO que permite eliminar bacterias, como la que produce el botulismo (*Clostridium botulinum*), y mantener el color rojo de la carne.

En nuestra vida cotidiana consideramos a esta molécula como una sustancia nociva, ya que el NO se produce durante la combustión de la gasolina pasando a formar parte del conocido *smog*. Una vez liberado, este gas pasa de la atmósfera a la estratosfera donde participa en la degradación del ozono (Howard, 1980; Sandermann, 2001). A pesar de su apariencia dañina, se ha comprobado que el NO actúa como una molécula señalizadora interviniendo en diversas respuestas biológicas.

El descubrimiento de la importancia del NO en la fisiología de los organismos tuvo lugar en la década de los ochenta, cuando se demostró que era el responsable de la relajación muscular y la tonicidad de los vasos, por lo que se conocía como EDRF, *Endothelium Derived Relaxing Factor* (Palmer et al., 1987). Debido a este hecho, el NO se ha convertido en una importante fuente de interesantes investigaciones en animales. Así, en 1992 el NO fue reconocido como “Molécula del año” por la prestigiosa revista Science. Diversos trabajos afirmaban que el NO era un efector que intervenía en numerosos procesos fisiológicos en animales, incluyendo la relajación del músculo liso, la inhibición de la agregación plaquetaria, la comunicación neuronal y la respuesta inmune (Schmidt y Walter, 1994). La insistencia en las investigaciones sobre esta molécula permitió la identificación de la enzima responsable de la producción del NO, la óxido nítrico sintasa (NOS) (Nathan y Xie, 1994). Años después, en 1998, Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro y Ferid Murad recibieron el Premio Nobel de Medicina debido al descubrimiento y descripción de la actividad biológica del NO en la señalización molecular del sistema cardiovascular.

Las plantas también tienen la capacidad de acumular y metabolizar el NO atmosférico (Nishimura et al., 1986) y, mediante la medición de los gases emitidos, se ha demostrado que el NO puede ser sintetizado en plantas (Leshem y Haramaty, 1996; Yamasaki, 2000) participando en la regulación de distintos procesos del desarrollo vegetal (Desikan et al., 2002; Pagnussat et al., 2003; Wendehenne et al., 2004; Lombardo et al., 2006; Bethke et al., 2007; Pii et al., 2007; Correa-Aragunde et al., 2008).

2.- QUÍMICA DEL ÓXIDO NÍTRICO.

El NO es una molécula pequeña, gaseosa, de vida media corta y bajo peso molecular que es soluble tanto en ambientes hidrofóbicos como hidrofílicos, aunque presenta mayor solubilidad en los primeros (lipofilia). Debido a sus características físicas y químicas, esta molécula es capaz de atravesar fácilmente las membranas biológicas sin necesidad de transportadores de membrana, simplemente por un transporte pasivo, pudiendo ejercer sus efectos en las células vecinas, lo que influirá en gran medida en su mecanismo de acción (Lira y Arredondo, 2004).

Este radical libre se considera una especie reactiva del nitrógeno formada por la unión de dos átomos, uno de oxígeno y otro de nitrógeno. El oxígeno presenta ocho electrones y el nitrógeno siete. Al encontrarse, estos electrones se aparean y dan lugar a la molécula de NO, que contiene un electrón desapareado. Debido a esto, la molécula presenta una gran afinidad por metales de transición tales como hierro, cobre y zinc, y reacciona rápidamente con el oxígeno molecular (O_2) y especies reactivas del O_2 (ROS) como los radicales superóxido (O_2^{\bullet}) e hidroxilo (OH^{\bullet}). También interactúa con el nitrógeno (N) y el azufre (S) que forman parte de las proteínas (gracias a la presencia de este electrón desapareado) en un proceso conocido como nitrosilación y que es la base química de las diversas funciones que ejerce el NO en los organismos (Figura I.1.).

El NO puede aparecer en dos formas intercambiables dependiendo del estado redox del medio en el que se encuentre: la forma oxidada debido a la pérdida de un electrón y que se conoce como catión nitrosonio (NO^+), o la forma reducida por la ganancia de un electrón y que se conoce como anión nitroxilo (NO^-). Estos dos

intermediarios son importantes en la química del NO. Desde el punto de vista del estado redox, el NO es un débil agente oxidante y un fuerte agente reductor.

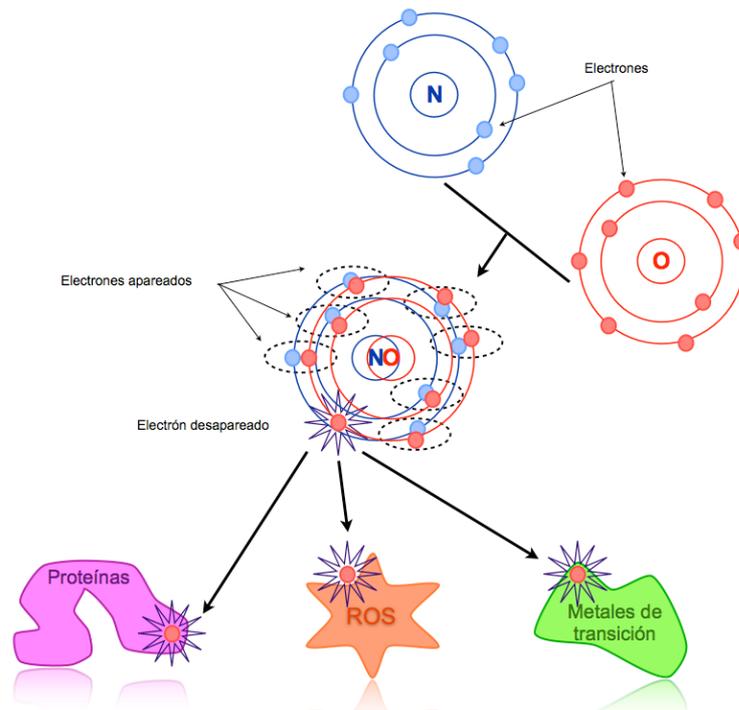


Figura I.1.- Formación del óxido nítrico. La molécula de NO se forma por la combinación de un átomo de nitrógeno (N) y otro de oxígeno (O). Esta molécula posee un electrón desapareado que le confiere su característica de radical libre, pudiendo interaccionar rápidamente con otras moléculas que presentan electrones desapareados. Adaptado de Lira y Arredondo, 2004.

3.- EL ÓXIDO NÍTRICO EN LA BIOLOGÍA DE LAS PLANTAS.

Durante las dos últimas décadas, el NO ha pasado a ser un nuevo mensajero en la biología de las plantas con una función importante en muchos procesos fisiológicos, como se ve reflejado en la Tabla I.1. Se ha comprobado que esta molécula interviene en la regulación de distintos procesos de desarrollo, incluyendo la homeostasis del hierro, el cierre estomático inducido por ácido abscísico (ABA) (Desikan et al., 2002; García-Mata y Lamattina, 2002; Neill et al., 2002a; Guo et al., 2003), el desarrollo de raíces adventicias y laterales (Pagnussat et al., 2002, 2003, 2004; Correa-Aragunde et al., 2004, 2006) y también en las respuestas de defensa y muerte celular (Delledonne et al., 1998, 2001;

Durner et al., 1998; de Pinto et al., 2002; Romero-Puertas et al., 2004; Wendehenne et al., 2004).

Tabla I.1.- Resumen de los procesos del crecimiento y desarrollo en los que interviene el NO.

Estadios del desarrollo	Crecimiento y desarrollo	Papel del NO	Referencia	
	Dormición de semillas	Rompe la dormición.	Batak et al., 2002. Bethke et al., 2004b, 2006, 2007.	
	Germinación	Promueve la germinación.	Beligni y Lamattina, 2000.	
	Aleurona	Permite la vacuolización de las células de la aleurona y la pérdida de la dormición.	Bethke et al., 2004b, 2007.	
	Formación de la raíz	Raíz Primaria	Inhibe la elongación de la raíz.	Correa-Aragunde et al., 2004.
		Raíz Secundaria	Promueve su formación.	Correa-Aragunde et al., 2004.
		Raíces adventicias	Promueve su formación.	Pagnussat et al., 2002.
		Pelos radiculares	Induce la formación de pelos.	Lombardo et al., 2006.
	Etiolación	Promueve la des-etiolación.	Beligni y Lamattina, 2000.	
Crecimiento del hipocotilo	Reduce su elongación.	Beligni y Lamattina, 2000.		
	Movimiento estomático	Induce cierre estomático.	García-Mata y Lamattina, 2001.	
	Crecimiento del tubo polínico	Regula el crecimiento y la orientación del tubo polínico.	Prado et al., 2004.	
	Floración	Inhibe la transición floral.	He et al., 2004.	
	Lignificación de la pared celular	Incremento de lignina.	Gabaldón et al., 2005.	
	Diferenciación del xilema	Induce la diferenciación de elementos traqueales.	Gabaldón et al., 2005.; Barceló et al., 2002.	
	Biosíntesis de celulosa	Afecta al contenido de celulosa en la raíz.	Correa-Aragunde et al., 2008.	
	Biosíntesis de clorofila y fotosíntesis	Incrementa el contenido de clorofila.	Zhang et al., 2006.	
	Disponibilidad del hierro	Mayor disponibilidad del hierro.	Graziano et al., 2002.	
	Nodulación	Controla la formación de nódulos.	Pii et al., 2007.	
	Gravitropismo	La acumulación de NO favorece la curvatura.	Hu et al., 2005.	
	Polaridad celular	Controla el estímulo de gravedad y el crecimiento polarizado.	Bushart y Roux, 2007; Salmi et al., 2007.	
	Maduración	Retrasa la maduración del fruto.	Leshem y Pinchasov, 2000.	
	Senescencia	Retrasa la senescencia de las hojas.	Leshem y Pinchasov, 2000.	

3.1.- Biosíntesis de óxido nítrico en plantas.

Aunque en animales el proceso de síntesis de NO es bien conocido, en plantas aún se desconocen algunas cuestiones fundamentales. En general, en los vegetales se han detectado dos vías de síntesis del óxido nítrico, una enzimática y otra no enzimática (Figura I.2.).

Dentro de la vía enzimática se han identificado enzimas que catalizan la síntesis de NO a partir de dos sustratos diferentes, nitrato y arginina. La primera enzima identificada fue la nitrato reductasa (NR) (Yamasaki y Sakihama, 2000), asociada con la asimilación de nitrógeno. Esta enzima reduce el nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), y posee además una actividad intrínseca a través de la cual, en condiciones en las que el NO_2^- se acumula en concentraciones micromolares, es capaz de reducir el NO_2^- a NO usando NAD(P)H como cofactor. En *Arabidopsis* hay dos isoformas de la NR, *NIA1* y *NIA2*, que presentan una elevada similitud en su secuencia (un 83.5% de similitud en la composición de aminoácidos), con zonas divergentes en el extremo N-terminal y otras pequeñas regiones. La síntesis de NO catalizada por la enzima NR es esencial en el cierre estomático inducido por ABA en las células guarda de *Arabidopsis thaliana* (Desikan et al., 2002). La utilización del doble mutante *nia1;nia2* permitió confirmar la implicación del NO en los procesos de señalización de esta hormona. Por otra parte, se ha demostrado la síntesis de NO mediada por esta enzima en la raíz y su posible papel fisiológico en la formación del aerénquima (Dordas et al., 2003).

Del mismo modo, existen evidencias de que las plantas sintetizan NO a partir de arginina y O_2 para generar citrulina y NO, al igual que ocurre en animales, y por lo tanto, que existe una NO sintasa (NOS). En 1997 se identificó en *Arabidopsis* una proteína que presentaba homología con la enzima NOS previamente descrita en animales, y se denominó AtNOS1 o simplemente NOS1. AtNOS1 fue identificada tras una búsqueda de genes de *Arabidopsis* que codificaban proteínas con una secuencia idéntica a las involucradas en la síntesis de NO en el caracol *Helix pomatia* (Huang et al., 1997; Guo et al., 2003). Esta nueva proteína se consideró que presentaba actividad para reducir arginina a citrulina. Además, el mutante por inserción de T-DNA *atnos1* era deficiente en la acumulación de NO (He et al., 2004; Zeidler et al., 2004; Bright et al.,

2006). Estos datos apoyaban firmemente la presencia en plantas de una enzima con actividad NOS.

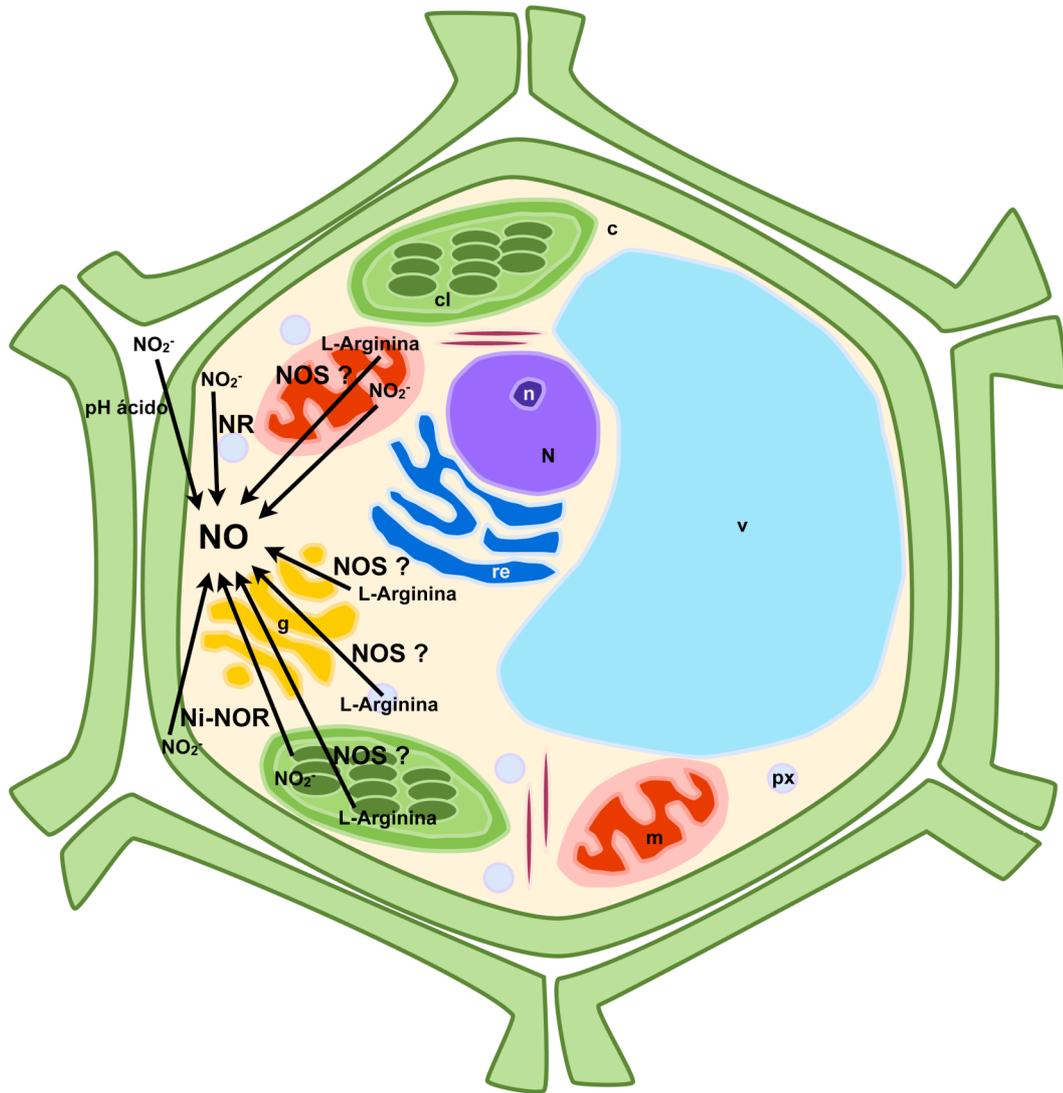


Figura I.2.- Rutas de síntesis de NO en plantas. Ni-NOR: nitrito-NO oxidoreductasa, NO: óxido nítrico, NO₂⁻: nitrito, NOS: NO sintasa, NR: nitrato reductasa, c: citoplasma, cl: cloroplasto, g: aparato de Golgi, m: mitocondria, N: núcleo, n: nucleolo, px: peroxisomas, re: retículo endoplasmático, v: vacuola.

En los últimos años, se ha generado una gran controversia en torno a la identificación de esta enzima y su actividad NOS. Trabajos recientes ponen en duda la capacidad real de esta proteína para reducir arginina a citrulina en la producción de NO

(Zemojtel et al., 2006). Aunque esta proteína no presente actividad NOS *per se*, sí está involucrada en la síntesis o acumulación de NO y por ello ha sido renombrada como *A. thaliana* NO-associated 1 (AtNOA1) (Crawford et al., 2006). Se ha especulado sobre su posible participación en el ensamblaje y estabilidad de ribosomas en la mitocondria debido a que presenta un dominio y actividad GTPasa (Zemojtel et al., 2006; Moreau et al., 2008). AtNOA1 podría localizarse en mitocondrias y/o cloroplastos, orgánulos en los cuales se produce transferencia de electrones y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Moreau et al., 2008; Flores-Pérez et al., 2008). La menor acumulación de NO descrita en el mutante *atnoa1* podría deberse a la mayor acumulación de ROS que se observa en este mutante, ya que el NO reacciona rápidamente con O₂⁻ y se reduce la cantidad de NO detectable (Moreau et al., 2008).

Estudios recientes realizados en el doble mutante *nia1;nia2* sugieren una posible conexión entre la síntesis de NO mediada por la NR y la NOS. Se ha observado una disminución del contenido en arginina (sustrato de la NOS) en el mutante *nia1;nia2* (Modolo et al., 2006). Esta reducción en el contenido de arginina podría tener repercusión en la síntesis de NO a través de la actividad de la enzima NOS, disminuyendo la producción de NO por esta vía. Sin embargo, aún no está claro cómo interaccionan ambas vías para controlar la síntesis de NO en plantas.

Stöhr y Stremlau (2006) proponen la existencia de otra enzima que interviene en la síntesis de NO. Esta enzima es una proteína de unión a membrana específica de raíz y que se conoce como nitrito-NO oxidoreductasa (Ni-NOR). Ni-NOR utiliza el citocromo *c* como donador de electrones *in vivo*, pero aún no ha sido clonada y caracterizada. Otras enzimas que no están claramente descritas y se creen involucradas en la producción de NO son la xantina oxidoreductasa (XOR), que en animales produce NO en condiciones de hipoxia (Millar et al., 1998) y el citocromo P450 (del Río et al., 2004).

Paralelamente, existe otra vía no enzimática de producción del NO basada en la reducción de NO₂⁻ a NO, para lo cual se requiere un pH ácido:



Esta síntesis se ha descrito en el apoplasto del tejido de aleurona de semillas de cereales durante la germinación (Bethke et al., 2004a). Se ha observado la síntesis no enzimática de NO en respuesta a giberelinas (GAs) y a ABA debido a que son hormonas que rápidamente acidifican el medio, aunque se desconoce si se trata de una vía extendida a los diferentes órganos de la planta o a todo el reino vegetal y cuál es su relevancia fisiológica en las diferentes etapas del crecimiento y desarrollo de la planta.

3.2.- Metabolismo del óxido nítrico en plantas.

Al igual que ocurre con otras moléculas con actividad biológica, la concentración de NO en las células depende tanto de su tasa biosintética, como de su eliminación o metabolismo (Figura I.3.). La eliminación de NO en las células no significa el fin de su actividad en los procesos de señalización, ya que los productos generados durante el proceso de eliminación, como el nitrito o el peroxinitrito, pueden ser elementos importantes en la señalización.

Debido a su naturaleza inestable, el NO reacciona rápidamente con el O₂ para formar nitrato y nitrito. El nitrito formado puede ser utilizado de nuevo como sustrato en la producción de NO mediante la acción de la NR, y tener también alguna actividad biológica *per se* (Gladwin et al., 2005). Así, en animales se ha descrito que el nitrito altera la expresión génica (Bryan et al., 2005), modifica la señalización por cGMP, inhibe la actividad del citocromo P450 e interviene en la nitrosilación de proteínas (Bryan et al., 2005; Gladwin et al., 2005; Bryan 2006).

El NO es un radical libre y como tal puede reaccionar con otros radicales libres existentes en las células. Tanto en plantas como en animales, el NO se produce en los mismos lugares y al mismo tiempo que las especies reactivas de oxígeno (ROS), como los aniones superóxido. Éstos pueden reaccionar con el NO de forma estequiométrica para dar lugar a peroxinitrito (ONOO⁻). Se ha descrito que, al contrario que en animales, las células vegetales son resistentes a ONOO⁻ (Delledonne et al., 2001), y además podría actuar en la señalización en plantas (Klotz et al., 2002; Minetti et al., 2002). Sin embargo, la presencia de aniones superóxido influye en la concentración de NO disponible que puede intervenir en procesos de señalización. El NO podría tener un papel clave en el

control de los niveles de ROS o viceversa. Vanin et al. (2004) sugieren que los niveles de síntesis de NO en las células están subestimados debido a que el NO reacciona rápidamente con aniones superóxido.

El NO también reacciona, de forma reversible, con glutatión (GSH) y con grupos tiol en residuos de cisteína de proteínas, dando lugar a proteínas S-nitrosiladas que pueden participar en la señalización (apartado 6.2.2.). El glutatión es un tripéptido cuya concentración en las células es elevada (2-3 mM) (Ball et al., 2004). El GSH suele encontrarse en su forma reducida, aunque puede convertirse en forma oxidada (GSSG), ya que existe un equilibrio reversible entre ambas. GSH es el principal compuesto antioxidante en las células, manteniendo el citoplasma en un estado reducido. El NO reacciona con GSH para formar glutatión S-nitrosilado (GSNO) que puede ser fundamental en la regulación de la concentración del NO en las células. Por otra parte, el GSNO puede ser metabolizado por la enzima GSNO reductasa (Díaz et al., 2003) siendo una enzima clave en el control de la actividad del NO y la formación de proteínas nitrosiladas que participan en procesos regulados por NO, como las respuestas de defensa frente a patógenos (Feechan et al., 2005).

De la misma forma que reacciona con grupos tiol, el NO interacciona con metales de transición, principalmente hierro, que frecuentemente se encuentra asociado a grupos hemo. Las hemoglobinas no simbióticas (nsHbs) pueden reaccionar con NO para formar nitrato en una reacción dependiente de NAD(P)H. Este proceso se ha descrito en alfalfa (*Medicago sativa*), cebada (*Hordeum vulgare*) y Arabidopsis (revisado por Perazzolli et al., 2006). Las Hbs permiten la detoxificación del NO y la evidencia más clara, es la utilización de plantas transgénicas que presentan modificaciones en los niveles de hemoglobina (Ahb1), de tal forma que alterando los niveles de Ahb1 en Arabidopsis se produce una variación inversa en los niveles de NO en la planta (Perazzolli et al., 2004).

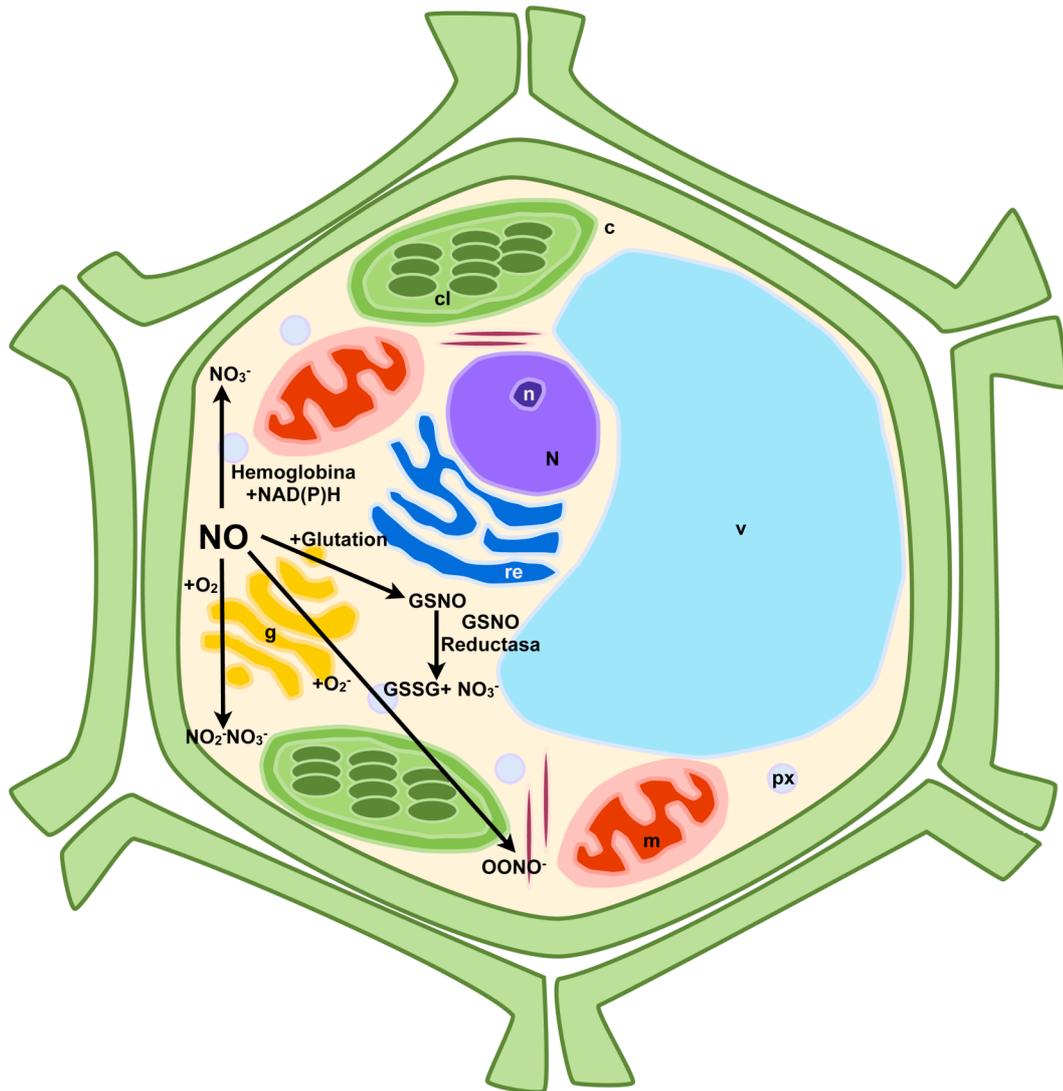


Figura I.3.- Eliminación y detoxificación de NO en plantas. GSNO: glutation S-nitrosilado, GSSG: glutation oxidado, NO: óxido nítrico, NO₂⁻: nitrito, NO₃⁻: nitrato, O₂: oxígeno, O₂⁻: superóxido, OONO⁻: peroxinitrito, c: citoplasma, cl: cloroplasto, g: aparato de Golgi, m: mitocondria, N: núcleo, n: nucleolo, px: peroxisomas, re: retículo endoplasmático, v: vacuola.

4.- EFECTOS FISIOLÓGICOS DEL ÓXIDO NÍTRICO EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO VEGETAL.

El NO es una molécula señalizadora que no va a participar de forma aislada en la activación de los procesos fisiológicos que regula, sino que lo hace interaccionando con las hormonas vegetales a lo largo del crecimiento y desarrollo de una planta.

4.1.- Dormición y germinación de semillas.

La dormición se define como la incapacidad para germinar de semillas viables aunque las condiciones ambientales sean favorables y se debe a las características intrínsecas de la propia semilla (Bewley, 1997). El establecimiento de la dormición está regulado genéticamente, aunque también depende de las condiciones ambientales, y su eliminación se puede producir por la presencia de determinadas señales como luz (Casal y Sánchez, 1998), bajas temperaturas (Bewley, 1997), hormonas (Koornneef et al., 2002), azúcares (Finkelstein y Gibson, 2002) y productos químicos como nitrato, nitrito, cianuro (CN⁻), acida sódica y fusicoccina (Taylorson y Hendricks, 1997).

Las giberelinas (GAs) y el ABA son hormonas vegetales que tienen una importante función en la regulación de la dormición (Grappin et al., 2000; Yamaguchi y Kamiya, 2001; Jacobsen et al., 2002). La influencia de estas hormonas en la dormición se ha estudiado mediante el uso de variedades mutantes de *Arabidopsis* deficientes en ABA y en GAs, comprobándose que estas hormonas intervienen en el establecimiento y mantenimiento del proceso de dormición y en la ruptura de la dormición, respectivamente (McCourt, 1999; Koornneef et al., 2000).

El NO está implicado en la ruptura de la dormición favoreciendo la germinación de las semillas. Se ha observado que usando compuestos que liberan NO, como el SNP, se produce la eliminación de la dormición de semillas de *Arabidopsis* (Batak et al., 2002; Bethke et al., 2004b), cebada (Bethke et al., 2004b), lechuga (*Lactuca sativa*) (Beligni y Lamattina, 2000) y *Paulonia imperial* (*Paulownia tomentosa*) (Giba et al., 1998). También se ha comprobado que los secuestradores específicos del NO, como el cPTIO, mantienen a las semillas en dormición, aunque no inhiben la germinación una vez que la dormición ha sido eliminada. Además, el cPTIO inhibe la rotura de la dormición estimulada por cianuro, nitrato y nitrito exógeno. Por su parte, la aplicación de NO gaseoso puro reduce la dormición de semillas de *Arabidopsis*, lo cual apoya la hipótesis de que el NO actúa inhibiendo la dormición y, debido a que la dormición de las semillas está íntimamente relacionada con la producción de ABA (Koornneef et al., 2002), sugiere la existencia de interacciones entre la señalización del ABA y la del NO.

La capa de aleurona en semillas de *Arabidopsis* presenta un papel importante en el mantenimiento de la dormición, siendo capaz de percibir y responder a estímulos como NO, GAs y ABA. En este proceso, el NO actúa por encima de las GAs, permitiendo la vacuolización de las células de la capa de aleurona, señal que indica la salida de la dormición (Bethke et al., 2007). En el endospermo de semillas de *Arabidopsis* se produce una rápida acumulación de NO durante las primeras horas de imbibición. Este aumento provoca una disminución en los niveles de ABA, dando lugar a la germinación de las semillas. Se ha demostrado que el NO actúa regulando el catabolismo del ABA, mediante la regulación de un gen que codifica la enzima (+)-ABA 8'-hidroxilasa que participa de forma activa en el catabolismo del ABA durante la imbibición (Liu et al., 2009).

Estudios más recientes corroboran la implicación del NO en la ruptura de la dormición. Se ha descrito que mutantes afectados en la síntesis o acumulación de NO, como el triple mutante *nia1;nia2;noa1-2* (con muy bajos niveles de NO), son hipersensibles al ABA, presentando mayor dormición que semillas del ecotipo silvestre (Lozano-Juste y León, 2010a; 2010b).

4.2.- Desarrollo de raíces y arquitectura radicular.

La raíz es el órgano de la planta que proporciona nutrientes y agua al resto del organismo, además de una sujeción física al sustrato que la rodea. Debido a esto, la arquitectura radicular debe adaptarse continuamente a un entorno cambiante mediante el desarrollo de la raíz primaria (PR) y la formación de raíces laterales (LR). Las LRs se producen a partir de las células del periciclo, que se desdiferencian y proliferan dando lugar a la emergencia de un nuevo meristemo (Malamy y Benfey, 1997).

Las auxinas son hormonas vegetales que están implicadas en el crecimiento de la PR y en la formación y desarrollo de LRs controlando específicamente procesos de división y elongación celular (Reed et al., 1998; Casimiro et al., 2001; Bhalerao et al., 2002; revisado por Casimiro et al., 2003; Malamy, 2005).

Estudios realizados en tomate (*Solanum lycopersicum*) demuestran que el NO inhibe el crecimiento de la PR y promueve la formación de LRs regulada por auxinas (Correa-Aragunde et al., 2004). El NO se acumula en las células del periciclo que darán lugar a las

LRs, lo que sugiere su implicación en los estadios más tempranos de su desarrollo. El NO actúa regulando la expresión de genes como la ciclina *CYCD3;1* o el inhibidor *KRP2* (Correa-Aragunde et al., 2006), que intervienen en la activación del ciclo celular durante la formación del primordio de las LRs en tomate (Correa-Aragunde et al., 2004, 2006). Esta respuesta se reduce en el mutante de la prohibitina, *phb3*, afectado en el cierre estomático inducido por ABA, debido a que acumula menos NO en respuesta a H_2O_2 (Wang et al., 2010). Por otra parte, se ha observado cómo el NO afecta de forma positiva o negativa al crecimiento de la raíz dependiendo de la concentración de dicho gas. Este comportamiento dual se ha descrito en raíces de *Arabidopsis* (He et al., 2004) y soja (Hu et al., 2005). Del mismo modo, la inducción del desarrollo de LR depende de la concentración de NO, de tal forma que concentraciones superiores a 500 μM de SNP (donador de NO) bloquean la emergencia de LR y, consecuentemente, disminuye su número (Casimiro et al., 2001).

El NO también participa en la formación de raíces adventicias. Las auxinas promueven el proceso de formación de raíces adventicias a través de la diferenciación de células que van a dar lugar a un nuevo meristemo apical. Estudios realizados en pepino han demostrado la participación de NO y cGMP en las respuestas a auxinas durante la formación de raíces adventicias (Pagnussat et al., 2002; 2003).

Otro componente importante en el sistema radicular son los pelos radicales. Estos son células especializadas cuya misión es incrementar el área de absorción de agua y la captación de nutrientes. El NO participa en las respuestas a auxinas incrementando el número y tamaño de pelos en plántulas de lechuga y promoviendo la elongación de los mismos en raíces de *Arabidopsis* (Lombardo et al., 2006).

4.3.- Etiolación y desarrollo del hipocotilo.

En ausencia de luz se produce un fenómeno conocido como etiolación, en el cual las plántulas carecen de clorofila y se produce un desarrollo prominente del eje embrionario conocido como hipocotilo. El crecimiento del hipocotilo en *Arabidopsis* se debe a una serie de eventos de elongación celular controlados, que en oscuridad comienzan desde la base (Gendreau et al., 1997). Este proceso de etiolación se ve

reducido debido a la adición, en oscuridad, de citoquininas (CK). Al realizar tratamientos con NO se obtienen resultados similares a la adición de CKs por lo cual, el NO podría actuar como un componente aguas abajo en la señalización de las CKs en este proceso (Lamattina et al., 2003). Al realizar tratamientos con SNP se observó una reversión parcial en el verdor de la planta en oscuridad, así como una reducción en la elongación del hipocotilo en plantas de lechuga y Arabidopsis (Beligni y Lamattina, 2000). Estudios realizados recientemente sugieren que la señalización mediada por ATP extracelular (eATP) y NO controla algunos de los componentes que intervienen en el mantenimiento del estado redox y la actividad de la NADPH oxidasa (NOX), regulando la elongación celular en el hipocotilo en condiciones de oscuridad (Tonón et al., 2010). También sugieren la posible participación, junto con eATP y NO, de reguladores del crecimiento como las auxinas y brasinoesteroides (BRs), los cuales previamente han sido descritos como reguladores del crecimiento del hipocotilo en oscuridad (De Grauwe et al., 2005).

4.4.- Crecimiento del tubo polínico.

El NO también puede actuar como un regulador del crecimiento y la orientación del tubo polínico. El crecimiento del tubo polínico solamente tiene lugar en ausencia de NO en el ápice del tubo, mientras que cuando éste se acumula se detiene el crecimiento. El mecanismo de actuación se produce a través de una ruta dependiente de cGMP (Prado et al., 2004; Feijó et al., 2004). Recientemente, se ha descrito su implicación en el proceso de comunicación entre el polen y el pistilo al realizar ensayos de polinización cruzada entre el mutante *atnos1* (con menor producción de NO y fertilidad reducida) y plantas silvestres, siendo el NO el que interviene en las señales del óvulo que van a dirigir la reorientación del tubo polínico (Prado et al., 2008).

La pérdida de la orientación en el crecimiento del tubo polínico se debe también a la falta de un gradiente de Ca^{2+} en el ápice (Pierson et al., 1996; Holdaway-Clarke y Hepler, 2003). Prado et al. (2008) proponen una interacción entre la señalización mediada por NO y por Ca^{2+} en este proceso.

4.5.- Transición floral.

El NO suprime la transición desde el estadio de crecimiento vegetativo a reproductivo, afectando a la expresión de genes reguladores de la floración (revisado por Crawford y Guo, 2005). El control de la transición floral en las plantas es esencial para maximizar su éxito reproductivo bajo condiciones favorables. La floración es un proceso complejo que depende de la integración de múltiples respuestas a variables tanto ambientales como endógenas. Debido a que el NO se produce tanto en respuestas a estímulos externos, como de forma constitutiva, las plantas integran ambas variables para determinar el momento en el cual se produce la floración, retrasándola. El estudio de mutantes que presentan una mayor acumulación de NO (*nox1*), así como la aplicación exógena de NO, revela un retraso del momento de la floración. Mientras que mutantes que producen menos NO (*nos1/nao1*) presentan una floración temprana (He et al., 2004).

Se han descrito en *Arabidopsis* cuatro vías de integración de señales para determinar el momento de floración (Simpson y Dean, 2002). Por una parte, se encuentran el fotoperiodo y la vernalización que van a integrar las señales externas, y por otro lado la vía autónoma y la ruta de las GAs, que son independientes de las señales ambientales (Mouradov et al., 2002). El NO participa regulando el fotoperiodo y la vía autónoma, ya que reprime la expresión de genes como *CONSTANS* (*CO*) y *GIGANTEA* (*GI*), e induce genes como *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) (He et al., 2004).

4.6.- Diferenciación del xilema.

El xilema representa el principal tejido conductor de agua, y junto con el floema constituyen el tejido vascular. El xilema es un tejido complejo formado por diferentes tipos celulares con protoplasma vivo o carente de él. Las células más características son las traqueidas, elementos no vivos, con paredes lignificadas y especializadas en el transporte de agua (Kozela y Regan, 2003). Uno de los procesos más importantes que contribuyen a la diferenciación del xilema es la muerte celular programada (Fukuda, 1996; Robert y McCann, 2000). Ésta se produce en las células que van a formar las traqueidas, junto con procesos de formación de pared celular secundaria y lignificación (Groover y Jones, 1999). Durante este proceso de xilogénesis se produce un flujo de Ca^{2+} en las células

provocando el colapso de las vacuolas y un aumento en enzimas hidrolíticas. También se produce la secreción de enzimas serín-proteasas y la proteólisis de la matriz celular para coordinar los procesos de síntesis de pared celular y muerte celular (Groover y Jones, 1999).

Se conoce muy bien la cascada de señalización que lleva a la muerte celular, pero aún se desconocen algunas de las señales que disparan este proceso. Se ha descrito anteriormente que el NO participa en la diferenciación celular y muerte celular programada (Wendehenne et al., 2001; Neill et al., 2003). El NO podría actuar regulando la muerte celular y la lignificación durante el proceso de xilogénesis ya que se acumula durante el proceso de diferenciación del xilema y es necesario para la formación de la pared celular secundaria (Gabaldon et al., 2005).

4.7.- Biosíntesis de celulosa.

La celulosa constituye el principal componente de las paredes celulares. En la pared celular primaria, la celulosa se deposita en células con capacidad de seguir creciendo y es un polímero muy importante en la determinación de la orientación en la expansión. Después de un periodo de expansión, algunas células desarrollan una segunda pared que les proporciona propiedades mecánicas, y van a formar parte, principalmente, de los componentes del xilema. Correa-Aragunde et al. (2008) han descrito la participación del NO en la síntesis de celulosa en tomate. En este trabajo se ha estudiado la incorporación de glucosa marcada con radiactividad a las cadenas de celulosa tras la aplicación exógena de NO mediante la utilización del donador SNP. Bajas concentraciones de NO (pmoles) aumentan la síntesis de celulosa, mientras que altas concentraciones (nmoles) reducen la formación de celulosa en la raíz. En aquellas plantas tratadas con concentraciones altas de NO, se reduce la longitud de la raíz, y esto viene acompañado de una reducción en la longitud de las células corticales, fenotipo observado en mutantes afectados en la síntesis de celulosa en Arabidopsis. En tomate se han identificado tres celulosa sintasas (CesA), cuyos niveles de expresión se ven reducidos después de tratamientos con NO a altas concentraciones, lo cual sugiere que el NO está

actuando a nivel trascricional en el proceso de síntesis de celulosa (Correa-Aragunde et al., 2008).

4.8.- Biosíntesis de clorofila.

El NO también está implicado en los procesos mediados por luz en plantas. Cuando se crecen plantas de cebada en oscuridad, éstas sufren un proceso de etiolación (apartado 4.3.). Estas plantas etioladas recuperan su color verde en presencia de luz. En este proceso interviene el NO endógeno favoreciendo la síntesis de clorofila. La adición de NO de forma exógena (SNP) acelera la recuperación del color verde de las plantas al producirse una mayor acumulación de clorofila y de proteínas del tilacoide (LHCII y PSIA/B), aumentando la eficacia del fotosistema II (PSII), mientras que el tratamiento con el secuestrador cPTIO retrasa este proceso (Zhang et al., 2006).

4.9.- Regulación de la percepción, homeostasis y disponibilidad de hierro.

El hierro (Fe) es un elemento esencial en varios procesos importantes para el desarrollo de las plantas, como la fotosíntesis, la respiración y la fijación del nitrógeno. Es muy abundante en el suelo, pero no está disponible para las plantas debido a que suele encontrarse en estado oxidado (Fe^{3+}) formando complejos insolubles. Por este motivo, las plantas deben desarrollar mecanismos que permitan captar el Fe del suelo.

El NO presenta gran afinidad por metales de transición y en plantas de maíz se ha demostrado que es capaz de evitar los síntomas de deficiencias que aparecen en condiciones de carencia de Fe (Graziano et al., 2002). Además, en plantas crecidas en concentraciones suficientes de Fe, aparecen síntomas de clorosis cuando se someten a tratamientos con cPTIO, que secuestra el NO endógeno (Graziano et al., 2002). Estas evidencias demuestran que el NO juega un papel importante en la nutrición del Fe, aumentando su disponibilidad en las plantas.

En condiciones de deficiencia de Fe se produce la acidificación del apoplasto, lo que podría producir la síntesis no enzimática del NO a partir de NO_2^- . Este NO puede aumentar la disponibilidad y absorción de Fe mediante dos mecanismos. Por una parte,

contribuye a la reducción del Fe^{3+} (forma insoluble) a Fe^{2+} , favoreciendo así su entrada en la planta. Por otra parte, puede formar complejos de dinitrosilación del hierro (DNICs) que parecen estar unidos a glutatión (Mulsch et al., 1993; Ueno y Yoshimura, 2000; Severina et al., 2003), lo que facilitaría el transporte del Fe a través de la membrana. Dentro de la célula, el complejo DNIC sería capaz de reciclar el Fe a partir de proteínas de Fe y ferritina (DiDonato et al., 2004; Takahashi et al., 2003; Pich et al., 2001).

4.10.- Nodulación.

El NO actúa en el proceso de nodulación como un intermediario en la señalización de las auxinas. En nódulos en formación de *Medicago truncatula* y *Medicago sativa* se produce una acumulación de NO, siendo ésta mayor en nódulos en los que hay una sobreproducción de IAA. El aumento de NO en los nódulos con una sobreproducción de IAA se debe a que la bacteria induce localmente la síntesis de NO producida por la planta. La adición de cPTIO produce una disminución en el número de nódulos en la raíz de plantas inoculadas con cepas de *Rhizobium* que producen más IAA y cepas control. La ausencia de NO inhibe la formación de nódulos y suprime el efecto de las auxinas en este proceso (Pii et al., 2007).

4.11.- Gravitropismo.

Las raíces de las plantas son gravitrópicas, ya que pueden responder a cambios en la orientación de la gravedad afectando al crecimiento de la raíz y provocando lo que se conoce como curvatura. En plántulas de soja (*Glycine max*) sometidas a cambios en la orientación se observa una distribución asimétrica en la acumulación de NO, siendo mayor la concentración en la zona más baja de la raíz. Las auxinas estimulan la formación de NO en raíces de soja, mientras que inhibidores del transporte de auxinas, como el ácido 1-N-naftilftalámico (NPA), inhiben la acumulación de NO. Esto sugiere la necesidad de un transporte lateral de auxinas para que se produzca una acumulación asimétrica de NO. Estos datos permiten concluir que el NO es necesario en la respuesta gravitrópica dependiente de auxinas en soja (Hu et al., 2005).

4.12.- Polaridad celular.

Al igual que ocurre en el crecimiento del tubo polínico (apartado 4.4.), el NO interviene en el crecimiento y orientación de las esporas. Salmi et al. (2007) propusieron que el NO podría tener un papel importante en la polaridad celular dirigida por la gravedad en la germinación de esporas del helecho *Ceratopteris richardii*, en una ruta dependiente de cGMP. La existencia de gradientes de Ca^{2+} permite el crecimiento polarizado de una espора debido a la influencia de la gravedad. El NO y el cGMP actúan como efectores, por debajo de la señal de Ca^{2+} , integrando la señal de gravedad para que se produzca un crecimiento polarizado en las esporas de *C. richardii* (Salmi et al., 2007).

4.13.- Senescencia de hojas y otros tejidos.

La senescencia de las hojas es un proceso degenerativo dentro del desarrollo de la planta, que se induce por señales exógenas como déficit de luz y de agua, y está regulado por factores endógenos como etileno (ET) y CKs (Dangl et al., 2000; Buchanan-Wollaston et al., 2003; Lim et al., 2003; Yoshida, 2003; Lin y Wu, 2004).

El NO retrasa la senescencia de hojas y frutos y la maduración de frutos. En tejidos aéreos se ha demostrado la existencia de una relación inversa entre la producción de ET y de NO (Leshem y Pinchasov, 2000), de forma que un incremento en los niveles de NO, ya sea a través de un aporte exógeno o por una producción endógena, disminuye la concentración de ET y se retrasa la aparición de los síntomas relacionados con la senescencia, como la pérdida de clorofila, proteínas y ácidos nucleicos. Por otra parte, los experimentos realizados con el mutante *nos1/nao1* (deficiente en NO) indican que NOS1/NOA1 protege a las plantas de la senescencia inducida por oscuridad ya que, en condiciones de oscuridad, el mutante *nos1/nao1* presenta mayor senescencia y pérdida de clorofila que el tipo silvestre. Además, el aporte exógeno de NO mediante donadores como el SNP, reduce la senescencia inducida por oscuridad y la pérdida de la clorofila en el mutante *nos1/nao1* (Guo y Crawford, 2005).

5.-PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN RESPUESTA A ESTRESSES BIÓTICOS Y ABIÓTICOS.

5.1.- Patógenos.

Uno de los efectos del NO mejor conocido en plantas es la respuesta frente a patógenos. Las plantas han desarrollado sofisticados mecanismos de defensa para hacer frente a los ataques de patógenos (Dangl y Jones, 2001), dentro de los cuales destacan la Respuesta Hipersensible (HR), que se lleva a cabo en el lugar de invasión del patógeno y la Respuesta Sistémica Adquirida (SAR), que tiene lugar en zonas diferentes a las afectadas por el patógeno. La presencia de un patógeno avirulento desencadena una rápida producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que inician la HR y regulan la cascada de señalización involucrada en el establecimiento de la SAR (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998). El aumento en los niveles de ROS va acompañado de un aumento en NO (Romero-Puertas et al., 2004), que se produce antes del comienzo de la muerte celular (Delledonne et al., 1998). Se ha observado que los lipopolisacáridos (LPS), tanto de patógenos de plantas como de animales, inducen un rápido y fuerte incremento en los niveles de NO en *Arabidopsis*, siendo esta síntesis de NO dependiente de la actividad de AtNOA (Zeidler et al., 2004). El NO podría además tener un papel importante en la transmisión de la HR de célula a célula, como se ha observado en avena infectada con cepas avirulentas de *Puccinia coronata* (Tada et al., 2004). ROS y NO también colaboran en la muerte del patógeno mediante la formación de peroxinitrito (ONOO⁻), que es muy tóxico y puede actuar induciendo la HR (Delledonne et al., 2001) (Figura I.4.).

Por otra parte, en las respuestas de las plantas frente a patógenos hay una relación entre el NO y el ácido salicílico (SA) (Figura I.4.). El tratamiento con NO aumenta los niveles endógenos de SA (Durner et al., 1998; Huang et al., 2004), que es necesario para la expresión de proteínas relacionadas con la patogénesis (*PRI*) y probablemente también de la fenilalanina amonio liasa (*PAL*), los cuales son dependientes de NO (Durner et al., 1998). El SA induce genes de defensa que son activos durante la SAR, y esta SAR inducida por SA se ve atenuada cuando se aplican inhibidores de NOS o secuestradores de NO (Song y Goodman, 2001). Por tanto, el NO estaría involucrado

en la síntesis y acción del SA, aunque también hay estudios que indican que el NO necesita SA para llevar a cabo su acción (Song y Goodman, 2001).

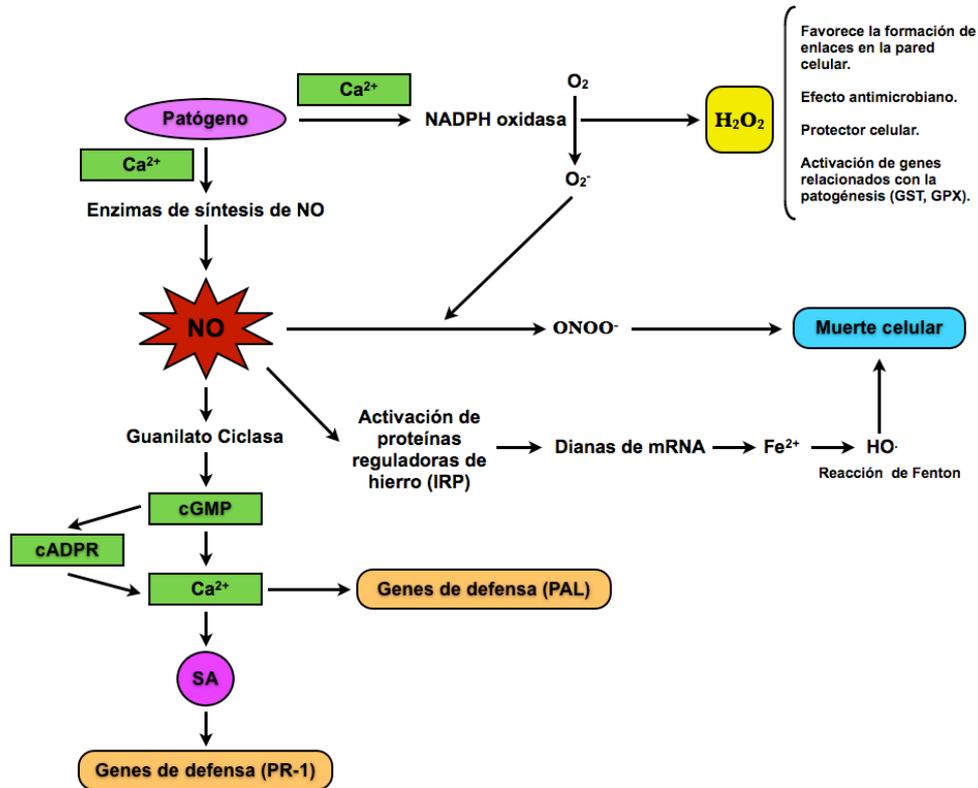


Figura I.4.- Papel del NO en la regulación de la señalización de las respuestas de defensa frente a patógenos de plantas (figura adaptada de Wendehenne et al., 2001; Delledonne, 2005). GPX: glutatión peroxidasa, GST: glutatión S-transferasa, PAL: fenilalanina amonio liasa, PR1: proteína relacionada con la patogénesis, H_2O_2 : peróxido de hidrógeno, ONOO^- : peroxinitrito, SA: ácido salicílico.

El NO también puede actuar protegiendo a las células del estrés oxidativo producido por la presencia de ROS, como la muerte celular inducida en capas de aleurona por las GAs (Beligni et al., 2002). El mecanismo mediante el cual el NO ejerce este efecto no se conoce con exactitud, pero se sabe que el NO protege a las células de las lesiones y la toxicidad producida por ROS mediante el incremento de los niveles de proteínas con función protectora, incluyendo catalasas, superóxido dismutasa, glutatión S-transferasa y oxidasas (Beligni et al., 2002; Huang et al., 2002; Polverari et al., 2003) (Figura I.4.).

Recientemente, se han descrito proteínas, tanto nitrosiladas como nitradas, involucradas en las respuestas de defensa frente a patógenos (Romero-Puertas et al., 2008; Cecconi et al., 2009). Entre las 16 proteínas S-nitrosiladas bajo condiciones de HR a un patógeno (Romero-Puertas et al., 2008), se encuentran enzimas que participan en el metabolismo y la señalización, y enzimas antioxidantes (apartado 6.2.2.). Sin embargo, entre las proteínas nitradas se encuentran proteínas involucradas en procesos celulares importantes tales como fotosíntesis, glicólisis y asimilación de nitrato (apartado 6.2.1.).

5.2.- Estreses abióticos.

La mayoría de los estreses abióticos producen un aumento rápido en los niveles de NO en la planta que aminora el efecto nocivo de las especies reactivas de oxígeno (ROS). El NO también reacciona con otras moléculas diana y regula la expresión de genes de respuesta a diferentes condiciones de estrés (revisado por Qiao y Fan, 2008).

5.2.1.- Papel del óxido nítrico en respuesta a sequía: regulación del cierre estomático.

La sequía es uno de los factores más importantes que limitan la productividad de los cultivos. La falta de agua promueve la producción de NO en guisante y tabaco (Leshem y Haramaty, 1996; Gould et al., 2003). El movimiento estomático es fundamental en la regulación de la pérdida de agua por transpiración y del intercambio gaseoso necesario en la fotosíntesis, y está regulado por ABA. El ABA se acumula en las células guarda en respuesta a un déficit hídrico y cambia los flujos iónicos, dando lugar a un aumento del contenido hídrico y de la turgencia de las células guarda, lo que produce el cierre estomático (Bray, 1997). Tras la unión del ABA a sus receptores específicos, se desencadena una cascada de señalización en la cual se produce la activación de canales iónicos y producción de segundos mensajeros, como cADPR e inositol trifosfato, que dan lugar al aumento del Ca^{2+} en el citosol (Schroeder et al., 2001).

Tabla I.2.- Resumen del papel del NO en las respuestas a estreses abióticos.

Estrés	Papel del NO	Especie	Referencia	
Sequía/estrés osmótico	- Involucrado en la señalización por ABA, cierre estomático.	<i>Nicotiana tabacum</i>	Gould et al., 2003.	
	- Inducción de la síntesis de ABA, expresión de proteínas LEA.	<i>Pisum sativum</i> <i>Vicia faba</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	Leshem y Haramaty, 1996. Desikan et al., 2002.	
	Salinidad	- Aumento de la tolerancia osmótica. - Inducción de genes <i>antiport</i> Na ⁺ /H ⁺ .	<i>N. tabacum</i> <i>Oryza sativa</i> <i>Arabidopsis</i> <i>Zea mays</i>	Gould et al., 2003. Uchida et al., 2002. Guo et al., 2003. Zhang et al., 2006.
Daño mecánico	- El aumento de NO provoca muerte celular.	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Taxus brevifolia</i>	Garces et al., 2001. Pedroso et al., 2000.	
	-Aumento de la expresión del gen <i>IPO</i> .	<i>Ipomea batatas</i>	Imanishi et al., 1997.	
	-Inhibición de la síntesis de H ₂ O ₂ .	<i>Solanum lycopersicum</i>	Orozco-Cardenas y Ryan, 2002.	
Elevada temperatura	Aumento de la tolerancia en plántulas; rápida producción de NO.	<i>Medicago sativa</i> <i>N. tabacum</i> <i>O. sativa</i>	Leshem et al., 1998. Gould et al., 2003. Uchida et al., 2002.	
	Baja temperatura	Descenso en los niveles de ROS.	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Mallick et al., 2000.
		Aclimatación.	<i>A.thaliana</i>	Zhao et al., 2009.
Herbicidas	Promueve la actividad de enzimas antioxidantes.	<i>S. obliquus</i>	Mallick et al., 2000.	
		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Sakihama et al., 2002.	
Radiación UV-B	- Induce la expresión de la chalcona sintasa (CHS).	<i>A. thaliana</i> <i>Z. mays</i>	Mackerness et al., 2001. Zhang et al., 2003.	
	- Aumento de la actividad NOS.			
Toxicidad por metales pesados	- En presencia de Al ³⁺ reduce la actividad NOS.	<i>Hibiscus moscheutos</i>	Tian et al., 2007.	
	- Aumento de la actividad SOD. Efecto detoxificante y antioxidante.	<i>Lupinus luteus</i> <i>Glycine max</i>	Kopyra y Gwozdz, 2003. Singh et al., 2004.	

El NO también es esencial en el cierre estomático inducido por ABA (Neill et al., 2002a). Se ha observado un incremento en la síntesis de NO en respuesta a ABA en células guarda de *Arabidopsis*, guisante (*Pisum sativum*) y judía (*Vicia faba*) (Desikan et al., 2002; García-Mata y Lamattina, 2002; Neill et al., 2002a, 2003), aunque el mecanismo de esta inducción es aún desconocido. El uso de donadores de NO ha permitido observar que el NO exógeno produce el cierre estomático y reduce la transpiración en numerosas especies, como judía, *Salpichroa organifolia*, *Tradescantia* sp. (García-Mata y Lamattina, 2001), guisante, tomate, cebada, trigo (*Triticum sativum*) y *Arabidopsis* (Desikan et al., 2002; Neill et al., 2002a). Además, la adición de cPTIO como secuestrador del NO inhibe el cierre estomático inducido por ABA, lo cual indica la importancia del NO endógeno en este proceso (Desikan et al., 2002; García-Mata y Lamattina, 2002; Neill et al., 2002a; Bright, 2006). Por otra parte, en mutantes que acumulan menos NO, *atnoa1* y *nia1;nia2*, no tiene lugar un aumento en la producción de NO inducido por ABA, ni el cierre estomático inducido por esta misma hormona (Desikan et al., 2002). Sin embargo, el triple mutante *nia1;nia2;noa1-2* obtenido por Lozano-Juste y León (2010a), presenta una mayor resistencia a la deshidratación y tolerancia a la sequía debido a su elevada eficiencia en el cierre estomático.

El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) también juega un papel importante en el cierre estomático inducido por ABA. En judía la exposición a H₂O₂ exógeno aumenta los niveles Ca²⁺ y produce el cierre estomático (McAinsh et al., 1996), y en *Arabidopsis*, al tratar células guarda con ABA se produce un aumento en la síntesis de H₂O₂ y el cierre estomático (Pei et al., 2000). Este aumento en la síntesis de H₂O₂ estimula la acumulación de NO en las células guarda y el cierre estomático (García-Mata y Lamattina, 2001, 2002; Desikan et al., 2004; Bright et al., 2006; Neill et al., 2008). Al realizar una búsqueda de mutantes afectados en la síntesis de NO inducida por H₂O₂, se ha encontrado un mutante de la prohibitina (*phb3*), afectado en el cierre estomático inducido por ABA (Wang et al., 2010). PHB3 podría actuar regulando los niveles de NO en las plantas y la señalización mediada por este gas.

La principal fuente de NO en este proceso es la enzima NR, ya que al tratar células guarda de *Arabidopsis* con nitrito se induce la síntesis de NO dando lugar al cierre estomático, y al secuestrar el NO mediante cPTIO se inhibe la acumulación de NO y el

cierre estomático que se produce en respuesta a nitrito (Desikan et al., 2002). Además los inhibidores de la NOS no impiden la síntesis de NO inducida por ABA ni el cierre estomático en células de la epidermis de Arabidopsis (Desikan et al., 2002). Estos datos se han confirmado en los mutantes *nia1* y *nia2*, que son deficientes en la enzima NR y no presentan síntesis de NO ni cierre estomático inducido por ABA (Desikan et al., 2002). Pero como se ha comentado en el apartado 4., parece ser NIA1 la que presenta una actividad real en la síntesis de NO durante el cierre estomático inducido por ABA (Bright, 2006).

5.2.2.- Papel del óxido nítrico en respuesta a estrés salino.

Se ha descrito la participación del NO en los procesos de tolerancia al estrés salino en diferentes especies de plantas. En arroz, el NO protege a la planta del estrés provocado por la concentración de sales, aumentando su viabilidad y crecimiento en aquellas plantas tratadas previamente con SNP (Uchida et al., 2002). En plántulas de maíz sometidas a condiciones de estrés salino el NO aumenta su crecimiento y peso (Zhang et al., 2006). El mutante *atnoa1* de Arabidopsis, con niveles bajos de NO endógeno, presenta mayor sensibilidad al estrés por NaCl (Guo et al., 2003; Zhao et al., 2007b). Cuando se crecen plántulas de Arabidopsis de ecotipo silvestre bajo condiciones de estrés provocado por NaCl, estas presentan una tasa de supervivencia mayor que plántulas del mutante *atnoa1*. Además, el mutante contiene niveles elevados de peróxido de hidrógeno, tanto en condiciones control como de estrés salino. Esto sugiere que el mutante *atnoa1* es más vulnerable al estrés oxidativo y salino (Zhao et al., 2007a).

El mutante *atnoa1* presenta una mayor relación Na^+/K^+ que plántulas silvestres sometidas a concentraciones elevadas de NaCl, mientras que el tratamiento con SNP atenúa el aumento en Na^+/K^+ (Zhao et al., 2007b). Zhang et al. (2004) proponen que el NO aumenta la tolerancia al estrés salino en plántulas de maíz a través de un incremento en la acumulación de K^+ en raíces y hojas, mientras que el Na^+ la disminuye. Estudios posteriores sugieren que el tratamiento con NO y NaCl estimula la actividad de H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa en las vacuolas, produciéndose un incremento en la translocación de H^+ y el intercambio Na^+/H^+ (Zhang et al., 2006). El NO podría aumentar la tolerancia a

las sales incrementando la expresión de genes que codifican proteínas de membrana plasmática que actúan como canales de Na^+/H^+ , y genes que codifican proteínas con actividad H^+ -ATPasa, necesarios para la homeostasis del Na^+ y la adquisición de K^+ (Qiao y Fan, 2008).

5.2.3.- Papel del óxido nítrico en respuesta a herida.

El NO también participa en las respuestas a heridas en plantas. Se ha descrito un rápido incremento en los niveles de NO en respuesta a herida (Jih et al., 2003; Huang et al., 2004). Asimismo, se observa un aumento en la expresión de enzimas claves en la ruta de síntesis del jasmónico (JA), como son *AOS*, *LOX2* y *OPR3* (Huang et al., 2004). Sorprendentemente, esta inducción no se ve reflejada en una mayor acumulación de JA o en una inducción de genes de respuesta a JA, como *PDF1.2*. Una posible explicación a este hecho es la existencia de un papel antagonista del SA, descrito anteriormente (Farmer et al., 1998; Glazebrook, 2001). Así, el NO actúa incrementando los niveles de SA en la planta (Durner et al., 1998; Durner y Klessig, 1999; Huang et al., 2004). Utilizando plantas deficientes en SA, *NahG*, tratadas con NO se detecta mayor acumulación de JA y la inducción de genes de respuesta a éste (*PDF1.2* y *JIP*).

Se ha estudiado esta respuesta en otras especies de interés económico como la batata y el tomate. En la batata se produce un aumento de la expresión del gen *Ipomoelina* (IPO) en respuesta a JA y a herida mecánica (Imanishi et al., 1997). Aunque se produce una mayor acumulación de NO y H_2O_2 inmediatamente después de producirse una herida, en presencia de SNP se retrasa la inducción de IPO en respuesta a herida (Jih et al., 2003). Los autores de este trabajo sugieren dos importantes efectos del NO en las respuestas inducidas por una herida: (1) comienzo de la muerte celular junto con el H_2O_2 y (2) retraso en la expresión de IPO. Esta interpretación es contradictoria a lo publicado por Tada et al. (2004), que describe que el NO juega un papel importante en la propagación de la muerte celular, pero no en su comienzo.

En tomate, sin embargo, el NO inhibe la síntesis de H_2O_2 en respuesta a herida y la expresión de genes de defensa inducidos por JA (Orozco-Cardenas y Ryan, 2002). Así, el NO actúa por debajo de la síntesis de JA y por encima de la producción de H_2O_2 (Jih et

al., 2003). Estos resultados contradictorios se correlacionan con los estudios realizados sobre las respuestas a herida en *Arabidopsis* y Solanáceas (León et al., 2001).

5.2.4.- Papel del óxido nítrico en respuesta a temperaturas extremas.

Las elevadas temperaturas producen un aumento rápido en los niveles de NO en hojas y suspensiones celulares de tabaco (Gould et al., 2003). También se ha descrito un aumento en la producción de NO en respuesta a altas temperaturas en alfalfa (Leshem, 2001). El uso de donadores de NO reduce el daño provocado por las altas temperaturas en plántulas de arroz y previene los daños que puedan aparecer en el fotosistema II (PSII) (Uchida et al., 2002). Además, la adición de NO de forma exógena aumenta la tasa de supervivencia de plántulas de trigo y maíz sometidas a estrés térmico (Lamattina et al., 2001). Esta respuesta del NO a temperaturas extremas puede deberse a la disminución de los niveles de ROS en la planta por las elevadas o bajas temperaturas (Neill et al., 2002b). Estudios recientes sugieren que durante el proceso de aclimatación al frío se produce un aumento en la síntesis de NO mediada por la NR, debido a un aumento en la expresión de *NIA1*. Esta mayor concentración de NO permite una acumulación de Prolina (Pro) que confiere tolerancia al frío (Zhao et al., 2009).

5.2.5.- Papel del óxido nítrico en respuesta a herbicidas.

El NO disminuye la toxicidad provocada por los herbicidas. En el caso del diquat, el NO protege de los efectos en la membrana de los cloroplastos, y la pérdida de clorofila causada por este herbicida se revierte al utilizar donadores de NO, como SNP (Beligni y Lamattina, 1999). El paraquat provoca una pérdida en el contenido proteico, que se revierte por la adición de NO de forma exógena. También mejora la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), peroxidasas (POD) y glutathion reductasas (GR) en plantas sometidas a estrés por paraquat (Huang et al., 2002).

5.2.6.- Papel del óxido nítrico en respuesta a radiación UV-B.

El NO también está implicado en las respuestas a estrés por luz UV-B, produciéndose un bloqueo en la inducción de la expresión del gen que codifica la chalcona sintasa (CHS) en presencia de inhibidores de la NOS y secuestradores de NO (Mackerness et al., 2001). En hipocotilos de maíz se produce un aumento de la actividad NOS en respuesta a luz UV-B, lo cual sugiere la participación del NO como segundo mensajero y lleva a cabo un efecto antioxidante (Zhang et al., 2003; An et al., 2005).

5.2.7.- Papel del óxido nítrico en respuesta al estrés provocado por metales pesados.

En este caso, el NO provoca un aumento en la actividad de enzimas antioxidantes, especialmente la superóxido dismutasa (SOD). Mediante microscopía confocal se ha observado una disminución de la fluorescencia debida a O_2^- en raíces de *Lupinus luteus* sometidas a estrés por la presencia de metales pesados (Kopyra y Gwozdz, 2003), lo cual sugiere que el NO puede secuestrar O_2^- , provocando una disminución en los aniones superóxido. También se ha estudiado el efecto detoxificante y antioxidante en cultivos celulares de soja expuestos a cadmio y cobre tratados con *Chlorella* (Singh et al., 2004). Recientemente, se ha descrito que el NO aminora la toxicidad producida por el Al^{3+} en la elongación de la raíz en *Hibiscus moscheutos* (Tian et al., 2007).

6.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR ÓXIDO NÍTRICO: SEÑALIZACIÓN Y MECANISMOS DE RESPUESTA.

El NO regula la expresión de numerosos genes en células animales mediante diferentes mecanismos, dentro de los cuales se puede destacar la interacción con receptores, la regulación de la actividad de factores de transcripción tales como NF- κ B (Lander et al., 1993), o la intervención en la estabilidad o traducción del mRNA (Wang et al., 2008). En plantas se han identificado, mediante análisis a gran escala, genes cuya expresión está regulada por NO (Grün et al., 2006). Concretamente, en *Arabidopsis* se han identificado 342 genes regulados por NO (Huang et al., 2002; Polverari et al., 2003;

Parani et al., 2004; Ahlfors et al., 2009; Besson-Bard et al., 2009). Un número menor de genes se ha identificado en raíces de *Arabidopsis*, en las cuales el mayor porcentaje de estos genes regulados por NO están reprimidos (Badri et al., 2008). La mayoría de los genes regulados por NO codifican proteínas relacionadas con las respuestas de defensa, incluida la muerte celular, el metabolismo, la detoxificación celular, el transporte, la homeostasis del hierro, la señalización, la floración y la biosíntesis de lignina (Polverari et al., 2003; He et al., 2004; Parani et al., 2004). También participa en la regulación de la síntesis de hormonas como el SA, el JA y el ET (Huang et al., 2004; Parani et al., 2004). Dentro de estos genes regulados por NO podemos destacar:

✱ **Genes relacionados con las respuestas de defensa:** el NO regula la expresión de genes que codifican las proteínas PAL y PR1 (Parani et al., 2004) (Figura I.4.). Se ha detectado la acumulación de PAL y PR1 en suspensiones celulares de tabaco tratadas con análogos de cGMP. La activación de estos genes de defensa se produce a través de cGMP, ya que su expresión puede suprimirse mediante inhibidores de la guanilato ciclasa (Durner et al., 1998).

✱ **Genes relacionados con la muerte celular:** la muerte celular inducida por NO requiere procesamiento del RNA y síntesis de proteínas (Clarke et al., 2000), y dispara un proceso activo en el cual las proteasas parecen tener un papel esencial. En suspensiones celulares de soja se ha observado que las proteasas sensibles a cisteína son reguladores esenciales en la muerte celular (Belenghi et al., 2003) y, en *Arabidopsis*, los genes que codifican cisteín-proteasas son inducidos por NO (Polverari et al., 2003).

✱ **Genes relacionados con la homeostasis del hierro:** el NO induce la expresión del gen que codifica la ferritina, proteína que actúa como reservorio de hierro en hojas de *Arabidopsis* (Murgia et al., 2002). El NO actúa a través de la proteína reguladora de hierro (IRP) que es un factor de transcripción capaz de regular la expresión del gen de la ferritina.

✱ **Genes relacionados con la floración:** se ha descrito que el NO inhibe la expresión de los genes *CONSTANS* (CO) y *GIGANTEA* (GI). Sin embargo, induce genes como *FLOWERING LOCUS C* (FLC) (He et al., 2004).

* **Genes mitocondriales:** el NO puede activar la respiración induciendo la transcripción del gen que codifica la oxidasa alternativa (AOX) (Huang et al., 2002).

* **Genes de cloroplastos:** el NO produce un aumento en la producción de enzimas antioxidantes induciendo genes que codifican la superóxido dismutasa (SOD), catalasas o ascorbato peroxidasa, y que contribuyen a la reducción de los daños provocados por los altos niveles de H₂O₂ (Shi et al., 2005).

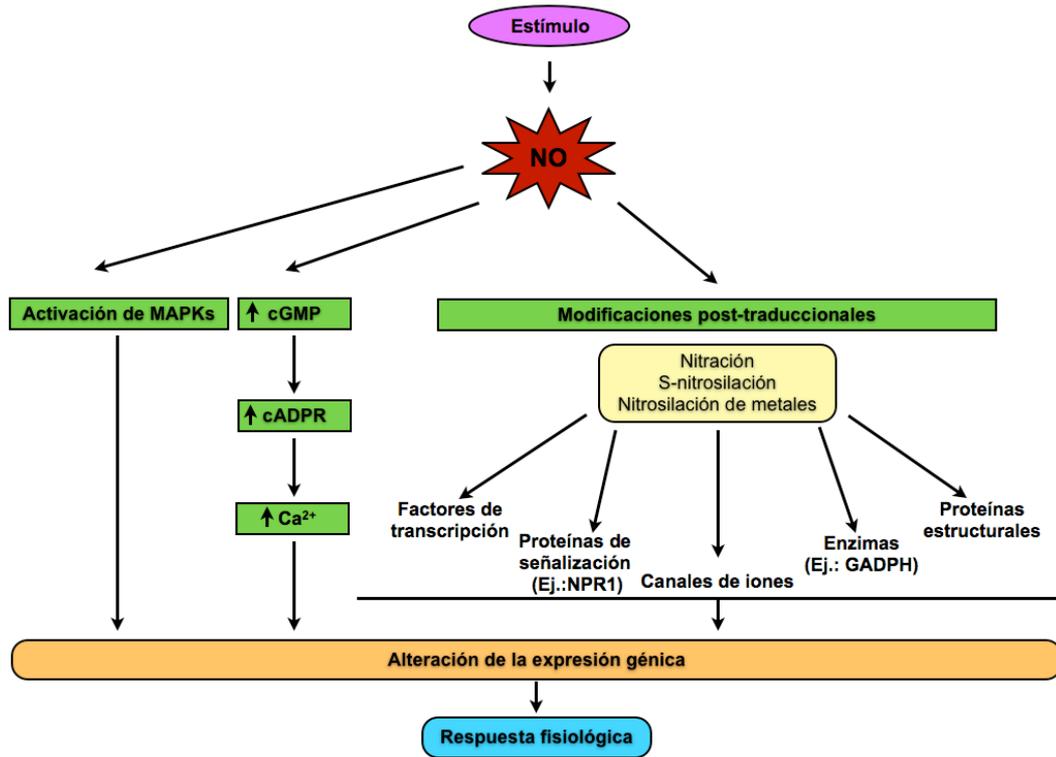


Figura I.5.- Posibles mecanismos de señalización mediada por NO en plantas (figura adaptada de Wilson et al., 2008; Moreau et al., 2009).

Las actividades biológicas del NO son numerosas y complejas, y el mecanismo por el cual esta molécula regula la expresión de genes no está del todo aclarado, no habiendo, hasta el momento, evidencias de la existencia de elementos *cis* en la región promotora de genes eucariotas de respuesta a NO. Por comparación con las vías descritas anteriormente en animales (Ahern et al., 2002), en plantas se han propuesto dos vías

principales para la señalización mediada por NO: una vía indirecta, en la cual el NO podría actuar a través de la activación de la guanilato ciclasa (GC), que produce cGMP como segundo mensajero; o una vía directa, a través de modificaciones post-traduccionales dentro de las cuales destacan la S-nitrosilación y la nitración (Figura I.5.).

6.1.- Señalización mediada por cGMP, cADPR, Ca²⁺ citosólico y MAPKs.

La GC es un componente esencial en la señalización del NO en animales. La unión del NO al grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble (SGC) activa a la enzima e incrementa el cGMP. Este aumento en los niveles del segundo mensajero altera la actividad de proteínas como fosfodiesterasas, proteín-kinasas dependientes de cGMP y canales iónicos que se abren en respuesta a nucleótidos cíclicos (CNGCs) (Beck et al., 1999). El cGMP puede actuar aumentando la síntesis de cADPR, que en células animales funciona como un segundo mensajero estimulando la liberación de Ca²⁺ intracelular, lo cual da lugar a la activación de canales de calcio sensibles a rianodina o receptores de rianodina (RyRs) en el retículo endoplasmático (Ahern et al., 2002), en un proceso en el que también intervienen proteín-kinasas dependientes de cGMP (Willmott et al., 1996; Reyes-Harde et al., 1999). Los RyRs son una familia de canales intracelulares de Ca²⁺ que tienen un papel importante en las funciones neuronales reguladas por NO (Reyes-Harde et al., 1999). El NO también puede regular la activación de RyRs mediante nitrosilación (Xu et al., 1998). Por su parte, los CNGCs se activan directamente por la unión de cGMP. Estos canales se encuentran en la membrana plasmática participando en la cascada de transducción de sistemas sensoriales como la visión, el tacto y el olfato (Zagotta y Siegelbaum, 1996; Gibson y Garbers, 2000). En plantas, hay evidencias que sugieren la existencia de una cascada de señalización regulada por NO que es comparable a la de animales, aunque aún no se ha demostrado la existencia de una GC sensible a NO. Ludidi y Gehring (2003) observaron como la GC de Arabidopsis, AtGC1, no se activa por NO. El uso de compuestos farmacológicos inhibidores de la GC en animales ha sido de gran utilidad en plantas, ya que ha permitido demostrar la participación de cGMP en las cascadas de transducción de señales mediadas por NO. El NO produce un aumento en los niveles de algunos componentes implicados en la señalización, como son cGMP, cADPR y Ca²⁺ citosólico (Durner et al., 1998;

Wendehenne et al., 2001; Garcia-Mata et al., 2003). Así, se ha observado que el cierre estomático en respuesta a ABA requiere concentraciones elevadas de Ca^{2+} citosólico (Allen et al., 2000), el cual es necesario para que el H_2O_2 y el NO lleven a cabo su acción en las células guarda. El NO induce la liberación de Ca^{2+} en las células guarda por una vía dependiente de cGMP y cADPR. El proceso conduce a un aumento de la concentración del Ca^{2+} citosólico mediante la activación de canales de salida de Cl^- y la inhibición de canales de entrada de K^+ , que son dependientes de Ca^{2+} , lo cual contribuye a la pérdida de solutos en las células guarda produciendo el cierre del poro estomático (García-Mata y Lamattina, 2001, 2002, 2003; García-Mata et al., 2003).

Al igual que ocurre con otras hormonas vegetales, el NO activa las cascadas de señalización a través de proteín-kinasas activadas por mitógeno (MAPKs) (Kumar y Klessig, 2002; Pagnussat et al., 2004). Los estudios farmacológicos sugieren que el cierre estomático inducido por ABA y por H_2O_2 está regulado por MAPKs (Burnett et al., 2000; Desikan et al., 2004). El H_2O_2 es capaz de activar MAPKs en cultivos celulares, hojas y protoplastos de *Arabidopsis* (Neill et al., 2002b), y el tratamiento con NO puede provocar la activación transitoria de estas kinasas. Esto sugiere que el ABA, el H_2O_2 y el NO actúan sobre las MAPKs que participan en la regulación del cierre estomático (Desikan et al., 2003). En este proceso también intervienen proteín-fosfatasa, responsables de procesos de desfosforilación que pueden tener importancia en el cierre estomático inducido por ABA (Schroeder et al., 2001). Las proteín-fosfatasa de tipo 2C, ABI1 y ABI2, son reguladores negativos en las rutas de señalización del ABA (Merlot et al., 2001). En las células guarda de *Arabidopsis*, ABI1 actúa por encima de la síntesis de H_2O_2 y ABI2 actúa por debajo (Murata et al., 2001). Por su parte, el NO también está involucrado en esta cascada de señalización. En los mutantes *abi1-1* y *abi2-1*, que son insensibles al ABA y no presentan la respuesta de cierre estomático, se produce la síntesis de NO en respuesta a ABA. En este caso, las fosfatasa ABI1 y ABI2 podrían actuar por debajo de la síntesis de NO, ya que se ha observado que el tratamiento con el donador de NO SNP no induce el cierre estomático en los mutantes afectados en estas proteínas (Desikan et al., 2002).

Hay evidencias de que en la formación de raíces adventicias se produce la activación de una cascada de MAPKs que parece ser independiente de cGMP, ya que la

actividad *in vitro* de las MAPKs inducidas por NO no es afectada por los inhibidores de la guanilato ciclasa como LY83583. Por lo tanto, estos inhibidores no afectan a la actividad de las MAPKs inducidas por NO, pero sí pueden prevenir la formación de raíces adventicias inducidas por NO (Pagnussat et al., 2003). Sin embargo, la activación de la ruta de MAPKs no es suficiente para la formación de raíces adventicias, lo que sugiere que el NO puede activar dos rutas diferentes, una dependiente de cGMP y otra independiente, en la cual estaría involucrada la cascada de MAPK. Estas dos rutas parecen necesarias para iniciar la formación de raíces adventicias en pepino, ya que si alguna de éstas se bloquea no se lleva a cabo el proceso (Pagnussat et al., 2004).

6.2.- Modificaciones post-traduccionales del óxido nítrico: Nitrosilación y Nitración de proteínas.

El NO, debido a su elevada reactividad, es capaz de unirse a proteínas dando lugar a modificaciones post-traduccionales, lo cual le permite ejercer diversas funciones en los organismos. El NO puede llevar a cabo, directa o indirectamente, dos tipos de modificaciones dependiendo del aminoácido con el que interactúe. Si el aminoácido afectado es una tirosina, el proceso se conoce como nitración. Mientras que en el caso de que el aminoácido afectado sea una cisteína, nos encontramos ante un proceso de nitrosilación.

6.2.1.- Nitración.

La nitración de la tirosina se produce cuando se sustituye un átomo de hidrógeno de una tirosina por un grupo nitro, dando lugar a la formación de 3-nitrotirosina. Este proceso se produce por la presencia de NO y el radical superóxido que reaccionan rápidamente dando lugar a peroxinitrito, que participa directamente en la nitración de la tirosina (van der Viet et al., 1997). La nitración de residuos de tirosina puede alterar la conformación y estructura de la proteína, su actividad catalítica y/o su susceptibilidad a la digestión por proteasas, y podría interferir en las cascadas de fosforilación debido a la nitración de residuos de tirosina en proteínas diana de tal forma que competiría

directamente con la fosforilación de dichos residuos, como ocurre en animales (Monteiro et al., 2008).

En plantas, este proceso parece tener un papel fisiológico relevante durante los estreses biótico y abiótico (Saito et al., 2006; Romero-Puertas et al., 2007; Corpas et al., 2008). Algunas de las proteínas nitradas identificadas en extractos de proteínas de *Arabidopsis* infectada con *Pseudomonas syringae* pv. *Tomate* están relacionadas con la fotosíntesis (PsbO1, PsbO2), la síntesis de ATP (CF1-ATPase α), el ciclo de Calvin y la glicólisis (subunidad grande de la Rubisco, Rubisco activasa, FBA1 y FBA2) y la asimilación de nitrógeno (GS2) (Cecconi et al., 2009).

6.2.2.- Nitrosilación.

El proceso de S-nitrosilación se produce por la transferencia de NO desde un grupo nitrosiol a un grupo sulfidril de un residuo de cisteína de la proteína, de tal forma que se produce un enlace S-NO. Mediante proteómica, se han identificado numerosas proteínas en *Arabidopsis* susceptibles de sufrir esta modificación post-traduccional (Lindermayr et al., 2005; Romero-Puertas et al., 2008). La nitrosilación de estas proteínas puede contribuir a la señalización hormonal, la regulación génica y el control de la muerte celular. Dentro de las proteínas S-nitrosiladas identificadas hasta el momento, se han descrito la hemoglobina1 (AHb1), S-adenosilmetionina sintasa, metacaspasa, Rubisco, NPR1, gliceraldehído 3P-deshidrogenasa (GAPDH), peroxiredoxina E (PrxIIE), y la proteína de unión a SA (SABP3), algunas de las cuales se detallan a continuación (revisado por Leitner et al., 2009):

✱ **NPR1**: es un regulador positivo fundamental en las respuestas de defensa mediadas por SA. La nitrosilación de esta proteína controla la oligomerización y localización de la misma, y su papel en la activación de las respuestas de defensa dependientes de SA (Tada et al., 2008).

✱ **AtSABP3**: esta proteína presenta capacidad de unión al SA y actividad anhidrasa carbónica (CA). Ambas se ven anuladas debido a la nitrosilación de dicha proteína. La inhibición de la actividad CA podría contribuir de forma

negativa en la regulación de las respuestas de defensa en las plantas (Wang et al., 2009).

✱ **PrxIII**: proteína capaz de degradar el peroxinitrito (ONOO^-), una de las especies reactivas de nitrógeno (RNS) más tóxicas para las células y responsable de la oxidación de los lípidos y la nitración de la tirosina. La S-nitrosilación de PrxIII inhibe su capacidad de detoxificación produciéndose un incremento en la formación de nitrotirosina dependiente de ONOO^- . De esta forma la S-nitrosilación podría regular la convergencia entre las rutas de señalización dependientes de ROS y NO en los procesos de respuesta a diferentes estreses (Romero-Puertas et al., 2007).

✱ **Metacaspasa 9**: proteína fundamental en el proceso de muerte celular programada. Al ser S-nitrosilada se inhibe su actividad autoproteolítica en su estado no maduro. Por lo tanto, esta modificación mantiene inactiva a la metacaspasa 9.

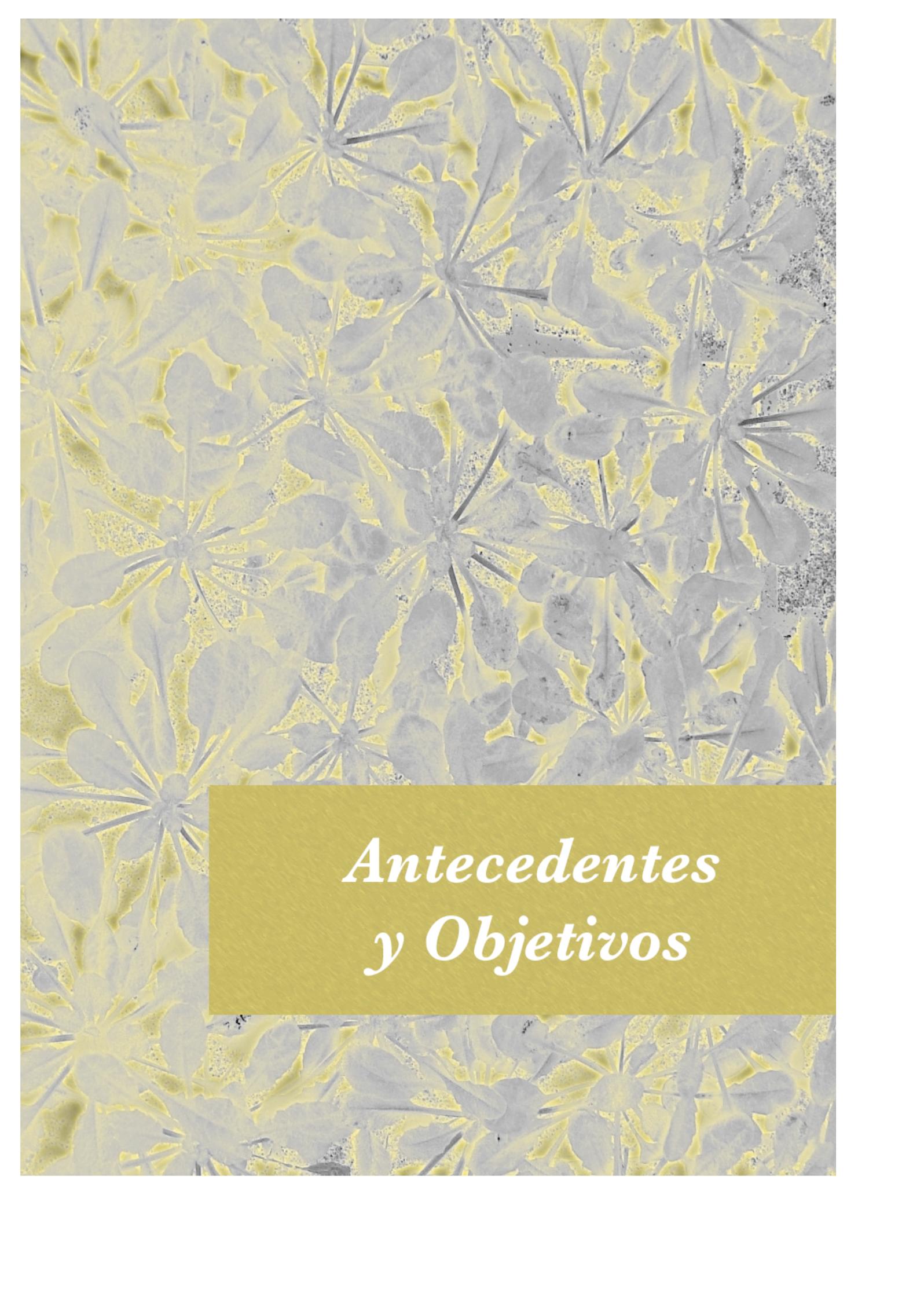
✱ **GAPDH**: la S-nitrosilación de esta proteína también podría jugar un papel importante en la regulación de la muerte celular programada, ya que la S-nitrosilación produce la inactivación de GAPDH e induce su translocación al núcleo (Holtgreve et al., 2008). En animales, la GAPDH S-nitrosilada se une y estabiliza a Siah1 (una E3 ubiquitín ligasa) y la transloca al núcleo, donde Siah1 degrada proteínas nucleares dando lugar a la apoptosis (Hara et al., 2005).

✱ **AtMYB2**: es un factor de transcripción que posee un dominio de unión R2R3-MYB y regula la expresión de genes de respuesta a estreses como la sequía y la salinidad. La S-nitrosilación de esta proteína inhibe su capacidad para unirse al DNA e inactiva el proceso biológico en el que participa (Serpa et al., 2007).

6.2.3.- Nitrosilación de metales.

El NO también puede reaccionar con metales de transición, siendo más relevante su unión al Fe (Cooper, 1999; Forman et al., 2008). En animales, se ha descrito el papel

del NO en la modulación de la actividad enzimática mediante la nitrosilación de grupos hemo, como la inhibición de la citocromo C oxidasa y NOS, la regulación de diversos citocromos P450 y la activación de la guanilato ciclasa (sGC) que interviene en las respuestas fisiológicas a NO en animales. Pero aún no se ha demostrado esta actividad en plantas. La única excepción en plantas es la hemoglobina (apartado 3.2.), aunque en este caso se trata de un mecanismo de secuestro del NO y no de una modificación enzimática como ocurre en animales. Sin embargo, el citocromo P450 en plantas se ha descrito como una posible diana de nitrosilación.



*Antecedentes
y Objetivos*

1.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO.

Este trabajo es el punto de partida de un amplio proyecto de investigación que trata de determinar el papel del óxido nítrico (NO) como molécula esencial en la regulación de procesos del desarrollo en plantas y su relación con las rutas de señalización hormonal en vegetales.

Además de ser una de las principales líneas de investigación de nuestro grupo, es un tema de creciente interés en la sociedad científica debido a la versatilidad que caracteriza a la molécula de NO. Como ya se ha comentado en la introducción, el NO es un radical libre gaseoso que se sintetiza en las células vegetales y actúa como molécula señalizadora en diferentes procesos de la fisiología de las plantas, como el crecimiento y desarrollo vegetal (Leshem y Pinchasov, 2000; Beligni y Lamattina, 2000; Bethke et al., 2004b, 2006, 2007; Pagnussat et al., 2002; Correa-Aragunde et al., 2004; Gabaldón et al., 2005; Lombardo et al., 2006; Correa-Aragunde et al., 2008), la defensa frente a patógenos (Durner et al., 1998; Delledonne et al., 2001; de Pinto et al., 2002; Romero-Puertas et al., 2004, 2008; Wendehenne et al., 2004; Cecconi 2009) o las respuestas a estreses abióticos (Garces et al., 2001; Gould et al., 2003; Zhang et al., 2006; Tian et al., 2007; Qiao y Fan, 2008; Zhao et al., 2009).

Actualmente, se desconocen los mecanismos moleculares que subyacen a los efectos del NO durante la germinación de semillas y el comienzo del desarrollo de la nueva planta, y su mecanismo de acción en la regulación de la expresión génica. La identificación de los elementos responsables de esta regulación es, por tanto, esencial para entender los medios con los que cuenta la planta para su percepción y señalización.

Por lo tanto, nuestra hipótesis de trabajo es que el NO puede actuar en los procesos del desarrollo vegetal a través de su interacción con otros reguladores del crecimiento, como las fitohormonas ABA, GAs, auxinas y JAs, empleando componentes moleculares similares. En particular, la germinación de semillas y el establecimiento de plántulas son procesos clave profundamente influenciados por este compuesto gaseoso.

Con estos antecedentes, el propósito general de este trabajo ha sido profundizar en el mecanismo de acción del NO en la germinación de semillas y en los primeros estadios del desarrollo de plantas, estudiando su implicación en las rutas de transducción de señales hormonales y en la regulación de la expresión génica durante estos procesos. Para ello, se ha realizado un análisis fenotípico, molecular y genético de las respuestas a NO en diferentes procesos del desarrollo temprano. A lo largo de la experimentación se ha utilizado *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo, debido a que las características de esta planta (genoma de pequeño tamaño completamente secuenciado, amplias colecciones de mutantes y herramientas de genética directa y reversa) facilitan la consecución de los objetivos planteados en este trabajo:

1.-LOCALIZACIÓN TISULAR DEL ÓXIDO NÍTRICO mediante la utilización de compuestos fluorescentes con afinidad al NO (DAF-2DA) que hacen posible visualizar los lugares de la planta donde se produce la síntesis endógena del gas.

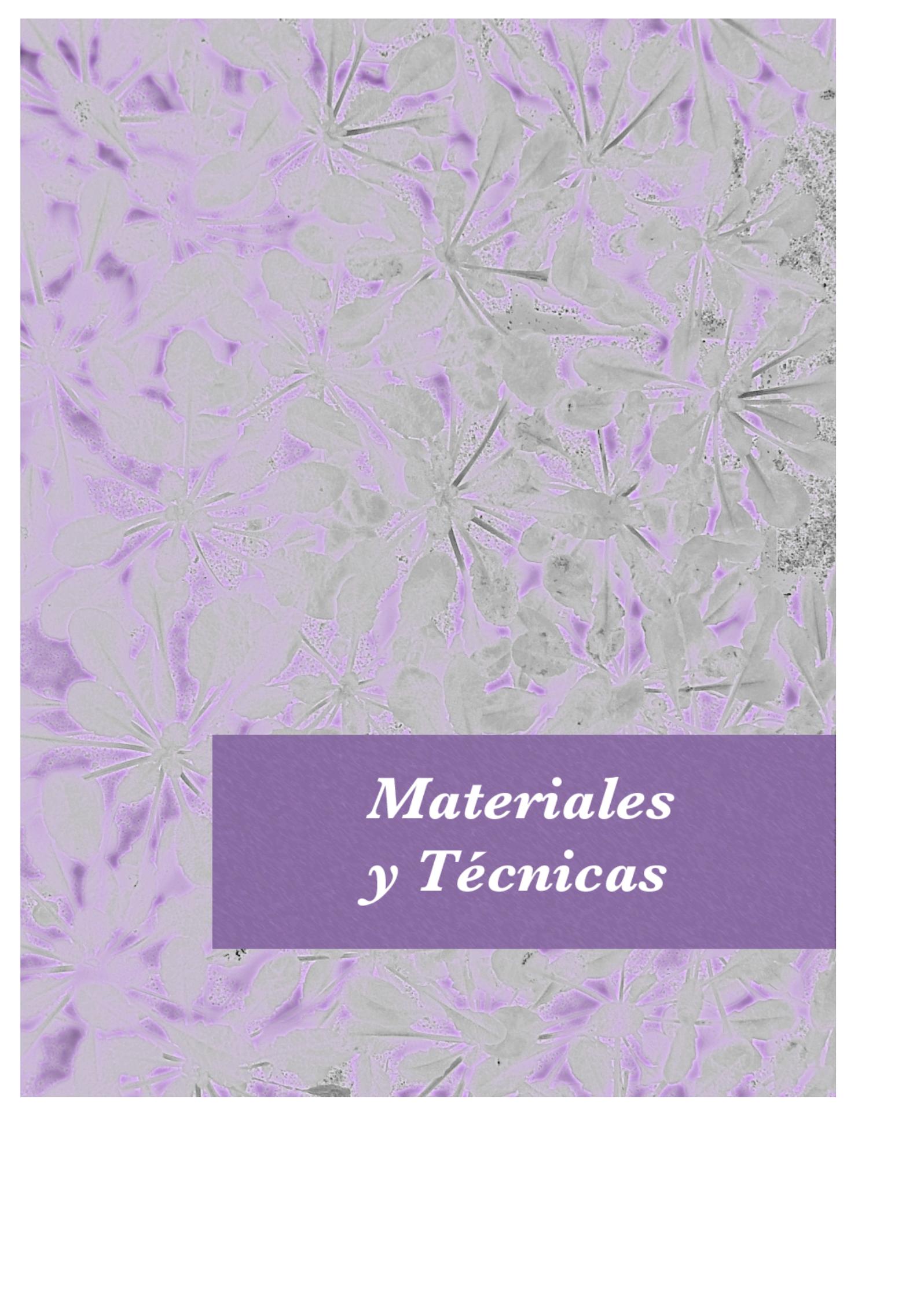
2.-BÚSQUEDA Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES EN GENES IMPLICADOS EN LAS RESPUESTAS A ÓXIDO NÍTRICO DURANTE LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO TEMPRANO mediante el empleo de líneas transgénicas de inserción de T-DNA, de tipo *gene-trap* que utilizan β -*GUS* como gen reportador.

3.-CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA, MOLECULAR Y GENÉTICA DE LA RESPUESTA A ÓXIDO NÍTRICO DURANTE LA GERMINACIÓN Y EL DESARROLLO TEMPRANO EN *Arabidopsis thaliana*, utilizando de las herramientas genéticas disponibles en *Arabidopsis* que nos permitan entender el mecanismo de acción de esta molécula en el crecimiento y desarrollo vegetal, incluida la germinación de semillas y el establecimiento de plántula. De esta forma, mediante la adición exógena de compuestos químicos liberadores o sequestradores de NO y/o el uso de mutantes con niveles alterados de NO, se caracterizará el efecto que produce este gas a nivel fenotípico y molecular.

4.-ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LAS RESPUESTAS A ÓXIDO NÍTRICO. El análisis del transcriptoma es esencial en la identificación a nivel genómico de genes implicados en los procesos fisiológicos de una planta. Por ello, hemos querido abordar este tipo de análisis para determinar el patrón de expresión temporal de grupos de genes, lo que a su vez es fundamental para el establecimiento de cascadas de regulación de la expresión génica en respuesta a los estímulos analizados.

5.-INTEGRACIÓN DE LOS RESULTADOS FENOTÍPICOS, GENÉTICOS Y MOLECULARES EN UN MODELO DE SEÑALIZACIÓN MOLECULAR DEL ÓXIDO NÍTRICO. Por último, la integración y correlación de los datos obtenidos de la aproximación genética junto con los análisis fenotípicos y moleculares en Arabidopsis permitirá abordar la relevancia biotecnológica de las potenciales dianas del NO.

La memoria que se expone a continuación, recoge el material, las técnicas empleadas y los resultados obtenidos, así como una discusión de los mismos.



*Materiales
y Técnicas*

1.- MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO.

1.1.- Semillas.

En la realización de este trabajo se han utilizado semillas de *Arabidopsis thaliana* L. Heynh, ecotipos Columbia (Col-0), Landsberg *erecta* (*Ler*) y Emkheim. Estos ecotipos forman parte de la colección del Arabidopsis Information Service, que tiene su origen en las estirpes silvestres de *Arabidopsis thaliana* recolectadas por F. Laibach, estando actualmente depositada y distribuida por el NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, U.K.) y el ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center, U.S.A.). Además, hemos utilizado semillas de NIL DOG17-1 (Near-isogenic line Delay Of Germination17-1) cedidas por M. Koornneef (Alonso-Blanco et al., 2003), líneas transgénicas de T-DNA de la colección del SALK y de tipo *gene-trap* procedentes del proyecto EXOTIC (Exon Trapping Insert Consortium), financiado por el 5º Programa marco de la Unión Europea y cedidas amablemente por el Dr. J. Paz-Ares (CNB, Madrid). Durante el desarrollo de este trabajo, también se han empleado diversas líneas transgénicas y mutantes cuyas características y referencias se resumen en las Tablas M.1. y M.2., respectivamente.

Tabla M.1.- Líneas transgénicas utilizadas.

Línea	Fondo	Características	Utilización	Referencia
<i>pPIN1:PIN1:GFP</i>	Col-0	Gen marcador <i>GFP</i> . Transportador de auxinas PIN1.	Localización del transportador de auxinas PIN1.	Benkova et al., 2003.
<i>pPIN2:PIN2:GFP</i>	Col-0	Gen marcador <i>GFP</i> . Transportador de auxinas PIN2.	Localización del transportador de auxinas PIN2.	Xu y Scheres, 2005.
<i>DR5:GUS/GFP</i>	Col-0	Gen marcador <i>GUS/GFP</i> . Línea reportadora de respuesta auxinas.	Ensayos de respuesta a auxinas.	Ulmasov et al., 1997. Friml et al., 2003.
<i>pCycB1;1:GUS</i>	Col-0	Gen marcador <i>GUS</i> . Línea marcadora de células que se encuentran en la fase G2 del ciclo de división celular.	Estudios del proceso de división en el meristemo de la raíz.	Colon-Carmona et al., 1999.
<i>pRGA:GFP:RGA</i>	<i>Ler</i>	Proteína DELLA. Gen marcador <i>GFP</i> .	Localización de RGA.	Silverstone et al., 2001.

Tabla M.2.- Líneas mutantes utilizadas.

Línea	Fondo	AGI code	Características	Referencia
<i>atnoa1</i>	Col-0	At3g47450	Mutante con menor producción de NO. cGTPasa.	Guo et al., 2003; Crawford, 2006; Moreau et al., 2008.
<i>nia1;nia2</i>	Col-0	At1g77760 At1g37130	Doble mutante afectado en la síntesis de NO. Nitrato reductasa 1 (NR1) y 2 (NR2).	Wilkinson y Crawford, 1993.
<i>cue1/nox1</i>	Col-0	At5g33320	Mutante sobreproductor de NO. Tanslocador fosfoenolpiruvato/fosfato del cloroplasto.	Streatfield et al., 1999. He et al., 2004.
<i>argah1.1</i>	Col-0	At4g08900	Arginina amidohidrolasa. Mutante con mayor acumulación de NO.	Flores et al., 2008.
<i>argah2.1</i>	Col-0	At4g08870	Arginina amidohidrolasa. Mutante con mayor acumulación de NO.	Flores et al., 2008.
<i>qdella</i>	<i>Ler</i>	At1g14920 At2g01570 At1g66350 At5g17490	Cuádruple mutante afectado en las proteínas DELLA: GAI, RGA, RGL1 y RGL3. Represores de la señalización de GAs.	Wilson y Somerville, 1995. Silverstone et al., 1997. Sánchez-Fernández et al., 1998. Dill y Sun, 2001.
<i>global della</i>	<i>Ler</i>	At1g14920 At2g01570 At1g66350 At3g03450 At5g17490	Mutante afectado en las 5 proteínas DELLA: GAI, RGA, RGL1, RGL2 y RGL3. Represores de la señalización de GAs.	Wilson y Somerville, 1995. Silverstone et al., 1997. Sánchez-Fernández et al., 1998. Dill y Sun, 2001.
<i>qdella;ga1</i>	<i>Ler</i>	At1g14920 At2g01570 At1g66350 At5g17490 At4g02780	Cuádruple mutante afectado en las proteínas DELLA: GAI, RGA, RGL1 y RGL3, en un fondo deficiente a GAs (Copalil difosfato sintasa, CPS).	Wilson y Somerville, 1995. Silverstone et al., 1997. Sánchez-Fernández et al., 1998. Dill y Sun, 2001. Sun et al., 1992.
<i>tt3;tt7</i>	Col-0	At5g42800 At5g07990	Mutante con mayor acumulación de flavonoides. Dihidroflavonol reductasa (DFR) y flavonol 3'-hidroxilasa (F3'-H).	Koornneef, 1990. Shirley et al., 1995. Graham, 1998.

1.2.- Microorganismos.

Los microorganismos empleados a lo largo de la experimentación han sido *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*. La cepas utilizadas, junto con sus características más relevantes, utilización y referencia bibliográfica, se detallan en la Tabla M.3.

Tabla M.3.- Cepa de *Escherichia coli* y estirpe de *Agrobacterium tumefaciens*.

Cepa	Características	Utilización	Referencia
DH5α	F ⁻ , φ80dlacZΔM15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (rk ⁻ , mk ⁺), supE44, deoR, relA1, Δ(lacZYA-argF)U169	Subclonar fragmentos de cDNA. Preparación de células competentes.	Hanahan, 1983.
C58C1	rif ^r , contiene el plásmido binario pGV2260, cb ^r	Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> mediante infiltración. Preparación de células competentes.	Deblaere et al., 1985.

1.3.-Vectores empleados.

Los vectores utilizados en este trabajo, junto con sus características más destacables y el mapa correspondiente, se detallan en la Figura M.1. y en la Tabla M.4.

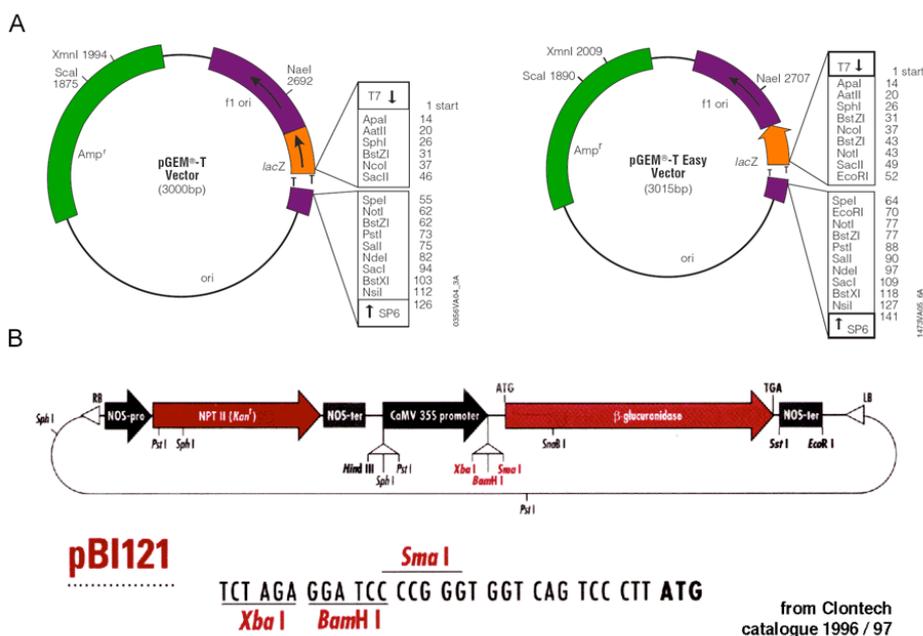


Figura M.1.- (A) Mapa del los vectores de replicación en *E. coli*: pGEM-T y pGEM-T easy. (B) Mapa del vector binario de replicación en *A. tumefaciens*: pBI121.

Tabla M.4.- Plásmidos.

Plásmido	Resistencia	Utilización	Referencia
pGEM-T	Amp ^r	Clonaje directo de productos de PCR y posterior secuenciación.	Promega.
pGEM-T easy	Amp ^r	Clonaje directo de productos de PCR y posterior secuenciación.	Promega.
pBI121	Kan ^r	Construcciones para la transformación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	Bevan, 1984.

2.- MATERIAL NO BIOLÓGICO.

2.1.- Medios de cultivo.

En el desarrollo de este trabajo se han utilizado diferentes medios de cultivo. En la Tabla M.5. se especifica la composición, utilización y referencia bibliográfica de estos medios.

Tabla M.5.- Medios de cultivo.

Medio	Composición	Utilización	Referencia
Murashige y Skoog (MS)	MS Comercial (Duchefa): 4.9g/l Glucosa 2% (w/v) pH 5.7 (KOH)	Germinación y crecimiento de plántulas.	Murashige y Skoog, 1962.
Luria-Bertani (LB)	Bactotripton 1% (w/v) NaCl 1% (w/v) Extracto de levadura 0.5% (w/v) pH 7.0	Propagación de microorganismos.	Sambrook et al., 1989.
SOC	Bactotripton 2% (w/v) NaCl 10 mM KCl 0.025 mM Extracto de levadura 0.5% (w/v) Glucosa 20 mM	Propagación de microorganismos.	Sambrook et al., 1989.

Todos los medios fueron preparados con agua destilada y se esterilizaron en autoclave 20 min a 120°C, manteniéndolos a 4°C hasta su utilización. Para la preparación de placas con medio sólido, al medio correspondiente se le añadió agar al 0.6% (w/v) (MS) y 1.5-2% (w/v) (LB). Cuando fue necesario, los medios fueron

suplementados con diferentes hormonas o antibióticos, que se añadieron después de esterilizar el medio y a una temperatura menor de 55°C.

2.2.- Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos empleados en la realización de PCR convencional fueron diseñados con el programa Oligo® 4.05, Primer Análisis Software (Nacional Bioscience, Inc.) y sintetizados por la empresa Isogen, Inc., y se encuentran detallados en la Tabla M.6.

Los oligonucleótidos utilizados para la qRT-PCR (Tabla M.6) fueron diseñados con el programa Primer Express Software 1.0 (Applied Biosystems). Alternativamente, se utilizaron oligos diseñados por Universal ProbeLibrary for Arabidopsis (Roche, <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp>). En ambos casos se diseñaron oligonucleótidos que amplifican un segmento de cDNA entre 50-150 pb, con un contenido G-C entre el 30-80%, evitando carreras de nucleótidos idénticos (4 o más G), T_m entre 58-60°C y el extremo 3' sin más de 2 G y/o C.

En el caso de la TAIL-PCR, se utilizaron oligonucleótidos específicos de la inserción de T-DNA, junto con oligonucleótidos degenerados sintetizados y suministrados por Isogen, Inc. (Tabla M.7.).

Tabla M.6.- Oligonucleótidos utilizados en las técnicas de qRT-PCR y PCR convencional.

Gen	AGI code	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Utilización
<i>ACTIN8</i>	At1g49240	5'-AGTGGTCCGTACAACCGGTATTGT-3'	5'- GAGGATAGCATGTGGAAGTGAGAA-3'	qRT-PCR.
<i>PAPI</i>	At1g56650	5'-GAGAAGGCAAATGGCACCAA-3'	5'-TTCAACCATCTTAATCTACAACCTTTTCC-3'	qRT-PCR.
<i>DFR</i>	At5g42800	5'-AACGGATGTGACGGTGTFTT-3'	5'- TCCATTCACTGTCCGGCTTTA-3'	qRT-PCR.
<i>UF3GT</i>	At5g54060	5'-CGACGCAATCGCTATAAGG-3'	5'-ACTGCCCTACTTATGTAATCGCAGA-3'	qRT-PCR.
<i>ACC</i>	At1g03495	5'-GTGGATTGCGAGGAATCGTCT-3'	5'-TCCTAGCAAATCGTGTCTTGA-3'	qRT-PCR.
<i>GST</i>	At5g17220	5'-TAGGTTAGGCGAGAAATGTGA-3'	5'-TCGAAGAAAGCCGGTTATGTGA-3'	qRT-PCR.
<i>GAI</i>	At1g14920	5'-GGCGCTTATGCAGGCTCTT-3'	5'-GCCGGTGGACCAATTCC-3'	qRT-PCR.
<i>RGA</i>	At2g01570	5'-ACTTCGACGGGTACGCAGAT-3'	5'-TGTCGTCACCGTCGTTCCCT-3'	qRT-PCR.
<i>RGL1</i>	At1g66350	5'-TCAGTGGCGGTTAACTCGGT-3'	5'-GGGATGAGCTAAGAGGCGATG-3'	qRT-PCR.
<i>PINI</i>	At1g73590	5'-CCTCAGGGGAATAGTAACGACA-3'	5'-TCATCGTCTTTGTTACCGAAACT-3'	qRT-PCR.
<i>Promotor T7</i>		5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'		Secuenciación.
<i>M13 (-20) Universal</i>			5'-TGTAACGACGCGCCAGT-3'	Secuenciación.
<i>AtLecPKI</i>	At5g01540	5'-ACATCGGTCTGAATTACAAC-3'	5'-CGTTTCGTAAAGCCTCGCG-3'	Completar secuenciación.
		5'-CTTCGCTCACCCATGGGCACA-3'	5'-CTACTGACTGATACGAGAA-3'	Amplificación y clonaje en el vector pGEM-T.
		5'-CGTCGACCTCAATACCAG-3'	5'-CTGGTTCAACGATCAAAAATGG-3'	Obtención de DNA sonda para el análisis Northern Blot.
<i>PATL2</i>	At1g22530	5'-TCTAGTCTTGTTCCTTTTCG-3'	5'-TCAAAGAAAAGACTACAAC-3'	Amplificación, clonaje en el vector pGEM-T y obtención de DNA sonda para el análisis Northern Blot. RT-PCR.
		5'-CACCGTAGAGACCAAGAAAGAA-3'	5'-CTCCTTGTCTTGGCGATGT-3' 5'-TGGAAGAGTGATGGAGACGA-3'	Comprobación de la secuencia.
		5'-TCTAGTCTTGGATCCCTTTTCG-3'	5'-TCAAAGAAAAGACTACAAC-3'	Subclonaje en el vector binario pBI121.
<i>ACT2</i>		5'-GGATCGGTGGTTCATTCCTTGC-3'	5'- AGAGTTTGTACACACAAGTGCA-3'	RT-PCR.
<i>GL2</i>		5'-CAAGACAGCAGACTAATCGTAT-3'	5'-GGTTTGGAGGCGAGTGTGAGGAGC-3'	RT-PCR.
<i>UBQ14</i>	At4g02890	5'-ACCACCACG(A,G)AGACGGAG-3'	5'-ATGCAGAT(C,T)TTTGTGAAGAC-3'	RT-PCR.
LB (Left Border)	T-DNA Salk	5'-CTGTTGCCCGTCTCACTGGTG-3'		RT-PCR.

Tabla M.7.- Oligonucleótidos utilizados en la técnica de TAIL-PCR. Ds5¹-1, Ds5²-2 y Ds5⁵-5 son oligonucleótidos específicos para la inserción de T-DNA y AD2 es un oligonucleótido degenerado.

	Oligonucleótidos	Secuencia	Referencia
Oligonucleótidos específicos de la inserción de T-DNA	Ds5 ¹ -1	5'-ACGGTCGGGAACTAGCTCTAC-3'	Tsugeki et al., 1996.
	Ds5 ² -2	5'-CCGTTTGTATATCCCGTTCCGT-3'	Tsugeki et al., 1996.
	Ds5 ⁵ -5	5'-CGAAATCGATCGGGATAAA-3'	Tsugeki et al., 1996.
Oligonucleótido degenerado	AD2	5'-(AGCT)GTCGA(GC)(AT)GA(AGCT)A(AT)GAA-3'	Liu et al., 1995.

2.3.- Kits.

- ▲ “Plant DNA Isolation kit” (Roche): extracción y purificación de DNA genómico.
- ▲ “Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega): extracción y purificación de DNA plasmídico.
- ▲ “RNA wiz” y “TRI Reagent” (Ambion): extracción y purificación de RNA total.
- ▲ “GeneClean Turbo Nucleic Acid Purification kit” (Bio 101 Systems, USA): purificación de fragmentos de DNA.
- ▲ “Rediprime II Random Prime Labelling System” (Amersham Biosciences): marcaje radiactivo del DNA.
- ▲ “Mini Quick Spin DNA” (Roche): eliminación del exceso de nucleótidos en el marcaje radiactivo del DNA.
- ▲ “Bio-Rad Protein Assay” (Bio-Rad): cuantificación de proteínas.
- ▲ “ECL Advance™ Western Blotting Detection Kit” (Amersham): detección de proteínas.
- ▲ “1ST Strand Synthesis System for RT-PCR” (Invitrogen) y “1ST Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR” (Roche): síntesis de cDNA.
- ▲ “RNeasy MiniElute Cleanup Kit” (Qiagen): extracción y purificación de RNA total a partir de 1x10⁴ células.
- ▲ “RNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen): extracción y purificación de RNA total.

- ▲ “TargetAmp™ 2-Round aRNA Amplification Kit 2.0” (Epicentre Biotechnologies): amplificación de RNA (PolyA) a partir de 10 pg de RNA total.

3.- CONDICIONES DE GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO: TRATAMIENTOS EMPLEADOS.

3.1.- Esterilización y estratificación de semillas.

Las semillas de *Arabidopsis thaliana*, utilizadas para experimentos *in vitro*, se esterilizaron superficialmente mediante dos técnicas.

En la primera de las técnicas se procedió del siguiente modo:

1. Introducir las semillas en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
2. Añadir 500 µl de lejía (hipoclorito sódico) al 75% (v/v) y Tritón X-100 al 0.01% (v/v) para realizar un primer lavado. Agitar en vórtex durante 5 min.
3. Desechar la solución de lavado.
4. Realizar lavados exhaustivos en 1 ml de agua estéril, repitiendo el proceso tres veces.
5. Añadir agua estéril o agarosa al 0.15% (w/v).

En la segunda:

1. Introducir las semillas en tubos eppendorf de 1.5 ml dispuestos en una gradilla abiertos y dentro de una campana hermética.
2. Someter las semillas a una esterilización mediante vapores liberados por una solución de 100 ml de lejía (hipoclorito sódico) al 5% (v/v) y 3 ml de ácido clorhídrico (HCl) al 37% (v/v).
3. Mantener las semillas en la campana hermética durante 4-5 h.
4. Añadir agua estéril o agarosa al 0.15% (w/v).

Una vez esterilizadas, las semillas se sometieron a estratificación a 4°C durante 3-4 días en ausencia de luz, con la finalidad de eliminar la dormición y sincronizar la

germinación. La estratificación de semillas se realizó en agua, en agarosa al 0.15% (w/v) o una vez sembradas *in vitro*.

3.2.- Siembra de semillas.

Todas las siembras se realizaron con la ayuda de una micropipeta, tomando las semillas de una suspensión acuosa de agarosa al 0.15% (w/v). El proceso se realizó con el material estéril en una cabina de flujo laminar horizontal. Las placas se sellaron con esparadrapo quirúrgico Micropore 3M, que constituye una barrera efectiva para cualquier partícula pero no impide el intercambio de gases con el exterior. Tras la siembra, las placas fueron incubadas en cámaras de germinación a 21°C, con una humedad relativa del 50-60% y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad (80-100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$).

3.3.- Obtención de plántulas.

Para la obtención de plantas adultas, las semillas germinadas procedentes de las distintas líneas se sembraron en placas Petri en medio sólido MS. Las plántulas de *A. thaliana*, que germinaron *in vitro* después de 12-14 días, se pasaron a alveolos para su crecimiento en suelo, que contenía tierra (Sustrato para la horticultura profesional, TREF) y vermiculita (Termita®, Asfaltex) en una proporción 3:1 respectivamente, para un mejor drenaje. Las plántulas completaban su desarrollo en cámaras de luz o fitotrones, manteniéndose cubiertas con plástico durante los 4-5 primeros días con el fin de mantener niveles altos de humedad. Las condiciones de crecimiento fueron de día largo, con 16 h de luz (80-100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) y 8 h de oscuridad, a una temperatura de 22°C y una humedad relativa del 50-60%. Alternativamente, se utilizaron las instalaciones del Servicio de Invernadero Experimental (SIE) proporcionado por Parque Científico (Universidad de Salamanca), con condiciones similares.

Las bandejas de alveolos estuvieron sometidas a irrigación continua para mantener un nivel de humedad adecuado. Cada alveolo se destinó al cultivo de plantas individuales o 4 plantas de una misma línea que, en la mayoría de los casos, habían sido

transplantadas desde una placa Petri en la que habían permanecido durante las primeras semanas de su ciclo de vida. Tras terminar el ciclo de vida de la planta, las semillas fueron recolectadas en sobres de papel y almacenadas a temperatura ambiente hasta su utilización.

3.4.- Tratamientos utilizados.

Los distintos tratamientos utilizados en la germinación y crecimiento de las semillas y plántulas de *Arabidopsis*, sus respectivas concentraciones y su uso se indican en la tabla Tabla M.8.

Tabla M.8.- Tratamientos empleados para *A. thaliana*.

Tratamiento	Concentración	Uso	Referencia
Agua destilada estéril		Control.	
SNP (sodium nitroprusside)	2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M y 100 μ M	Compuesto químico que libera óxido nítrico en solución.	Sigma.
SNAP (S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine)	10 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M y 1 mM	Compuesto químico que libera óxido nítrico en solución.	Sigma.
GSNO (S-Nitroso-glutathione)	1 mM	Compuesto químico que libera óxido nítrico en solución.	Sigma.
NO	300 ppm	Gas puro.	Air-Liquid.
cPTIO (2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3 oxide)	100 μ M y 1 mM	Compuesto químico que actúa secuestrando óxido nítrico (scavenger).	Sigma.
Kanamicina (Kan)	50 μ g/ml	Selección de plantas transformantes.	Sigma.
Ácido abscísico (ABA)	0,5 μ M	Ensayos fenotípicos: inhibición de la germinación.	Sigma.
Ácido giberélico (GA ₃)	100 μ M	Ensayos fenotípicos: promueve la elongación del hipocotilo.	Sigma.
MG132	100 μ M	Inhibidor de la actividad del proteosoma 26S.	Sigma.
NPA (Ácido 1-N-naftilftalámico)	1 μ M	Inhibidor del transporte de auxinas.	Sigma.

Para la búsqueda de mutantes en genes regulados por NO en líneas transgénicas de inserción de T-DNA, de tipo *gene-trap*, la siembra se realizó en placas de microtítulo de 24 pocillos, en cada uno de los cuales se sembró una línea diferente de las semillas utilizadas en 2 ml de medio MS líquido y sembrando dos réplicas de cada placa. Tras la siembra, las placas fueron incubadas en cámaras de germinación con condiciones controladas y agitación continua (150 rpm). A los 7 días de crecimiento se realizó el tratamiento que se describe a continuación:

1. Eliminar el medio líquido en el que han crecido las plántulas durante 7 días.
2. Añadir soluciones de SNP 100 μ M o cPTIO 100 μ M.
3. Mantener las placas durante 3h en cámaras de luz con agitación continua (150 rpm).
4. Realizar el ensayo de actividad β -glucuronidasa expuesto en el apartado 11.

Para el estudio del desarrollo de la raíz la siembra se realizó en medio MS sólido dispensado en placas Petri de 5 cm de diámetro. Las placas se mantuvieron en cámaras de germinación con condiciones controladas de 5 a 10 días dependiendo del tratamiento a realizar. El tratamiento se realizó a los 3 días de crecimiento de las plántulas de la siguiente forma:

1. Introducir tres placas con semillas en una placa Petri de 15 cm en la cual se ha colocado previamente una placa con una solución de SNP (Figura M.2.). Para los donadores SNAP y GSNO, añadir una solución de 2 ml de las concentraciones reflejadas en la la Tabla M.8. a cada placa. Finalmente, si el tratamiento se realiza con gas puro, inyectar el NO con una jeringuilla en una cámara hermética en la cual están dispuestas las placas con las semillas.
2. En el caso del tratamiento con cPTIO, añadir a cada placa sembrada 2 ml de una solución 1 mM.

Todas las placas fueron selladas con film de plástico transparente para evitar la pérdida del gas. Se realizaron tratamientos a diferentes tiempos: 8h, 24h, 2 días y 5 días.

Para los ensayos del crecimiento del hipocotilo en oscuridad la siembra se realizó en medio MS sólido. Las placas se mantuvieron en cámaras de germinación a 22°C y un

fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad ($80-100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) durante 2 días para permitir la liberación de NO a partir de los donadores. Posteriormente, se crecieron en oscuridad durante 4 días, tiempo que se prolongó el tratamiento y que se realizó inmediatamente después de la estratificación, del mismo modo que en el caso anterior.

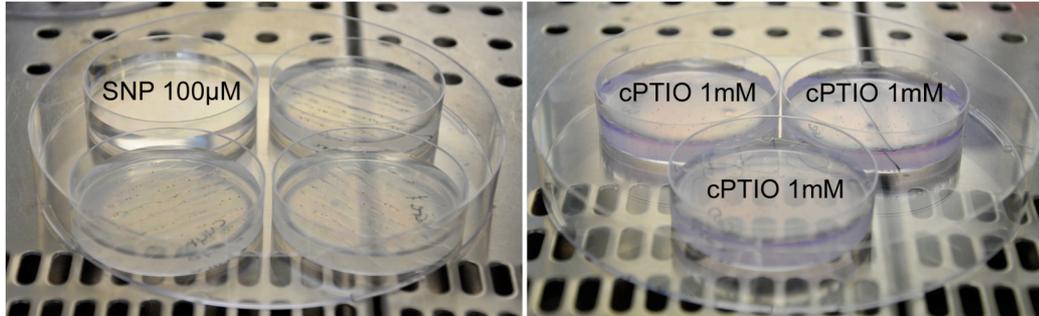


Figura M.2.- Tratamientos realizados con el donador de NO, SNP, y el secuestrador, cPTIO.

4.- MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS.

4.1.- Condiciones de crecimiento.

Normalmente, las cepas de *E. coli* se crecieron en medios de cultivo LB o SOC (Tabla M.5.) a 37°C . Los cultivos en medio líquido se mantuvieron en agitación constante (225 rpm) en un agitador orbital con temperatura controlada. En el caso de *A. tumefaciens* las células se crecieron en medio líquido LB (Tabla M.5.) a una temperatura de 28°C y con una agitación constante de 200 rpm. Para estimar el crecimiento de los cultivos se midió la D.O. a 600 nm.

Cuando fue necesaria la selección de colonias por resistencia a antibióticos, los medios se suplementaron con ampicilina (Amp) ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma), kanamicina (Kan) ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma), o rifampicina (Rif) ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma) disueltos en agua y esterilizados a través de filtros estériles de $0.45 \mu\text{m}$ de diámetro de poro (Albet).

4.2.- Conservación de cepas.

Las cepas bacterianas se mantuvieron a corto plazo en placas de agar a 4°C . La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas se hizo por congelación rápida en

nitrógeno (N₂) líquido de cultivos crecidos hasta la fase logarítmica tardía. Para ello se realizaron los siguientes pasos:

1. Añadir glicerol estéril a los cultivos crecidos en el medio líquido correspondiente hasta una concentración final del 30% (v/v).
2. Agitar en vórtex.
3. Congelar en N₂ líquido.

Los criotubos se almacenaron a una temperatura de -80°C, donde son viables durante varios años.

4.3.- Transformación de células de *E. coli*.

Para la introducción de DNA plasmídico en el interior de *E. coli* se utilizaron células competentes, que son más permeables al DNA, y de esta forma se consigue una transformación eficiente.

4.3.1.- Preparación de células competentes.

El protocolo utilizado para la preparación de células competentes DH5α se ha modificado de Inoue et al. (1990) y se realizó básicamente siguiendo estos pasos:

1. A partir de un stock de glicerol de la cepa de *E. coli* DH5α, mediante triple estría, sembrar una placa con LB e incubar a 37°C durante toda la noche.
2. Inocular 5-7 colonias aisladas en 250 ml de medio SOC e incubar en agitación (250 rpm) a 37°C hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ = 0.6.
3. Colocar el cultivo en hielo durante 10 min.
4. Centrifugar a 1270 x g (3000 rpm) a 4°C durante 10 min.
5. Descartar el sobrenadante.
6. Resuspender las células en 80 ml de tampón TB frío.
7. Incubar en hielo durante 10 min.

8. Centrifugar a 1270 x g (3000 rpm) a 4°C durante 10 min.
9. Descartar el sobrenadante.
10. Invertir el tubo durante 1 min para eliminar totalmente los restos del tampón.
11. Resuspender en 20 ml de TB frío agitando manualmente.
12. Añadir DMSO a la mezcla de células a una concentración final del 7% (v/v).
13. Separar alícuotas de 100 µl en tubos eppendorf estériles sobre hielo seco.
14. Almacenar a -80°C donde pueden conservarse al menos durante un año.

★ **Tampón TB:** PIPES 10 mM, CaCl₂ 15 mM y KCl 250 mM, pH ajustado a 6.7 con KOH.

4.3.2.- Transformación de células competentes.

La transformación de células competentes de las cepas DH5α de *E. coli* se realizó siguiendo la técnica estándar:

1. Añadir entre 20 y 200 ng de plásmido o de la reacción de ligación sobre 50-100 µl de células descongeladas en hielo.
2. Incubar la mezcla en hielo durante 30 min.
3. Aplicar un pulso de calor de 50 seg a 42°C y mantener en hielo durante 2 min.
4. Añadir 950 µl de medio SOC previamente calentado a 37°C.
5. Incubar 60 min a 37°C con agitación horizontal (225 rpm).
6. Centrifugar 45 seg a 15856 x g (13000 rpm).
7. Sembrar distintas diluciones (50 y 200 µl) en placas con medio LB agar que contenga el antibiótico necesario (Amp o Kam) para la selección de colonias.
8. Incubar durante toda la noche a 37°C.
9. Las colonias crecidas se conservan en placas a 4°C.

En todos los casos, la eficiencia de transformación fue superior a 1×10^8 cfu/ μ g DNA (cfu: unidades formadoras de colonias).

4.4.- Transformación de células de *A. tumefaciens*.

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria gram negativa que infecta a diferentes especies de plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. La cepa de *A. tumefaciens* (Tabla M.3.) utilizada en nuestros ensayos fue la C58C1, que contiene un plásmido Ti desarmado pGV2260 (Deblaere et al., 1985). Dentro del plásmido Ti se encuentra el T-DNA que contiene la construcción de interés, y que se integra en el genoma de la planta por un proceso de transferencia para el que se requiere el gen de virulencia *vir* presente en el plásmido GV2260. Cuando la bacteria se pone en contacto con los capullos florales de *Arabidopsis*, y tras un pulso de vacío, la bacteria infecta el tejido. En este periodo de contacto, la bacteria transfiere al tejido el T-DNA del plásmido Ti, que se integra en el material genético de sus células, transcribiéndose más tarde como si fuera un gen propio de la planta.

4.4.1.- Preparación de células competentes.

Para la obtención de células competentes de esta cepa de *Agrobacterium* se realizaron los siguientes pasos:

1. Preparar un cultivo saturado de células en 10 ml de medio LB líquido suplementado con rifampicina (50 μ g/ml) e incubar a 28°C durante 16 h, en agitación (200 rpm).
2. Inocular 200 ml de LB suplementado con rifampicina (50 μ g/ml) con 4 ml de este cultivo saturado e incubar a 28°C durante 5-6 h hasta que la D.O.₆₀₀ sea de 0.5-1.0.
3. Recoger las células del cultivo por centrifugación a 1693 x g (4000 rpm) durante 5 min y a 4°C.
4. Lavar las células en 100 ml de Tris-HCl 10 mM pH 8.0.

5. Centrifugar durante 5 min a 1693 x g (4000 rpm).
6. Resuspender las células obtenidas en 4 ml de glicerol al 10% (v/v) a 4°C.
7. Dividir esta suspensión en fracciones de 200 µl.
8. Congelar en N₂ líquido y almacenar a -80°C.

4.4.2.- Transformación de células competentes.

La transformación de células competentes de *A. tumefaciens* C58C1 se realizó mediante choque térmico siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

1. Añadir entre 100-500 ng del DNA transformante a una suspensión de 200 µl de células competentes, previamente descongeladas en hielo, y mezclar.
2. Congelar en N₂ líquido durante 5 min.
3. Descongelar en un baño a 37°C durante 25 min.
4. Añadir 1 ml de medio LB e incubar a 28°C durante 1 h y en constante agitación (200 rpm).
5. Centrifugar durante 45 seg a 15856 x g (13000 rpm).
6. Retirar 750 µl de medio y resuspender las células en el medio restante.
7. Sembrar distintas diluciones (50 y 200 µl) en placas de medio LB-agar suplementado con rifampicina (50 µg/ml) y el antibiótico correspondiente al vector utilizado (kanamicina, 50 µg /ml).
8. Incubar las células a 28°C durante toda la noche y conservar las placas a 4°C.

5.- ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

5.1.- Extracción y purificación de DNA genómico.

La obtención de DNA genómico de *Arabidopsis thaliana* se realizó utilizando el “Plant DNA Isolation kit” (Roche), partiendo de plántulas de 8 días congeladas en N₂ líquido. Los pasos a seguir son:

1. Reducir a polvo cada muestra mediante disgregación del tejido en un Silamat S5 (Ivoclar Vivadent, Madrid) durante 15 seg utilizando bolas de vidrio de 425-600 microns (Sigma).
2. Homogeneizar la muestra con 300 μ l de tampón de extracción.
3. Añadir 20 μ l de SDS al 10% (w/v), mezclándolo bien y dejándolo 10 min a 65°C para lisar las membranas celulares y eliminar las proteínas de la muestra.
4. Tras este calentamiento, añadir 150 μ l de acetato potásico 5 M e incubar 5 min a 0°C.
5. Centrifugar 10 min a 16000 x g (13118 rpm) a 4°C.
6. Recoger el sobrenadante cuidadosamente, y añadir 200 μ l de isopropanol frío. Mezclar y dejar reposar 10 min a -20°C.
7. Centrifugar 10 min a 13800 x g (11314 rpm) a 4°C. Descartar el sobrenadante.
8. Secar el precipitado a temperatura ambiente y disolver en 140 μ l de TE.
9. Eliminar por centrifugación los componentes insolubles durante 5 min a 9880 x g (8100 rpm) a 4°C.
10. Añadir 14 μ l de acetato sódico 3 M y 300 μ l de isopropanol frío para precipitar el DNA. Tras este tratamiento se forma una masa fibrosa de DNA que se transfiere a un nuevo tubo.
11. Centrifugar brevemente para eliminar el líquido sobrante y secar a vacío 5-10 min.
12. Disolver el precipitado en 25 μ l de agua estéril y tratar con RNasa pancreática libre de DNasa (10 μ g/ml) para eliminar restos de RNA.
13. Incubar la mezcla durante 30 min a 37°C.
14. Almacenar a -20°C.

★ **Tampón de extracción:** Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, EDTA 50 mM, NaCl 500 mM y β -mercaptoetanol 10 mM.

★ **Tampón TE:** Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 y EDTA 1 mM.

Alternativamente, para la extracción de DNA se utilizó una adaptación de la técnica de Aitchitt et al. (1993). El material de partida fue igual que en el caso anterior. Los pasos a seguir son:

1. Reducir a polvo las muestras mediante disgregación del tejido.
2. Homogeneizar en 500 μ l de tampón CTAB 3X durante 30 min a 65°C.
3. Añadir 500 μ l de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y mezclar.
4. Centrifugar durante 10 min a 17075 x g (14000 rpm).
5. Añadir al sobrenadante otros 500 μ l de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y centrifugar.
6. Precipitar añadiendo al sobrenadante 1 ml de etanol al 100% y 150 μ l de acetato de sodio 3M, pH 5.2. Incubar 1 h a temperatura ambiente.
7. Centrifugar 10 min a 17075 x g (14000 rpm) y secar el precipitado.
8. Resuspender el precipitado en 50 μ l de agua estéril.
9. Tratar con RNasa pancreática libre de DNasa (10 μ g/ml) para eliminar restos de RNA e incubar durante 30 min a 37°C.
10. Estimar la cantidad de DNA obtenida por electroforesis y almacenar a -20°C.

★ **Tampón CTAB 3X:** CTAB 3% (w/v), Tris-HCl 100mM, pH 8.0, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M y β -mercaptoetanol 1% (v/v).

5.2.- Extracción y purificación de DNA plasmídico.

El aislamiento rápido y a pequeña escala de DNA plasmídico a partir de *E. coli* y *A. tumefaciens* se realizó con el “Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega), con el que se consiguen muestras de gran calidad. La técnica se basa en la

descrita por Birnboim y Doly (1979) o de lisis alcalina, en que las células se lisan en presencia de NaOH y SDS, con pequeñas modificaciones. Para llevar a cabo la extracción de DNA plasmídico se siguieron los pasos descritos a continuación:

1. Inocular 10 ml de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente, con una colonia de bacterias procedente de placa o “stock” de glicerol.
2. Incubar a 37°C toda la noche en agitación (225 rpm).
3. Centrifugar el cultivo resultante a 1090 x g (2574 rpm) durante 15 min a 4°C.
4. Decantar el sobrenadante, dejando el precipitado tan seco como sea posible.
5. Resuspender el precipitado en 250 µl de “Cell Resuspension Solution” y mantener la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Añadir 250 µl de “Cell Lysis Solution” para lisar las células. Cerrar los tubos y mezclar el contenido invirtiendo 4 veces.
7. Tratar con 10 µl de proteasa alcalina durante no más de 5 min.
8. Añadir 350 µl de “Wizard Plus SV Neutralization Solution” y mezclar inmediatamente invirtiendo los tubos para neutralizar el efecto de la proteasa alcalina.
9. Centrifugar la muestra 10 min a 14000 x g (11478 rpm).
10. Decantar el sobrenadante en la columna de afinidad incluida en el kit y centrifugar hasta la total eliminación del líquido.
11. Lavar la columna con 750 µl de “Column Wash Solution” a temperatura ambiente y centrifugar a máxima velocidad durante 1 min.
12. Repetir el proceso de lavado con 250 µl de “Column Wash Solution” y centrifugar de nuevo.
13. Eliminar los restos de etanol con una centrifugación de 1 min a temperatura ambiente.

14. Eluir el material plasmídico con la adición de agua libre de DNasa y centrifugar 1 min a 14000 x g (11478 rpm).

15. Almacenar a -20 °C.

★ **“Cell Resuspension Solution”**: Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, EDTA 10 mM y 100 µg/ml de RNasa A.

★ **“Cell Lysis Solution”**: NaOH 0.2 M y SDS al 1% (w/v).

★ **“Wizard Plus SV Neutralization Solution”**: Acetato potásico 0.76 M (≈ pH 4.2), ácido acético glacial 2.1 M e hidrocloreuro de guanidina 4.1 M.

★ **“Column Wash Solution”**: Acetato potásico 60 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 y etanol al 95% (v/v).

5.3.- Extracción y purificación de RNA total.

Como material de partida para la extracción de RNA de *Arabidopsis thaliana* se utilizaron plántulas sometidas a diferentes tratamientos. Para la extracción del RNA se utilizó el preparado “RNA wiz”, siguiendo las especificaciones del suministrador (Ambion):

1. Disgregar el material de partida en un tubo eppendorf utilizando la técnica expuesta en el apartado 5.1.
2. Colocar en N₂ líquido para mantener congelado el tejido y añadir 1 ml de “RNA wiz” por cada 100 mg de tejido.
3. Agitar de nuevo en el Silamat durante 5-10 seg.
4. Incubar 5 min a temperatura ambiente.
5. Añadir 0.2 volúmenes de cloroformo agitando en vórtex durante 20 seg.
6. Incubar 10 min a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 10000 x g (8198 rpm) durante 15 min a 4°C y recoger la fase acuosa.

8. Añadir 0.5 volúmenes de agua libre de RNasa, 1 volumen de isopropanol (2-propanol) y mezclar.
9. Incubar durante 10 min a temperatura ambiente y hasta completar 1 h a 4 °C.
10. Centrifugar a 10000 x g (8198 rpm) durante 15 min a 4°C.
11. Descartar el sobrenadante y añadir al menos 1 volumen de etanol al 75% (v/v).
12. Agitar en vórtex y centrifugar durante 5 min.
13. Eliminar el sobrenadante y secar durante 5 min.
14. Resuspender en 30 µl de agua tratada con DEPC (Dietil pirocarbonato, Sigma).
15. Almacenar a -80°C.

Alternativamente, se utilizó el preparado “TRI Reagent” de la misma casa comercial (Ambion), principalmente para aquellas muestras empleadas en análisis transcriptómicos. Los pasos a seguir son:

1. Disgregar el material siguiendo el mismo procedimiento que en el caso anterior.
2. Añadir 1 ml de “TRI Reagent” por cada 100 mg de tejido y agitar en el Silamat durante 5 seg.
3. Incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
4. Añadir 0.2 volúmenes de cloroformo, agitar en vórtex durante 10-20 seg y centrifugar 10-15 min a 12000 x g (9838 rpm).
5. Recoger la fase acuosa y añadir 0.5 volúmenes de isopropanol (2-propanol) frío. Mezclar e incubar durante 10 min a temperatura ambiente y hasta completar 1 h a 4°C.
6. Centrifugar a 12000 x g (9838 rpm) durante 8 min.

7. Descartar el sobrenadante y añadir 1 volumen de etanol al 75% (v/v) (-20°C). Agitar en vórtex.
8. Centrifugar durante 5 min a 7500 x g (6149 rpm).
9. Eliminar el etanol y resuspender en 30 µl de agua libre de RNasa, incubándose 5 min a 65°C para mejorar la resuspensión.
10. Mantener en hielo a 4°C toda la noche.
11. Centrifugar 10 min a 11000 x g (9018 rpm) y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
12. Almacenar a -80°C.

5.4.- Cuantificación de ácidos nucleicos.

La determinación de la concentración de DNA y RNA se realizó midiendo la absorbancia de las soluciones a 260 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1603) y considerando que una unidad de densidad óptica A_{260} equivale a 40 µg/ml de RNA y 50 µg/ml de DNA. También se midió la D.O. a 235 y 280 nm para determinar la pureza de la muestra y el grado de contaminación en azúcares y proteínas, respectivamente.

Alternativamente, se utilizó el espectrofotómetro ultrasensible de medición de ácidos nucleicos (Nanodrop Technologies Inc.), que a través de un programa informático, proporciona los µg/µl de DNA y RNA presentes en la muestra.

5.5.- Tratamiento y modificación del DNA.

5.5.1.- Digestión del DNA con enzimas de restricción.

Los tratamientos con endonucleasas de restricción se realizaron de forma rutinaria para la separación de insertos de cDNA del plásmido. Las enzimas utilizadas hidrolizan las moléculas del DNA en secuencias nucleotídicas concretas y se especifican en la Tabla M.9. Las digestiones de las muestras con estas enzimas se realizaron siguiendo las especificaciones de los suministradores (Roche) o siguiendo las condiciones más generales descritas por Sambrook et al. (1989). La temperatura a la que se realizaron las

incubaciones fue de 37 °C, mientras que los tiempos de incubación variaron desde 2 a 4 horas.

Tabla M.9.- Enzimas de restricción empleadas.

Enzima de Restricción	Sitio de corte	Referencia
<i>Bam</i> HI	g/gatcc	Roche.
<i>Nco</i> I	c/catgg	Roche.
<i>Not</i> I	gc/ggcccgc	Roche.
<i>Sac</i> I	gagct/c	Roche.
<i>Spe</i> I	a/ctagt	Roche.

5.5.2.- Ligación: T4 DNA ligasa.

La inserción de fragmentos de DNA en el vector plasmídico, se realizó utilizando la DNA ligasa del fago T4 (Promega y Roche), enzima que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre moléculas que presentan extremos tanto cohesivos como romos.

Para ello se linearizó el plásmido con las enzimas apropiadas, siendo posteriormente purificado. También se purificó y se calculó la cantidad de inserto de DNA a utilizar en la reacción, según la fórmula:

$$X \text{ ng de inserto de DNA} = 3 \times (Y \text{ pb inserto de DNA}) \times (\text{ng vector}) / (\text{pb vector})$$

Las reacciones de ligación con los vectores pGEM-T y pGEM-T easy se realizaron en un volumen final de 10 µl que contiene:

✧ DNA	x µl
✧ Vector	50 ng
✧ T4 DNA ligasa (Promega)	1 µl
✧ Tampón de ligación 2X	5 µl
✧ Agua estéril	hasta un volumen final de 10 µl

★ **Tampón de ligación 2X:** Tris-HCl 60 mM, pH 7.8, MgCl₂ 20 mM, DTT 20 mM, ATP 2 mM y polietilenglicol al 10% (w/v).

Las reacciones de ligación con el vector pBI121 se realizaron en un volumen final de 20 μ l que contiene:

✧ DNA	x μ l
✧ Vector	50 ng
✧ T4 DNA ligasa (Roche)	1 μ l
✧ Tampón de ligación 10X	2 μ l
✧ Agua estéril	hasta un volumen final de 20 μ l

★ **Tampón de ligación 10X:** Tris-HCl 66 mM, pH 7.5, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM y ATP 1 mM.

En ambos casos los pasos a seguir para llevar a cabo la ligación son:

1. Incubar el DNA en una relación 3 veces proporcional del inserto respecto al vector (3:1), en presencia de DNA ligasa (1U) y del tampón de ligación.
2. Mantener las reacciones a 16°C durante 24 h.
3. Transformar *E. coli* o *A. tumefaciens* (en función de los plásmidos utilizados) (apartados 4.3.2. y 4.4.2.) con la mezcla de ligación y plaquear en medio selectivo (suplementado con antibiótico) para identificar las colonias portadoras de plásmidos recombinantes.

5.5.3.-DNA Polimerasas.

Otros experimentos de modificación de las moléculas de DNA se realizaron utilizando diversas enzimas que copian la cadena de DNA (polimerasas) y que se detallan a continuación:

-Transcriptasa inversa SuperScript™ (Invitrogen), necesaria para la síntesis de la primera cadena de cDNA a partir del RNA. La transcripción inversa se realizó a partir de 1 μ g de RNA total obtenido de plántulas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 o *Ler* y líneas mutantes o transgénicas, utilizando el “SuperScript™ 1st Strand Synthesis System for RT-PCR” (Invitrogen), a partir del iniciador oligo(dT)₁₂₋₁₈. Los pasos a seguir son:

1. Añadir 1 μl del oligonucleótido Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y 1 μl de la mezcla de dNTPs 10 mM a cada muestra de RNA.
2. Desnaturalizar la muestra de RNA a 65°C durante 5 min y mantener en hielo al menos 1 min.
3. Añadir 9 μl de la mezcla de la reacción e incubar durante 2 min a 42°C:

✧ RT Buffer 10X	2 μl
✧ MgCl ₂ 25 mM	4 μl
✧ DTT 0.1M	2 μl
✧ Inhibidor de RNasa (40 U/ μl)	1 μl
4. Añadir 1 μl de la enzima “SuperScript II Reverse Transcriptase” (50U/ μl) e incubar 50 min a 42°C.
5. Incubar a 70°C durante 15 min y enfriar en hielo.
6. Añadir 1 μl de RNasa H a cada tubo e incubar 20 min a 37°C.
7. Almacenar el cDNA resultante a -20°C hasta su utilización posterior.

★ **RT Buffer 10X:** Tris-HCl 200 mM, pH 8.4 y 500 mM KCl.

Alternativamente, se utilizó la transcriptasa reversa AMV, “1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR” (Roche), a partir del iniciador oligo-p(dT)₁₅. Los pasos a seguir son:

1. Incubar a 65°C durante 15 min para desnaturalizar la muestra de RNA. Mantener en hielo 5 min.
2. Añadir 11.8 μl de la mezcla de la reacción al RNA desnaturalizado:

✧ RT Buffer 10X	2 μl
✧ MgCl ₂ 25 mM	4 μl
✧ dNTPs 10 mM	2 μl
✧ Oligo-p(dT) ₁₅ (0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1 μl
✧ Inhibidor de RNasa (50 U/ μl)	1 μl
✧ AMV RT	0.8 μl

3. Incubar la reacción a 25°C durante 10 min para permitir el anillamiento de los iniciadores.
4. Mantener en hielo 5 min.
5. Incubar durante 1 h a 42°C.
6. Incubar a 99°C durante 5 min para desnaturalizar la transcriptasa reversa y mantener en hielo 5 min.
7. Almacenar las muestras a -20°C.

★ **RT Buffer 10X:** Tris-HCl 100 mM, pH 8.3 y 500 mM KCl.

-**Fragmento Klenow** de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Roche), utilizada para el marcaje radiactivo de fragmentos de DNA (apartado 5.8.) y la creación de extremos romos (apartado 10.1.1.).

-**Taq DNA polimerasa** (Roche), enzima aislada de *Thermus aquaticus* y fundamental en la técnica de PCR (apartado 5.10.).

5.6.- Electroforesis de ácidos nucleicos.

El análisis de los fragmentos de DNA y RNA obtenidos, se realizó por electroforesis en geles de agarosa a una concentración del 1-1.2% (w/v). En la preparación de los geles y el desarrollo de las electroforesis se siguieron los procedimientos convencionales descritos por Sambrook et al. (1989).

5.6.1.- Geles de DNA.

Para las electroforesis de DNA, los geles de agarosa se prepararon al 1-1.2% (w/v) siguiendo los siguientes pasos:

1. Mezclar 1-1.2 g de agarosa en 100 ml de tampón TBE 1X.
2. Llevar la mezcla a ebullición.

3. Incorporar 10 μ l de bromuro de etidio (10 mg/ml), como agente intercalante, para visualizar los fragmentos de DNA en un transiluminador con luz ultravioleta (302 nm) ("UVP BioDoc-It™ Imaging System).
4. Distribuir la mezcla en el molde para geles y solidificar a temperatura ambiente.

★ **Tampón TBE 1X:** Tris/ácido bórico 1M y EDTA 20 mM.

Las muestras de DNA se prepararon para su carga en el gel del siguiente modo:

1. Mezclar las muestras con tampón de la muestra (LB 10X).
2. Cubrir el gel con el tampón de electroforesis TBE 1X.
3. Cargar las muestras en los pocillos con la ayuda de una micropipeta.
4. Aplicar una diferencia de potencial de 70-100 V durante 40 min.
5. Visualizar los fragmentos de DNA en un transiluminador.

★ **LB (Loading Buffer)10X:** Tris-HCl 1M, pH 8.0, glicerol 60% (v/v), azul de bromofenol 0.25% (w/v) y xylene cyanol 0.25% (w/v).

El tamaño de los distintos fragmentos de DNA se estimó por comparación con los marcadores de DNA del fago λ digerido con *Eco* RI y *Hind* III (Sigma) para pesos moleculares entre 21 y 0.5 kb.

5.6.2.- Geles de RNA.

Los distintos tipos de RNA fueron separados en geles desnaturizantes de agarosa al 1.2% (w/v) que se elaboraron de la siguiente forma:

1. Mezclar 1.8 g de agarosa en 112.5 ml de agua Milli Q.
2. Disolver por calentamiento.
3. Añadir 28 ml de formaldehido (37% v/v) como agente desnaturizante, para evitar la formación de estructuras secundarias y 15 ml de 10X MEN.

4. Distribuir la mezcla en el molde para geles y solidificar a temperatura ambiente.

★ **10X MEN:** MOPS 200 mM, acetato sódico 50 mM y EDTA 20 mM, pH 7.0.

Las muestras de RNA se prepararon de la siguiente forma:

1. Tomar el volumen de muestra necesario para obtener 10 µg de RNA y completar con agua destilada estéril hasta alcanzar un volumen final de 20 µl.
2. Añadir 31.3 µl de tampón de carga.
3. Desnaturalizar la muestra por calentamiento a 55°C durante 15 min y enfriar en hielo.

★ **Tampón de carga:** 20 µl de formamida desionizada al 50% (v/v), 5 µl 10X MEN, 6 µl formaldehído al 6% (v/v) y 0.3 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml, que va a permitir la visualización del RNA en un transiluminador de luz ultravioleta).

La electroforesis se desarrolló a 70 V durante unos minutos para que penetrara la muestra en el gel y posteriormente se desarrolló a 100 V, utilizando el tampón de corrido 1X MEN. Para visualizar el frente de corrido se cargaron 10 µl de LB 10X en uno de los pocillos.

5.7.- Purificación de fragmentos de DNA.

Cuando fue necesario aislar determinados fragmentos de DNA para su posterior uso y caracterización (obtención de sondas, subclonación, etc.), éstos se obtuvieron y purificaron a partir de geles de agarosa. Para ello se utilizó el “GeneClean Turbo Nucleic Acid Purification kit” (Bio 101 Systems, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. Tras la separación de los fragmentos por electroforesis, se procedió de la siguiente forma:

1. Cortar el fragmento de interés del gel de agarosa con un bisturí estéril bajo luz UV.

2. Introducir el trozo de agarosa en un tubo eppendorf y añadir 100 μ l de “GeneClean turbo salt” (formulación de la casa comercial) por cada 0.1 g de gel de agarosa.
3. Incubar a 55°C durante 5 min, mezclando el contenido cada 2 min.
4. Una vez disuelta la agarosa, transferir un máximo de 600 μ l a una columna “GeneClean turbo cartridge”.
5. Centrifugar a 16221 x g (13300 rpm) durante 5 seg y eliminar el sobrenadante.
6. Lavar el precipitado con 500 μ l de la solución de lavado (“Turbo Wash Solution”, formulación de la casa comercial).
7. Centrifugar a 16221 x g (13300 rpm) durante 5 seg y repetir el lavado.
8. Centrifugar durante 4 min para eliminar cualquier resto de alcohol.
9. Colocar la columna en un nuevo tubo eppendorf y añadir 30 μ l de la solución de elución (formulación de la casa comercial). Incubar 5 min a temperatura ambiente.
10. Centrifugar 1 min para obtener el sobrenadante que contiene el DNA.
11. Almacenar a -20°C.

5.8.- Marcaje radiactivo del DNA.

La técnica empleada para el marcaje de fragmentos de DNA fue la denominada *random primed* utilizando el kit “Rediprime II Random Prime Labelling System” (Amersham Biosciences). Siguiendo las instrucciones del suministrador, se realizaron los siguientes pasos:

1. Diluir el DNA (2.5-25 ng) en 45 μ l de tampón TE.
2. Desnaturalizar el DNA por calor a 95-100 °C durante 5 min y mantener en hielo otros 5 min.

3. Centrifugar brevemente y añadir a la reacción de marcaje, que contiene dATP, dGTP, dTTP, enzima *Klenow* libre de exonucleasa y oligonucleótidos al azar.
4. Añadir 5 μ l de [α - 32 P] dCTP (3000 Ci/mmol) (Amersham) y mezclar hasta conseguir un color púrpura.
5. Incubar a 37°C durante 1 h.
6. Parar la reacción añadiendo 0.5 μ l de EDTA 0.5 M y diluir con 50 μ l de tampón TE.

★ **Tampón TE:** Tris HCl 10 mM, pH 8.0 y EDTA 1 mM.

Antes de usar la sonda en las reacciones de hibridación, se eliminó el exceso de nucleótidos usando las columnas “Mini Quick Spin DNA” (Roche). Los pasos a seguir son:

1. Resuspender la matriz de la columna mediante agitación vigorosa y centrifugar a 3659 x *g* (3000 rpm) durante 1 min para eliminar el exceso de tampón.
2. Depositar la sonda en el centro de la matriz y centrifugar de nuevo a 3659 x *g* (3000 rpm) durante 2 min.
3. Recoger el eluido en un eppendorf que contiene la sonda purificada sin los nucleótidos no incorporados. Medir la relación sonda:columna ($\geq 2:1$).
4. Desnaturalizar la sonda por incubación a 95-100°C durante 5 min seguida de otros 5 min en hielo.

5.9.- Northern blot.

Esta técnica sirve para transferir distintos tipos de RNA, separados por electroforesis, a membranas de nylon para su posterior hibridación con una sonda radiactiva.

5.9.1.- Transferencia de RNA.

Los RNAs obtenidos de los distintos tratamientos fueron sometidos a electroforesis (apartado 5.6.2.) y transferidos a un filtro de nylon (Hybond-N, Amersham) siguiendo el procedimiento que se describe a continuación:

1. Añadir tampón de transferencia SSC 20X a la cubeta de transferencia.
2. Depositar en la cubeta una placa de cristal que actúa como puente sobre la cubeta de transferencia.
3. Impregnar una hoja de papel de filtro con el tampón SSC 20X y colocar sobre la placa de cristal. Las burbujas que puedan quedar atrapadas entre el papel se eliminan haciendo rodar sobre él una varilla de vidrio.
4. Colocar el gel con la cara de la transferencia en contacto con el papel de filtro y depositar sobre él una membrana de nylon (Hybond-N, Amersham) de igual tamaño que el gel y, del mismo modo que en el caso anterior, se eliminan las burbujas de aire.
5. Colocar 3-4 papeles de filtro (Whatman 3MM) de aproximadamente 7 cm sobre la membrana y una torre de papel de celulosa.
6. Superponer una placa de vidrio y un peso de 300-500 g para facilitar la transferencia.
7. Dejar la transferencia durante 16-18 h, cambiando el papel de celulosa a intervalos de 8 h.
8. Una vez finalizada la transferencia, desmontar el Northern, marcando la situación de los pocillos.
9. Exponer el filtro 2 min en un Stratalinker (UV) 1800 (Stratagene), con el fin de que el RNA transferido quede fijado en la membrana.

★ **Tampón de transferencia SSC 20X:** NaCl 3 M y citrato sódico 0.3 M, pH 7-8.

En estas condiciones, el filtro puede ser usado para la hibridación con una sonda radiactiva.

5.9.2.- Hibridación y autorradiografía.

La prehibridación de los filtros Hybond-N se realizó mediante la técnica de Church y Gilbert (1984), siguiendo los pasos que se describen a continuación:

1. Precalentar el horno de hibridación a 65°C.
2. Preparar la solución de prehibridación, mezclando 4 ml tampón fosfato 1 M pH 7.2, 9 ml de agua estéril y 7 ml de SDS 20% (w/v).
3. Calentar esta mezcla a 65°C en el horno de hibridación.
4. Añadir a los 10 min 40 µl de EDTA 0.5 M pH 8.0.
5. Prehibridar el filtro durante 1 h a 65°C.
6. Añadir la sonda radiactiva desnaturalizada a la solución de prehibridación evitando que toque la membrana.
7. Incubar toda la noche a la misma temperatura.

Una vez finalizada la hibridación, se procedió a realizar su lavado con el fin de eliminar el exceso de radiactividad de la membrana:

1. Precalentar las soluciones de lavado SSC 2X, SDS 0.1% (w/v) y SSC 0.5X, SDS 0.1% (w/v) a 65°C.
2. Recoger la sonda en un tubo de 50 ml para su posible reutilización y conservar a -20°C en una urna de metacrilato.
3. Realizar un primer lavado de la membrana con una solución de baja astringencia (SSC 2X, SDS 0.1% w/v), durante 10 min a 65°C.
4. Realizar un segundo lavado durante 10 min a 65°C, aumentando la astringencia del lavado (SSC 0.5X, SDS 0.1% w/v).
5. Comprobar el nivel de radiactividad del filtro y repetir el último lavado en caso de ser necesario.
6. Cubrir los filtros con una película plástica y exponerlos en placas de imagen Bas-IP 2040S (20x40 cm) Fujifilm durante 24 h.

7. Revelar las placas utilizando el analizador de bioimágenes “Bio-imaging analyzer” Bas-1500 (Fujifilm) para determinar la intensidad de las manchas.

5.10.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

5.10.1.- Técnica de PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se emplea para amplificar clones o fragmentos de cDNA comprendidos entre dos regiones de secuencia conocida. Para ello, se precisan dos oligonucleótidos de diferente secuencia y complementarios al extremo 3' de cada una de las hebras del DNA molde (Tabla M.6.). Las reacciones rutinarias se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ l que contiene:

☒ DNA (≤ 1 μ g)	2 μ l
☒ Oligonucleótido sentido (100 y 20 μ M)	1 μ l
☒ Oligonucleótido antisentido (100 y 20 μ M)	1 μ l
☒ dNTPs 10 mM (Roche)	1 μ l
☒ Tampón de la polimerasa 10X	5 μ l
☒ Taq polimerasa 5 U (Roche)	1 μ l
☒ Agua estéril	39 μ l

★ **Tampón de la polimerasa 10X:** Tris-HCl 10 mM, pH 8.3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM.

En la reacción, el DNA a amplificar fue previamente desnaturalizado por calor en presencia de un exceso molar de los oligonucleótidos y de los cuatro dNTPs, y después la mezcla se enfrió hasta una temperatura a la cual los oligos anillaban con su secuencia molde. La temperatura de anillamiento (T_a) se calculó con el programa Oligo 4.05, dependiendo de la longitud y composición de los oligonucleótidos utilizados, siguiendo la fórmula: $T_a = 2(A+T) + 4(G+C)$. Una vez producido el anillamiento, los oligonucleótidos fueron extendidos con la polimerasa, que sintetiza el nuevo DNA en dirección 5'→3'. El tiempo de extensión aproximado fue de 1 min por Kb. Las condiciones de temperaturas y tiempos empleados en las distintas reacciones de PCR fueron diferentes dependiendo de cada caso, y se detallan en los apartados

correspondientes. Para estas reacciones se utilizaron los termocicladores GeneAmp PCR System 9700 (Perkin- Elmer) y Mastercycler gradient (Eppendorf).

5.10.2.- TAIL PCR.

La TAIL PCR (Thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction) es una técnica muy eficiente para la amplificación de secuencias desconocidas que son adyacentes a sitios de inserción conocidos en Arabidopsis. Esta técnica consiste en tres reacciones de PCR consecutivas. Para ello, se usaron oligonucleótidos específicos de la inserción (cebadores Ds) junto con oligonucleótidos degenerados (cebadores AD) sintetizados y suministrados por Isogen, Inc (Tabla M.7.). Las condiciones de la TAIL-PCR se optimizaron para cada reacción utilizando concentraciones de DNA, oligonucleótidos y volúmenes finales diferentes.

En la primera PCR (Tail1), para un volumen final de 20 μ l la mezcla de amplificación contenía:

✧ DNA molde (2-5 μ g/ μ l)	2 μ l
✧ Oligonucleótido degenerado AD2 (20 μ M)	3 μ l
✧ Oligonucleótido Ds 5'-1 (20 μ M)	0.2 μ l
✧ dNTPs 10 mM (Roche)	0.4 μ l
✧ Tampón de la polimerasa 1X	2 μ l
✧ Taq polimerasa 5 U (Roche)	0.2 μ l
✧ Agua estéril	12.2 μ l

★ **Tampón de la polimerasa 1X:** Tris-HCl 10 mM, pH 8.3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM.

En la segunda PCR (Tail2) consecutiva la mezcla contenía:

✧ DNA molde (1:50)	1 μ l
✧ Oligonucleótido degenerado AD2 (20 μ M)	3 μ l
✧ Oligonucleótido Ds 5'-2 (20 μ M)	0.2 μ l
✧ dNTPs 10 mM (Roche)	0.4 μ l
✧ Tampón de la polimerasa 1X	2 μ l

- ✧ Taq polimerasa 5 U (Roche) 0.2 µl
- ✧ Agua estéril 13.2 µl

★**DNA molde:** procede de una dilución 1:50 de la PCR anterior.

En la tercera PCR (Tail3) la mezcla contenía en un volumen final de 30 µl:

- ✧ DNA molde (1:10) 1.5 µl
- ✧ Oligonucleótido degenerado AD2 (20 µM) 3 µl
- ✧ Oligonucleótido Ds 5'-5 (20 µM) 0.3 µl
- ✧ dNTPs 10 mM (Roche) 0.6 µl
- ✧ Tampón de la polimerasa 1X 2 µl
- ✧ Taq polimerasa 5 U (Roche) 0.3 µl
- ✧ Agua estéril 22.3 µl

★**DNA molde:** procede de una dilución 1:10 de la PCR anterior.

Las condiciones de cada PCR se especifican en la Figura M.3.

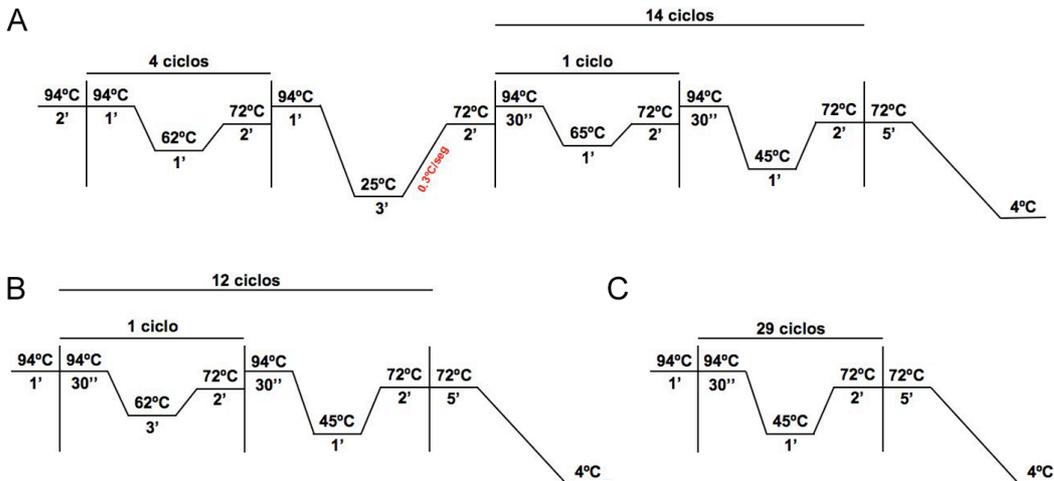


Figura M.3.- Condiciones utilizadas en las tres reacciones consecutivas de la TAIL-PCR. (A) TAIL 1, (B) TAIL 2, (C) TAIL 3.

5.10.3.- PCR cuantitativa.

La qRT-PCR es una técnica que nos permite cuantificar, de forma muy específica, la cantidad de mRNA en una muestra determinada. El fundamento de esta

técnica consiste en la monitorización, en todo momento, del proceso de amplificación que se está llevando a cabo ya que utiliza técnicas de fluorescencia. En el desarrollo de este trabajo, se ha utilizado como método de detección la molécula de SYBR Green I que emite fluorescencia al unirse a moléculas de cDNA de doble cadena durante la amplificación. Al final del proceso de amplificación, se obtendrá la correspondiente gráfica que representará la intensidad de fluorescencia con respecto al número de ciclos que han tenido lugar. Esta gráfica nos permitirá extrapolar los resultados referentes a las cantidades iniciales de cDNA con las que contábamos en nuestra muestra, que tendrá su reflejo en la cantidad del transcrito que es lo que realmente nos indica los niveles de expresión de un gen.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo empleando el termociclador ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA), por triplicado y en un volumen final de 25 µl que contiene:

✧ 2X Master Mix	12 µl
✧ ROX (300 nM concentración final)	0.375 µl
✧ Oligonucleótido sentido (50-300 nM)	x µl
✧ Oligonucleótido antisentido (50-300 nM)	y µl
✧ cDNA (10 ng)	5 µl
✧ Agua estéril	hasta completar 25 µl

★ **2X Master Mix:** “Brilliant® SYBR® Green QPCR MasterMix” (Stratagene).

La concentración óptima a utilizar de cada pareja de oligonucleótidos (sentido y antisentido) se determinó analizando su curva de disociación, utilizando siempre la menor concentración que resulte en Rn (relación entre la intensidad de la fluorescencia emitida por la muestra y la intensidad de la fluorescencia emitida por el control) mayores y Ct (corte entre el *Threshold* y la curva de amplificación obtenida, ciclo umbral que se utiliza para la cuantificación) menores, y que no generen dímeros. Para ello se compararon todas las combinaciones de concentraciones posibles entre 50 y 300 nM.

Las condiciones de tiempos y temperaturas se especifican en la Figura M.4.

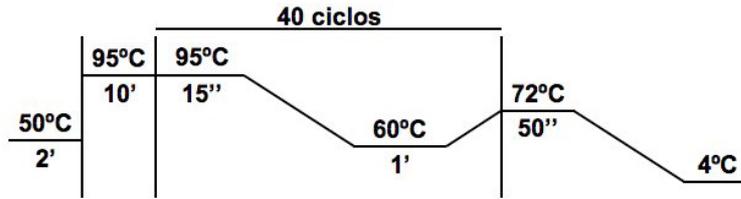


Figura M.4.- Condiciones de tiempos y temperaturas utilizadas en la qRT-PCR.

Principalmente existen dos métodos de cuantificación, dependiendo si la eficiencia de amplificación del gen objeto de estudio y el gen de referencia (control endógeno: gen de la β -actina) son comparables.

En un principio, se analizaron los datos mediante el método basado en la utilización de una recta patrón a partir de cDNA de concentraciones conocidas, que provienen del control endógeno, extrapolando la concentración del gen de interés en la muestra experimental a partir del Ct obtenido. Posteriormente, se calculó la relación entre la cantidad del gen testado y del control endógeno, comparándose dicha relación entre las muestras. Para ello, se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$\text{Target Normalizado (muestra problema)} = \frac{\text{Target}}{\text{Control endógeno}}$$

$$\text{Calibrator Normalizado (muestra control)} = \frac{\text{Calibrator}}{\text{Control endógeno}}$$

$$\text{Fold difference in target} = \frac{\text{Target Normalizado}}{\text{Calibrator Normalizado}}$$

Otro método utilizado fue el $\Delta\Delta\text{Ct}$, en el que se comparan directamente los Cts del gen de interés y del gen referencia (ΔCt) en cada muestra. Posteriormente, se comparan los ΔCt de la muestra experimental con respecto a la muestra control. Para aplicar este método es necesario comprobar que las eficiencias de ambos genes sean

similares. Para ello, se determina cómo varía ΔCt ($Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}}$) en las diferentes diluciones de las muestras (recta patrón del control endógeno y del gen problema). La eficiencia de amplificación de ambos genes es comparable cuando el valor absoluto de la pendiente de los valores de ΔCt vs. Log input es < 0.1 . En todos los casos, este valor fue < 0.1 . Las ecuaciones utilizadas para calcular los valores de $\Delta\Delta Ct$ fueron:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{test}} - \Delta Ct_{\text{calibrator}}$$

5.11.- Secuenciación del DNA.

La determinación de la secuencia de nucleótidos de los clones de cDNA se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca, que posee un secuenciador automático ABI 377 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Inc.) y utiliza el “dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” con la enzima AmpliTaq DNA polimerasa FS (Perkin Elmer).

Las muestras se prepararon mezclando 100 ng de DNA de doble cadena con 3 pmol del oligonucleótido correspondiente hasta un volumen final de 8 μ l. Los iniciadores utilizados fueron “M13 (-20) universal primer” y promotor T7, además de los específicos para completar la secuencia de los clones *AtLecPK1* (At5g01540) y *PATL2* (At1g22530) (Tabla M.6.).

6.- CLONAJE DE LOS FRAGMENTOS DE INTERÉS.

La construcción de los plásmidos recombinantes y su transformación se llevó a cabo como se describe a continuación.

Las regiones codificantes de los clones aislados, correspondientes a *AtLecPK1* y *AtPATL2*, se amplificaron por PCR utilizando los oligonucleótidos especificados en la Tabla M.6., los cuales se diseñaron según la secuencia del clon obtenida en la base de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org>). Las condiciones de la reacción de PCR se especifican en la Figura M.5.

El producto amplificado de ambos clones fue purificado utilizando “GeneClean Turbo Nucleic Acid Purification kit” (apartado 5.7.) y comprobado en gel de agarosa. Los fragmentos correspondientes a *AtLecPK1* y *AtPATL2* se ligaron directamente a los vectores pGEM-T y pGEM-T easy, respectivamente. En cada caso el inserto fue liberado mediante digestión con las enzimas de restricción adecuadas (*Spe* I/*Nco* I y *Nco* I, respectivamente) (apartado 5.5.1.).

La transformación de la cepa DH5 α de *E. coli* con estos dos plásmidos recombinantes se realizó según se indica en el apartado 4.3.2., seleccionando las colonias por resistencia a ampicilina, en ambos casos.

Del mismo modo, se obtuvo un fragmento correspondiente a la región 3' no codificante del clon *AtLecPK1*, que fue utilizado como sonda específica en el análisis por Northern Blot (apartado 5.9.), amplificado con los oligos detallados en la Tabla M.6. Las condiciones de la PCR se detallan en la Figura M.5A. Del mismo modo, se obtuvo una sonda para el análisis por Northern Blot del clon *AtPATL2*, utilizando los oligos que se especifican en la Tabla M.6. Las condiciones de la PCR se detallan en la Figura M.5B.

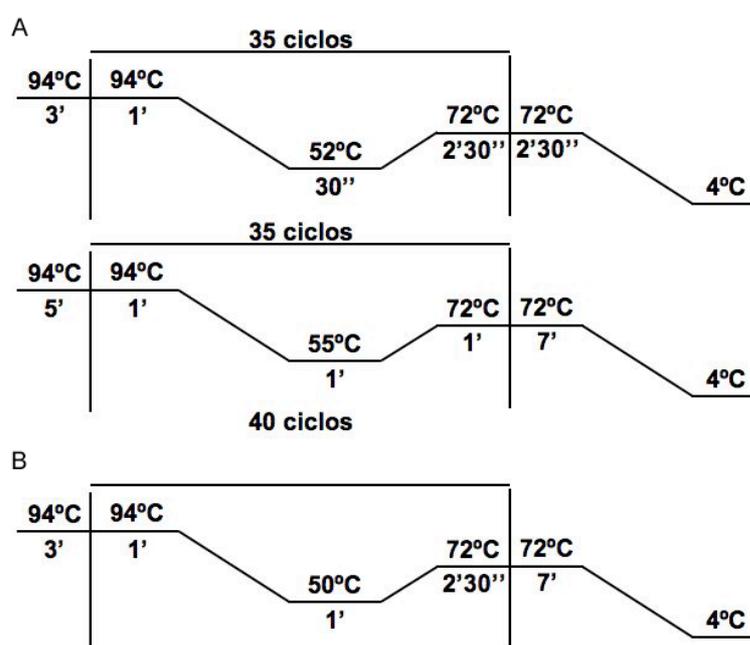


Figura M.5.- (A) Condiciones de la PCR para la obtención del clon *AtLecPK1* y la sonda específica utilizada en el análisis por Northern Blot, respectivamente. (B) Condiciones de la PCR para la obtención del clon *AtPATL2* y su sonda.

7.- ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.

7.1.- Extracción de proteínas.

La obtención de proteínas de las líneas transgénicas *pPIN1:PIN1:GFP* y *pPIN2:PIN2:GFP* se realizó partiendo de raíces seccionadas de plántulas de 7 días sometidas a diferentes tratamientos. Los pasos a seguir para llevar a cabo la extracción de proteínas se detallan a continuación:

1. Disgregar el material congelado en un tubo eppendorf con una varilla de plástico. Mantener siempre en N₂ líquido.
2. Homogeneizar añadiendo 50 µl de la solución de extracción.
3. Mantener en hielo durante 10 min y homogeneizar cada 2 min.
4. Centrifugar a 13000 x g (10658 rpm) durante 10 min y a 4°C.
5. Recoger el sobrenadante y almacenar a -20°C.

★Solución de extracción: Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 75 mM, EGTA 15 mM, MgCl₂ 15 mM, DTT 1 mM, Tween 20 0.1% (v/v), NaF 1mM, NaV 0.2 M, Na-pirofosfato 2 mM, β-glicerofosfato 60 mM y una mezcla de inhibidores de proteasas 1X (Roche).

7.2.- Cuantificación de proteínas.

La determinación de la concentración de proteínas se realizó utilizando el preparado comercial “Bio-Rad Protein Assay” (Bio-Rad), basado en la técnica de Bradford (1976) y utilizando seroalbúmina bovina (BSA) como estándar. A continuación se detallan los pasos a seguir:

1. Preparar diluciones de BSA (0.1-0.8 mg/ml) a partir de un stock de 2mg/ml.
2. Diluir una parte de la solución de tinción “Dye Reagent Concentrate” (formulación de la casa comercial) con 4 partes de agua destilada y desionizada.

3. Preparar las muestras diluyendo 5 μl del producto de extracción en 15 μl de agua.
4. Añadir 1 ml de la dilución 1:4 de la solución de tinción a cada muestra y diluciones de BSA.
5. Incubar a temperatura ambiente 5 min.
6. Medir la D.O. en el espectrofotómetro a 595 nm.

Con los datos obtenidos en la cuantificación se realizó una recta patrón con el estándar BSA y se extrapolaron las concentraciones de las muestras problema.

7.3.- Electroforesis de proteínas por SDS-PAGE.

La técnica utilizada para la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS fue la descrita por Laemmli (1970), con algunas modificaciones. Se utilizó un equipo Miniprotean II (Bio-Rad). La composición de los geles utilizados se especifica en la Tabla M.10. Los pasos a seguir para la preparación de los geles se detalla a continuación:

1. Preparar, en primer lugar, el gel separador mezclando los componentes en el orden señalado en la Tabla M.10.
2. Poner la mezcla entre 2 cristales colocados en posición vertical y solidificar.
3. Preparar el gel concentrante mezclando los compuestos como se indica en la Tabla M.10.
4. Añadir la mezcla al gel separador solidificado y colocar un peine para formar los pocillos.
5. Solidificar y guardar a 4°C hasta su utilización.

Tabla M.10.- Composición de los geles utilizados en la electroforesis de proteínas.

Reactivos	Gel separador 10%	Gel concentrante 4%
Agua MilliQ	4 ml	3.01 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	2.5 ml	–
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	–	1.25 ml
SDS 10% (w/v)	100 µl	50 µl
Acrilamida/bis-acrilamida 30% (w/v)	3.33 ml	0.66 ml
APS 10% (w/v)	50 µl	25 µl
TEMED	10 µl	5 µl

Dependiendo de las muestras, se cargaron entre 5 y 10 µg de proteína en un volumen final de 20 µl, añadiendo 5 µl del tampón de la muestra. Las muestras fueron desnaturalizadas mediante incubación a 95°C durante 5 min antes de ser cargadas en el gel. La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta con tampón de corrido 1X, a 100 V y 4°C.

★ **Tampón de la muestra 4X:** Tris-HCl 0.25 M, pH 6.8, SDS 8% (w/v), glicerol 40% (v/v), β-mercaptoetanol 20% (v/v) y azul de bromofenol.

★ **Tampón de corrido 10X:** Tris base 25 mM, glicina 190 mM y SDS 0.2% (w/v). Se utiliza al 1X.

Los tamaños de las proteínas separadas se determinaron por comparación con el marcador preteñido “See Blue® Pre-Stained” (Invitrogen) (Figura M.6).

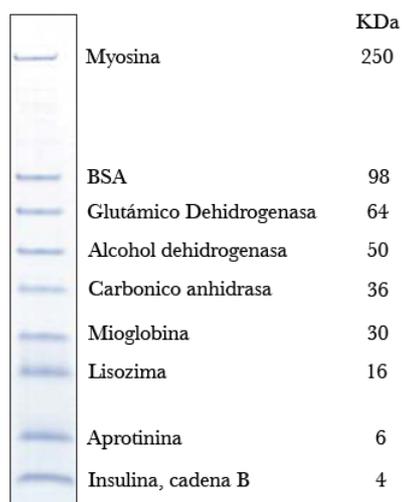


Figura M.6.- Marcador preteñido “See Blue® Pre-Stained” (Invitrogen).

7.4.- Western blot.

Esta técnica sirve para transferir proteínas, separadas previamente por electroforesis, a membranas de PVDF para su posterior hibridación con anticuerpos específicos que permiten reconocer las proteínas de interés (Burnette, 1981).

7.4.1- Electrotransferencia de proteínas.

La transferencia se llevó a cabo utilizando el método de Towbin et al. (1979) con algunas modificaciones. Los pasos a seguir son:

1. Una vez finalizada la electroforesis colocar sobre el gel una membrana de Immobilon™-P (Millipore) previamente sumergida en metanol absoluto durante 15 seg y luego equilibrada en tampón de transferencia durante al menos 5 min.
2. Humedecer papel filtro (Whatman 3M) y 2 esponjas en el tampón de transferencia.
3. Cubrir el gel y la membrana con papel filtro (Whatman 3M) y esponjas por ambos lados, y cerrar el *cassette* de electrotransferencia.

4. Introducir en una cubeta de electrotransferencia, orientando la membrana hacia el polo positivo del circuito.
5. Realizar la transferencia a 80 V durante 2 h usando el tampón de transferencia y a 4°C.
6. Una vez terminado este proceso, separar la membrana del gel e incubar en metanol al 100% durante 10 seg para eliminar el agua.
7. Secar la membrana durante 10 min para su posterior incubación con los anticuerpos respectivos.

★ **Tampón de transferencia:** Tris base 25 mM, glicina 192 mM, y metanol al 20% (v/v).

Una vez secada la membrana se realizó una incubación de 5 min en una solución de Ponceau S 0.1% (Sigma), para teñir las proteínas y comprobar que los niveles de carga y la transferencia se habían realizado correctamente. Posteriormente, se eliminó el colorante de la membrana lavando con agua destilada.

7.4.2.- Inmunodetección de las proteínas de interés.

La detección de las proteínas de interés (PIN1:GFP y PIN2:GFP) se llevó a cabo mediante hibridación con un anticuerpo monoclonal específico que reconoce la proteína verde fluorescente GFP (“Living Colors® A.v. Monoclonal Antibody”, Clontech). Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo unido a peroxidasa de rábano (“ECL™ Anti-Mouse IgG, Horseradish Peroxidase-Linked”, Amersham). Para la comprobación de las cargas se utilizó un anticuerpo monoclonal específico que reconoce la actina de plantas (“Monoclonal Anti-Actin Plant”, Sigma). La hibridación se realizó siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

1. Incubar la membrana en una solución de bloqueo, durante al menos 1 h y en agitación, para evitar la unión del anticuerpo a zonas inespecíficas de la membrana.
2. Eliminar la solución de bloqueo e incubar la membrana con el anticuerpo primario anti-GFP diluído (1:10000) en la misma solución de bloqueo

durante 16 h a 4°C con agitación suave. Posteriormente, para hibridar con el anticuerpo específico para actina, utilizar una dilución 1:10000 en la solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación suave.

3. Realizar 4 lavados de 5 min con PBS-T.
4. Incubar con el anticuerpo secundario diluido (1:5000) en la solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación suave.
5. Realizar 4 lavados de 5 min con PBS-T, seguido de un último lavado con PBS.

★ **Solución de Bloqueo:** PBS-T 1X y ECL Advance Blocking Agent (Amersham) al 2% (w/v).

★ **PBS 10X pH 7.5:** Di-hidrógeno fosfato de sodio 2-hidrato 80 mM, di-sodio hidrógeno fosfato anhidro 20 mM, cloruro de sodio 100 mM.

★ **PBS-T 1X:** Dilución 1:10 a partir de PBS 10X y Tween-20 0.1 % (v/v).

La detección de las proteínas se llevó a cabo utilizando el kit “ECL Advance™ Western Blotting Detection Kit” (ECL Advance Solution A y ECL Advance Solution B, Amersham) y siguiendo las indicaciones del suministrador. Este sistema de detección proporciona Luminigen® TMA-6 que actúa como sustrato de la peroxidasa de rábano. Esta enzima cataliza la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno. Inmediatamente después de la oxidación, el luminol se encuentra en un estado excitado del que pasa a la situación basal, reducida y más estable, emitiendo luz. La luz emitida tiene una longitud de onda de 440 nm, que fue captada por el sistema de detección LAS-1000, Fujifilm.

8.- ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO.

La caracterización molecular de las respuestas a NO durante los primeros estadios del desarrollo en Arabidopsis se realizó mediante análisis transcriptómico utilizando plántulas de ecotipo Col-0 sin tratar y tratadas con SNP y cPTIO (apartado 3.4.). Para cada tratamiento se realizaron diversas réplicas experimentales y 3 réplicas biológicas que fueron hibridadas independientemente. Una vez realizados los tratamientos, se procedió a la extracción de RNA total (apartado 5.3.). El RNA obtenido se analizó para comprobar su posible degradación utilizando un analizador Agilent 2100

Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

8.1.- Síntesis de cRNA biotinilado.

A partir de 4 µg del RNA obtenido se sintetizó cDNA utilizando el kit comercial suministrado por Affimetrix, siguiendo sus especificaciones, al igual que para el marcaje del cDNA por biotinización y posterior purificación del cRNA. Posteriormente, se fragmentaron 15 µg de cRNA mediante incubación a 94°C durante 35 min, dando lugar a fragmentos de 35-200 bases de longitud.

8.2.- Hibridación, lavado y escaneado.

La hibridación del microarray se realizó en la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Madrid. Se hibridaron 10 µg de cRNA fragmentado en la micromatriz del genoma completo de Arabidopsis ATH1 Genome Array (Affymetrix, Santa Clara, CA) que contenía 22500 transcritos de los 24000 genes descritos en *A. thaliana*. Para llevar a cabo la hibridación, tinción y escaneado se realizaron los siguientes pasos:

1. Añadir cada muestra a la solución de hibridación, siendo la concentración final de cRNA 0.05 µg/ml.
2. Hibridar durante 16 h a 45°C.
3. Lavar y teñir con estreptavidina-ficoeritrina en el equipo Fluidics station 450 (Affymetrix).
4. Escanear a una resolución de 2.5 µm en un escáner GeneChip®Scanner 3000 7G System (Affymetrix) y analizar los datos utilizando el GeneChip Operating Software (GCOS).

★ **Solución de hibridación:** Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico 100 mM, Na⁺ 1M, EDTA 20 mM y Tween-20 0.01% (v/v).

8.3.- Análisis de datos.

Los datos se analizaron utilizando el paquete informático affyImaGUI R (Wettenhall et al., 2006). Para su normalización y corrección del fondo se utilizó el algoritmo Robust Multi-array Analysis (RMA) (Irizarry et al., 2003). Para el análisis de expresión diferencial se utilizó el test estadístico de Bayes para modelos lineales de datos de microarrays (limma) incluido en el paquete affyImaGUI. El p-value fue corregido utilizando el método de Benjamini-Hochberg's (False Discovery Rate) (Benjamini y Hochberg 1995; Reiner et al., 2003).

Se consideró que un gen se expresaba diferencialmente cuando su p-value era menor de 0.05, y sólo fueron considerados para posteriores análisis aquellos genes cuyo \log_2 ratio era ≥ 1 o ≤ -1 .

El cluster jerárquico se calculó y diseñó utilizando el software TIGR MeV (Multiarray experiment viewer, version 4.4) proporcionado por el TIGR institute (Saeed et al., 2003). Los CEL.files de los diferentes tratamientos hormonales se obtuvieron del proyecto AtGenExpress (<http://arabidopsis.org/portal/expression/microarray/ATGeneExpress.jsp>) y todos los datos seleccionados fueron normalizados utilizando el software RMAExpress.

Para llevar a cabo los estudios de correlación entre el NO y diversos tratamientos hormonales se consideraron dos categorías diferentes, una corresponde a todos aquellos genes inducidos ≥ 2 -fold o reprimidos ≤ -2 -fold en las dos condiciones, y otra corresponde a genes que presentaron una inducción ≥ 2 -fold o una represión ≤ -2 -fold en una de las condiciones y en la otra condición presentaban al menos un mínimo de inducción 1-fold $\leq x, y < 2$ -fold o de represión 1-fold $\geq x, y > 2$ -fold, respectivamente. Se analizaron un total de 733 genes.

Los datos del análisis transcriptómico se analizaron utilizando la aplicación FatiGO (<http://fatiGO.bioinfo.cipf.es/>) en la cual se agruparon los genes según su función biológica. Alternativamente, se utilizó la base de datos "The Bio-Array Resource for Plant Functional Genomics" (BAR, <http://bar.utoronto.ca/>). La clasificación de los genes está basada en el MapMan versión 3.0.0 (<http://www.gabi.rzpd.de/projects/MapMan/>) (Thimm et al., 2004; Usadel et al., 2005).

Los datos del análisis transcriptómico han sido depositados en GenBank Gene Expression Omnibus (GEO), cuyo número de acceso es GSE21556.

9.- IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES.

9.1.- Extracción de flavonoides.

La identificación y cuantificación de flavonoles y antocianinas se realizó utilizando, para cada muestra, 3 extractos procedentes de plantúlas control y tratadas con SNP 100 μ M y cPTIO 1 mM, siguiendo los pasos detallados a continuación:

1. Liofilizar 20 mg de tejido vegetal.
2. Macerar las muestras liofilizadas en el solvente de extracción.
3. Agitar mediante vórtex y sonicar 10 min.
4. Centrifugar a 4000 x g (9446 rpm) durante 15 min.
5. Recoger el sobrenadante y repetir este proceso 2 veces (desde el paso 2).
6. Combinar los extractos y concentrar hasta eliminar el metanol aplicando vacío.
7. Lavar la fase acuosa con n-hexano para eliminar las clorofilas.
8. Activar una columna de C₁₈ Sep-Pak (Waters, Milford, Ma, USA) añadiendo 5 ml de metanol y posteriormente 5 ml de agua ultra-pura para estabilizar el relleno.
9. Depositar la muestra en la resina para purificar la muestra.
10. Lavar con agua ultra-pura con el fin de eliminar azúcares, ácidos y otras impurezas solubles en agua.
11. Añadir una solución de acetonitrilo:agua (80:20) y 0.5 TAF para recuperar los flavonoides retenidos en la columna.
12. Concentrar el eluido en un rotavapor bajo vacío.

13. Disolver los flavonoides en una solución acuosa que contiene ácido acético al 2.5% (v/v) y que se utilizará para su posterior análisis de identificación y cuantificación por HPLC-DAD-MS.

★ **Solvente de extracción:** Metanol al 70% (v/v) y ácido trifluoroacético (TAF) 0.5% (v/v).

9.2.- Identificación de flavonoides por HPLC-DAD-MS.

La identificación de los compuestos individuales se realizó por cromatografía líquida de alta presión y espectrofotometría de masas (HPLC-DAD-MS). Para la separación cromatográfica, se utilizó un equipo Hewlett-Packard 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), provisto con una bomba cuaternaria, inyector automático, sistema de termostatación de columnas y detector de diodos en circuito integrado, dotado de una célula de flujo para altas presiones con conexión al espectrofotómetro de masas. Las condiciones utilizadas para llevar a cabo la separación de los compuestos de interés fueron las descritas por Di Paola-Naranjo et al. (2004), con pequeñas modificaciones.

La fase estacionaria utilizada fue una columna para HPLC de fase reversa (AQUA® de Phenomenex; C₁₈; 5 µm, 150 mm × 4.60 mm) termostatación a 35°C. Como fase móvil se utilizó un gradiente binario compuesto por 2.5% (v/v) ácido acético (solvente A) y 100% acetonitrilo (solvente B) (Tabla M.11.).

Tabla M.11.- Gradiente cromatográfico.

Tiempo (min)	Solvente A	Solvente B
0	90	10
5	90	10
20	87	13
35	85	15
55	65	35

Las longitudes de onda seleccionadas como preferentes para la detección de flavonoles y antocianinas fueron 360 y 520 nm, respectivamente. Se inyectaron 100 µl de muestra a un flujo de 0.5 ml/min. Previo al análisis, las muestras y solventes fueron filtrados a través de filtros de 0.45 µm (Millipore).

El análisis de espectrofotometría de masas se llevó a cabo en un equipo Finnigan™ LCQ MS detector (Termostequest, San José, CA) equipado con una fuente de ionización a presión atmosférica (API), utilizando una interfase de ionización por electrospray (ESI), acoplado a una estación de tratamiento de datos *X-calibur™*. Las condiciones del método empleado fueron optimizadas empleando estándares de flavonoles y antocianos. La temperatura y voltaje de capilar fueron 195°C y 4 V, respectivamente. Los espectros de masas fueron registrados en modo ión positivo en un intervalo de relación m/z entre 150 y 1500. El detector fue programado para realizar una serie de tres barridos consecutivos: el primero del espectro total de masas (*full scan*), el siguiente correspondiente al espectro generado tras la ruptura del ión mayoritario del primer barrido (MS^2) y por último el correspondiente el espectro de masas generado tras la ruptura del fragmento mayoritario obtenido en el MS^2 (MS^3).

La identificación de los compuestos se realizó teniendo en cuenta las características de la cromatografía y espectroscopía (UV-visible, espectro de masas y patrones de fragmentación de masas) y su comparación con la literatura.

9.3.- Cuantificación de flavonoles y antocianinas.

La cuantificación de los flavonoles se realizó por comparación de los picos obtenidos a 360 nm, con las curvas obtenidos con quercetina (derivados de quercetina) y kamferol (derivados del kamferol) (Extrasynthese. Geany, France). En el caso de las antocianinas, la cuantificación se realizó por comparación de los picos obtenidos a 520 nm, con la curva de calibración de la cianidin 3-O-glucoside (Polyphenols Labs. Sandnes, Norway). Los resultados obtenidos se expresan en mg/g de peso seco.

10.- OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS.

10.1.- Transformación de *Arabidopsis thaliana* mediante infiltración.

10.1.1- Construcción para la transformación de plantas de *A. thaliana*.

El gen utilizado en la generación de plantas transgénicas fue *PATL2* (At1g22530), aislado en la búsqueda de mutantes en genes regulados por NO en líneas transgénicas de inserción de T-DNA de tipo *gen-trap*. Este gen fue aislado mediante TAIL-PCR como se explica en el apartado 5.10.2. La transformación se llevó a cabo utilizando el vector binario pBI121 (Bevan, 1984) (Figura M.1B., Tabla M.4.), cuyo T-DNA contiene el gen reportador *GUS* (β -glucuronidasa) bajo el control del promotor constitutivo 35S, y el gen *NPTII* (neomicina fosfotransferasa II) que confiere resistencia a kanamicina. La bacteria *A. tumefaciens* introducirá en las células vegetales las construcciones preparadas dentro del fragmento de T-DNA, que se encuentra entre las zonas denominadas LB (left border) y RB (right border) del plásmido pBI121.

La región codificante del gen *PATL2* amplificado por PCR (apartado 6.) se escindió del plásmido pGEM-T easy utilizando la enzima de restricción *Not* I (Tabla M.9.), y se preparó para la subclonación, creando extremos romos utilizando la enzima Klenow (apartado 5.5.3.) y cortando en uno de sus extremos con *Bam* HI (Tabla M.9.). Por su parte, se linearizó el vector binario pBI121 por medio de la enzima *Sac* I (Tabla M.9.) creando extremos romos. Posteriormente, se cortó con la enzima *Bam* HI, quedando preparado el vector para la subclonación del inserto. Por último, se ligó el gen *PATL2* en el vector binario pBI121.

Las células competentes de *A. tumefaciens* se transformaron con la construcción pBI121-*PATL2* (Figura M.7.) siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.4.

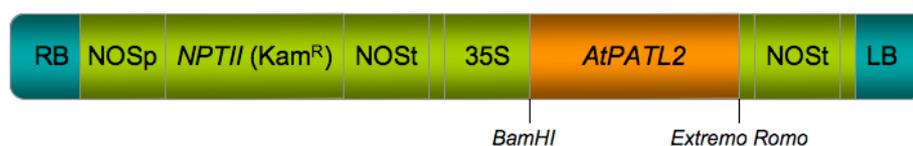


Figura M.7.- Construcción utilizada en la transformación de plantas de *Arabidopsis*. *RB*:Borde derecho del T-DNA; *NOSp*: promotor NOS; *NPTII*: Neomicina fosfotransferasa II; *NOSt*: terminador NOS; *35S*: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; *LB*: Borde izquierdo del T-DNA. La región codificante del gen *AtPATL2* fue amplificada a partir de cDNA y tras clonarla y escindirle del vector pGEM-T fue subclonada en el vector pBI121 utilizando la enzima de restricción *Bam*HI y la enzima *Klenow*.

Para confirmar que las células transformadas contenían la construcción se realizó una extracción de los plásmidos (apartado 5.2.) y una posterior PCR con los oligonucleótidos correspondientes al clon *PATL2*.

10.1.2.- Infiltración de plantas de *A. thaliana* con *A. tumefaciens*.

La transformación de *Arabidopsis* mediante *A. tumefaciens* se realizó por la técnica de infiltración *in planta* (Clough y Bent, 1998). Este procedimiento permite la transformación de *Arabidopsis* sin la necesidad de regenerar tejidos *in vitro*, evitando la aparición de variación somaclonal, y además, reduce el tiempo requerido para obtener individuos transformados.

Las plantas de *Arabidopsis* (ecotipo Col-0) que se transformaron fueron crecidas en presencia de kanamicina (50 µg/ml) para su selección, de acuerdo a la resistencia incluida en el plásmido.

A continuación se describe la preparación del inóculo y la infiltración a vacío:

1. Preparar un preinóculo saturado de células de *A. tumefaciens* transformadas con la construcción pBI121-*PATL2* mezclando en un matraz de 50 ml, 10 ml de medio LB líquido, rifampicina 50 µg/ml y kanamicina 25 µg/ml.
2. Incubar el cultivo a 28°C durante 12-14 h y con una agitación de 200 rpm.
3. Inocular 500 ml de medio LB suplementado con rifampicina 50 µg/ml y kanamicina 25 µg/ml, con 5 ml del cultivo saturado anterior.
4. Incubar a 28°C durante 5-6 h y con una agitación de 250 rpm.
5. Comprobar el correcto estado de crecimiento mediante espectrofotometría (D.O. a 600 nm).
6. Centrifugar a 9964 x g (7000 rpm) durante 5 min y a 4°C.
7. Resuspender el precipitado en 200 ml de solución de infiltración y colocar en un recipiente de plástico.

8. Introducir las plantas en posición invertida en el inóculo, de modo que la parte aérea (flores) quede sumergida en la suspensión celular y procurando que no se moje la tierra.
9. Someter las plantas a un pulso de vacío durante 5 min y repetir el proceso.
10. Eliminar el exceso de solución de las plantas secándolas cuidadosamente sobre papel de filtro.
11. Introducir las plantas en una bolsa de plástico cerrada con el fin de evitar la pérdida de humedad y favorecer su recuperación. Mantenerlas en cámaras de crecimiento durante 2-3 días (16 h de luz, 8 h de oscuridad).
12. Retirar la bolsa al cabo de 2-3 días y mantener las condiciones de crecimiento descritas en el apartado 3.3.

★ **Solución de infiltración:** medio MS, sacarosa 5% (w/v), BAP 44 nM y agente surfactante Silwet L-77 0.02% (v/v).

10.2.- Selección de plantas transgénicas.

Las plantas infiltradas (T0) se mantuvieron en las condiciones de crecimiento descritas anteriormente, hasta la producción de semillas. Una vez recolectadas y secadas a temperatura ambiente, fueron seleccionadas mediante la siembra en placas de MS-agar suplementado con kanamicina (50 µg/ml). El medio también fue suplementado con cefotaxima (250 µg/ml) con el fin de impedir el crecimiento de colonias de *A. tumefaciens*. A los 10 días de la siembra, se pudo diferenciar entre semillas transformadas (resistentes a kanamicina, capaces de germinar y formar plántulas desarrolladas) que constituirían la generación T1, de las no transformadas (sensibles a kanamicina e incapaces de desarrollarse).

10.2.1.- Análisis de la segregación del marcador de resistencia a kanamicina en la generación T2.

Las plántulas de la generación T1 se transfirieron a bandejas de alvéolos para su crecimiento en tierra, y se dejaron crecer hasta la producción de semillas. Las semillas recolectadas (generación T2) se sembraron en placas de medio MS-agar suplementado con kanamicina (50 µg/ml), donde se estudió la segregación de la resistencia a kanamicina de dichas semillas.

El análisis estadístico de la segregación de resistencia a kanamicina de las plantas T2 se realizó calculando el valor χ^2 con la corrección de Yates. Esta prueba permite comprobar si la segregación observada se ajusta o no a la segregación teórica esperada y su fórmula es la siguiente:

$$\chi^2_{\text{corr}} = \sum (\Theta - E - 1/2)^2 / E$$

Donde Θ es la frecuencia observada, E es la correspondiente frecuencia esperada y $\Theta - E$ es el valor absoluto de la diferencia entre la frecuencia observada y esperada.

Cada valor χ^2 obtenido corresponde a un determinado valor de probabilidad, indicativo de que la desviación entre los datos esperados y observados sea debida al azar. El número de grados de libertad es el número de comparaciones independientes menos uno y dado que las comparaciones independientes son las clases fenotípicas, el número de grados de libertad en este caso es uno. El límite para aceptar o rechazar la hipótesis se fijó en la probabilidad de 0.05 (valor χ^2 igual a 3.841), por lo que valores de probabilidad mayores o iguales a 0.05 indican que la desviación entre los datos no es significativa, y por lo tanto se acepta la hipótesis.

Finalmente, se obtuvieron las correspondientes plantas homocigotas para la inserción en la generación T3 que fueron crecidas en presencia de distintos tratamientos que se detallan en la Tabla M.8.

11.- ENSAYO HISTOLÓGICO DE LA ACTIVIDAD β -GLUCURONIDASA.

La actividad β -glucuronidasa se localizó en plantas transformadas con el gen reportador *GUS* mediante ensayos histoquímicos, siguiendo una modificación del protocolo descrito por Jefferson et al. (1987):

1. Colocar el tejido a analizar en una placa de microtítulo o tubo eppendorf y añadir 3ml o 1 ml de solución GUS.
2. Someter a vacío durante 15 min.
3. Incubar a 37°C en oscuridad durante 4 o 16 h, dependiendo de la muestra.
4. Lavar con etanol al 70% (v/v) para eliminar la pigmentación endógena del tejido.
5. Mantener las muestras a 4°C en etanol al 70% (v/v) hasta realizar las correspondientes fotografías.

★ **Solución GUS:** Tampón $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, pH 7, Triton X-100 0.5% (v/v) y 1 mg/ml del sustrato X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol β -D-glucurónico, Sigma).

Alternativamente, se utilizó otra modificación del protocolo descrito por Jefferson et al. (1987):

1. Tratar las plántulas con una solución de acetona al 90% (v/v), previamente enfriada a -20°C, durante 5 min.
2. Eliminar la solución de acetona y lavar con agua destilada. Eliminar la solución de lavado y repetir.
3. Retirar la solución de lavado y añadir la solución GUS.
4. Incubar a 37°C el tiempo necesario, dependiendo de las muestras entre 1-2 h.
5. Eliminar la solución GUS y lavar con agua destilada dos veces.
6. Decolorar las muestras con etanol al 70% (v/v). Repetir el lavado con etanol al 70% (v/v).

7. Almacenar las muestras a 4°C en la solución de etanol hasta realizar las correspondientes fotografías.

★ **Solución GUS:** Tampón $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, pH 7, Triton X-100 0.5% (v/v), $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 mM, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 mM, EDTA 0.05% (w/v) y 1 mg/ml del sustrato X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol β -D-glucurónico, Sigma) disuelto en DMSO (Sigma).

12.- ENSAYO DE FLUORESCENCIA CON DAF-2DA.

El ensayo de fluorescencia con diacetato de diaminofluoresceína (DAF-2DA) se utilizó para analizar la acumulación de NO endógeno en semillas y plántulas de 7 días que habían sido sometidas a los tratamientos expuestos en el apartado 3.4. DAF-2DA es un compuesto permeable que es hidrolizado en las células y cuando se produce NO se nitrosila dando lugar a una elevada fluorescencia. Para llevar a cabo el ensayo, se realizaron los siguientes pasos:

1. Incubar las semillas y plántulas durante 1 h a 25°C en oscuridad en la solución de tinción.
2. Realizar 3 lavados sucesivos de 15 min con tampón Tris-HCl 10 mM pH 7.4 para eliminar los restos de fluorescencia.
3. La fluorescencia emitida por este compuesto se detectó observando las muestras en una lupa de fluorescencia y microscopio confocal utilizando filtros adecuados de 495 nm de excitación y 515 nm de emisión.

★ **Solución de tinción:** DAF-2DA 5 μM (Sigma) y Tris-HCl 10 mM pH 7.4.

13.- ENSAYO DE FLUORESCENCIA CON DPBA.

El ensayo de fluorescencia con ácido difenilbórico 2-aminoetil éster (DPBA) se empleó para analizar la localización y acumulación de flavonoles en plántulas control y tratadas con SNP 100 μM y cPTIO 1 mM. Este compuesto se une a quercetina emitiendo fluorescencia de color dorada (emisión máxima 543 nm) y a kamferol

emitiendo fluorescencia amarillo-verdosa (emisión máxima 520 nm). La tinción se llevó a cabo según lo descrito por Murphy et al. (2000), con algunas modificaciones:

1. Incubar las plántulas en una solución de tinción durante 5-15 min.
2. Lavar durante 5 min con la solución de lavado.
3. La fluorescencia fue detectada mediante excitación con filtros FITC en una lupa Leica (excitación 450-490 nm).

★ **Solución de tinción:** DPBA al 25% (Sigma) y Triton X-100 0.005% (v/v).

★ **Solución de lavado:** Tampón $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 100 mM, pH 7.0 y Triton X-100 0.005% (v/v).

14.- FIJACIÓN CON CLORALHIDRATO.

Para llevar a cabo la observación celular de la raíz en plántulas de Arabidopsis, ecotipo Col-0, sin tratar y tratadas con donadores de NO (SNP, SNAP, GSNO), gas puro y cPTIO, y líneas mutantes afectadas en los procesos de síntesis de NO, se realizaron los siguientes pasos:

1. Introducir las plántulas crecidas en las condiciones expuestas para el estudio del desarrollo de la raíz (apartado 3.4.) en 1 ml de solución de fijación y mantener a 4°C durante 3-4 días.
2. Eliminar la solución de fijación y someter las plántulas a lavados exhaustivos con agua.
3. Retirar el agua. Añadir 400 μl de ácido periódico al 1% (v/v) e incubar a temperatura ambiente durante 30 min.
4. Realizar lavados exhaustivos con agua destilada.
5. Incubar cada muestra en 400 μl del reactivo de Schiff a los que previamente se han añadido 40 μl de yoduro de propidio (1 mg/ml, Sigma) y mantener a temperatura ambiente durante 1 h y 30 min.
6. Realizar de nuevo varios lavados con agua destilada.

7. Añadir 400 μ l de una solución de cloralhidrato 16 M.
 8. Colocar 80 μ l de la solución de Hoyer's en un portaobjetos de vidrio.
 9. Eliminar el exceso de la solución de cloralhidrato y disponer las plántulas en el portaobjetos.
 10. Cubrir con un cubreobjetos y reposar 24 h antes de observar las muestras al microscopio confocal.
- ★ **Solución de fijación:** Metanol 50% (v/v) y ácido acético 10% (v/v).
 - ★ **Reactivo de Schiff:** Metabisulfito de sodio 100 mM y HCl 3% (v/v).
 - ★ **Solución de Hoyer's:** Cloralhidrato 24 M y glicerol 5.3 M.

15.- MICRODISECCIÓN POR LASER (LMPC).

La microdissección es una técnica que permite el aislamiento de células de interés a partir de un tejido, mediante su visualización a través del microscopio y con ayuda de un láser. Existen diferentes tecnologías para llevar a cabo esta técnica. En el desarrollo de este trabajo se ha utilizado la tecnología PALM Microlaser Technologies, que permite cortar las células de interés con un láser UV-A de 325 nm y las muestras son recogidas en un tubo eppendorf colector debido a la presión ejercida por dicho láser. La puesta a punto de esta técnica se llevó a cabo en el laboratorio del Prof. K. Lindsey (The Integrative Cell Biology Laboratory, School of Biological and Biomedical Sciences, Durham University, Durham, UK) y del Dr. F. R. Tadeo (Centro de Genómica, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias-IVIA, Valencia).

15.1.- Preparación de las muestras.

La obtención de plántulas de Arabidopsis para llevar a cabo la técnica de microdissección se realizó germinando las semillas en placas de MS, cubiertas con una maya nitex (Sefar Maissa SA) de poro muy fino, la cual facilita la disección manual de las raíces. Se crecieron en vertical durante 7 días en cámaras de germinación con

condiciones controladas. Los pasos a seguir para su preparación se detallan a continuación.

15.1.1.- Fijación de las muestras.

1. Diseccionar manualmente, con una cuchilla, la parte apical (meristemo y zona de elongación) de la raíz primaria de cada plántula.
2. Introducir el material vegetal en la solución de fijación EAA y mantener en hielo.
3. Aplicar vacío durante 10 min y mantener a 4°C.
4. Incubar a 4°C durante 1 h en agitación continua (70 rpm).
5. Cambiar la solución de fijación y aplicar vacío 10 min.
6. Incubar a 4°C durante 2 h en agitación continua (70 rpm).
7. Cambiar de nuevo la solución de fijación y aplicar vacío 10 min.
8. Incubar a 4°C 16 h en agitación continua (70 rpm).

★ **Solución de fijación EAA:** Etanol : ácido acético, 3:1.

15.1.2.- Tratamiento de crioprotección.

Después del proceso de fijación se realizaron varias incubaciones en soluciones con concentraciones crecientes de sacarosa, con el fin de evitar la formación de cristales de hielo durante el proceso de congelación de las muestras y así, mejorar la morfología de las células al realizar la criodisección. Los pasos a seguir se describen a continuación:

1. Introducir las muestras en una solución de sacarosa 10% (w/v) preparada en tampón fosfato salino (PBS al 0.01% (v/v), pH 7.4).
2. Aplicar vacío durante 10 min e incubar durante 3 horas a 4°C en agitación continua (70 rpm).

3. Cambiar la solución de sacarosa por otra de mayor concentración (15% w/v).
4. Aplicar vacío durante 10 min e incubar 4 h a 4°C agitación continua (70 rpm).
5. Cambiar la solución de sacarosa por otra de mayor concentración (34% w/v) que contiene safranina O (Sigma) al 0.1% (w/v) para teñir las muestras.
6. Aplicar vacío durante 10 min e incubar 2 días a 4°C agitación continua (70 rpm).
7. Lavar las muestras con una solución de sacarosa al 34% (w/v) en PBS pH 7.4 para eliminar el exceso de colorante.

★ **Solución PBS 10X pH 7.4:** NaCl 0.00137 mM, KCl 27mM, Tampón $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 100 mM, pH 7.4, KH_2PO_4 18 mM.

15.1.3.- Congelación de las muestras.

1. Embeber las muestras en medio de inclusión “OTC Tissue Teck” (RA Lamb) y orientarlas en el molde. Colocar 3 muestras por molde.
2. Congelar las muestras rápidamente en isopentanol enfriado con N_2 líquido, evitando así la formación de cristales.
3. Conservar a -80°C hasta su procesamiento.

★ **OTC Tissue Teck (RA Lamb):** solución compuesta por glicol y resinas que proporcionan una excelente matriz para la realización de cortes en el criostato.

15.2.- Criodisección.

Una vez congeladas las muestras, se realizaron cortes utilizando un criostato Leyca CM 3050S. Los cortes obtenidos se fijaron en portaobjetos libre de RNasa, que presentan en una de sus caras una lámina de polietileno (PEN) de 1.35 μm . Esta

membrana es sensible a la luz UV y facilita el proceso de corte con el láser y la recolección de las muestras. Las muestras se prepararon realizando los siguientes pasos:

1. Realizar cortes entre 8-10 μm en el criostato a -22°C .
2. Antes de montar los cortes obtenidos, irradiar los portaobjetos con luz UV (900 nm) durante 90 seg para disminuir la hidrofobicidad de la membrana y favorecer la adherencia de las secciones.
3. Una vez montadas las secciones en los portaobjetos, fijar las muestras mediante deshidratación introduciendo los portaobjetos en etanol frío al 70% (v/v) durante 2-3 min.
4. Sumergir las muestras 5-6 veces en agua libre de RNasas fría para eliminar los restos de medio de inclusión.
5. Dejar secar las muestras.

15.3.- LMPC, extracción y amplificación de RNA.

Para llevar a cabo la microdissección se utilizó el microscopio PALM MicroBeam (Zeiss). Las células aisladas se recogieron en tubos especiales “PALM AdhesiveCaps”, que permiten recoger las células en seco, lo cual minimiza la actividad de RNasas. Para la extracción de RNA se utilizó “RNeasy MiniElute Cleanup Kit” (Qiagen), con el que se puede purificar RNA total a partir de 1×10^4 células. La extracción se realizó siguiendo las especificaciones del suministrador:

1. Mezclar 10 μl de β -mercaptoetanol (Sigma) con 1 ml de “RLT Buffer” (formulación de la casa comercial) y recoger el tejido microdisseccionado en 60 μl de esta mezcla. El tejido puede ser almacenado a -80°C hasta el momento de la extracción.
2. Homogeneizar en vórtex durante 30 seg.
3. Incorporar al lisado 1 volumen de etanol al 100% y mezclar pipeteando.
4. Transferir el lisado a una columna “RNeasy MiniElute spin column” y centrifugar a $8000 \times g$ (6559 rpm) durante 15 seg. Repetir una vez.

5. Añadir 350 μl de “RW1 Buffer” (formulación de la casa comercial) a la columna, mezclar y centrifugar a 8000 x g (6559 rpm) durante 15 seg. Eliminar el eluido.
6. Incluir en la columna una solución de 10 μl de DNasa I libre de RNasas (Qiagen) a la que previamente hemos añadido 70 μl de “RDD Buffer” (formulación de la casa comercial) e incubar a temperatura ambiente durante 15 min.
7. Añadir 350 μl de “RW1 Buffer”, mezclar y centrifugar a 8000 x g (6559 rpm) durante 15 seg.
8. Centrifugar otros 15 seg y descartar el eluido.
9. Pipetear sobre la resina de la columna 500 μl de “RPE Buffer” al que previamente hemos añadido etanol 100% (4 volúmenes de etanol 100% por 1 volumen de “RPE Buffer”) y centrifugar a 8000 x g (6559 rpm) durante 15 seg.
10. Añadir 500 μl de etanol al 80% (v/v) y centrifugar durante 2 min. Eliminar el eluido y centrifugar durante 30 seg.
11. Centrifugar durante 5 min para eliminar los restos de etanol.
12. Colocar la columna en un tubo eppendorf, añadir 10 μl de agua tratada con DEPC (Sigma), incubar durante 5 min y centrifugar a 8000 x g (6559 rpm) durante 2 min.
13. Añadir otros 10 μl de agua tratada con DEPC (Sigma) e incubar durante 5 min.
14. Centrifugar a 8000 x g (6559 rpm) durante 2 min y almacenar a -80°C .

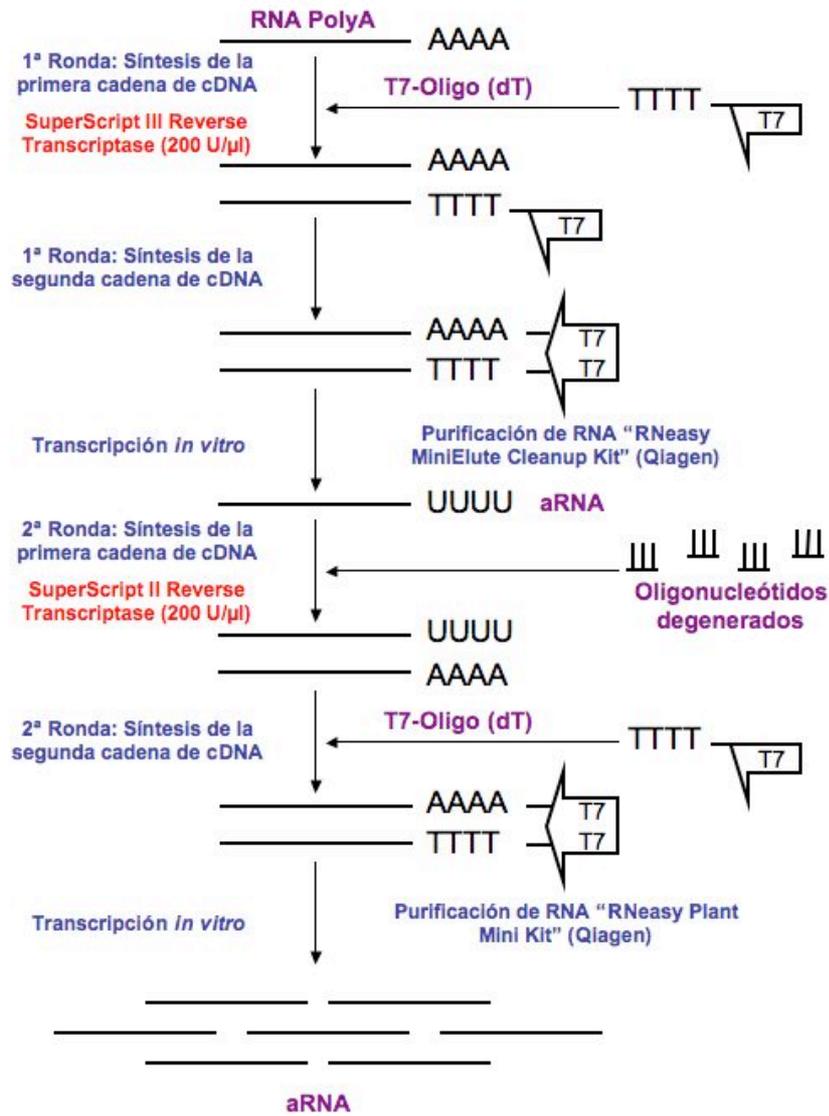


Figura M.8.-. Esquema del proceso de amplificación del RNA obtenido de células individuales mediante la técnica LMPC.

El RNA obtenido fue sometido a dos rondas sucesivas de amplificación utilizando "TargetAmp™ 2-Round aRNA Amplification Kit 2.0" (Epicentre Biotechnologies), que permite la amplificación de RNA (PolyA⁺) a partir de 10 pg de RNA total. La técnica consiste en una primera transcripción reversa en la cual se sintetiza la primera cadena de

cDNA utilizando el oligonucleótido T7-Oligo(dT), que contiene una secuencia del promotor de la RNA polimerasa del fago T7 en su extremo 5'. Esta reacción es catalizada por la transcriptasa reversa "SuperScript III" (Invitrogen). La cadena de RNA molde, utilizada en el primer paso, es digerida en fragmentos mediante la actuación de la RNase H y se genera una doble cadena de cDNA que contiene el promotor de la transcripción T7, en una orientación que permitirá la formación de RNA anti-sentido (aRNA) en el posterior proceso de transcripción *in vitro*. El aRNA así producido es purificado mediante columnas de cromatografía. La segunda transcripción reversa se lleva a cabo utilizando como molde el aRNA purificado, oligonucleótidos degenerados y la transcriptasa reversa "SuperScript II" (Invitrogen). La segunda cadena se sintetiza utilizando el oligonucleótido T7-Oligo(dT). Posteriormente, se lleva a cabo la transcripción *in vitro* utilizando como molde el cDNA generado en el paso anterior. Finalmente, se purifica el aRNA amplificado (Van Gelder et al., 1990) (Figura M.8.).

16.- ANÁLISIS Y PRESENTACIÓN DE DATOS.

16.1.- Fotografía.

Los geles de agarosa para la separación de DNA y RNA fueron fotografiados con una cámara digital DC 290 Zoom (Kodak) y el software Kodak 1 D Image Analysis, mientras eran irradiados con un transiluminador de luz ultravioleta (UVP modelo TM-20, 302 nm). Alternativamente, se utilizó un transiluminador "UVP Bio Doc-IT™". En ambos casos, las imágenes se imprimieron en una impresora "Video Graphic Printer UP-895 MD" (Sony).

Para la lectura de las imágenes obtenidas por medio del phosphorimager Bas-IP Fujifilm se utilizó el analizador de bioimágenes "Bio-imagin analyzer" Bas-1500 Fujifilm y el programa Fujifilm Mac-Bas. Para el revelado del western blot se utilizó una "Intelligent Dark-BoxII" y el sistema de escaneado LAS-1000 Fujifilm.

Las fotografías de plántulas han sido tomadas con una cámara Nikon D90 con objetivo 18-105RV. Algunas imágenes fueron capturadas con un escáner EPSON Perfection 3590.

Las fotografías de fluorescencia y GUS en plantas fueron tomadas con una cámara digital Leica DFC 490 y una lupa Leica MZ16 FA. Alternativamente, se utilizó un microscopio Leica DMLB acoplado a una cámara DC 300F.

Las fotografías del meristemo de la raíz y fluorescencia fueron tomadas en un microscopio confocal Zeiss Axiovert 200 y Leica TCS SP2.

16.2.- Análisis informático.

El análisis de restricción de los clones aislados se realizó con el programa DNA Strider™ 1.1 (Ch. Marck y C.E.A.).

El diseño de oligonucleótidos para PCR convencional se llevó a cabo con el programa Oligo® 4.05, Primer Analysis Software (National Biosciences, Inc.). Para comprobar la eficiencia de los oligos se realizaron PCRs virtuales mediante el programa Amplify. Los oligonucleótidos específicos utilizados en la qRT-PCR se diseñaron utilizando el programa Primer Express software 1.0 (Applied Biosystems) o Universal ProbeLibrary for Arabidopsis (Roche, <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp>).

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron visualizadas mediante la aplicación EditView (ABI PRISM™; Perkin Elmer), y se analizaron por comparación con las aplicaciones disponibles en las bases de datos TAIR BLAST 2.2.8 (<http://www.arabidopsis.org/Blast/>) y MIPS (<http://mips.gsf.de/proj/thal/db/>).

Los análisis de composición y perfiles hidropáticos de la secuencia de aminoácidos, así como las comparaciones entre las secuencias de aminoácidos de las diferentes proteínas y los dendrogramas de similitud, se realizaron utilizando el software de Macintosh DNASTAR LASERGENE, que contiene diferentes aplicaciones para los distintos análisis. Los dominios específicos dentro de las proteínas se localizaron mediante el programa PROSITE (<http://www.expasy.ch/tools/scnpsit1.html>).

Las mediciones de la longitud de raíces e hipocotilos se realizaron utilizando el programa ImageJ.

El estudio de los datos obtenidos en el análisis transcriptómico se realizó utilizando el software GeneChip Operating, el paquete informático affyImaGUI R (Wettenhall et al., 2006) y el software TIGR MeV (Multiarray experiment viewer, version 4.4) proporcionado por el TIGR Institute (Saeed et al., 2003). Alternativamente, se utilizaron las aplicaciones FatiGO (<http://fatigo.bioinfo.cipf.es/>), BAR (The Bio-Array Resource for Arabidopsis Functional Genomics) (<http://bar.utoronto.ca/>) y MapMan versión 3.0.0 (<http://www.gabi.rzpd.de/projects/MapMan/>) (Thimm et al., 2004; Usadel et al., 2005). Del mismo modo, se obtuvieron datos del proyecto AtGen Express (<http://arabidopsis.org/portals/expression/microarray/ATGeneExpress.jsp>).

16.3.- Presentación de datos.

El programa utilizado en la escritura ha sido Microsoft® Word para Mac (Microsoft Corporation). Para las figuras se han utilizado los programas Adobe Photoshop® 7.0 (Adobe Systems), Microsoft PowerPoint y Keynote (iWork '09). Finalmente, para el análisis estadístico y obtención de gráficas se utilizó el programa Microsoft® Excel para Mac (Microsoft Corporation) y Numbers (iWork '09). La bibliografía se ha realizado utilizando como herramineta el gestor de referencias bibliográficas EndNote 9.0 (Thomson).



Resultados

1.- DETECCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO ENDÓGENO DURANTE EL DESARROLLO TEMPRANO DE *Arabidopsis thaliana*.

Con el fin de profundizar en el mecanismo de acción del óxido nítrico durante los primeros estadios del desarrollo en *Arabidopsis thaliana*, en este trabajo se ha realizado una caracterización fenotípica, molecular y genética de las respuestas a NO en diferentes procesos del desarrollo temprano.

Como paso previo al análisis fenotípico y genético, se analizó la acumulación de NO en semillas y plántulas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo columbia (Col-0) crecidas en medio MS durante 2 y 7 días, en condiciones control y tratadas con un secuestrador de NO (cPTIO). Para ello, se realizó un ensayo de detección del NO endógeno utilizando diacetato de diaminofluoresceína (DAF-2DA) (apartado 12 de Materiales y Técnicas), compuesto permeable que se hidroliza en las células siendo atrapado por éstas. Cuando se produce NO, el compuesto DAF-2DA se nitrosila dando lugar a una elevada fluorescencia. Tras su observación en la lupa y microscopio confocal, se obtuvieron los resultados expuestos en la Figura R.1. En ellos, se observa que durante los estadios iniciales de emergencia radicular (plántulas de 2 días) se acumula un máximo de NO en el comienzo de la zona de elongación-diferenciación (EDZ) (Figura R.1A.). Sin embargo, en estadios posteriores (plántulas de 7 días), esta fluorescencia está menos localizada (Figura R.1B.) y se extiende desde el meristemo (cápsida) hasta la zona de EDZ (epidermis) (Figura R.1C-D.). Nuevamente, parece detectarse un máximo de NO al comienzo de la zona de EDZ (Figura R.1D-F.). Del mismo modo, también se observa acumulación de NO en los primordios de las raíces secundarias de plántulas de 7 días (Figura R.1E.) y en las capas mas externas del hipocotilo, así como en el haz vascular de plántulas crecidas en oscuridad (Figura R.1G.). Sin embargo, en plántulas tratadas con el secuestrador de NO, cPTIO, no se observa la fluorescencia asociada a la presencia de NO (Figura R.1H.).

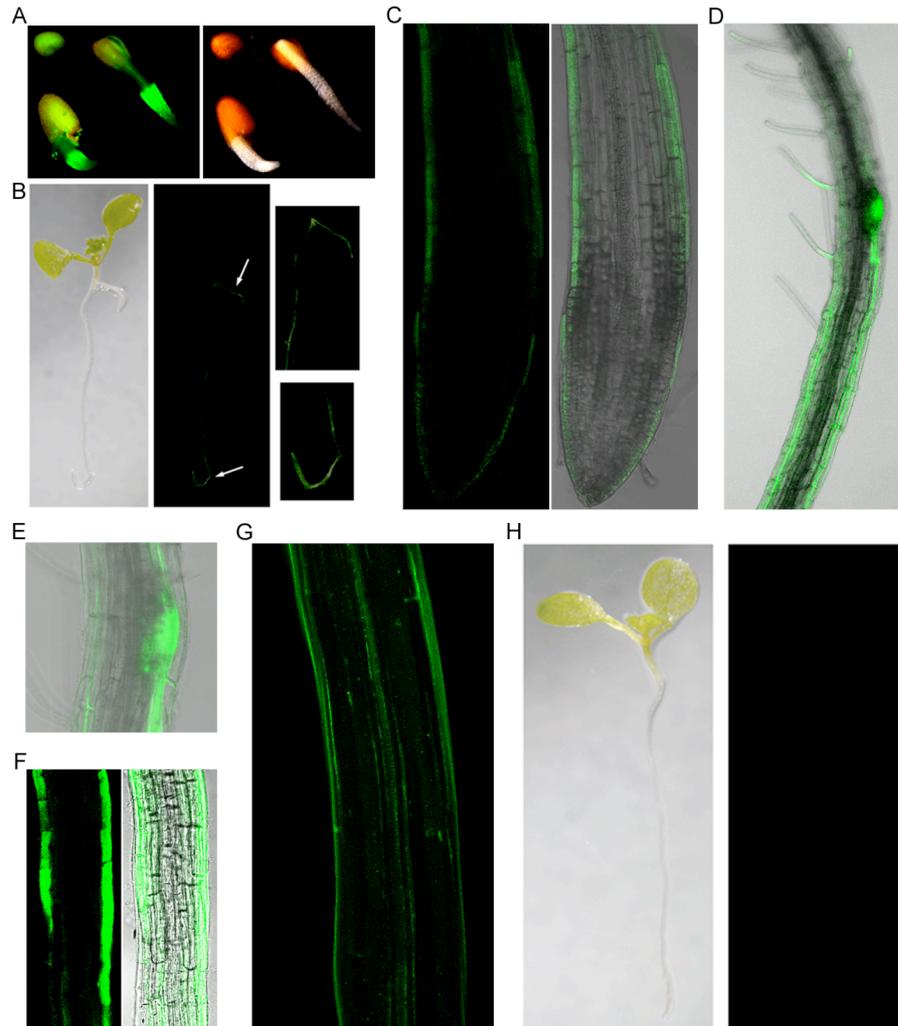


Figura R.1.- Detección del NO endógeno mediante la utilización del compuesto fluorescente DAF-2DA en plántulas de *Arabidopsis* del ecotipo Col-0 crecidas durante 2 días (**A**) y 7 días (**B-F**). (**B**) Fluorescencia en plántula completa observada a la lupa. (**C**) Fluorescencia en meristemo y comienzo de la zona de EDF. (**D-F**) Fluorescencia en la zona diferenciación. (**G**) Fluorescencia en el hipocotilo de plántulas crecidas en oscuridad. (**H**) Plántula de 7 días tratada con cPTIO.

2.- BÚSQUEDA DE MUTANTES ALTERADOS EN LA RESPUESTA A ÓXIDO NÍTRICO.

Con el fin de identificar genes que tengan un papel relevante en las respuestas al NO y que permitan profundizar en el mecanismo de acción de esta molécula señalizadora en plantas, en este trabajo se ha llevado a cabo la búsqueda de genes inducibles o reprimibles por óxido nítrico, utilizando la colección de mutantes EXOTIC

(amablemente cedida por el Dr. Javier Paz-Ares, CNB-CSIC). Esta colección dispone de aproximadamente 2500 líneas transgénicas de inserción de T-DNA de tipo *gene-trap*, que utilizan como gen reportador el gen de la β -glucuronidasa (β -*GUS*). El sistema se basa en los elementos transponibles *Ac* y *Ds* del maíz, que permiten su movilidad dentro del genoma. El elemento *Ds* presenta el gen β -*GUS* y como gen de selección la Neomicina fosfotransferasa (NPTII), que confiere resistencia al antibiótico kanamicina (Figura R.2). El uso de estas líneas nos permite no sólo identificar nuevos genes regulados por el estímulo objeto de estudio (NO en este caso), sino además, conocer el patrón de expresión del gen identificado debido a la presencia del gen reportador β -*GUS*, al tiempo que se obtiene un mutante de ese gen por la inserción del T-DNA que normalmente provoca su pérdida de función (*knockout*).

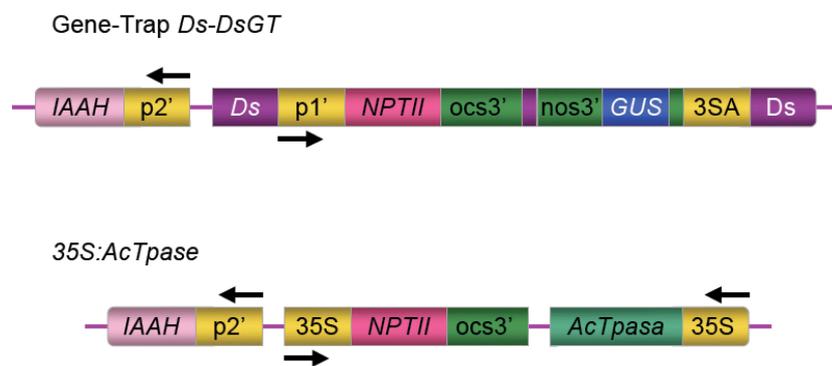


Figura R.2.- Construcción de las líneas transgénicas de inserción de T-DNA de tipo *gene-trap* de la colección EXOTIC. *IAAH*: gen de la indol-acetamida hidrolasa que confiere sensibilidad a naftaleno acetamida (NAM), p2' y p1': promotores del T-DNA, 35S: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, 3SA: *triple splice acceptor*, *Ds*: elemento transponible del maíz, *NPTII*: gen de la neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia a kanamicina, *ocs3'* y *nos3'*: terminadores de la transcripción, *GUS*: gen reportador de la β -glucuronidasa, *AcTpasa*: elemento transponible del maíz.

2.1.- Determinación de las condiciones idóneas para la búsqueda de mutantes de respuesta a óxido nítrico.

Para la identificación de los posibles genes inducibles o reprimibles por NO, se decidió utilizar plántulas de 7 días tratadas durante 3h con el donador de NO (SNP 100 μ M) y su secuestrador (cPTIO 100 μ M), en concentraciones descritas previamente como óptimas por varios autores, como se detalla en el apartado 3.4. de Materiales y Técnicas. Pasado este tiempo, se realizó el ensayo histológico de actividad β -glucuronidasa para

localizar la expresión del gen reportador. Se seleccionaron aquellas líneas en las que el gen reportador se expresó específicamente en respuesta a SNP o cPTIO, lo cual indicaría que el gen reportador se ha insertado en un gen regulado por estos compuestos.

2.2.- Análisis de la colección de mutantes de inserción del transposón *Ds*.

Del análisis de la colección de aproximadamente 2500 líneas transgénicas de inserción de T-DNA de tipo *gene-trap*, se obtuvieron distintos patrones de expresión de la actividad GUS, siendo la mayoría constitutivos. Sin embargo, un 3.4% del total de líneas analizadas (73 líneas) presentó una expresión diferencial en presencia de SNP o cPTIO. Los datos obtenidos se resumen en la Tabla R.1.

Tabla R.1.- Resultados del análisis de la colección de líneas transgénicas de inserción de T-DNA de tipo *gene-trap* y la identificación de varios genes mutados.

Sin tinción GUS		Tinción GUS		
1615		522		
	Patrón constitutivo	GUS en SNP	GUS en cPTIO	GUS en SNP y cPTIO (diferente patrón)
	449	23	21	29

Línea EXOTIC	SNP	cPTIO	AGI code	Descripción
Ex-3	✓		At5g01540	Lectina proteín-kinasa1.
Ex-23		✓	At1g49650	Proteína relacionada con la muerte celular.
Ex-25	✓		At3g61490	Poligalacturonasa.
Ex-41	✓		At4g13830	Proteína de adaptación al estrés (heat shock protein).
Ex-55	✓		At5g14700	Cinnamoil CoA reductasa.
Ex-67	✓		At3g14380	Proteína integral de membrana.
Ex-119		✓	At1g22530	Patelina2.

Dado que nuestro interés se centraba en la identificación de genes implicados en las respuestas a NO, decidimos utilizar solamente aquellas líneas que mostraron un

patrón de expresión diferencial en presencia del donador de NO (SNP) o de su secuestrador (*scavenger*) (cPTIO). De esta forma, los mutantes correspondientes a líneas inducibles por NO se denominaron *noi* (*nitric oxide inducible*) y los pertenecientes a líneas reprimibles se nombraron *nor* (*nitric oxide repressible*). Las líneas identificadas mediante TAIL-PCR se describen en la segunda parte de la Tabla R.1.

3.- EL ÓXIDO NÍTRICO PROMUEVE LA SALIDA DE LA DORMICIÓN Y LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS.

3.1.- Distintos ecotipos de Arabidopsis presentan diferente grado de sensibilidad a los tratamientos con óxido nítrico.

La dormición es uno de los procesos fisiológicos del ciclo de vida de una planta en los que el NO está implicado. Se ha observado que en presencia de NO liberado por el donador SNP, se produce la ruptura de la dormición favoreciendo así la germinación de las semillas en diferentes especies (Giba et al., 1998; Beligni y Lamattina, 2000; Batak et al., 2002; Bethke et al., 2004b), mientras que en presencia de cPTIO, secuestrador de NO, las semillas se mantienen en dormición. En nuestro trabajo hemos utilizado tres ecotipos de Arabidopsis que presentan diferentes grados de dormición, Col-0, Emkheim y NIL DOG17-1, con el objetivo de determinar su sensibilidad al NO en el proceso de dormición y germinación. Se trataron semillas sin estratificar de estos ecotipos con agua, SNP 100 μ M y cPTIO 100 μ M (apartado 3.4. de Materiales y Técnicas), obteniendo los resultados que se muestran en la Figura R.3. Los ecotipos Emkheim y NIL DOG17-1 presentan una dormición más profunda que el ecotipo Col-0 cuando las semillas se recogen directamente de la planta madre. La presencia de NO permite la ruptura de la dormición incluso en los ecotipos con una dormición más pronunciada. Mientras que su ausencia, debido a la adición de cPTIO, mantiene las semillas en estado de dormición.

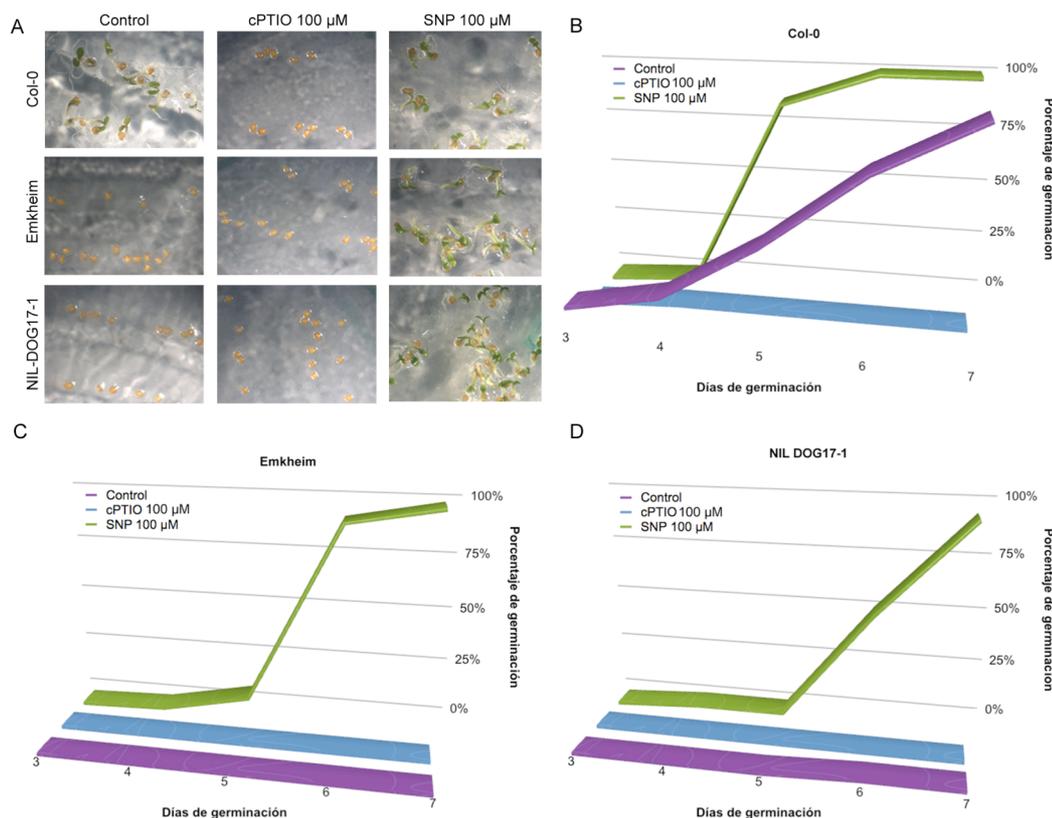


Figura R.3.- (A) Ensayo de dormición/germinación en diferentes ecotipos de *Arabidopsis*, Col-0 (B), Emkheim (C) y NIL DOG17-1 (D), que presentan distintos grados de dormición. Los ensayos se realizaron en semillas sin estratificar, en presencia de agua (Control), SNP 100 μM y cPTIO 100 μM.

3.2.- Implicación del gen *AtLecPK1*, inducible por óxido nítrico, en la dormición y germinación de semillas.

Como se ha descrito en el apartado 2, una vez analizada la colección de mutantes EXOTIC, se seleccionaron algunas de las líneas que presentaban un patrón de expresión diferencial en respuesta a SNP o cPTIO (Tabla R.1.). Una de las líneas inducibles por SNP se corresponde con el mutante al que hemos denominado *noi1* (*nitric oxide inducible 1*), en el que se observa una mayor expresión del gen reportador en los cotiledones de plántulas tratadas con SNP 100 μM y ausencia en cotiledones tratados con cPTIO 100 μM (Figura R.4.).

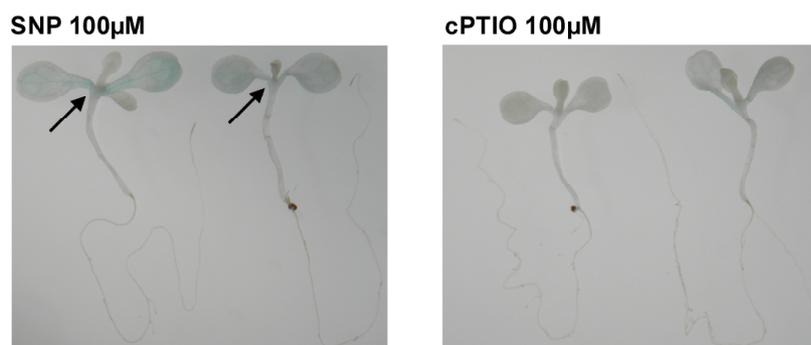


Figura R.4.- Ensayo histoquímico de la actividad β -glucuronidasa en la línea *noi1* tras el tratamiento con el donador SNP y el secuestrador cPTIO. Las flechas indican las zonas de mayor expresión del gen reportador.

3.2.1.- Identificación del gen mutado *NOII*.

La identificación del gen mutado inducible por NO se realizó clonando y secuenciando las regiones flanqueantes a la inserción mediante TAIL-PCR. Para la obtención del clon se utilizaron tres oligonucleótidos específicos (Ds5'-1, Ds5'-2 y Ds5'-5) y uno degenerado (AD2) (Tabla M.7., apartado 2.2. de Materiales y Técnicas), obteniéndose un fragmento de aproximadamente 1200 nucleótidos. Tras la obtención de la secuencia nucleotídica se realizó la comparación con la base de datos de Arabidopsis y se obtuvo una similitud del 98% con el gen *AtLecPK1* (At5g01540), lo que significaba que el gen clonado se corresponde con este gen de *A. thaliana*. Para completar la secuencia del clon se diseñaron oligonucleótidos específicos (Ex3 SEN y Ex3 ANS) (Tabla M.6., apartado 2.2. de Materiales y Técnicas) y se clonó en el vector pGEMT. Posteriormente, se completó dicha secuencia utilizando oligonucleótidos internos (Ex3 SEN2 y Ex3 ANS3) (Tabla M.6., apartado 2.2. de Materiales y Técnicas). El lugar de inserción del transposón se encuentra en el nucleótido 1559, como se puede observar en la Figura R.5.

1	ta	ttc	att	gga	cat	ttt	atc	ttt	tta	tct	ttt	aag	ggt	taa	tca	caa	acg	tcc	aag	tcc	ata
63		tga	cta	ttt	ttt	ttc	ttt	ctt	ggt	ctt	aag	gaa	aaa	tat	aaa	ata	cct	gat	ggt	aaa	gtc
123		aac	gta	gaa	ttt	gtc	aaa	gtc	agc	ctg	atg	glt	ggg	ttt	gga	cct	ctt	ttt	aac	cac	atg
183		glt	caa	gca	cta	aaa	cat	glt	ggt	ccc	agt	ctt	aat	ggg	aat	tat	ttg	ttg	aaa	taa	atg
243		gct	aat	att	ttt	ttt	cta	ttt	att	aat	ttt	gta	caa	aac	ttc	ttc	tcc	cat	ata	ttt	tca
303		atg	tac	ggt	aat	gtg	aac	att	gag	agg	aaa	gaa	cca	tgt	tcc	ttc	ttc	ttt	ttt	ggt	ttt
363		ggt	ata	att	ttc	atc	ttc	ttt	gac	cca	tta	gaa	tct	gaa	aga	aaa	aaa	aaa	aac	aac	tct
423		ctc	atg	tcc	ata	aaa	gaa	att	atc	cca	aga	act	ctt	caa	agt	atc	tct	tta	tct	ctt	ctt
483		tct	tta	ctt	cgc	tca	ccc	ATG	GGC	ACA	CAA	AGA	TCC	ATG	TTC	ATA	GTC	TCA	TTC	TTA	TTC
								M	G	T	Q	R	S	M	F	I	V	S	F	L	F
543		AAG	CTT	TTC	CTG	TTT	TTG	AGC	GTC	CAT	GTT	CGA	GCT	CAG	AGA	ACA	ACA	ACA	AAT	TTT	GCT
		K	L	F	L	F	L	S	V	H	V	R	A	Q	R	T	T	T	N	F	A
603		TTC	CGA	GGT	TTT	AAC	GGA	AAC	CAA	TCG	AAG	ATT	CGG	ATT	GAA	GGA	GCC	GGC	ATG	ATC	AAA
		F	R	G	F	N	G	N	Q	S	K	I	R	I	E	G	A	A	M	I	K
663		CCC	GAC	GGA	CTA	TTG	AGA	CTC	ACT	GAC	CGA	AAG	TCG	AAT	GTT	ACC	GGT	ACA	GCT	TTC	TAC
		P	D	G	L	L	R	L	T	D	R	K	S	N	V	T	G	T	A	F	N
723		CAC	AAA	CCG	CTG	AGG	TTG	CTT	AAT	AGA	AAT	TCC	ACA	AAC	GTC	ACA	ATT	CGT	TCC	TTT	AGC
		H	K	P	V	R	L	L	N	R	N	S	T	N	V	T	I	R	S	F	S
783		ACG	TCT	TTT	GTC	TTT	GTC	ATA	ATC	CCT	TCA	AGC	TCA	AGC	AAT	AAA	GCC	TTT	GGA	TTC	ACA
		T	S	F	V	F	V	I	I	P	S	S	S	S	N	K	G	F	G	F	P
843		TTC	ACA	CTA	TCT	CCA	ACA	CCT	TAT	CGT	CTC	AAT	GCT	GGA	TCC	GCA	CAG	TAC	TTG	GGA	GTT
		F	T	L	S	P	T	P	Y	R	L	N	A	G	S	A	Q	Y	L	G	V
903		TTC	AAC	AAA	GAG	AAC	AAT	GGG	GAT	CCT	AGG	AAC	CAC	GTA	TTC	GCA	GTG	GAA	TTC	GAC	ACG
		F	N	K	E	N	N	G	D	P	R	N	H	V	F	A	V	E	F	D	T
963		GTG	CAA	GGA	TCA	AGA	GAC	GAC	AAC	ACC	GAC	AGA	ATA	GGA	AAC	GAC	ATC	GGT	CTG	AAT	TAC
		V	Q	G	S	R	D	D	N	T	D	R	I	G	N	D	I	G	L	N	Y
1023		AAC	AGT	CGT	ACT	TCG	GAT	CTC	CAA	GAA	CCA	GTC	GTG	TAT	TAC	AAA	AAT	GAT	GAT	CAC	AAC
		N	S	R	T	S	D	L	Q	E	P	V	V	Y	Y	N	N	D	D	H	N
1083		AAA	AAA	GAA	GAT	TTC	CAG	CTT	GAG	AGT	GGC	AAT	CCT	ATT	CAA	GCC	CTT	TTG	GAG	TAT	GAT
		K	K	E	D	F	Q	L	E	S	G	N	P	I	Q	A	L	L	E	Y	D
1143		GGA	GCA	ACA	CAA	ATG	CTA	AAC	GTC	ACC	GTT	TAT	CCC	GCG	AGA	TTA	GGG	TTT	AAA	CCC	ACA
		G	A	T	Q	M	L	N	V	T	V	Y	P	A	R	T	L	G	F	K	P
1203		AAG	CCT	TTG	ATC	TCT	CAA	CAT	GTT	CCA	AAA	CTG	TTG	GAG	ATT	GTG	CAA	GAA	GAA	ATG	TAC
		K	P	L	I	S	Q	H	V	P	K	L	L	E	I	V	Q	E	E	M	Y
1263		GTC	GGA	TTT	ACG	GCA	TCG	ACG	GGG	AAA	GGT	CAG	TCA	AGT	GCT	CAT	TAC	GTG	ATG	GGT	TGG
		V	G	F	T	A	S	T	G	K	G	Q	S	S	A	H	Y	V	M	G	W
1323		AGT	TTT	TCA	AGC	GGC	GGA	GAA	CGT	CCA	ATT	GCG	GAT	GTT	CTA	ATC	CTC	TCG	GAG	CTT	CCT
		S	F	S	S	G	G	E	R	P	I	A	D	V	L	I	L	S	E	L	P
1383		CCG	CCG	CCG	CCG	AAT	AAG	GCG	AAG	AAG	GAA	GGT	TTA	AAT	TCT	CAA	GTC	ATT	GTT	ATG	ATC
		P	P	P	P	N	K	A	K	K	E	G	L	N	S	Q	V	I	V	M	I
1443		GTG	GGT	TTA	TCG	GCA	GTA	ATG	CTG	GTC	ATG	CTT	GTG	TTA	CTC	TTC	TTT	GTC	ATG	TAC	
		V	A	L	S	A	V	M	L	V	M	L	V	L	L	F	F	F	V	M	Y
1503		AAG	AAG	AGA	CTG	GGA	CAA	GAA	GAG	ACT	CTT	GAA	GAC	TGG	GAA	ATC	GAT	CCT	CGC	AGA	
		K	K	R	L	G	Q	E	E	T	L	E	D	W	E	I	D	H	P	R	R
1563		TTG	AGA	TAC	AGA	GAC	CTC	TAC	GTA	GCC	ACG	GAT	GGA	TTT	AAA	AAG	ACT	GGA	ATC	ATC	GGA
		L	R	Y	R	D	L	Y	V	A	T	D	G	F	K	K	T	G	I	I	G
1623		ACC	GGA	GGA	TTT	GGA	ACC	GTT	TTT	AAA	GGA	AAA	CTG	CCG	AAT	TCG	GAT	CCC	ATC	GCA	GTG
		T	G	G	F	G	T	V	F	K	G	K	L	P	N	S	D	P	I	A	V
1683		AAG	AAG	ATA	ATT	CCA	AGT	AGC	AGG	CAA	GGT	GTT	CGA	GAA	TTT	GTC	GCA	GAG	ATC	GAG	AGT
		K	K	I	I	P	S	S	R	Q	G	V	R	E	F	V	A	E	I	E	S
1743		TTG	GGG	AAA	CTA	AGG	CAT	AAG	AAT	CTG	GTG	AAC	CTC	CAA	GGA	TGG	TGC	AAA	CAC	AAA	AAC
		L	G	K	L	R	H	K	N	L	V	N	L	Q	G	W	C	K	H	K	N
1803		GAT	CTC	TTG	TTG	ATT	TAC	GAT	TAC	ATC	CCC	AAC	GGA	AGC	TTA	GAC	TCT	CTG	CTC	TAC	ACT
		D	L	L	L	I	Y	D	Y	I	P	N	G	S	L	D	S	L	L	Y	T
1863		GTA	CCG	AGA	AGA	AGC	GGC	GCC	GTT	TTG	TCG	TGG	AAC	GCT	CGT	TTT	CGC	ATC	GCT	AAA	GGA
		V	P	R	R	S	G	A	V	L	S	W	N	A	R	F	Q	I	A	K	G
1923		ATC	GCG	TCT	GGT	TTA	TTG	TAT	CTT	CAC	GAA	GAA	TGG	GAG	AAG	ATT	GTG	ATT	CAT	AGA	GAC
		I	A	S	G	L	L	Y	L	H	E	E	W	E	K	I	V	I	H	R	D
1983		GTG	AAA	CCT	AGC	AAT	GTC	TTG	ATC	GAT	TCA	AAG	ATG	AAC	CCT	AGA	TTG	GGA	GAT	TTT	GGA
		V	K	P	S	N	V	L	I	D	S	K	M	N	P	R	L	G	D	F	G
2043		CTC	GCG	AGG	CTT	TAC	GAA	CGC	GGA	ACG	CTA	TCG	GAA	ACA	ACA	GCA	CTC	GTT	GGA	ACC	ATC
		L	A	R	L	Y	E	R	G	T	L	S	E	T	T	A	L	V	G	T	I
2103		GGG	TAC	ATG	CCG	CCA	GAG	CTT	TCC	CGC	AAC	GGA	AAC	CCC	TCA	TCT	GCG	TCT	GAT	GTT	TTT
		G	Y	M	A	P	E	L	S	R	N	G	N	P	S	S	A	S	D	V	F
2163		GCG	TTT	GGC	GTT	TTG	TTA	GAG	ATC	GTT	TGC	GGG	AGA	AAA	CCA	ACG	GAT	TCC	GGT	ACC	T
		A	F	G	V	L	L	L	E	I	V	C	G	R	K	P	T	D	S	G	T
2223		TTC	TTT	TTG	GTC	GAT	TGG	GTT	ATG	GAG	CTT	CAC	GCG	AAC	GGT	GAG	ATT	CTC	AGT	GCG	ATT
		F	F	L	V	D	W	V	M	E	L	H	A	N	G	E	I	L	S	A	I
2283		GAT	CCG	AGA	CTA	GGA	TCT	GGT	TAC	GAC	GGA	GGA	GAA	GCA	AGG	CTT	GCT	CTC	GCC	GTC	GGA
		D	P	R	L	G	S	G	Y	D	G	G	E	A	R	L	A	L	A	V	G
2343		TTG	CTC	TGT	TGC	CAC	AAA	CCG	GCG	TCT	CGG	CCG	TCG	ATG	AGA	ATC	GTG	CTT	AGG	TAT	
		L	L	C	C	H	Q	K	P	A	S	R	P	S	M	R	I	V	L	R	Y
2403		CTA	AAC	GGA	GAG	GAG	AAT	GTA	CCT	GAG	ATT	GAC	GAT	GAG	TGG	GGA	TAT	TCA	AAG	TCT	TCA
		L	N	G	E	E	N	V	P	E	I	D	D	E	W	G	Y	S	K	S	S
2463		AGA	AGC	GAA	TTT	GGA	TCC	AAG	TTG	GTA	GGA	TAT	GTT	TCG	TCG	ACC	TCA	ATC	AGA	GTT	R
		R	S	E	F	G	S	K	L	V	G	Y	V	S	S	T	S	I	T	R	V
2523		TCT	TCG	ACT	TCT	CGT	ATC	AGT	CAG	TAG	tgg	ata	aag	cac	att	cac	ttt	ttt	gct	tcg	aat
		S	S	T	S	R	I	S	Q	Z											
2583		tag	tca	aat	cgt	tta	gct	tca	aaa	gac	caa	aac	atg	att	taa	cta	gta	ctt	atg	att	aat
		gaa	caa	tag	tat	aaa	ata	aat	ttg	ttg	gaa	tgt	cta	tag	cta	aaa	gtt	tct	gaa	atg	aat
2643		gtg	gcg	ggg	agg	taa	aac	ctt	aat	ata	taa	ttt	ttt	cgt	gac	gtc	aca	cag	att	agt	cat
		act	atc	aaa	aaa	att	aaa	att	agt	att	ttg	taa	cgt	cac	aaa	gat	cac	tca	tac	agt	tat
2703		gat	ttt	ttt	ata	taa	aat	tac	tgt	atg	ttt	tgc	tta	acg	tca	tca	ttt	ttg	tta	tat	tgt
		ccg	gat	tat	cca	ttt	ttg	atc	ggt	gaa	cca	gcc	aat	tct	ata	ttc	ata	att	gat	tat	gac
2763		gaa	cct	cat	tcc	tca	atg	aat	att	ttt	ctt	caa	aag	aat	att	aga	att	aca	atc	aat	tca
		tcg	aat	ctc	cat	gct	caa	tag	ttt	gaa	aac	att	ttt	tgt	ggt	tgt					

Figura R.5.- Secuencia nucleotídica del gen *AtLecPK1* y secuencia de aminoácidos deducida a partir de ella. Los codones de inicio y terminación están resaltados en amarillo. En rojo se señala el codón de paro anterior al ATG inicial. El triángulo azul indica el lugar exacto de la inserción del transposón.

La secuencia de nucleótidos correspondiente al clon *AtLecPK1*, así como su traducción en aminoácidos, queda reflejada en la Figura R.5. en la que se observa el clon completo constituido por 3035 pares de bases (pb). En la secuencia nucleotídica se distinguen 3 regiones:

- Región 5' no codificante: formada por 500 nucleótidos. En esta región aparece, previamente al codón ATG, una señal de terminación (TAA) en la misma fase de lectura.

- Región codificante: está constituida por 2049 nucleótidos. En esta región aparecen el codón ATG, correspondiente a la metionina inicial, en el nucleótido 402 y el codón de paro de la transcripción (TAG), en el nucleótido 2547.

- Región 3' no codificante: presenta 486 nucleótidos.

Este gen se caracteriza por la ausencia de intrones en su secuencia, como reveló la base de datos MIPS.

Se realizó un estudio comparativo de la proteína deducida del clon *AtLecPK1* enviando la secuencia de nucleótidos a la base de datos TAIR. En este estudio, se observó una elevada similitud con secuencias que codifican receptores de tipo lectina proteín-kinasas, como queda reflejado en la Figura R.6A., donde se puede observar la comparación de las tres proteínas de Arabidopsis que presentan mayor similitud a la proteína deducida del clon *AtLecPK1*.

El dendrograma de similitud muestra la relación existente entre AtLecPK1 (At5g01540) y otras 11 clases de lectinas PKs diferentes de Arabidopsis (Figura R.6B.). Se observa una elevada semejanza con Atg01550, Atg01560 y Atg08870, como ya reveló la comparación de sus secuencias, todas ellas pertenecientes a la misma familia proteica.

El genoma de Arabidopsis contiene, al menos, 42 secuencias de lectina PKs y otras 9 secuencias que están relacionadas con lectinas solubles (Barre et al., 2002). El análisis filogenético del dominio lectina de las PKs de *Medicago truncatula*, *A. thaliana* y algunas lectinas solubles de legumbres (Navarro-Gochicoa et al., 2003) ha permitido agrupar estas proteínas en 3 clases: A, B y C. La proteína AtLecPK1 caracterizada en este

estudio se incluye dentro de la clase A, mientras que la clase B está más relacionada con las lectinas de legumbres.

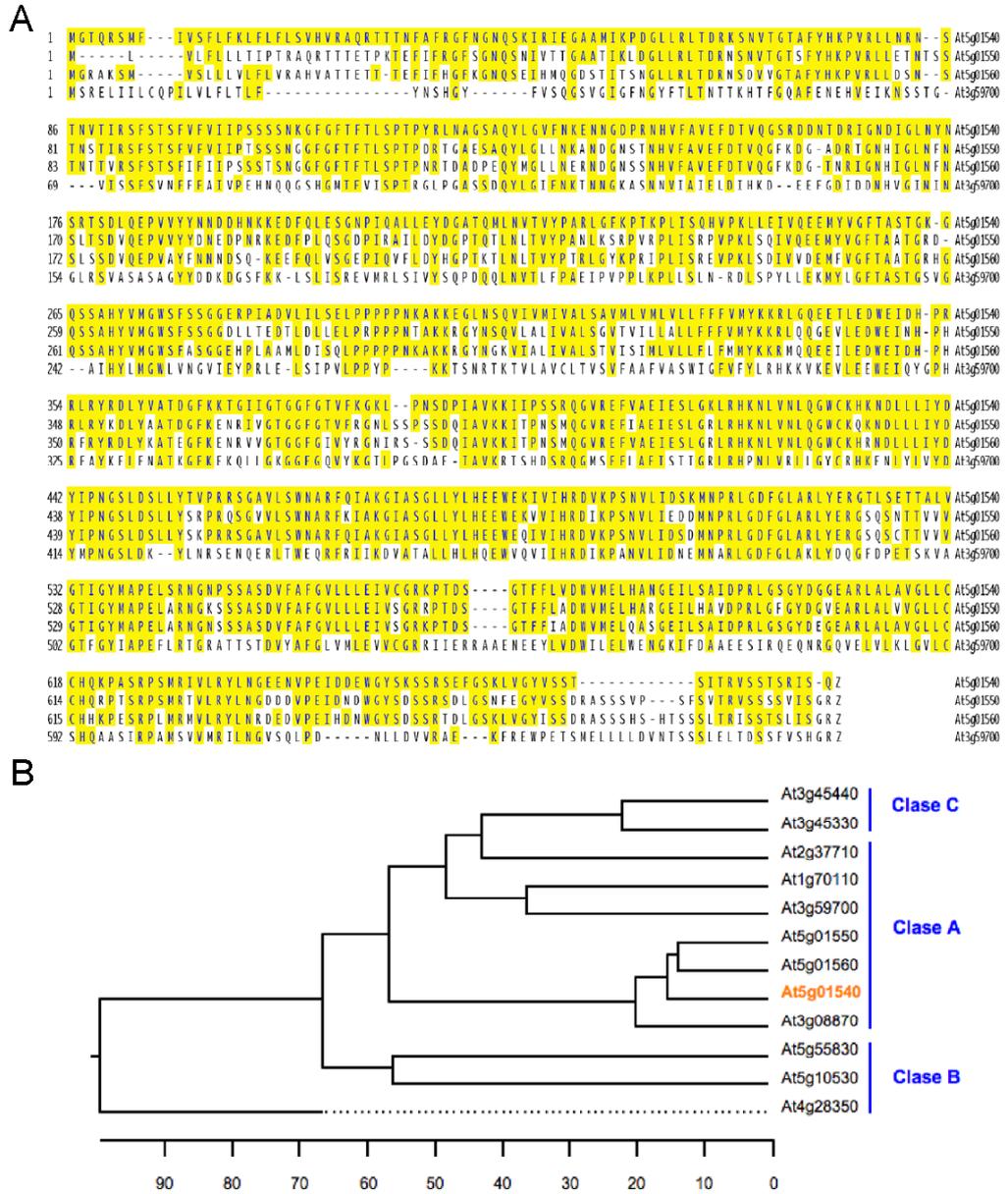


Figura R.6.- (A) Comparación de la secuencia aminoacídica de AtLecPK1 con tres lectina proteína-kinasas de Arabidopsis (At5g01550, At5g01560 y At3g59700). En amarillo aparecen los aminoácidos idénticos. **(B)** Dendrograma de similitud de los distintos receptores proteína-kinasas de tipo lectina descritos en Arabidopsis y agrupadas en 3 clases: A, B y C.

La proteína deducida de la secuencia nucleotídica clonada consta de 683 aminoácidos, posee un peso molecular de 75.9 KDa, un punto isoelectrico de 9.15 y su carga a pH 7 es de 13.00 (Tabla S.5.). Al analizar su composición de aminoácidos se observa un porcentaje elevado de aminoácidos hidrofóbicos (34.85% del total), especialmente leucina y valina, siendo la leucina el más abundante superando el 10% del total, siguiéndoles en orden de abundancia los aminoácidos cargados y los polares (27.09% y 26.50% del total, respectivamente).

Cuando se estudia el perfil hidropático obtenido según el algoritmo de Kyte y Doolittle (Figura R.7B.), se observa una alternancia de zonas hidrofóbicas e hidrofílicas en el dominio proteín-kinasa (entre los aa 350 y 683 aproximadamente), sin que haya un predominio claro de ninguna de ellas. En el extremo amino terminal se encuentra una zona hidrofóbica que se corresponde con el péptido señal (entre los aa 1 y 30 aproximadamente). El dominio lectina está constituido, fundamentalmente, por zonas hidrofílicas (entre los aa 30 y 300 aproximadamente). En la zona central de la proteína se observa una porción claramente hidrofóbica, que podría corresponder con el dominio transmembrana (entre los aa 300 y 350).

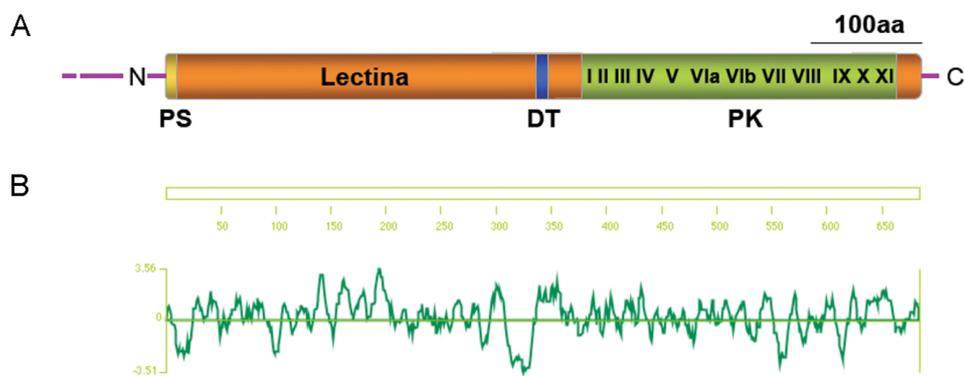


Figura R.7.- (A) Diagrama esquemático de AtLecPK1 mostrando los extremos amino (N) y carboxilo (C), el dominio extracelular similar a lectina, el dominio característico de las proteín-kinasas (PK) con los subdominios I-XI, el péptido señal (PS) y el dominio transmembrana (DT). (B) Perfil hidropático correspondiente a la secuencia de aminoácidos del clon AtLecPK1.

La Figura R.7A. muestra un diagrama esquemático de la proteína AtLecPK1, con los residuos conservados en el dominio catalítico (I-XI) característicos de las proteín-kinasas (Hanks et al., 1988). Estos dominios presentan regiones conservadas, que tienen

pequeñas variaciones y que permiten mantener la estructura tridimensional de la proteína y su actividad, y regiones menos conservados.

Los subdominios VIIb y VIII dentro del dominio proteín-kinasa permiten diferenciar la especificidad entre serina/treonina PKs y tirosina PKs, debido a las secuencias que contienen. La proteína AtLecPK1 presenta características de proteín-kinasas de tipo serina/treonina, ya que al comparar los subdominios VIIb y VIII de AtLecPK1 con los subdominios característicos de serina/treonina y tirosina proteín-kinasas, presentan mayor similitud con los primeros. Estos datos quedan reflejados en la Figura R.8.

	VIIb					VIII									
Serina/treonina PK	D	(L/I)	K	P	(A/E)	N	G	T	F	G	Y	I	A	P	E
AtLecPK1	D	V	K	P	S	N	G	T	I	G	Y	M	A	P	E
Tirosina PK	D	L	A	A	R	N	F	P	I	K	W	M	A	P	E

Figura R.8.- Comparación de los subdominios VIIb y VIII de AtLecPK1 con los subdominios correspondientes a serina/treonina y tirosina proteín-kinasas.

Tras analizar la secuencia de aminoácidos de la proteína en la base de datos PROSITE, se obtuvieron datos sobre la presencia de varias dianas posibles de N-miristilación a lo largo de toda la proteína. La N-miristilación consiste en la acilación por la adición covalente de un ácido graso saturado de C14 (miristilato). También se detectó la presencia de diferentes dianas de N-glicosilación, de fosforilación por proteín-kinasa C (CK2), que presenta preferencia por la fosforilación de residuos de serina y treonina, caseín-kinasa II, que es una proteín-kinasa de tipo serina/treonina cuya actividad es independiente de nucleótidos cíclicos y calcio, y proteín-kinasas dependientes de cAMP y cGMP, que también parecen tener preferencia por la fosforilación de residuos de serina/treonina. También se reveló la presencia de una diana de amidación. Además entre los aminoácidos 577 y 598 (dominio proteín-kinasa) se observó un motivo de cremallera de leucina (leuzine zipper), que consiste en una repetición periódica de residuos de leucina (cada 7 aminoácidos, LvdwvmeLhangeiLsaidprL) que permiten la

dimerización entre proteínas. Por último, la base de datos nos proporcionó información sobre la secuencia del subdominio VIIb, reconociéndola como el sitio activo de las serina/treonina PKs.

3.2.2.- Estudio de la expresión del gen *AtLecPK1*.

Una vez caracterizada la proteína *AtLecPK1*, se procedió al estudio de la expresión del gen correspondiente en plántulas de 7 días y plantas adultas de 3-4 semanas, sometidas a tratamientos con SNP (100 μ M y 1 mM) y cPTIO (100 μ M) durante 3h y 30 min, respectivamente. Para ello, se aislaron los RNAs de las plántulas y plantas tratadas y se analizaron mediante la técnica de Northern blot.

Debido a la elevada similitud de *AtLecPK1* con otros genes que codifican proteínas-kinasas, como se puede comprobar en la comparación de la secuencia de aminoácidos de *AtLecPK1* con otras proteínas-kinasas y en el dendrograma de similitud (Figura R.6A y B.), fue necesaria la búsqueda de una sonda específica que permitiera la hibridación con el correspondiente mRNA. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos que permitieron obtener una secuencia específica del extremo 3' no codificante del clon (Tabla M.6., apartado 2.2. de Materiales y Técnicas).

Utilizando esta secuencia específica como sonda, se analizó la expresión del clon en plántulas de 7 días sometidas a tratamientos con SNP y cPTIO durante 3h mediante Northern blot. Como se puede observar en la Figura R.9A., en los tratamientos con SNP, tanto 100 μ M como 1 mM, se aprecia mayor expresión. Por su parte, el secuestro de NO mediante la adición de cPTIO reprime la inducción de este gen a lo largo del tratamiento, mostrando niveles de expresión inferiores al control en agua.

Del mismo modo, se estudió la expresión de *AtLecPK1* en plantas adultas de 3-4 semanas tratadas con agua, SNP 100 μ M y 1 mM y cPTIO 100 μ M, durante 30 min, utilizando como sonda la secuencia específica descrita anteriormente. El resultado se refleja en la Figura R.9B., en la cual se observa que los niveles de mRNA en los tratamientos con SNP (100 μ M y 1 mM) son similares o superiores al control en agua. Por su parte, el mRNA correspondiente a este clon se expresa en cantidades muy bajas en los tratamientos con cPTIO.

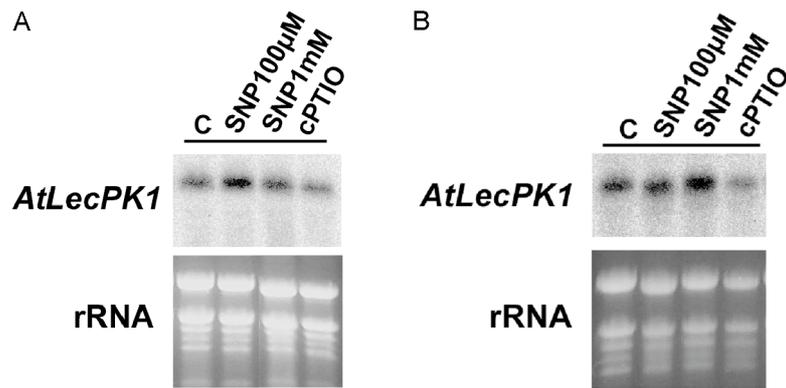


Figura R.9.- (A) Análisis por Northern Blot de los RNAs aislados de plántulas de 7 días tratadas con agua (C), SNP (100 µM y 1 mM) y cPTIO (100 µM), durante 3h. (B) Análisis por Northern Blot de los RNAs aislados de plantas de 3-4 semanas tratadas con agua (C), SNP (100 µM y 1 mM) y cPTIO (100 µM), durante 30 min.

3.2.3.- Análisis fenotípico del mutante *noi1* en procesos de germinación.

Una vez caracterizada la proteína, se realizó un análisis fenotípico del mutante *noi1* durante el proceso de germinación. Como ya se ha mencionado anteriormente, el NO inhibe la dormición permitiendo la germinación de las semillas. En la Figura R.10A. se representa el porcentaje de germinación de semillas sin estratificar pertenecientes a Ler y al mutante *noi1*. Después de 7 días de su siembra en placa, el 91% de las semillas del ecotipo silvestre germinaron y presentaban cotiledones verdes, mientras que en el mutante el porcentaje de germinación era más bajo, del 34%. Los resultados muestran que las semillas del mutante presentaban mayor dormición que el ecotipo silvestre Ler.

Asimismo, semillas sin estratificar del mutante *noi1* fueron tratadas con agua, SNP 100 µM y cPTIO 100 µM. Se observó como en presencia del donador de NO, el porcentaje de germinación era similar al control (26% y 34%, respectivamente), mientras que en ausencia de NO las semillas prácticamente no germinaban (4%) (Figura R.10B.).

Ya que el proceso de dormición está íntimamente relacionado con la acción del ácido abscísico (ABA), se crecieron el ecotipo silvestre Ler, el mutante *noi1* y el mutante insensible al ABA, *abi1-1*, en presencia de ABA 0.5 µM. Los resultados obtenidos se representan en la Figura R.10C. Mientras que *abi1-1* germina al 100% después de 7 días de germinación, el ecotipo silvestre se ve afectado por la presencia de ABA en el medio

(germinan el 60% de las semillas). El mutante *noi1* presentó un porcentaje de germinación del 12%, mostrando una marcada hipersensibilidad a la hormona.

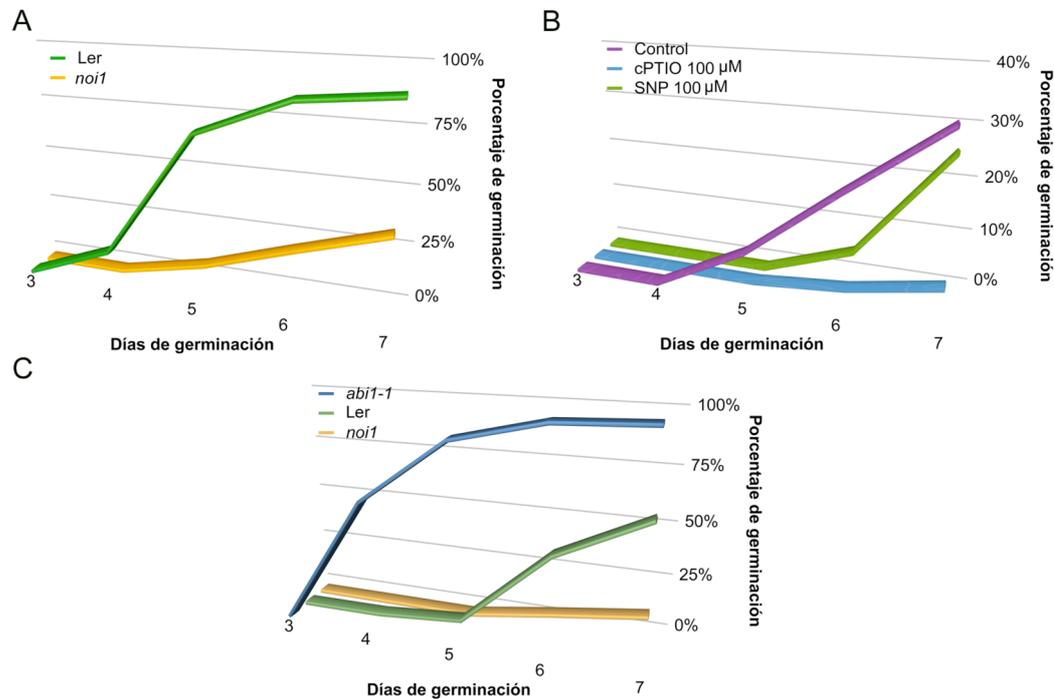


Figura R.10.- Caracterización fenotípica del mutante *noi1*. **(A)** Ensayo de dormición/germinación en semillas sin estratificar del ecotipo silvestre Ler y del mutante *noi1*. **(B)** Ensayo de dormición/germinación del mutante *noi1* en presencia de SNP 100 µM y cPTIO 1mM. **(C)** Ensayo de hipersensibilidad al ABA (0.5 µM) en semillas sin estratificar de ecotipo Ler, el mutante insensible a ABA (*abi1-1*) y el mutante *noi1*.

4.- PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN EL CRECIMIENTO DE LA RAÍZ PRIMARIA.

4.1.- Altos niveles de óxido nítrico inhiben el crecimiento de la raíz primaria.

Se ha descrito previamente que el NO participa en el desarrollo de la raíz, inhibiendo el crecimiento de la raíz primaria (PR) y promoviendo el desarrollo de raíces laterales (LR) en *Arabidopsis* y tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Correa-Aragunde et al., 2004; He et al., 2004). Para profundizar en el mecanismo por el cual, el NO inhibe el crecimiento de la raíz principal, realizamos un ensayo dosis-respuesta a concentraciones crecientes de los donadores de NO, SNAP (Figura R.11A y B.) y SNP (Figura R.11C.).

Las medidas de la longitud de la raíz muestran una disminución progresiva en el crecimiento de la raíz a medida que aumenta la concentración de los donadores. Este efecto en el crecimiento de la raíz es específico del NO, ya que al aplicar conjuntamente donador y secuestrador del gas (SNAP 1 mM y cPTIO 1 mM) se revierte el fenotipo, con un mayor crecimiento de la raíz principal a la situación control (Figura R.11B.).

Debido a la controversia existente en torno a la acción de los donadores de NO, se realizaron ensayos incubando las plántulas en presencia del NO liberado por diferentes donadores (SNP, SNAP y GSNO) y a la aplicación directa del gas, observándose una inhibición significativa en el crecimiento de la raíz en todos los casos, comparado con plántulas control y tratadas con el secuestrador cPTIO (Figura R.11D.). También se analizó el fenotipo que presentaba el mutante sobreproductor de NO, *cue1/nox1* (He et al., 2004), mostrando una inhibición significativa en el crecimiento de la raíz comparado con el ecotipo silvestre Col-0.

Para caracterizar la cinética de la inhibición del crecimiento, se realizó un ensayo a distintos tiempos en el cual se evaluó el crecimiento de la raíz primaria de plántulas crecidas durante 3 días en medio MS, que posteriormente fueron incubadas con SNP 100 μM y cPTIO 1mM durante 7 días. Las medidas de longitud de la raíz se realizaron cada día durante los 7 días de tratamiento. Este ensayo reveló que en ausencia de NO, en las plántulas tratadas con el secuestrador cPTIO, se produce un aumento en la longitud de la raíz primaria a los 2 días de tratamiento comparado con el control. Sin embargo, esta diferencia no es significativa a tiempos largos del tratamiento (7 días). Por otra parte, se observó cómo en presencia de SNP se produce una inhibición de la raíz primaria desde el inicio del tratamiento (Figura R.11E.).

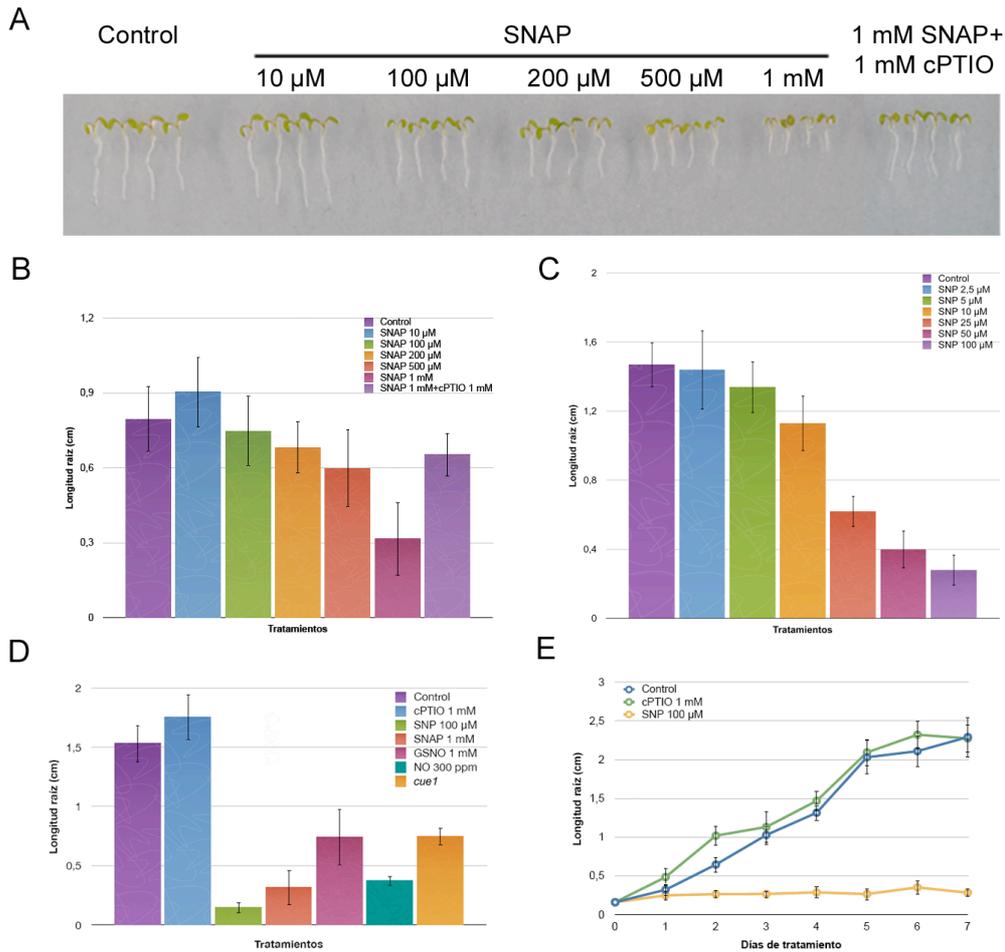


Figura R.11.- Caracterización fenotípica de las respuestas a NO en el crecimiento de la raíz. **(A)** Plántulas del ecotipo silvestre Col-0 en condiciones control y sometidas a tratamientos con diferentes concentraciones de SNAP (10 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M y 1 mM) y la combinación de SNAP 1 mM y cPTIO 1 mM, durante 5 días. **(B)** Longitud de la raíz medida en plántulas procedentes del ensayo de dosis-respuesta realizado con el donador SNAP. **(C)** Longitud de la raíz medida en plántulas tratadas con diferentes concentraciones de SNP (2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M y 100 μ M). **(D)** Longitud de la raíz primaria de plántulas Col-0 crecidas en condiciones control, en presencia de diferentes donadores de NO (SNP 100 μ M, SNAP 1 mM, GSNO 1 mM), NO gas a 300 ppm y cPTIO 1 mM. También se representa la longitud de la raíz primaria del mutante sobreproductor de NO, *cue1/nox1*. **(E)** Medidas de la longitud de la raíz de plántulas control y tratadas durante 7 días con SNP 100 μ M y cPTIO 1 mM. Las medidas fueron realizadas cada día durante los 7 días de tratamiento.

4.2.- El óxido nítrico regula la elongación celular en raíces de Arabidopsis.

En un intento de comprobar si la disminución observada en el crecimiento de la raíz primaria conlleva un cambio en el número de células o en el tamaño de éstas, se midieron y compararon el número y tamaño de las células del córtex, tomando como punto de partida la primera célula después del centro quiescente hasta llegar a la zona de elongación y diferenciación de la raíz. Se incluyeron plántulas control, plántulas tratadas con diferentes donadores de NO (SNP y SNAP), con el secuestrador cPTIO, la combinación de SNAP y cPTIO, y un mutante sobreproductor de NO (*cue1/nox1*). Los resultados obtenidos están representados en la Figura R.12. La adición y/o eliminación de NO durante la fase inicial del crecimiento de la raíz (plántulas de 5 días), produce un cambio en el número de células que se extienden entre el centro quiescente y el comienzo de la zona de elongación, y que se traduce finalmente en cambios en el tamaño del meristemo. Así, en plántulas control la transición a la zona de elongación se produce alrededor de la célula 28, mientras que en plántulas tratadas con SNP 100 μM se produce en torno a la célula 17, similar a lo ocurrido en el mutante sobreproductor *cue1/nox1*. Sin embargo, en cPTIO 1 mM ocurre en la célula 33. Además de esta variación en el comienzo de la elongación, se observan diferencias significativas en el tamaño de las células de esta zona. En plántulas tratadas con SNP 100 μM y en el mutante *cue1/nox1* se observan células de mayor tamaño en comparación con el control y el tratamiento con el secuestrador (Figura R.12D., células de la 1-10 y de la 11-20). Como se puede observar en la Figura R.12E., este efecto es revertido por cPTIO en presencia del donador SNAP. Como resumen de estos resultados podemos decir que altos niveles de NO reducen el tamaño del meristemo, debido a una disminución del número de células que lo componen, aunque promueven significativamente su elongación. Sin embargo, la ausencia de NO retarda el comienzo de la elongación celular en los estadios iniciales de formación de la radícula.

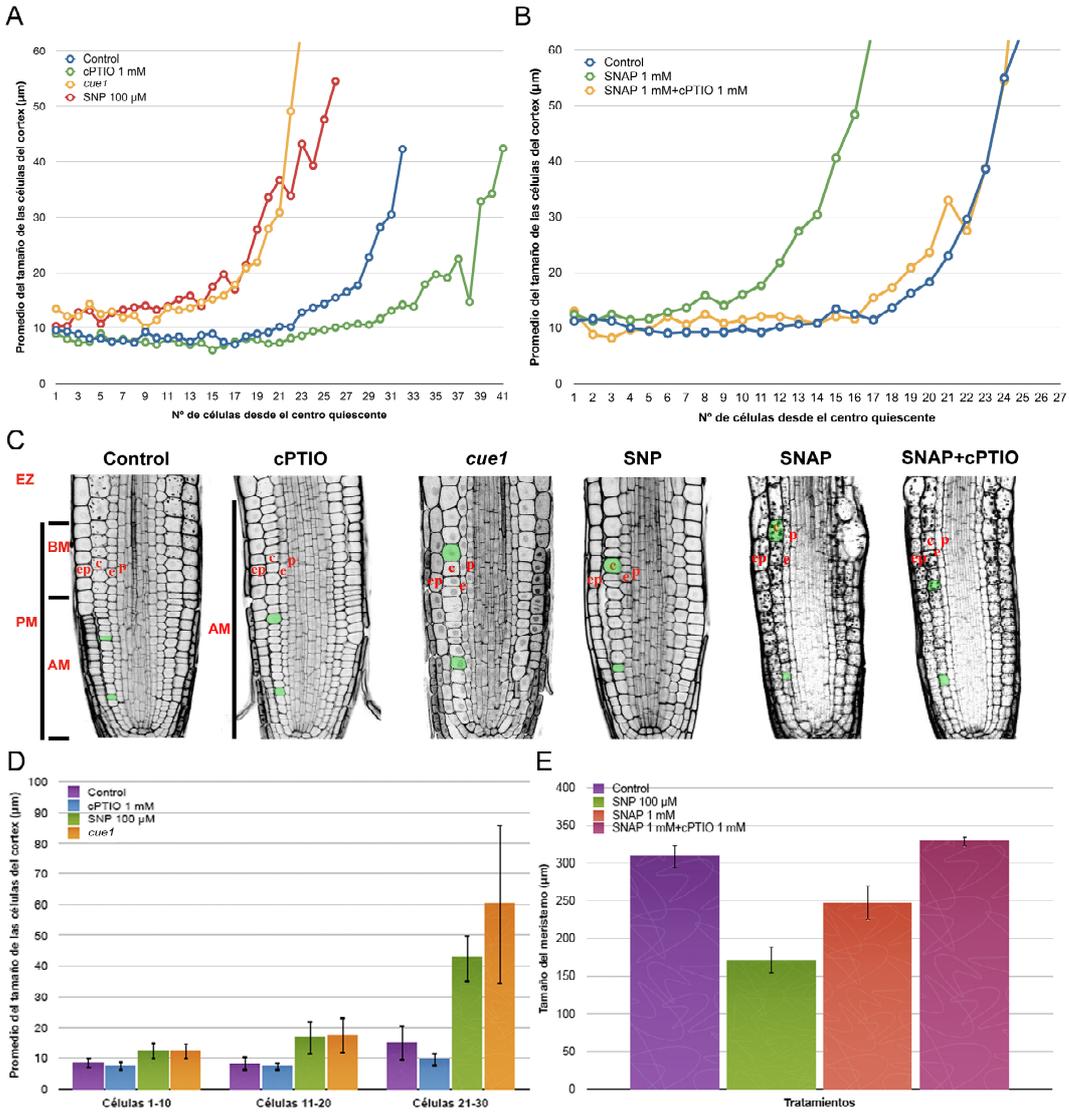


Figura R.12.- Efecto del NO en el meristemo de la raíz. **(A)** Promedio del tamaño de las células del córtex (de la 1 a la 40 contadas desde el centro quiescente) en plántulas control, tratadas con cPTIO 1 mM, SNP 100 μM y el mutante sobreproductor de NO, *cue1*. **(B)** Promedio del tamaño de las células del córtex (de la 1 a la 40 contadas desde el centro quiescente) en plántulas control, tratadas con SNAP 1 mM y la combinación de este donador con el secuestrador de NO, cPTIO 1 mM. **(C)** Imágenes de microscopía confocal del meristemo de la raíz principal (PM) de plántulas crecidas en presencia de los tratamientos descritos anteriormente. En la condición control se distinguen el meristemo apical (AM) y basal (BM), y el comienzo de la zona de elongación (EZ). Las plántulas crecidas en presencia de donadores y el mutante sobreproductor *cue1* muestran una mayor tasa de elongación en las células del meristemo y un menor tamaño final del meristemo. Este efecto es revertido al añadir cPTIO 1 mM. **(D)** Promedio del tamaño de las células del córtex de la 1-20, 11-20 y 21-30 contadas desde el centro quiescente. **(E)** Tamaño del meristemo en plántulas tratadas con SNP 100 μM y SNAP 1 mM, y su reversión con cPTIO 1 mM. ep: epidermis, c: córtex, e: endodermis y p: periciclo.

Tras 5 y 7 días de tratamiento con SNP, se mantiene la tendencia de reducción en el número de células capaces de dividirse, debido al aumento en la elongación celular en todo el meristemo. Sin embargo, tras tratamientos prolongados con cPTIO (7 días) no existe variación en el tamaño celular, siendo éste similar al control (Figura R.13.), sin observarse diferencias en el número de células que componen el meristemo.

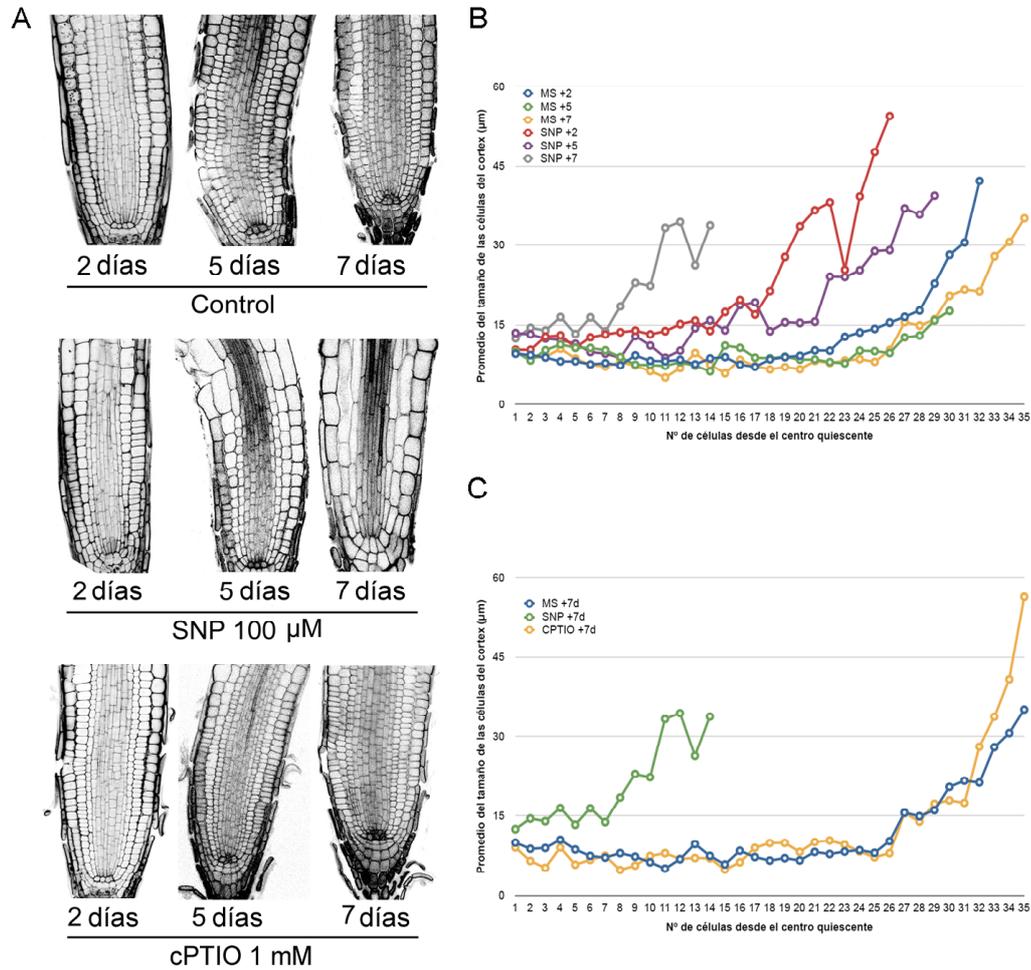


Figura R.13.- Efecto del tratamiento con SNP y cPTIO a diferentes tiempos (2, 5 y 7 días) en el meristemo de la raíz. **(A)** Imágenes del meristemo de la raíz tomadas al confocal. **(B)** Promedio del tamaño de las células del córtex (de la 1-40 células) de plántulas del ecotipo Col-0 en condiciones control (MS) y tratadas con SNP 100 µM durante 2, 5 y 7 días. **(C)** Promedio del tamaño de las células del córtex (de la 1-40 células) en condiciones control (MS) y tratadas con SNP 100 µM y cPTIO 1mM, durante 7 días.

4.3.- Altos niveles de óxido nítrico reducen la división celular en raíces de *Arabidopsis*.

Para estudiar si los efectos en la tasa de elongación celular en el meristemo de la raíz conllevaban cambios en el proceso de división, se utilizó una línea marcadora de la fase G2 del ciclo celular, *CycB1;1::GUSDB* (Colon-Carmona et al., 1999). En la Figura R.14. se observa una disminución en la expresión de la línea reportadora en respuesta a los tratamientos con NO liberado por los donadores SNP y SNAP, mientras que la acción conjunta del donador y el secuestrador cPTIO reestablece la expresión de *CycB1;1::GUSDB*. Estos resultados sugieren que altos niveles de NO tienen un efecto citoestático, inhibiendo el crecimiento de la raíz. La ausencia de NO debido a la adición de cPTIO no afecta al patrón de expresión de la línea reportadora. Estos resultados sugieren que el NO endógeno no regularía directamente este proceso.

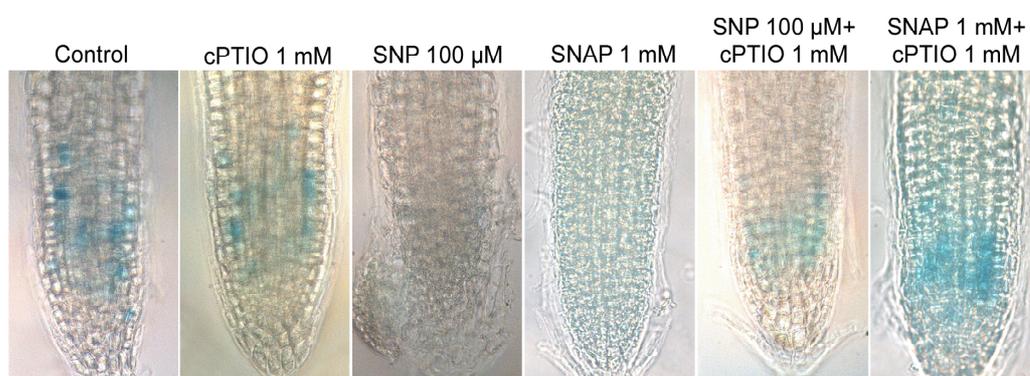


Figura R.14.- Efecto de altos niveles de NO en la división celular del meristemo utilizando la línea marcadora *CycB1;1::GUSDB* (marca las células en el estado G2 del ciclo de división celular).

4.4.- Altos niveles de óxido nítrico reducen la elongación celular en la zona de diferenciación de la raíz.

Otro de los pasos seguidos en nuestro estudio fue evaluar el efecto del NO en la zona de diferenciación de la raíz. Para ello, se cuantificó el tamaño de las células del córtex en esta zona, donde la diferenciación se aprecia debido a la aparición de pelos radiculares. Como se muestra en la Figura R.15., no se observa una diferencia significativa en el tamaño de las células en plántulas en las que el NO ha sido secuestrado por la acción del cPTIO, con respecto a las plántulas control ($142.69 \pm 35.03 \mu\text{m}$ en

plántulas control y $137.96 \pm 34.97 \mu\text{m}$ en tratamientos con cPTIO). Sin embargo, al aumentar los niveles de NO exógeno (SNP y SNAP) se observa una reducción significativa del tamaño celular ($75.36 \pm 17.13 \mu\text{m}$ en SNP y $85.06 \pm 21.56 \mu\text{m}$ en SNAP). La adición conjunta de SNAP y cPTIO permite la reversión, observándose células con mayor longitud ($116.25 \pm 32.95 \mu\text{m}$).

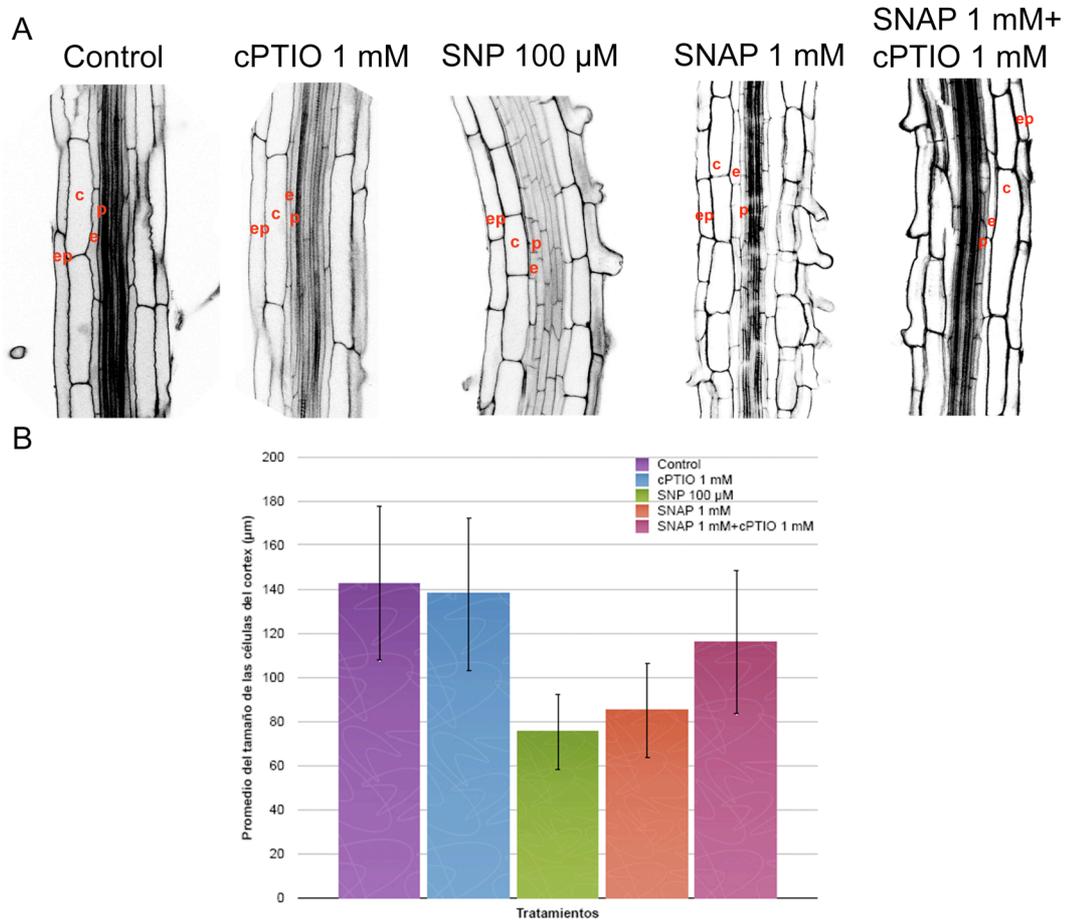


Figura R.15.- Efecto del NO en la zona de diferenciación de la raíz. **(A)** Imágenes de confocal que representan la zona de diferenciación de la raíz. Como se puede observar, la adición exógena de NO (SNP y SNAP) produce una disminución en el tamaño de las células en esta zona. **(B)** Promedio del tamaño de las células del córtex en la zona de diferenciación (célula >40 contando a partir del centro quiescente). ep: epidermis, c: córtex, e: endodermis y p: periciclo.

Tomado en su conjunto, los resultados obtenidos sugieren que el NO endógeno puede tener un papel importante en el desarrollo del meristemo de la raíz, modulando el tamaño del meristemo en los estadios iniciales de formación de la radícula. Así, la ausencia de NO retrasa el comienzo de la zona de elongación-diferenciación de la raíz (Figura R.12A.). Además, altos niveles de NO producen un incremento en la elongación de las células en el meristemo de la raíz primaria (Figura R.12. y R.13.), reduciendo la división celular en esta zona (Figura R.14.), mientras que reduce el tamaño celular en la zona de elongación (Figura R.15.).

La reducción en la elongación de las células en la zona de diferenciación de la raíz, debida a la aplicación exógena de NO (SNP 100 μM), es revertida tras la adición conjunta de SNP 100 μM y GAs (GA_3 100 μM), hormona que regula procesos de división y elongación celular (Figura R.16A.). Además, se observa una reversión parcial en el crecimiento de la raíz primaria, detectándose un mayor crecimiento de la raíz en aquellas plántulas tratadas conjuntamente con SNP 100 μM y cPTIO 1 mM, SNP 100 μM y GA_3 100 μM , y SNP 100 μM , cPTIO 1 mM y GA_3 100 μM (Figura R.16B.). Por otra parte, el mutante *qdella* (deficiente en 4 de las 5 proteínas DELLA, descritas como reguladores negativos en la señalización mediada por GAs) es parcialmente insensible al NO en el crecimiento de la raíz, ya que presentó mayor longitud de la raíz tras el tratamiento con SNP. Sin embargo, la línea *pRGA:RGA-GFP*, presenta igual sensibilidad al SNP comparado con el control (Figura R.16C.).

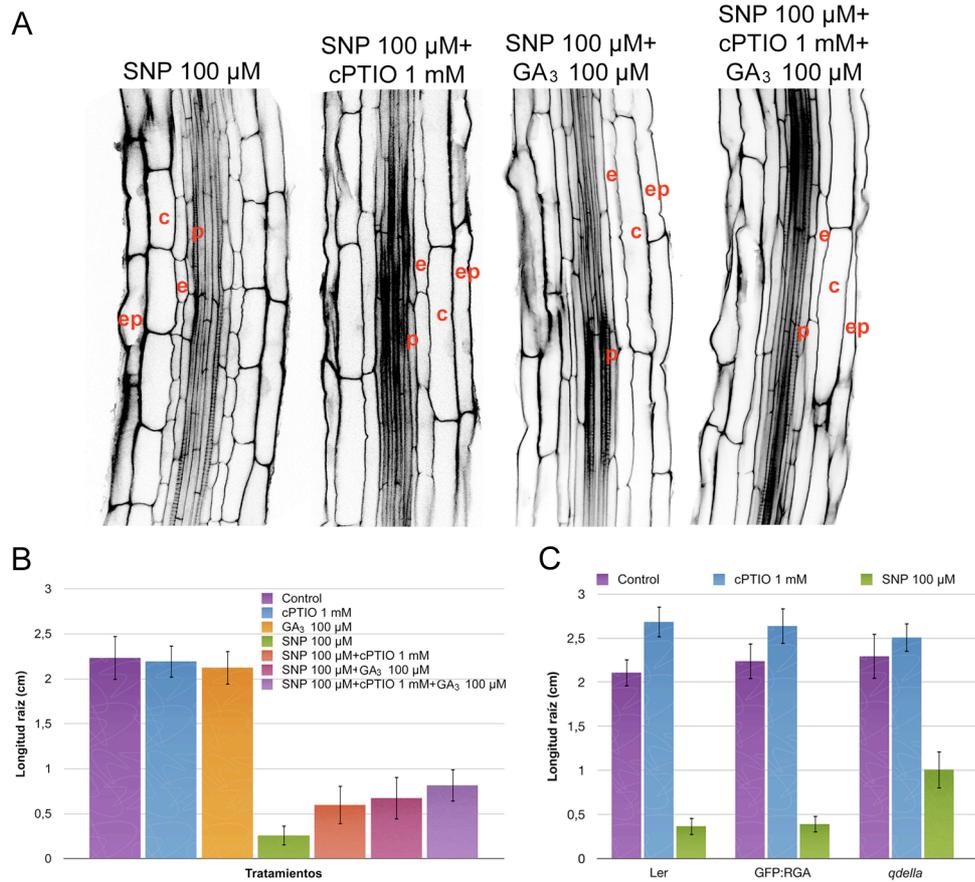


Figura R.16.- Efecto de las GAs en la reversión de la inhibición de la elongación celular producida por la adición de SNP en la zona de diferenciación de la raíz. **(A)** Imágenes de confocal que representan la zona de diferenciación de la raíz. Como se puede observar, la adición exógena de NO (SNP) produce una disminución en el tamaño de las células en esta zona, que es revertido al añadir conjuntamente SNP y GA₃, y SNP, cPTIO y GA₃. ep: epidermis, c: córtex, e: endodermis y p: periciclo. **(B)** Promedio del tamaño de la raíz tras la adición de SNP 100 μ M, cPTIO 1 mM, SNP 100 μ M + cPTIO 1 mM, SNP 100 μ M + GA₃ 100 μ M y SNP 100 μ M + cPTIO 1 mM + GA₃ 100 μ M. **(C)** Longitud de la raíz medida en plántulas del ecotipo silvestre Ler, *qdella* (mutante deficiente en 4 de las 5 proteínas DELLA) y la línea *pRGA:RGA:GFP*, en condiciones control y tratadas con SNP 100 μ M y cPTIO 1 mM.

4.5.- Altos niveles de óxido nítrico alteran la respuesta a auxinas.

La distribución espacial de las auxinas es un factor importante capaz de regular diferentes procesos del desarrollo en las plantas, incluidos la división y elongación celulares durante el crecimiento de la raíz. Como se ha expuesto anteriormente, al aumentar los niveles de NO de forma exógena o con mutantes sobreproductores se producen cambios en los patrones de división y elongación celular. Es por ello que nos

planteamos si altos niveles de NO pudieran estar alterando la respuesta a auxinas. Utilizando el gen reportador de respuesta a auxinas *DR5:GUS* y *DR5:GFP*, se observó que el NO altera su patrón de expresión, siendo ésta más tenue en el centro quiescente y la zona de la columela de plántulas tratadas con SNP 100 μ M durante 3h, 24h y 48h, comparadas con el control (Figura R.17.). Este cambio en el patrón de expresión se debe a la acción directa del NO, debido a que en presencia de su secuestrador cPTIO se logra revertir el patrón de expresión original (Figura R.17B.).

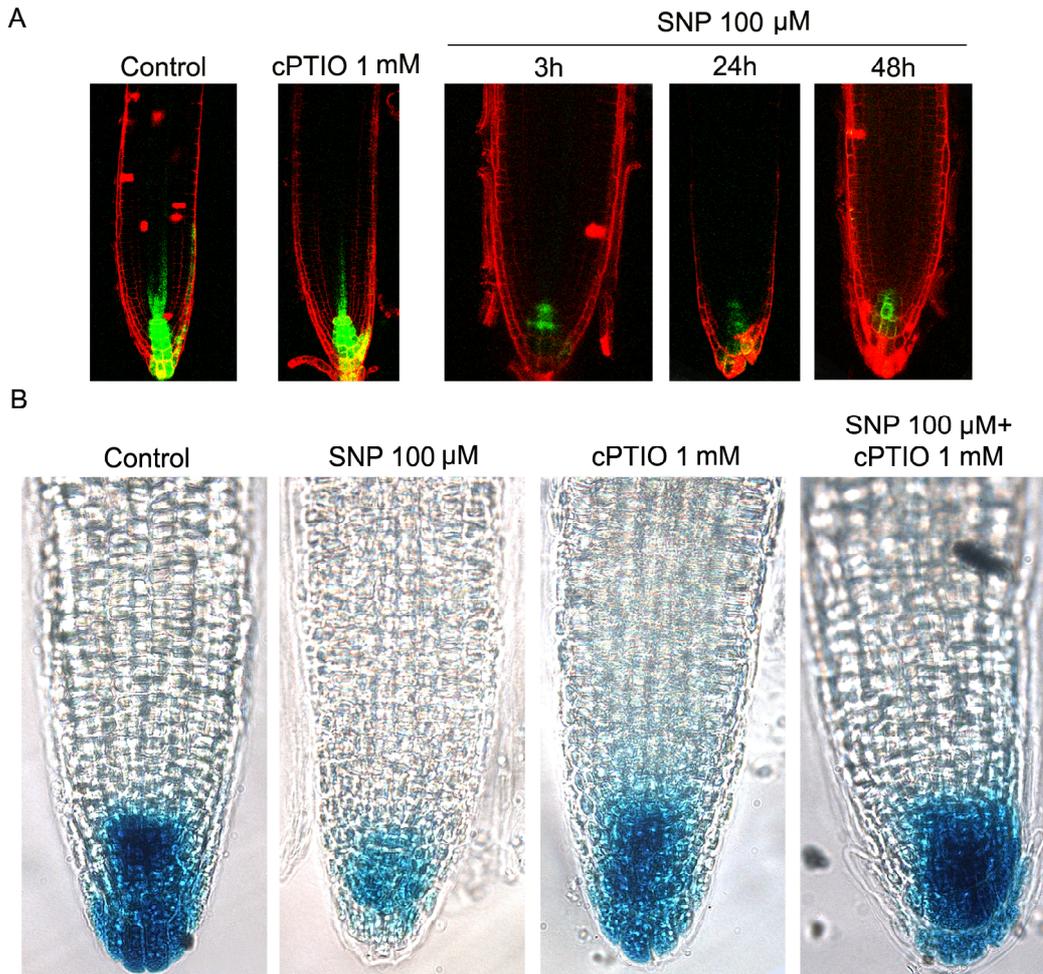


Figura R.17.- Patrón de expresión del gen reportador de respuesta a auxinas *DR5:GFP* y *DR5:GUS*. **(A)** Imágenes de confocal de plántulas *DR5:GFP* tratadas con cPTIO 1mM y SNP 100 μ M durante 3h, 24h y 48h. **(B)** Tinción GUS de plántulas *DR5:GUS* tratadas durante 2 días con SNP 100 μ M, cPTIO 1mM y la combinación de ambos.

4.6.- Altos niveles de óxido nítrico alteran el transporte basipétalo de auxinas.

Con las premisas anteriores, decidimos comprobar si la inhibición del crecimiento producida en presencia de SNP es consecuencia de la inhibición del transporte polar de auxinas. Para ello, se analizó el fenotipo de plántulas tratadas con el donador de NO, SNP, y un inhibidor del transporte polar de auxinas, ácido 1-N-naftilftalámico (NPA), así como la combinación de éstos, observándose una inhibición de la raíz primaria similar en plántulas tratadas con SNP y NPA (Figura R.18.).

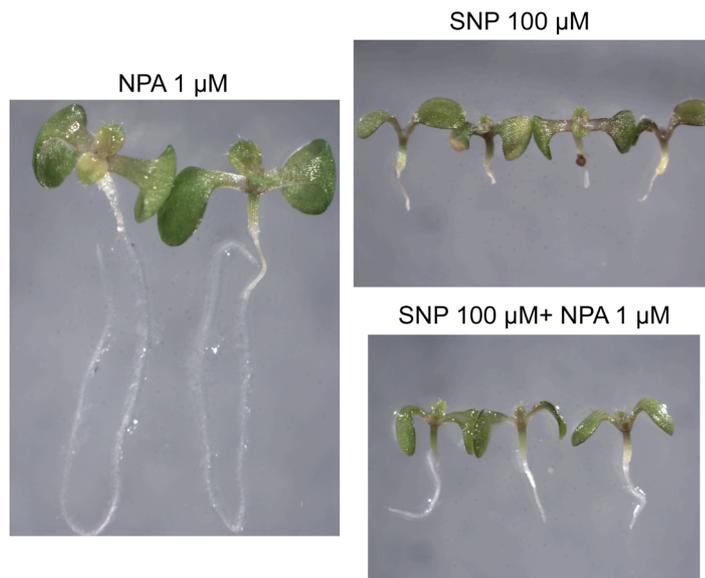


Figura R.18.- Plántulas del ecotipo silvestre Col-0 sometidas a tratamientos con el donador de NO (SNP 100 μ M), el inhibidor del transporte basipétalo de auxinas, NPA 1 μ M y la combinación de ambos.

Del mismo modo, para identificar si el efecto de altos niveles de NO en el cambio del patrón de respuesta a auxinas está relacionado con el transporte de esta hormona, analizando el efecto del NO en los transportadores PIN1 y PIN2. Para ello, se utilizaron las líneas transgénicas *pPIN1:PIN1-GFP* y *pPIN2:PIN2-GFP* (Benkova et al., 2003; Xu y Scheres, 2005). En condiciones control, PIN1 se localiza en el xilema participando en el transporte basipétalo de auxinas, mientras que PIN2 se localiza en las células epidérmicas y permite el transporte acropétalo y la recircularización de las auxinas en la punta de la

raíz. En la Figura R.19A. se observa una reducción en la abundancia de PIN1 en plántulas tratadas con SNP después de 3h, 8h y 24h, sugiriendo que al aumentar los niveles de NO en plántulas *pPIN1:PIN1-GFP* disminuyen los niveles de PIN1. Sin embargo, bajo las mismas condiciones experimentales, PIN2 no se ve afectado de forma significativa. Estos datos fueron también comprobados por western-blot con resultados similares (Figura R.19B-C.). Por otra parte, se analizó la localización de PIN1 en los primordios de las raíces laterales (Figura R.19D.), siendo ésta igual que en el control. Estos resultados nos permiten sugerir que la regulación de PIN1 por altos niveles de NO actúa únicamente a nivel de la raíz primaria.

Para averiguar si la desaparición de la fluorescencia en *pPIN1:PIN1-GFP* pudiera deberse a la existencia de una regulación a nivel transcripcional o una modificación a nivel post-traducciona, se analizaron los niveles de expresión de *PIN1* mediante qRT-PCR en condiciones control y en respuesta al tratamiento con SNP 100 μ M a 8 y 24 h. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en los niveles de expresión del transcrito (Figura R.19E.) y sugieren una posible regulación post-traducciona de PIN1 como respuesta a tratamientos con los donadores de NO.

Finalmente, para comprobar si el mecanismo de degradación de proteínas a través del proteosoma es el responsable de la desaparición de la señal de PIN1:GFP, se realizaron nuevos tratamientos incluyendo un inhibidor del proteosoma, MG132, y se compararon con el control y los tratamientos realizados con varios donadores de NO (SNP y SNAP) y su secuestrador cPTIO. Como queda reflejado en la Figura R.18A., las plántulas sometidas a tratamientos en los que se añade MG132 presentan fluorescencia en los lugares correspondientes a PIN1 y no difieren de la localización subcelular presente en el control y el tratamiento con cPTIO. Asimismo, la combinación del donador de NO y el inhibidor del proteosoma no revierte la fluorescencia original. Estos resultados fueron además comprobados por western blot obteniendo la misma evidencia (Figura R.18B-C.) (apartado 7.4. de Materiales y Técnicas). De este modo podemos sugerir que la desaparición de PIN1 asociada a altos niveles de NO pudiera producirse por un mecanismo independiente del proteosoma.

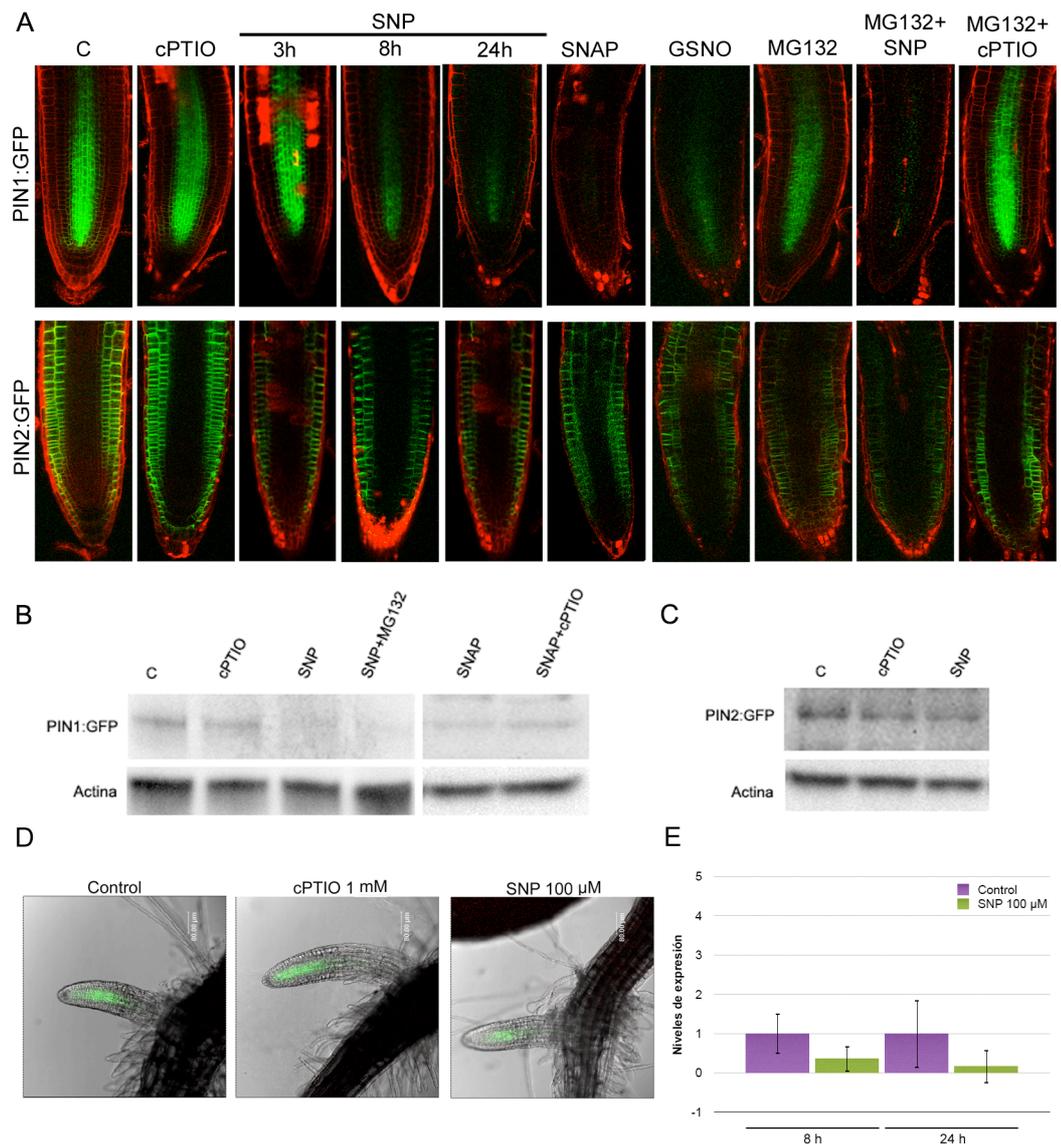


Figura R.19.- (A) Localización subcelular de las proteínas PIN1 y PIN2 en plántulas control y tratadas con diferentes donadores de NO (SNP: a 3h, 8h y 24h, SNAP y GSNO 8h) y la combinación con cPTIO y el inhibidor del proteosoma MG132. (B) Análisis mediante western blot de los niveles de PIN1 presentes en extractos de raíz aislada a partir de plántulas *pPIN1:PIN1-GFP* control y tratadas con cPTIO, SNP, SNP+MG132, SNAP y SNAP+MG132. (C) Análisis mediante Western blot de los niveles de PIN2 presentes en extractos de raíz aislados de plántulas *pPIN2:PIN2-GFP* control y tratadas con SNP y cPTIO. En ambos casos se utilizó la Actina como control de carga. (D) Localización subcelular de PIN1 en los primordios de las raíces secundarias de plántulas control y tratadas con cPTIO y SNP. (E) Niveles de expresión de *PIN1* en plántulas de 5 días crecidas en presencia de SNP 100 μM durante 8 y 24 h, así como en la condición control.

4.7.- Implicación del gen *AtPATL2*, reprimible por óxido nítrico, en el proceso de desarrollo de la raíz.

La búsqueda de genes inducibles y reprimibles por NO utilizando la colección de mutantes EXOTIC (apartado 2) nos permitió el aislamiento de un mutante al que hemos denominado *nor1* (*nitric oxide repressible 1*). En este mutante se observa un patrón de expresión diferencial, presentando una mayor expresión del gen reportador en la raíz de plántulas tratadas con el secuestrador cPTIO 100 μ M, comparado con plántulas tratadas con el donador SNP 100 μ M (Figura R.20.).

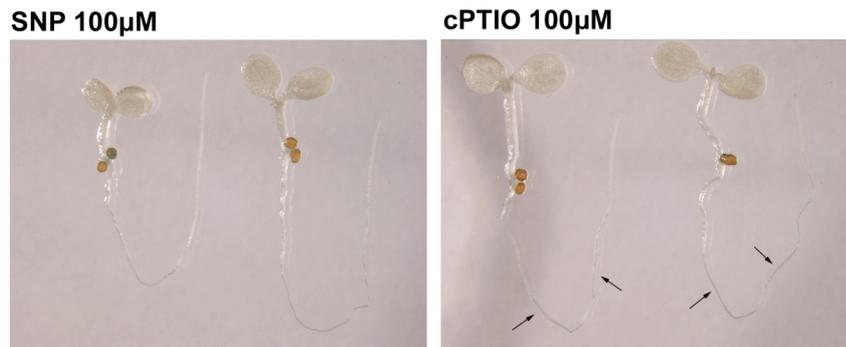


Figura R.20.: Ensayo histoquímico de la actividad β -glucuronidasa en la mutante *nor1* tras el tratamiento con el donador SNP y el secuestrador cPTIO. Las flechas indican las zonas de mayor expresión del gen reportador.

4.7.1.- Identificación del gen mutado *NORI*.

El gen mutado, reprimible por NO, se identificó clonando y secuenciando las regiones flanqueantes a la inserción mediante TAIL-PCR. El fragmento obtenido fue secuenciado y comparado con la base de datos de Arabidopsis obteniendo una similitud del 97% con el gen *AtPATL2* (At1g22530). Para completar la secuencia del clon se utilizaron oligonucleótidos específicos (EX119 SEN y EX119 ANS) (Tabla M.6., apartado 2.2. de Materiales y Técnicas) y se clonó en el vector pGEMT. El transposón se encuentra insertado en el nucleótido 259, de la región 5' no codificante (Figura R.21.).

En la Figura R.21. se representa la secuencia de nucleótidos correspondiente al clon *AtPATL2*, así como su traducción en aminoácidos. El clon completo está constituido por 3048 pares de bases (pb). En la secuencia nucleotídica se distinguen 3 regiones:

```

1 tt tgg aag aga ata aaa tga acc taa gaa tat atc aaa aga tca aaa ata tcc aaa gaa tat
63 gca aga gtt aga agt gaa tgg gag atc aaa aag ctg tga ctg gta aat tag aca ata
123 tat cct ttc ctt aga gaa aat tag tgt aac gaa tct aaa ata taa aag gaa tat gaa
183 taa gta aaa tat tca aaa aag ttg cta aat tag tta atg ttt aaa att ggt gaa tcc aag
243 att gag aga agc aaa aga cgg cgg ttt gga gaa aga gaa aat ttg gga ccc tct act aag
303 aaa agt atc ttc caa att agc tgt cca aca gat cgg acc agt ctg ttc tct ttt gct ctt
363 ctc aca cac aca caa aca taa cat ctc ctc cat ttt ctc tct tct ctc ttt tta gaa
423 ctc ttc ttc ttc ttc ttc tct ctc aat tcc atc tct ctc tct ctt tct agt tct tgt tcc
483 ctt tcy aat caa gty atc ATG GCT CAA GAA GAG ATA CAG AAA CCT ACT GCC TCT GTT CCA
M A Q E E I Q K P T A S V P
543 GTG GTT AAG GAG GAA ACT CCT GCC CCG GTT AAG GAG GTT GAG GTG CCG GTT ACT ACG GAG
V V K E E T P A P V K E V E V P V T T E
603 AAA GCT GTG GCT GCG CCT GCT CCG GAA GCT ACG GAG GAG AAA GTT GTG TCT GAG GTG GCG
K A V A A P A P E A T E E K V V S E V A
663 GTG CCT GAA ACA GAG GTG ACG GCG GTG AAA GAG GAG GAG GTT GCG ACG GGA AAG GAG ATC
V P E T E V T A V K E E E V A T G K E I
723 TTG CAA TCG GAG TCG TTT AAG GAG GAA GGC TAT TTG GCT TCT GAA TTA CAG GAA GCT GAG
L Q S E S F K E E G Y L A S E L Q E A I
783 AAG AAT GCT TTG GCT GAG TTA AAG GAG TTG GTT AGG GAG GCT TTG AAC AAG CGT GAA TTC
K N A L A E L K E L V R E A L N K R E F
843 ACC GCG CCA CCG CCA CCA CCA GCT CCG GTA AAG GAA GAG AAA GTT GAG GAG AAG AAA ACA
T A P P P P P A P V K E E K V E E K K T
903 GAG GAA ACA GAG GAA AAG AAG GAA GAA GTT AAA ACA GAG GAA AAA TCT CTT GAG GCT GAA
E E T E E K K E E V K T E E K S L E A E
963 ACC AAA GAA GAG GAG AAA TCT GCT GCT CCG GCC ACC GTA GAG ACC AAG AAA GAA GAG ATC
T K E E E K S A A P A T V E T K K E I
1023 TTG GCC GCT CCG GCT CCG ATC GTC GCA GAG ACC AAG AAG GAA GAG ACA CCA GTT GCT CCT
L A A P A P I V A E T K K E E T P V A P
1083 GCT CCG GTA GAG ACT AAA CCG GCT GCT CCG GTC GTT GCA GAG ACA AAG AAG GAA GAA ATA
A P V E T K P A A P V V A E T K K E I
1143 TTA CCA GCT GCT CCG GTC ACC ACA GAG ACC AAG GTG GAA GAG AAA GTC GTT CCA GTA GAA
L P A A P V T T E T K V E E K V V P V E
1203 ACC ACA CCG GCT GCT CCA GTC ACC ACA GAG ACC AAG GAA GAA GAG AAA GCC GCT CCG GCT
T T P A A P V T T E T K E E E K A A P V
1263 ACC ACA GAG ACC AAG GAG GAA GAG AAA GCA GCT CCG GGA GAG ACC AAG AAA GAA GAG AAA
T T F T K F F F K A A P G F T K K F F K
1323 GCA ACC GCC TCT ACT CAG GTC AAG AGG GCC TCA AAA TTT ATT AAA GAT ATA TTT GTC TCA
A T A S T Q V K R A S K F I K D I F V S
1383 GTC ACC ACT AGC GAG AAG AAG AAG GAA GAA GAG AAA CCA GCA GTA GTA ACA ATC GAG AAG
V T T S E K K K E E E K P A V V T I E K
1443 GCT TTC GCA GCT GAT CAA GAA GAA GAA ACA AAA ACC GTT GAA GCA GTC GAA GAA TCA ATC
A F A A D Q E E E T K T V E A V E E S I
1503 GTC TCC ATC ACT CTT CCA GAG ACA GCT GCA TAC GTA GAG CCA GAA GAA GTC TCA ATC TGG
V S I T L P E T A A Y V E P E E V S I W
1563 GGA ATC CCA CTT CTA GAG GAC GAA AGA TCC GAC GTG ATC CTC CTC AAA TTC CTC CGT GCA
G I P L L E D E R S D V I L L K F L R A
1623 CGT GAC TTC AAG GTC AAA GAA GCC TTC ACG ATG CTC AAA AAC ACC GTC CAA TGG CGC AAA
R D F K V K E A F T M L K N T V Q W R K
1683 GAG AAC AAG ATC GAC GAC CTA GTC TCA GAA GAT TTT GAA GGA AGC GAG TTT GAG AAG TTG
E N K I D D L V S E D L E G S E F E K L
1743 GTG TTC ACT CAC GGT GTC GAC AAA CAA GGA CAT GTG ATC TAT AGC TCG TAC GGT GAG
V F T H G V D K Q G H V V I Y S S Y G E
1803 TTT CAG AAC AAG GAG ATT TTC TCA GAT AAA GAG AAG CTT AGC AAG TTT CTC AAA TGG AGG
F Q N K E I F S D K E K L S K F L K W R
1863 ATT CAG TTC CAA GAG AAG TGT GTG AGG TCT CTT GAT TTT AGC CCT GAG GCT AAG TCA TCG
I Q F Q E K C V R S L D F S P E A K S S
1923 TTC GTG TTC GTT AGT GAC TTC AGG AAC GCT CCI GGA CTT GGI CAG AGA GCA TTG TGG CAG
F V F V S D F R N A P G L G Q R A L W Q
1983 TTC ATT AAA CGC GCC GTT AAG CAA TTC GAA GAT AAC TAT CCA GAG TTT GTC GCT AAA GAG
F I K R A V K Q F E D N Y P E F V A K E
2043 CTG TTC ATT AAT GTC CCA TGG TGG TAC ATT CCT TAC TAC AAA ACA TTC GGA AGT ATC ATT
L F T N V P W W Y I P Y Y K T F G S T I
2103 ACA TCG CCA AGG ACA AGG AGC AAG ATG GTC CTT TCT GGT CCA TCC AAA TCC GCT GAG ACC
T S P R T R S K H V L S G P S K S A E T
2163 ATT TTC AAA TAC GTA GCT CCT GAA GTA GTC CCG GTT AAG TAT GGT GGA CTC AGC AAA GAT
I F K Y V A P E V V P V K Y G G L S K D
2223 AGT CCA TTC ACC GTT GAA GAT GGA GTC ACC GAG GCC GTA GTT AAA TCG ACA TCT AAA TAT
S P F T V E D G V T E A V V K S T S K Y
2283 ACC ATT GAT TTG CCT GCT ACA GAG GGT TCC ACG CTC TCA TGG GAG CTT AGG GTT TTG GGT
T I D L P A T E G S T L S W E L R V L G
2343 GCG GAC GTG AGC TAC GGA GCT CAA TTT GAG CCA AGC AAT GAG GCA AGC TAC ACC GTG ATT
A D V S Y G A Q F E P S N E A S Y T V I
2403 GTC TCT AAG AAC CCG AAG GTC GGT TTA ACT GAT GAA CCG GTG ATA ACC GAT TCT TTC AAG
V S K N R K V G L T D E P V I T D S F K
2463 GCA AGT GAG GCG GGA AAG GTC GTG ATC ACG ATT GAC AAC CAA ACC TTT AAG AAG AAG AAG
A S E A G K V V I T I D N Q T F K K K K
2523 GTG CTC TAC AGG TCC AAA ACC CAA GCA TAA gat tat gtg tcc gat ctt tga atg aat gaa
V L Y R S K T Q A Z
2583 gaa aca aga aag atg gtt ggg aat ttt aat tca ttt aat tta gta cgt tta ttc att tgt
2643 gta ttt ttg aaa cct aaa aga agg ttt gtg ttt tat gga tgg ttt tga ttt gtt ttg gtg
2703 atg aga ttt ttt ttt gtt gat gat tct tat ata tac aaa ata ttt ata tac caa tgt gat
2763 tac cat tca att ttt ttg cta tgt gtg taa att tga act tat att agt ctt ttt cta ctg
2823 tgg ttg tgt caa gtt ttg ttc ctt tcg gac cgt tat tct tgg ttc ttt tag aca att agt
2883 taa agc ggt taa tac att tta acc tga ttt tga atg aag aga aag gca gaa aga taa ctt
2943 gct aaa aac ata act aac agt aca act aga tca gaa ata cag ttt cct ttt ctg acg gac
3003 cac tat tct tca ttt tat ata tca ctt cta gag att att tct gac att

```

Figura R.21.- Secuencia nucleotídica del gen *AiPATL2* y secuencia de aminoácidos deducida a partir de ella. Los codones de inicio y terminación están resaltados en amarillo. En rojo se señala el codón de paro anterior al ATG inicial. El triángulo azul indica el lugar exacto de la inserción del transposón. El triángulo naranja indica el lugar exacto de la inserción de T-DNA del mutante del SALK *086866*.

- Región 5' no codificante: formada por 500 nucleótidos. En esta región aparece, previamente al codón ATG, una señal de terminación (TAA) en la misma fase de lectura.

- Región codificante: está constituida por 2073 nucleótidos. En esta región aparecen el codón ATG, correspondiente a la metionina inicial, en el nucleótido 501 y el codón de paro de la transcripción (TAG), en el nucleótido 2573.

- Región 3' no codificante: presenta 430 nucleótidos.

Posteriormente, se realizó un estudio comparativo del clon enviando la secuencia de nucleótidos a la base de datos TAIR, observando una elevada similitud con secuencias que codifican otras patelinas en Arabidopsis, como queda reflejado en la figura R.22A. En esta figura se puede observar que la similitud entre las cinco proteínas comparadas es mayor en determinadas regiones, que se corresponden con dominios característicos de este tipo de proteínas, como se verá a continuación.

El dendrograma de similitud en la figura R.22B. muestra la relación existente entre AtPATL2 (At1g22530) y otras 11 proteínas PITPs (proteínas transportadoras de fosfatidilinositol) de Arabidopsis, grupo de proteínas al que pertenecen las patelinas. Se observa una elevada semejanza con AtPATL1 (At1g72150), como ya reveló la comparación de sus secuencias de aminoácidos.

La proteína deducida de la secuencia nucleotídica clonada consta de 684 aminoácidos, posee un peso molecular de 76.1 KDa, un punto isoelectrico de 4.86 y su carga a pH 7 es de -31.59 (Tabla S.6.). Al analizar su composición de aminoácidos se observa un porcentaje elevado de aminoácidos cargados e hidrofóbicos (35.82% y 34.65% del total, respectivamente). El aminoácido predominante es el glutámico, con un 16.08% del total.

Cuando se estudia el perfil hidropático obtenido según el algoritmo de Kyte y Doolittle (Figura R.23B.), se observa una predominancia de zonas hidrofílicas en toda la proteína. El dominio rico en glutámico es mayoritariamente hidrofílico (entre los aa 80 y 350). El dominio CRAL-TRIO está constituido, fundamentalmente, por zonas hidrofóbicas (entre los aa 350 y 390). En el resto del dominio SEC14 se aprecia una zona claramente hidrofílica, característica de este tipo de proteínas (entre los aa 400 y 600). En la zona del extremo C-terminal se observa una porción claramente hidrofílica, que se corresponde con el dominio GOLD (entre los aa 580 y 680).



Figura R.23.- (A) Diagrama esquemático de AtPATL2 mostrando los extremos amino (N) y carboxilo (C), el dominio rico en ácido glutámico (GLU-RICH), que contiene un dominio *coiled-coil* y varios motivos PXXP, el dominio SEC14 que contiene un dominio CRAL-TRIO y el dominio GOLD. (B) Perfil hidropático correspondiente a la secuencia de aminoácidos del clon AtPATL2.

La Figura R.23A. muestra un diagrama esquemático de la proteína AtPATL2 con sus dominios característicos. La región amino-terminal es una zona variable en longitud y composición. En todas las proteínas de la familia, exceptuando la AtPATL6, esta zona constituye un dominio muy ácido, con un porcentaje elevado de aminoácidos cargados, especialmente glutámico. Dentro de esta región, presenta un dominio *coiled-coil* y varios motivos PXXP, que permiten la unión con otras proteínas. El dominio característico de estas proteínas es el dominio SEC14, que está muy conservado. Este contiene un dominio CRAL-TRIO, que consiste en una zona hidrofóbica de unión a fosfolípidos. En el extremo carboxilo presenta una región rica en lisina, muy conservada

en todas las PATLs, que constituye el dominio GOLD. Éste está involucrado en las funciones del aparato de Golgi y el tráfico de lípidos.

4.7.2.- Estudio de la expresión del gen *AtPATL2*.

Una vez caracterizada la proteína AtPATL2, se procedió al estudio de la expresión del gen correspondiente en plántulas de 7 días crecidas en presencia de SNP 100 μ M y 1 mM, y cPTIO 100 μ M, durante 3h. Se utilizó agua como control. Para ello los RNAs de las plántulas tratadas se analizaron mediante Northern blot. Se observó una mayor expresión del transcrito en plántulas tratadas con cPTIO, siendo prácticamente inapreciable en el control y en los tratamientos con SNP (Figura R.24.). Estos resultados nos indican que este gen está reprimido por NO.

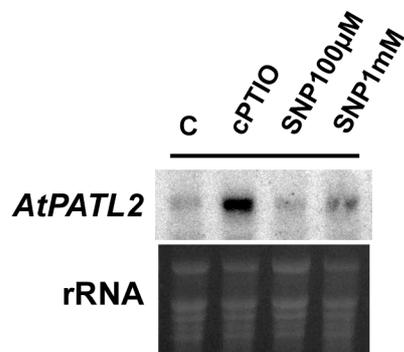


Figura R.24.- Análisis por Northern Blot de los RNAs aislados de plantas de 7 días control y tratadas con SNP 100 μ M y 1 mM y cPTIO 100 μ M, durante 3 h.

4.7.3.- Obtención de líneas mutantes de pérdida y ganancia de función en el gen *AtPATL2*.

Mediante RT-PCR, se comprobó que el mutante *nor1* no era un mutante con pérdida de función (Figura R.25A.). Por ello, se utilizó el mutante del SALK 086866, que es un mutante de inserción de T-DNA en el que el gen *PATL2* no es funcional debido a la interrupción de su secuencia por la inserción (Figura R.21.), como línea mutante de pérdida de función. Se seleccionaron diferentes aislados homocigotos mediante PCR y se comprobó mediante RT-PCR la ausencia completa de transcrito (*s086866.6*, *s086866.8* y *s086866.11*) (Figura R.25B.).

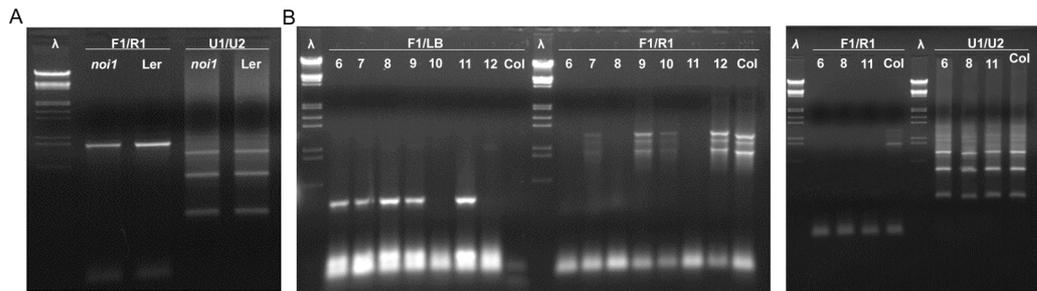


Figura R.25.- Identificación del mutante de pérdida de función. **(A)** RT-PCR del mutante *noi1*. **(B)** RT-PCR del mutante SALK 086866. F1: oligonucleótido sentido correspondiente al gen *AtPATL2*; LB: oligonucleótido *Left Border* correspondiente a la inserción de T-DNA; R1: oligonucleótido antisentido correspondiente al gen *AtPATL2*; U1/U2: oligonucleótidos sentido y antisentido correspondientes al gen de la Ubiquitina (Tabla M.6.).

Asimismo, se generaron líneas transgénicas que sobreexpresan *AtPATL2* utilizando el promotor de expresión constitutivo *35S*, de acuerdo a la metodología presentada en el apartado 10 de Materiales y Técnicas. Las semillas transformadas se seleccionaron por su resistencia al antibiótico kanamicina, conferida por el gen *NPTII* presente en el T-DNA de la construcción en el plásmido pBI121. Las semillas no transformadas germinaron en presencia del antibiótico, pero no consiguieron desarrollar cotiledones verdes. Estas semillas presentan un retraso en el crecimiento tanto de la raíz como de la parte aérea, no llegando a desarrollar hojas primarias. Sin embargo, las semillas resistentes a kanamicina germinaron en presencia del antibiótico y se mantuvieron verdes, mostrando un crecimiento normal. Las semillas seleccionadas como resistentes en la T1, muestran segregación de la resistencia a kanamicina en la progenie. Para determinar el tipo de segregación de la resistencia al antibiótico de cada línea se calculó el valor estadístico χ^2 (Parker, 1989), utilizando el número de plantas resistentes frente a sensibles (Tabla R.2.). El límite para aceptar o rechazar una hipótesis se fija en la probabilidad del 5%, equivalente a un valor de χ^2 3.841, para un grado de libertad. Para valores de χ^2 menores o iguales a 3.841, la desviación entre los datos observados y los esperados según la hipótesis, no es significativa y aceptamos la hipótesis nula.

Tabla R.2.- Segregación de la resistencia a kanamicina de las líneas transgénicas en la generación T2. K^R: número de semillas resistentes a kanamicina; K^S: número de semillas sensibles a kanamicina. Las líneas sombreadas en verde fueron las seleccionadas para realizar los diferentes ensayos fenotípicos.

Línea	K ^R	K ^S	Valor χ^2 para cada cociente		
			3R:1S	15R:1S	63R:1S
			(1 inserto)	(2 insertos)	(3 insertos)
<i>35S:AtPATL2 1</i>	81	21	0.837	33.383	227.840
<i>35S:AtPATL2 2</i>	76	28	0.115	72.369	418.549
<i>35S:AtPATL2 3</i>	90	25	0.490	44.480	291.402
<i>35S:AtPATL2 9</i>	128	13	17.894	1.646	48.889
<i>35S:AtPATL2 10</i>	84	29	0.003	69.409	411.226
<i>35S:AtPATL2 11</i>	42	30	9.796	148.148	727.040
<i>35S:AtPATL2 15</i>	94	5	19.963	0.081	5.727
<i>35S:AtPATL2 16</i>	118	8	22.391	0.019	15.787
<i>35S:AtPATL2 17</i>	81	21	0.837	33.383	227.840
<i>35S:AtPATL2 19</i>	59	21	0.017	51.253	301.155
<i>35S:AtPATL2 25</i>	73	23	0.014	48.400	298.666
<i>35S:AtPATL2 27</i>	78	20	0.870	31.154	214.205
<i>35S:AtPATL2 28</i>	116	27	2.538	36.812	267.711
<i>35S:AtPATL2 30</i>	89	21	1.745	28.802	208.485
<i>35S:AtPATL2 33</i>	56	15	0.380	24.339	164.196
<i>35S:AtPATL2 38</i>	74	16	2.133	18.492	143.493

Una vez seleccionadas las líneas transgénicas homocigotas para dicho gen en la generación T3, se procedió al estudio de la expresión del transgén, para lo cual se aisló RNA de plántulas transgénicas de 10 días, así como de plántulas del ecotipo silvestre Col-0, utilizadas como control, y se analizó mediante la técnica de qRT-PCR (apartado 5.10.3. de Materiales y Técnicas). Como se puede apreciar en la Figura R.26., las tres líneas seleccionadas muestran niveles de expresión altos del transgén AtPATL2, mientras

que en plántulas control la expresión es menor. Las líneas *35S:AtPATL2 2.1* (1 inserción) y *35S:AtPATL2 16.12* (2 inserciones), presentan mayor expresión del transgén que la línea *35S:AtPATL2 10.1* (1 inserción).

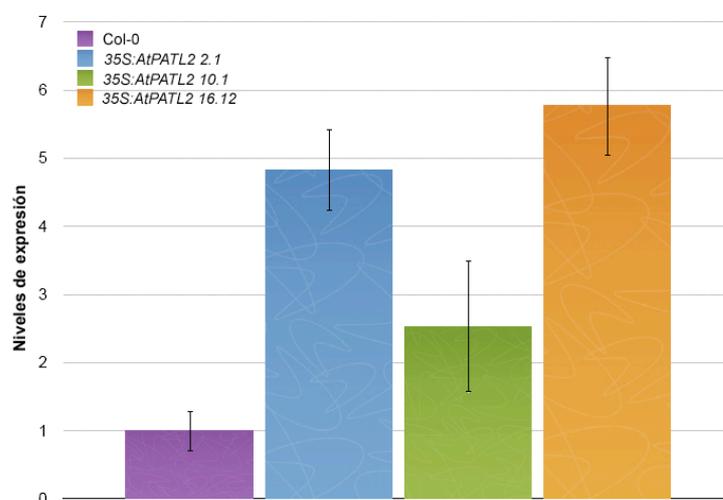


Figura R.26.- Caracterización de las líneas transgénicas generadas. Análisis de la expresión del gen *AtPATL2* en las líneas transgénicas mediante qRT-PCR.

4.7.4.- Análisis fenotípico de las líneas mutantes de pérdida y ganancia de función en el gen *AtPATL2*.

Como se ha señalado anteriormente en la caracterización del mutante *nor1*, este gen presenta un patrón de expresión específico en la raíz (Figura R.20.). Debido a la posible implicación del NO en la organogénesis de la raíz, se crecieron semillas de las líneas mutantes *s086866.6*, *s086866.8* y *s086866.11* y del tipo silvestre Col-0 en condiciones control y en presencia de SNP y cPTIO. La longitud de la raíz se representa en la Figura R.27., donde se aprecia una menor longitud de la raíz en los mutantes en condiciones control y cPTIO, con respecto al ecotipo silvestre Col-0. Sin embargo, no se observan diferencias significativas en el crecimiento de la raíz en presencia del donador de NO.

Para llevar a cabo un análisis funcional de las líneas sobreproductoras generadas se realizó una caracterización fenotípica en condiciones control, en presencia de cPTIO 1 mM y SNP 100 μ M. Los resultados se muestran en la Figura R.27., donde se aprecia que

en condiciones control la línea *35S:AtPATL2 2.1* presenta una raíz más corta que el ecotipo silvestre. Sin embargo, los tratamientos en presencia de SNP y cPTIO no muestran diferencias significativas.

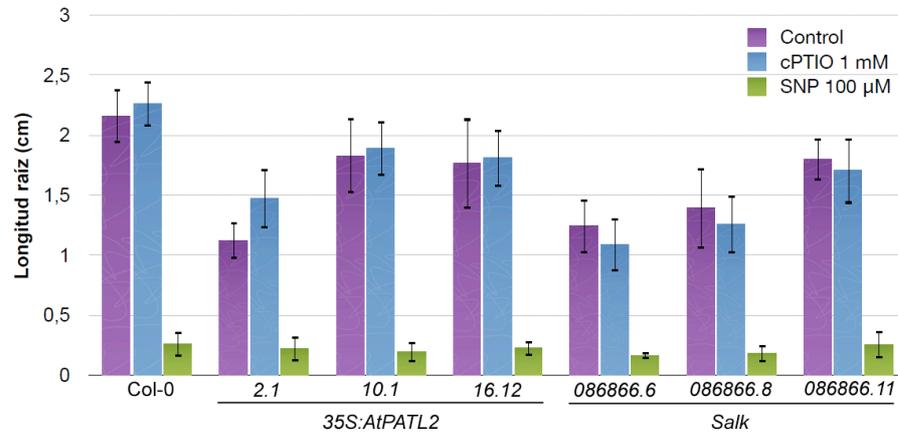


Figura R.27.- Análisis fenotípico de la respuesta a NO en el crecimiento de la raíz en plántulas del ecotipo silvestre Col-0, las líneas transgénicas *35S:PATL2 2.1*, *35S:PATL2 10.1* y *35S:PATL2 16.12*, y el mutante de inserción de T-DNA SALK *086866*, en el cual el gen *AtPATL2* está interrumpido. Las plántulas fueron crecidas durante 3 días y tratadas con SNP 100 µM y cPTIO 1 mM durante 5 días.

Del mismo modo, se comprobó si la disminución observada en el crecimiento de la raíz primaria conlleva un cambio en el número de células o tamaño de éstas. Para ello, se midieron y compararon el número y tamaño de las células del córtex, tomando como punto de partida la primera célula después del centro quiescente hasta llegar a la zona de elongación y diferenciación de la raíz. Se incluyeron plantas control, el mutante de pérdida de función SALK *086866.6* y la línea sobreexpresora *35S:AtPATL2 2.1*. Los resultados obtenidos no mostraron ningún retraso o adelanto significativo en el comienzo de la zona de elongación. Sin embargo, conviene destacar que la sobreproducción del gen *AtPATL2* parece producir divisiones asimétricas en el córtex a partir de los 7 días (Figura R.28.). Estas divisiones no están presentes ni en el control, ni en el mutante de pérdida de función en este estadio del desarrollo de la plántula y son anunciadoras del comienzo del *middle-cortex*.

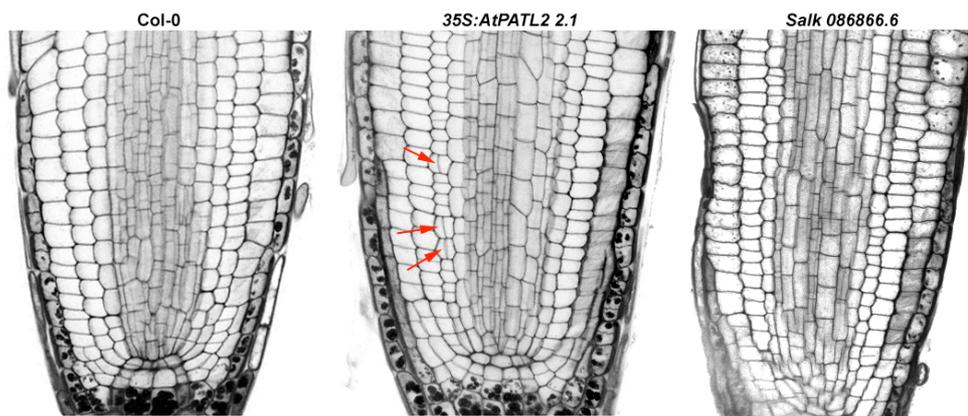


Figura R.28.- Estudio fenotípico a nivel microscópico de la pérdida y ganancia de función del gen *AtPATL2*. Imágenes del meristemo de la raíz, tomadas al microscopio confocal, de plántulas crecidas durante 7 días del ecotipo silvestre Col-0, la línea transgénica *35S:AtPATL2 2.1* y el mutante de pérdida de función *Salk 086866.6*. Las flechas rojas indican las divisiones asimétricas en el córtex de la línea sobreproductora.

5.- ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO Y METABÓLICO DE LAS RESPUESTAS A ÓXIDO NÍTRICO.

5.1.- Análisis transcriptómico en plántulas.

Basándonos en los resultados obtenidos hasta el momento y con el fin de determinar la implicación del NO en el desarrollo de la raíz e identificar los genes que se ven afectados y que pueden ser regulados diferencialmente por este factor en este proceso, se realizó un análisis transcriptómico de plántulas de *Arabidopsis* sometidas a tratamientos con SNP, cPTIO y agua (control). Los resultados obtenidos en este análisis se muestran en la Figura R.29. y Tabla R.3. Se realizaron tres réplicas biológicas independientes que fueron analizadas utilizando dos criterios independientes, para seleccionar aquellos genes que presentaban una expresión diferencial estadísticamente significativa ($p\text{-value} < 0.05$ y un $\log_2 \text{ratio} > 1$ o < -1). En el cluster jerárquico se pueden observar todos aquellos genes que se expresan de forma diferencial en al menos 3 de las comparaciones (Figura R.29.).

Utilizando el software MapMan (Thimm et al., 2004; Usadle et al., 2005), se han detectado una serie de genes involucrados en el metabolismo, cuyos niveles de expresión se ven aumentados en los tratamientos con SNP con respecto a cPTIO. Dentro de estos podemos destacar aquellos genes relacionados con el metabolismo de fenilpropanoides, y relacionados con la plasticidad de la pared celular, entre otros (Figura R.29A.).

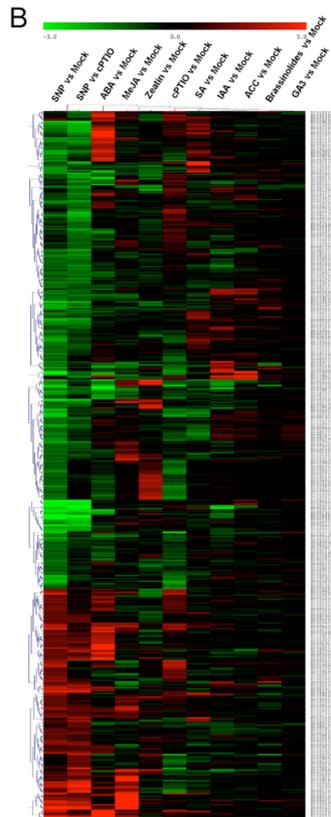
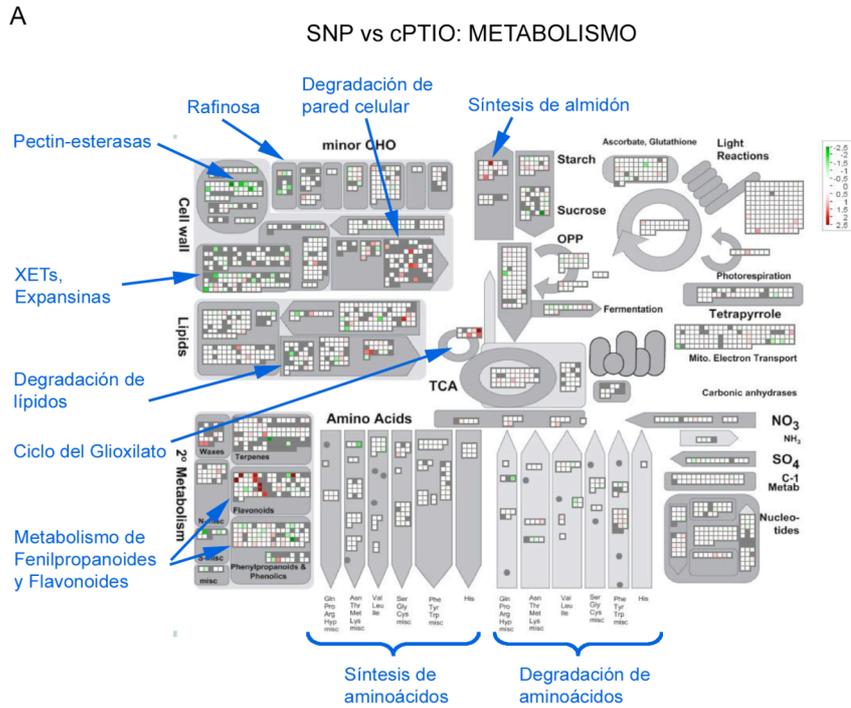


Figura R.29.- Análisis transcriptómico de las respuestas a NO. **(A)** Esquema representativo de la expresión de genes involucrados en el metabolismo, comparando los niveles de expresión en plántulas tratadas con SNP y aquellas tratadas con cPTIO. Los resultados se han analizado utilizando el software MapMan (Thimm et al., 2004; Usadle et al., 2005). Se representan en gris aquellos genes que están ausentes, en blanco se representan aquellos genes que no cambian, en gama de rojos se representan los genes que están inducidos y en gama de verdes los reprimidos. **(B)** Cluster jerárquico de los 507 genes expresados de forma diferencial en SNP vs control y SNP vs cPTIO (≥ 2 para inducidos y ≤ -2 para reprimidos). Los resultados se analizaron conjuntamente con los datos de expresión correspondientes a tratamientos hormonales disponibles en la base de datos AtGenExpress (ABA: ácido abscísico, MeJA: jasmonatos, Zetina: citoquininas, SA: ácido salicílico, ACC: precursor etileno, IAA: auxinas, BRs: brasinoesteroides, GA₃: giberelinas). Los diferentes genes (filas) y experimentos (columnas) fueron agrupados utilizando la aplicación The Institute for Genomic Research (TIGR) Multi-experiment Viewer (versión 4.4) utilizando la distancia Euclídea y completando el vínculo.

Con el fin de obtener mayor información a partir de los datos obtenidos en el análisis transcritoómico, se realizó un meta-análisis agrupando los resultados obtenidos en nuestro microarray con los datos de tratamientos hormonales disponibles en la base de datos AtGenExpress (<http://arabidopsis.org/portals/expression/microarray/ATGenExpress.jsp>) (Figura R.29B.). En el cluster se observó la posible interacción del NO con otras hormonas vegetales como el ABA o el MeJA.

Table R.3.- Genes inducidos en respuesta al tratamiento con SNP y que a su vez aparecen reprimidos en mayor o menor medida en el tratamiento con cPTIO. Entre ellos, se encuentran genes relacionados con la biosíntesis y metabolismo de flavonoles y antocianinas (sombreados en verde).

<i>AGI code</i>	M SNPvsC	M cPTIOvsC	M SNPvsCPTIO	Descripción
At5g42800	1.70	-2.29	3.99	Dihydroflavonol 4-reductase (DFR, TT3).
At1g03495	2.21	-1.28	3.49	Anthocyanin 5-aromatic acyltransferase.
At4g14090	2.41	-0.96	3.37	Anthocyanin 5-O-glucosyltransferase.
At4g22870	1.30	-2.01	3.31	Anthocyanidin synthase.
At5g56080	1.96	-0.88	2.83	Nicotinamine synthase.
At5g54060	1.99	-0.81	2.81	Flavonol 3-O-glucosyltransferase.
At5g17220	1.03	-1.77	2.80	Glutathione S-transferase (AtGSTF12).
At2g43530	1.09	-1.40	2.49	Putative trypsin inhibitor.
At4g39210	1.43	-1.03	2.46	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase (APL3).
At2g01890	2.36	-0.06	2.42	Putative purple acid phosphatase.
At1g56650	2.23	-0.15	2.38	Anthocyanin2 (MYB75, PAP1).
At2g23000	1.43	-0.95	2.36	Putative serine carboxypeptidase I.
At1g80130	2.17	-0.10	2.27	Unknown protein.
At5g45950	1.12	-1.13	2.25	GDSL-motif lipase/hydrolase.
At3g10450	1.91	-0.29	2.19	Putative glucose acyltransferase.
At1g75900	1.13	-0.87	2.00	Anter-specific proline-rich protein (EXL3).
At5g22500	1.33	-0.59	1.93	Acyl CoA reductase.
At2g02990	1.50	-0.34	1.84	Ribonuclease 1 (RNS1).

At1g64970	1.29	-0.53	1.82	Gamma-tocopherol methyltransferase (G-TMT).
At1g03310	1.12	-0.69	1.80	Putative isoamylase.
At3g06860	1.53	-0.17	1.69	Fatty acid multifunctional protein (MFP2).
At1g14700	1.55	-0.06	1.61	Purple acid phosphatase.
At1g19670	1.31	-0.29	1.60	Coronatine-induced protein 1 (CORI1).
At3g48350	1.29	-0.29	1.58	Cysteine proteinase.
At3g52180	1.18	-0.37	1.55	Protein tyrosine phosphatase (PTPKIS1).
At4g23680	1.30	-0.23	1.53	Putative major latex protein (MLP).
At2g39030	1.43	-0.09	1.52	GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT).
At1g28570	1.15	-0.37	1.52	GDSSL-motif lipase.
At3g15720	1.19	-0.31	1.50	Putative polygalacturonase.
At5g02940	1.01	-0.48	1.49	Putative protein.
At3g16360	1.01	-0.41	1.42	Two-component phosphorelay mediator (AHP4).
At1g67750	1.32	-0.05	1.37	Pectate lyase.
At1g02940	1.07	-0.29	1.36	Glutathione S-transferase (AtGSTF5).
At4g30960	1.18	-0.09	1.27	CBL-interacting protein kinase 6 (CIPK6).
At2g22420	1.16	-0.11	1.27	Peroxidase 17 (PER17).
At1g68560	1.17	-0.08	1.25	Alpha-xylosidase (XYL1).
At3g56080	1.14	-0.09	1.23	Dehydration-responsive protein (ERD3).
At3g16370	1.08	-0.12	1.20	Anter-specific proline-rich protein.

Asimismo, conviene destacar entre los genes diferencialmente regulados por NO, la presencia de genes que codifican enzimas modificadoras de pared celular (CWRs). En las Tablas R.4. y R.5. se representan genes inducidos y reprimidos en presencia de SNP y que están involucrados en la regulación de procesos relacionados con la expansión celular. Estos genes presentan un patrón de expresión específico en la zona de elongación de la raíz (Figura S.1.).

Table R.4.- Genes que codifican CWRs y se inducen en respuesta al tratamiento con SNP.

AGI code	M SNPvsC	M cPTIOvsC	M SNPvscPTIO	Descripción
At1g52400	3.04	0.44	2.59	Glycosyl hydrolase 1/beta-glucosidase (BGL1).
At5g06870	2.71	0.56	2.15	Polygalacturonase inhibiting protein 2 (PGIP2).
At3g18080	1.88	0.07	1.81	Glycosyl hydrolase 1, 6-phospho-beta-galactosidase.
At2g43660	1.80	-0.09	1.90	Glycosyl hydrolase 17, glucan endo-1,3-beta-glucosidase.
At4g30290	1.65	0.08	1.56	Xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase (XTH19).
At1g67750	1.32	-0.05	1.37	Pectate lyase.
At1g26770	1.30	0.76	0.54	Expansin (EXP10).
At1g78060	1.28	0.23	1.05	Glycosyl hydrolase 3, Xylosidase.
At3g15720	1.19	-0.31	1.50	Polygalacturonase.
At1g68560	1.17	-0.08	1.25	Alpha-xylosidase (XYL1).
At1g01900	1.16	0.59	0.57	Subtilisin-like serine protease (SBT1.1).
At2g20750	1.14	0.36	0.77	Beta-expansin (EXPB1).
At2g05790	1.06	0.59	0.47	Glycosyl hydrolase 17, beta-1,3-glucanase.

Table R.5.- Genes que codifican CWRs y se reprimen en respuesta al tratamiento con SNP.

AGI code	M SNPvsC	M cPTIOvsC	M SNPvscPTIO	Descripción
At4g16260	-3.20	-0.35	2.85	Glycosyl hydrolase 17, glucan endo-1,3-beta-glucosidase.
At1g47600	-2.85	-0.41	2.44	Glycosyl hydrolase 1, 6-phospho-beta-galactosidase.
At1g65310	-2.03	-0.38	1.65	Xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase (XTH17).
At5g59090	-1.66	0.85	2.51	Subtilisin-like serine protease (SBT4.12).
At4g19810	-1.48	-0.77	0.71	Glycosyl hydrolase 18, chitinase.
At1g32940	-1.43	-0.13	1.30	Subtilisin-like serine protease (SBT3.5).
At4g25820	-1.43	-0.83	0.60	Xyloglucan:xyloglucosyl transferase (XTR9).
At4g14130	-1.39	0.62	2.00	Xyloglucan:xyloglucosyl transferase (XTR7).
At1g62980	-1.28	-0.79	0.49	Expansin (EXP18).

Con los datos obtenidos en el análisis transcriptómico se realizó un análisis de ontología génica utilizando la aplicación FatiGO (<http://fatego.bioinfo.cipf.es/>) y la aplicación Bio-Array Resource for Arabidopsis (BAR, <http://www.bar.utoronto.ca>) (Toufighi et al., 2005). Este análisis reveló la existencia de genes coregulados por ABA y Me-JA entre los genes que aparecen inducidos por NO en el microarray. Aproximadamente el 25% del total de los genes inducidos después del tratamiento con SNP están inducidos por ABA. Entre ellos se pueden destacar *ABI1* (*ABSCISIC ACID INSENSITIVE 1*) y otros genes relacionados con el estrés, como *RD20* (*RESPONSIVE TO DESSICATION 20*), *RD22* (*RESPONSIVE TO DESSICATION 22*), *ERD3* (*EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 3*) y *P5CS2* (*DELTA 1-PYRROLINE-5-CARBOXYLASE SYNTHASE 2*). De la misma forma, encontramos que un 20% de los genes están coregulados por SNP y MeJA, incluidos *JRI* (*JASMONATE RESPONSIVE 1*), *VSP1* (*VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 1*), varios *MBPI* (*MYROSINASE-BINDING PROTEIN*), *COR11* (*CORONATINE-INDUCED PROTEIN 1*), *COR13* (*CORONATINE-INDUCED PROTEIN 3*), genes relacionados con la biosíntesis del JA (*LOX2* (*LIPOXYGENASE 2*), y *AOCl* (*ALLEN OXIDE CYCLASE 1*), y genes involucrados en la biosíntesis de flavonoides (Figura R.30.).

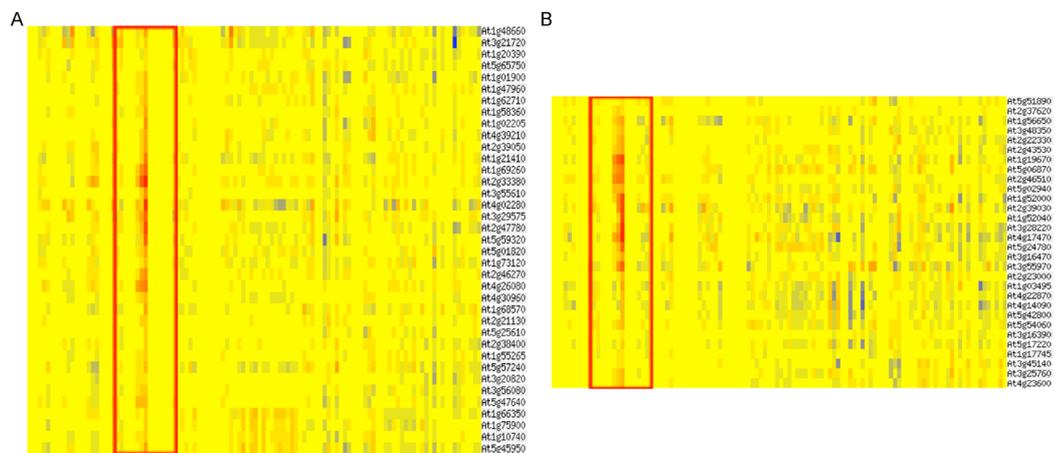


Figura R.30.- Análisis *in silico* utilizando la aplicación BAR (<http://www.bar.utoronto.ca>). (A) Corregulación de genes inducidos por NO y ABA (25%). (B) Corregulación de genes inducidos por NO y MeJA (20%).

También hay que destacar la presencia de genes que aparecen reprimidos por SNP (252) (Tabla S.2.). Dentro de estos se pueden encontrar genes de respuesta a auxinas como *IAA28* (*INDOL-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 2β*), regulador negativo de la formación de raíces secundarias en respuesta a auxinas, genes *SAUR* (*SMALL AUXIN UPREGULATED*) (At4g31320 y At5g20820), *YUCCA5* involucrado en la síntesis de auxinas, y *GH3* (At1g48690).

5.2.- Acumulación de flavonoides en plántulas tratadas con óxido nítrico.

El análisis transcriptómico revela que el NO induce la expresión de genes involucrados en la ruta de síntesis de flavonoles y antocianinas (sombreados en verde en la Tabla R.3. y en azul en la Figura R.31A.), entre ellos: *DFR* (dihidroflavonolreductasa), *ANS* (antocianín sintasa), *UFGT* (flavonol-3-O-glicosiltransferasa), *AAC* (antocianín 5-aromático aciltransferasa), *GSTF12* (proteína similar a glutatión S-transferasa) y UDP-glucosa (antocianín 5-O-glucosiltransferasa). Además, el NO induce la expresión de *PAP1/MYB75* (factor de transcripción de tipo MYB), que codifica un factor de transcripción que regula la ruta de síntesis de flavonoides. Para confirmar y validar los datos obtenidos en el análisis transcriptómico, se analizó la expresión de genes clave en la biosíntesis de flavonoles y antocianinas mediante qRT-PCR. Los datos obtenidos se reflejan en la Figura R.31B., donde se observa cómo los niveles de expresión de estos genes aumentan cuando las plántulas son sometidas a tratamientos con SNP 100 μ M, comparado con el tratamiento con el secuestrador de NO, cPTIO 1mM.

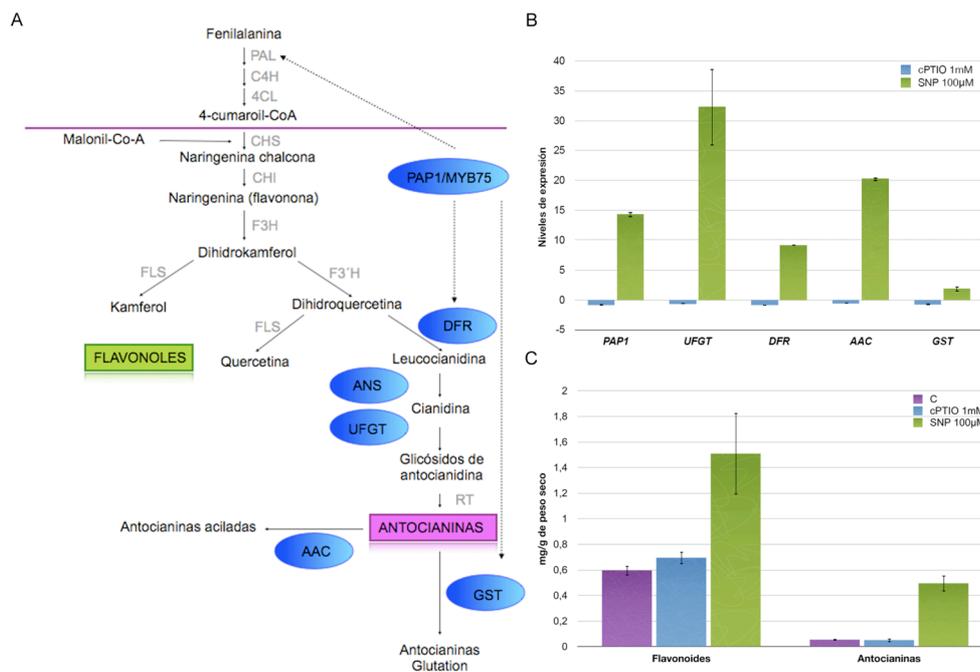


Figura R.31.- (A) Ruta de biosíntesis de flavonoles y antocianinas. En azul se destacan aquellos genes inducidos por NO. **(B)** Análisis de la expresión de genes regulados por NO en plántulas del ecotipo silvestre Col-0 mediante qRT-PCR. Se utilizaron plántulas control y plántulas tratadas durante 5 días con SNP 100µM y cPTIO 1mM. Los genes utilizados fueron: *PAP1* (At1g56650), *UFGT* (At5g54060), *DFR* (At5g42800), *ACC* (At1g03495), *GST* (At5g17220), tomando como control endógeno el gen de la *ACT3*. **(C)** Cuantificación de flavonoles y antocianinas mediante HPLC/MS.

A continuación, nos planteamos si el aumento en los niveles de expresión de genes implicados en la biosíntesis de flavonoles y antocianinas se traducía en una mayor acumulación de estos compuestos en las plántulas sometidas a tratamientos con el donador de NO. Para comprobar esta hipótesis, se monitorizó la acumulación de flavonoles mediante la tinción con DPBA. Este compuesto no sólo es capaz de detectar flavonoles, sino que permite diferenciar entre kamferol y quercetina dependiendo del color de la fluorescencia que emite el compuesto (amarillo-verdoso para el kamferol y dorado para la quercetina) (Peer et al., 2001). Como se muestra en la Figura R.32., en las plántulas control se detecta fluorescencia en la parte más baja de la raíz primaria, en los primordios de las raíces laterales que se forman a lo largo de la raíz y en la zona de unión de la raíz y el hipocotilo. En las plántulas tratadas con cPTIO, sólo se observa fluorescencia en la zona más baja de la raíz. Y, por último, en las plántulas sometidas a

tratamientos con SNP se detecta una mayor fluorescencia en el ápice de la raíz y en los primordios de las raíces laterales.

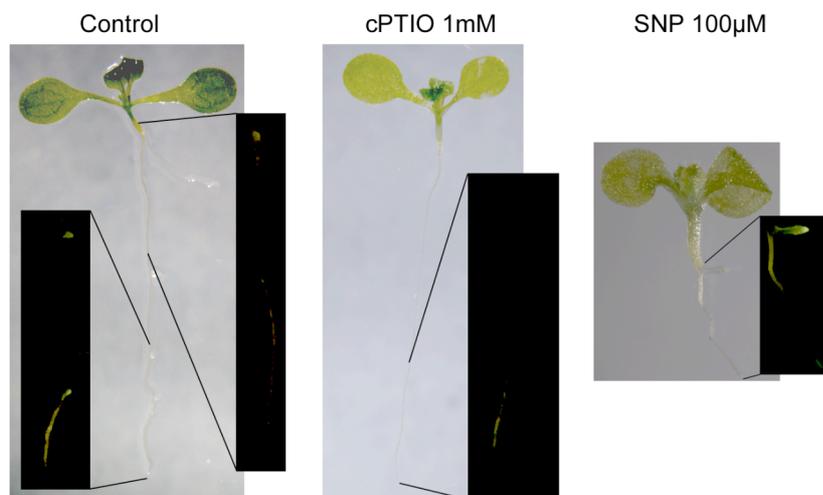


Figura R.32.- Detección de flavonoles (quercetina y kamferol), utilizando la tinción DPBA, en plántulas de *Arabidopsis* ecotipo Col-0 crecidas durante 3 días en medio MS y tratadas durante 5 días con SNP 100 μ M y cPTIO 1 mM.

Para confirmar estos resultados se realizó una cuantificación metabólica de los flavonoles y antocianinas mediante HPLC/MS en presencia de SNP 100 μ M, cPTIO 1mM y utilizando agua como control. De esta forma se observó que la cantidad de flavonoles totales en plántulas tratadas con SNP era el doble comparado con plántulas tratadas con cPTIO y el control en agua. Del mismo modo, se cuantificaron las antocianinas, observándose una gran diferencia entre los dos tratamientos, siendo 10 veces mayor la cantidad de antocianinas en SNP, como queda reflejado en la Figura R.31C. En las Tablas R.6. y R.7. se representan los diferentes compuestos detectados mediante HPLC/MS y su concentración expresada en mg/g de peso seco.

Tabla R.6.- Cuantificación de flavonoles mediante HPLC. Los datos representan la media de 3 experimentos diferentes con resultados similares. La concentración está expresada en mg/g de peso seco.

Compuesto	SNP	%	cPTIO	%	Control	%
Quercetin dirhamnosyl glucoside	0.083±0.002	5.5	0.038±0.000	5.2	0.023±0.002	3.2
Quercetin 3-O-glucoside7-O-glucoside	0.266±0.035	17.6	0.113±0.006	15.6	0.111±0.066	15.3
Kaempferol 3-O-rhamnosyl 7-O-glucoside	0.425±0.036	28.2	0.222±0.050	30.6	0.191±0.085	26.4
Quercetin 3-O-rhamnosyl 7-O-rhamnoside	0.193±0.024	12.8	0.072±0.004	9.9	0.063±0.002	8.7
Isorhamnetin 3-O-rhamnosyl 7-Oglucoside	0.049±0.017	3.3	0.038±0.001	5.2	0.033±0.011	4.5
Kaempferol 3-O-rhamnoside-7-Orhamnoside	0.352±0.025	23.3	0.163±0.042	22.5	0.137±0.054	18.9
Quercetin rhamnoside	0.072±0.008	4.8	0.042±0.003	5.8	0.018±0.004	2.5
Kaempferol rhamnoside	0.069±0.011	4.6	0.037±0.003	5.1	0.020±0.005	2.8
Total	1.509± 0.319		0.724±0.050		0.596±0.039	

Table R.7.- Cuantificación de antocianinas mediante HPLC. Los datos representan la media de 3 experimentos diferentes con resultados similares. La concentración está expresada en mg/g de peso seco. NQ: no cuantificable, t: trazas.

Compuesto	SNP	%	cPTIO	%	Control	%
Unknown cyanidin derivative 1	0.011±0.003	2.3	t	t	t	t
Cyanidin 3-O-[2-O-(sinapoyl)-β-xylopyranolsyl]-6-O-(4-O-(β-glucopyranosyl)-p-coumaroyl)-β-glucopyranoside]-5-O[6-O-(malonyl) β-glucopyranoside] Isomer 1	0.058±0.008	11.8	0.006±0.001	12.8	0.006±0.000	10.7
Unknown cyanidin derivative 2	0.067±0.007	13.5	0.008±0.001	16.1	0.009±0.001	16.0
Cyanidin 3-O-[2-O-(sinapoyl)-β-xylopyranolsyl]-6-O-(4-O-(β-glucopyranosyl)-p-coumaroyl)-β-glucopyranoside]-5-O[6-O-(malonyl) β-glucopyranoside] Isomer 2	0.346±0.047	69.8	0.033±0.013	64.2	0.040±0.001	73.3
Cyanidin 3-O-[2-O-(sinapoyl)-β-xylopyranolsyl]-6-O-(4-O-(β-glucopyranosyl)-p-coumaroyl)-5-O[6-O-(malonyl) β-glucopyranoside]	0.013±0.002	2.6	0.004±0.001	6.9	NQ	NQ
Total	0.495±0.063		0.051±0.015		0.054±0.007	

Dentro de los flavonoles identificados, basándonos en el cromatograma obtenido en el análisis mediante HPLC/MS, destaca la presencia de quercetina, kamferol e isoramnetina, siendo más abundantes kamferol-3-O-ramnosil-7-O-glucosido y kamferol-3-O-ramnosido-7-O-ramnosido (Figura R.33A. y Tabla S.3.).

Por otra parte, se identificaron 5 derivados de las antocianinas (Figura R.33B. y Tabla S.4.), tres de las cuales se identificaron basándonos en los resultados obtenidos en el análisis por HPLC/MS y por comparación con los datos publicados anteriormente por Bloor y Abrahams, (2002). Dos de los picos identificados (picos 2 y 4) presentan la misma masa, pero tienen diferente tiempo de retención, sugiriendo que pudieran ser isómeros en su configuración *cis/trans* del residuo cinamoil.

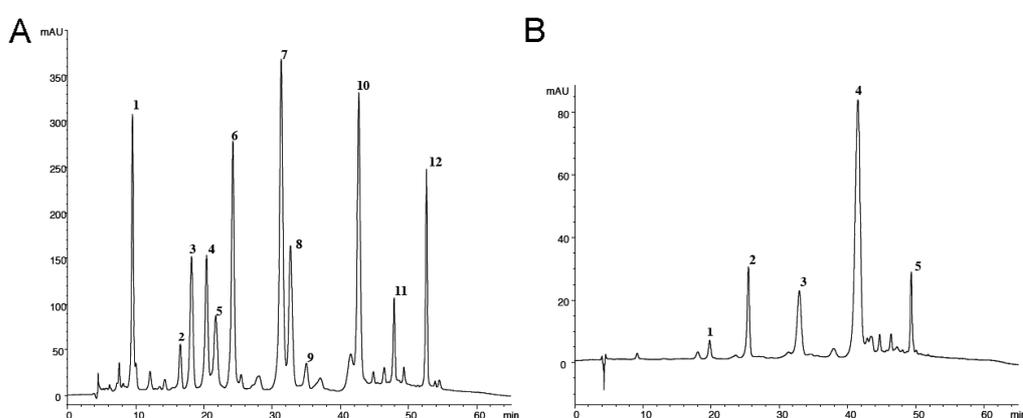


Figura R.33.- Análisis mediante HPLC/MS. **(A)** Cromatograma obtenido del análisis mediante HPLC a 360 nm, en el que se muestran el perfil de los flavonoles identificados en las plántulas de *Arabidopsis* tratadas con SNP. **(B)** Cromatograma obtenido a 520 nm para las antocianinas identificadas en plántulas de *Arabidopsis* tratadas con SNP. La identificación de estos picos queda reflejada en las Tablas Suplementarias 3 y 4, donde se recogen datos de tiempo de retención, espectro de absorción, MS² y MS³.

Se ha descrito que los flavonoles podrían actuar como reguladores del transporte de auxinas (revisado por Peer y Murphy, 2007). Con el fin de comprobar si el NO está inhibiendo el crecimiento de la raíz a través de los flavonoles y su función en el transporte de auxinas, se utilizó un mutante afectado en la acumulación de dichos compuestos, *tt3;tt7* (*transparent testa 3; transparent testa 7*), que acumula un exceso de quercetina y kamferol. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura R.34., donde se observa la hipersensibilidad del doble mutante a la adición exógena de NO.

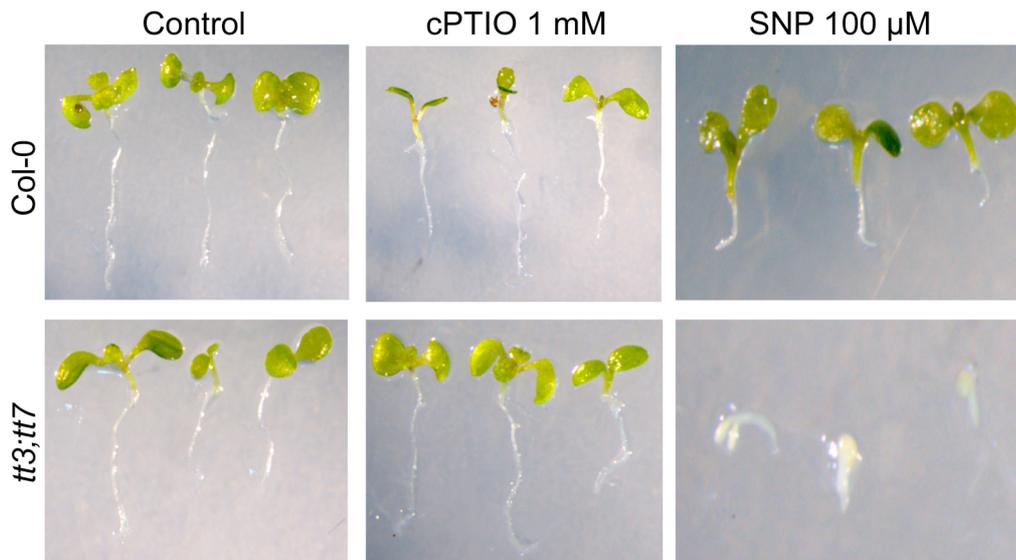


Figura R.34.- Análisis fenotípico de las respuestas a NO en plántulas del mutante afectado en la acumulación de flavonoles (*tt3;tt7*) en presencia de SNP 100 μ M y cPTIO 1 mM.

5.3.- Aislamiento de células de la epidermis de raíz.

Como hemos señalado en el apartado 1, utilizando la tinción DAF-2DA se observa acumulación de NO en las células de la epidermis en el meristemo y las zonas de transición y elongación de la raíz. Del mismo modo, los estudios celulares sugieren un posible papel del NO en los procesos de división y elongación celulares en estos tejidos de la raíz primaria. Con el fin de conocer en profundidad el papel que puede estar ejerciendo el NO endógeno en las zonas donde se produce y acumula, e identificar genes específicos que intervienen en la señalización mediada por el NO en la epidermis de la raíz, se optimizó el aislamiento de células de esta capa en la zona de transición y elongación en plántulas control y tratadas con cPTIO mediante la técnica de microdissección por láser (apartado 15 de Materiales y Técnicas) (Figura R.35A-C.). Para la obtención de aproximadamente 30 μ g de RNA específico de las células de la epidermis fue necesario procesar 174 cortes, de los cuáles se obtuvieron aproximadamente unas 3500 células. Para comprobar si el RNA aislado se corresponde a las células de interés, se analizó mediante RT-PCR la expresión del gen *GLABRA2* (*GL2*), involucrado en la determinación de la identidad celular en la epidermis de la raíz (Figura R.35D y E.) y empleado como marcador de este tipo celular.

Estos resultados preliminares demuestran la posibilidad de aislar específicamente las células donde el NO pueda estar llevando a cabo su función fisiológica.

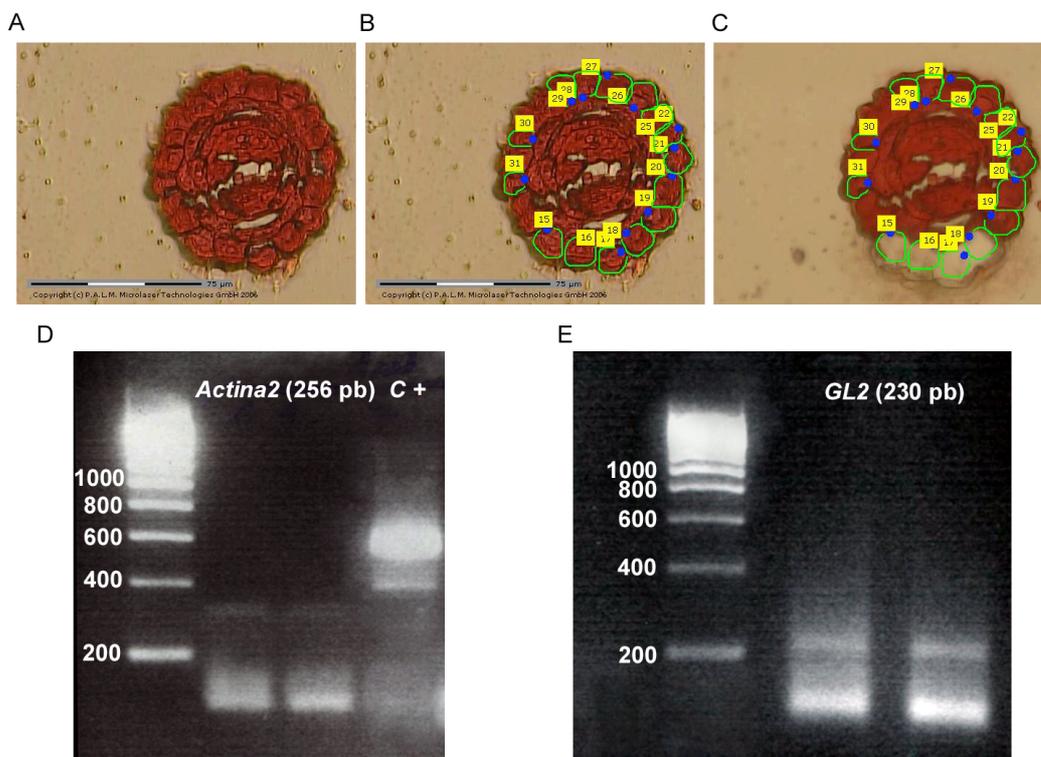


Figura R.35.- Aislamiento de células de la epidermis del meristemo de la raíz mediante microdissección por láser. Plántulas de Col-0 fueron crecidas en vertical en medio MS durante 5 días, tras los cuales se diseccionaron las raíces manualmente y fueron sometidas a un tratamiento de fijación y crioprotección (apartado 15 de Materiales y Técnicas). Posteriormente, fueron imbibidas en medio OTC para la obtención de bloques que fueron seccionados en el criostato y finalmente procesados en el microdisector para el aislamiento de células de la epidermis. **(A)** Corte sin procesar. **(B)** Selección de las células de interés. **(C)** Cortes realizados por el microdisector. **(D)** RT-PCR del gen de la *ACTINA2*, utilizando el control positivo incluido en el kit (C+). **(E)** RT-PCR del gen *GLABRA2* (*GL2*).

6.- PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN EL DESARROLLO DEL HIPOCOTILO.

La etiolación es un proceso del desarrollo temprano que tiene lugar cuando las plántulas son crecidas en oscuridad. Esta respuesta fotomorfogénica ha sido ampliamente estudiada y donde la ausencia de luz produce un mayor desarrollo del hipocotilo claramente visible.

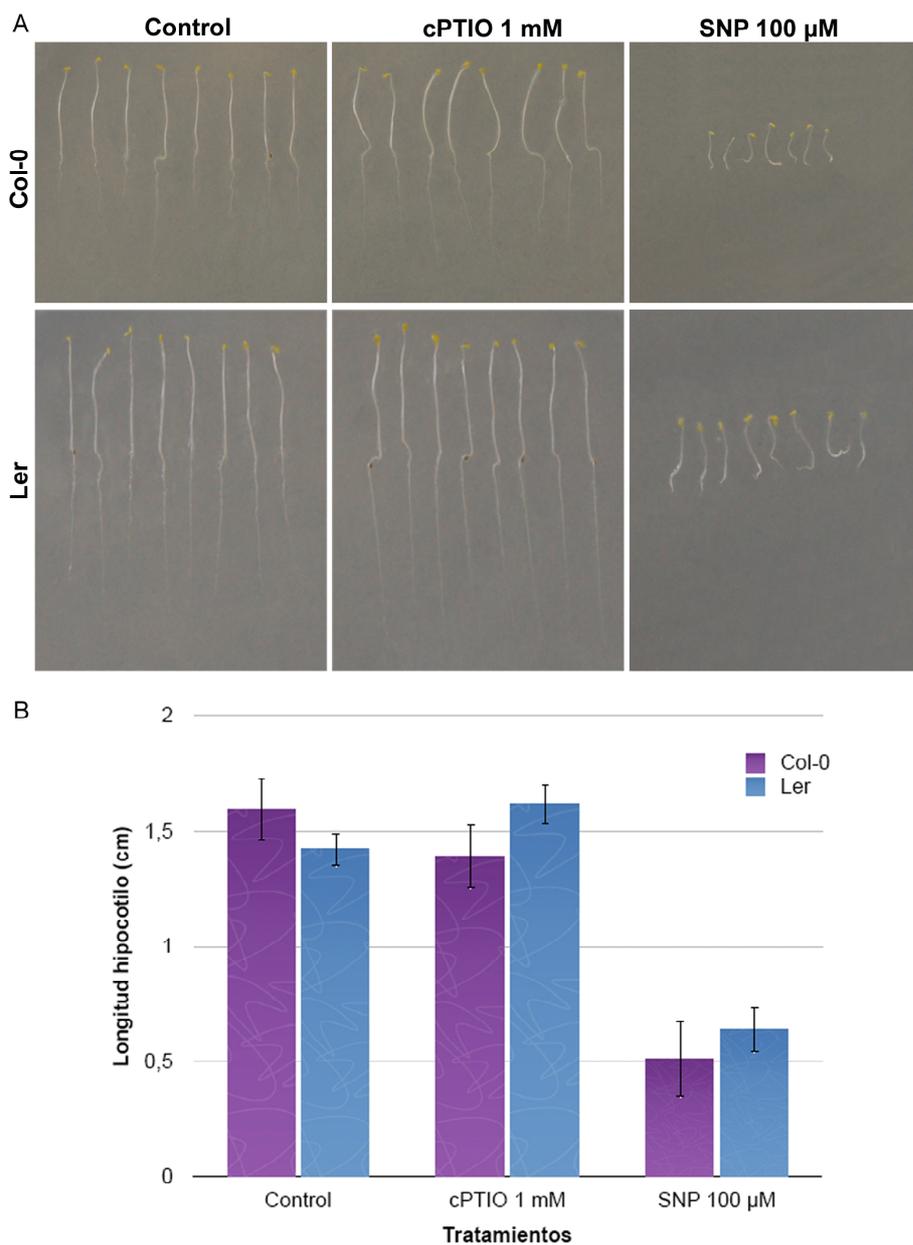


Figura R.36.- Caracterización fenotípica de las respuestas a NO en el desarrollo del hipocotilo. **(A)** Plántulas de los ecotipos Col-0 y Ler crecidas en condiciones de oscuridad, en presencia de SNP 100 μ M y cPTIO 1 mM. **(B)** Longitud del hipocotilo de plántulas Col-0 y Ler crecidas en oscuridad en los distintos tratamientos.

Trabajos previos demuestran que el NO participa en el proceso de desetiología inhibiendo el crecimiento del hipocotilo (Beligni y Lamattina, 2000). En nuestro trabajo nos planteamos determinar las bases moleculares sobre las que actúa el NO en el proceso de desarrollo del hipocotilo. Como se muestra en la Figura R.36., el NO inhibe el crecimiento del hipocotilo en plántulas tratadas con SNP, comparadas con el control y tras el tratamiento con el secuestrador de NO, cPTIO.

6.1.- Caracterización genética del proceso de elongación del hipocotilo.

Para profundizar en el mecanismo de acción del NO en este proceso se realizó en primer lugar un ensayo en condiciones de oscuridad utilizando mutantes deficientes (*atnoa1* y *nia1;nia2*) y sobreproductores de NO (*nox1/cue1*, *argah1.2* y *argah2.1*). En los mutantes *atnoa1* y *nia1;nia2*, que presentan niveles bajos de NO endógeno, se observa un hipocotilo cuya longitud es similar al ecotipo silvestre. Sin embargo, los mutantes con mayor acumulación de NO, *argah1.2* y *argah2.1* (afectados en la enzima arginasa), y *nox1/cue1* (afectados en el gen *NOX1/CUE1*, que codifica un translocador fosfoenolpiruvato/fosfato en el cloroplasto) presentan un hipocotilo más corto que el ecotipo silvestre (Figura R.37A.). Estos mutantes fueron expuestos a diferentes concentraciones de SNP (5 μ M, 10 μ M, 50 μ M y 100 μ M), observándose un fenotipo de hipersensibilidad en aquellos mutantes sobreproductores de NO, que muestran una mayor reducción en el crecimiento del hipocotilo comparado con el ecotipo Col-0 (Figura R.37B.). Esta inhibición es especialmente significativa a concentraciones bajas de NO (5 y 10 μ M) en los mutantes *nox1/cue1*.

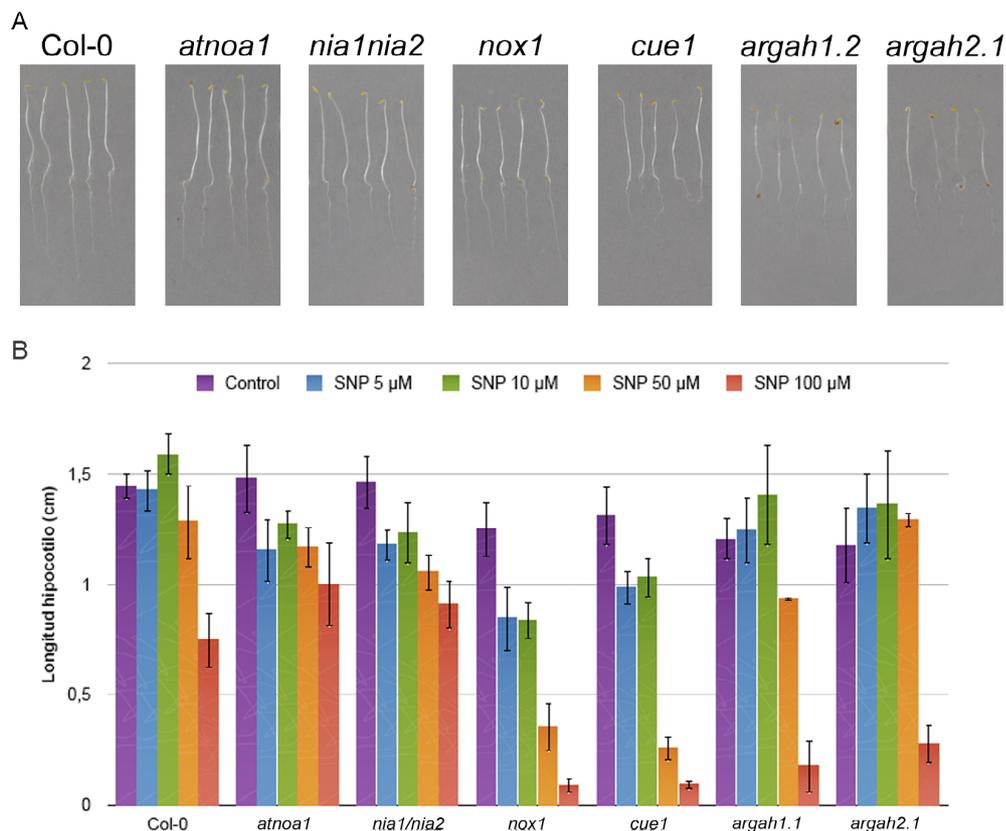


Figura R.37.- (A) Caracterización fenotípica de mutantes afectados en la acumulación de NO (*atnoa1*, *nia1/nia2*, *nox1*, *cue1*, *argah1.1* y *argah2.1*) en condiciones control. **(B)** Medidas de la longitud del hipocotilo del ecotipo silvestre Col-0 y las diferentes líneas afectadas en la acumulación de NO, en condiciones control y en presencia de diferentes concentraciones de SNP (5 μM, 10 μM, 50 μM y 100 μM).

6.2.- Reversión del efecto del óxido nítrico en el hipocotilo mediante la adición de giberelinas.

La elongación del hipocotilo es un proceso del crecimiento altamente regulado durante el ciclo de vida de la planta, en el cual participan diferentes hormonas vegetales. Entre ellas, las giberelinas (GAs) tiene un papel importante en el crecimiento del hipocotilo y las respuestas a la luz (Alabadí et al., 2004; Achard et al., 2007; revisado por Fleet y Sun, 2005). Con el fin de averiguar si existía alguna relación entre la acción de GAs y NO, se realizaron ensayos en los cuales plántulas crecidas en oscuridad fueron tratadas con diferentes concentraciones de SNP (0-100 μM) y GAs 100 μM observándose una reversión parcial en la acción del NO sobre el hipocotilo en presencia de GAs, siendo

más significativo a concentraciones inferiores a 75 μM de SNP (Figura R.38.), por lo que se sugiere una posible implicación de estas hormonas en la regulación de la elongación del hipocotilo mediado por NO.

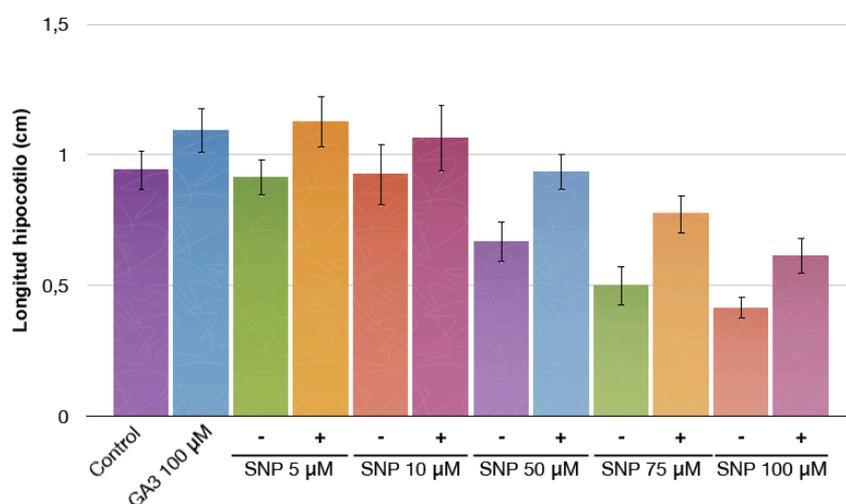


Figura R.38.- Longitud del hipocotilo en plántulas Col-0 tratadas con diferentes concentraciones de SNP (0-100 μM), GAs 100 μM y la combinación de cada concentración de SNP con GAs 100 μM . (-) tratamiento sin GAs, (+) tratamiento con GAs.

6.3.- Caracterización fenotípica y molecular de mutantes *della* en presencia de óxido nítrico.

Debido a la hipotética implicación de las GAs en el proceso de elongación del hipocotilo regulado por NO, el siguiente paso fue identificar el/los posible/s componentes de su ruta de señalización que pudieran integrar ambas señales. En este sentido, las proteínas DELLA se han descrito como reguladores negativos en la señalización mediada por las GAs. Por esta razón se analizó el fenotipo de mutantes afectados en las proteínas DELLA, en presencia SNP, cPTIO y en condiciones control (Figura R.39.).

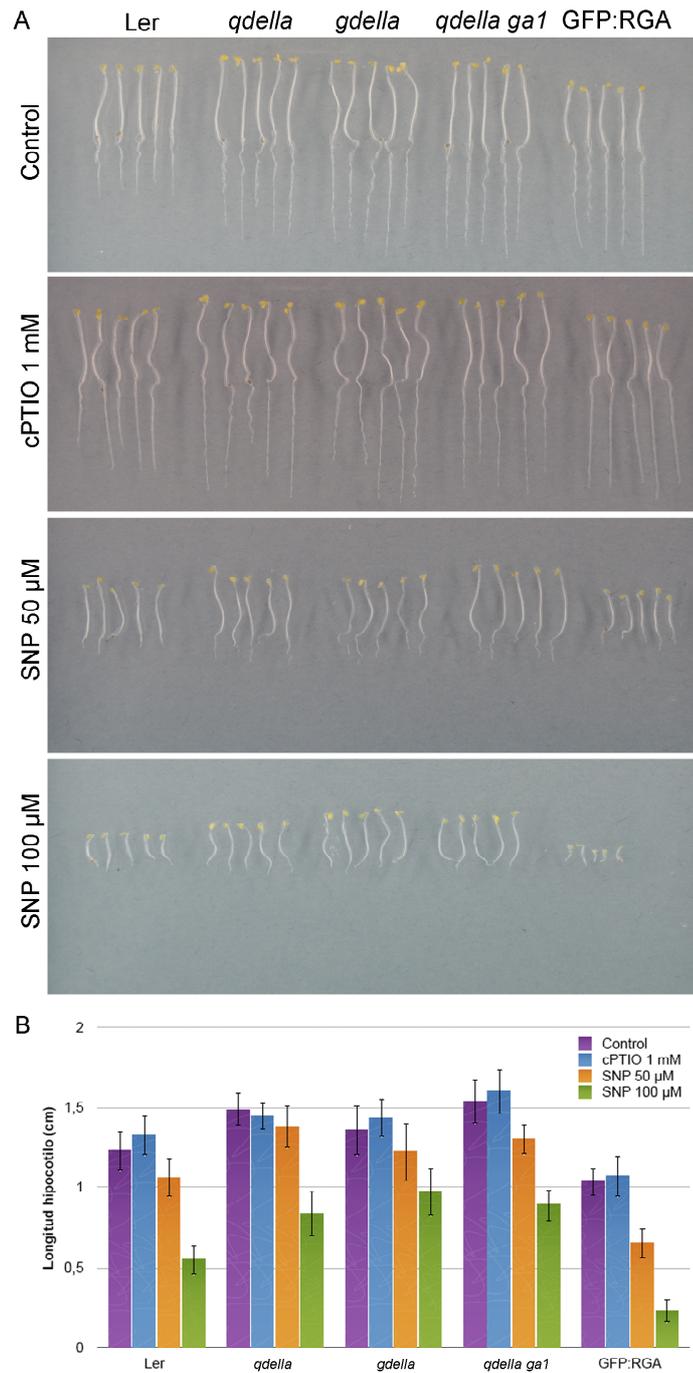


Figura R.39.- (A) Caracterización fenotípica de mutantes afectados en las proteínas DELLA, (*qdella*, *gdella* y *qdella;ga1*) y la línea *pRGA:RGA-GFP* en presencia de diferentes concentraciones de SNP (50 μM y 100 μM) y cPTIO 1 mM. **(B)** Longitud del hipocotilo medida en plántulas control y tratadas con SNP 50 μM y 100 μM y cPTIO 1 mM.

Como se muestra en la Figura R.39., los mutantes *quadruple della* (*qdella*), *quadruple della* en fondo *gal* deficiente en GAs (*qdella;gal*) y *global della* (*gdella*) presentaron mayor longitud del hipocotilo que el ecotipo silvestre en presencia de SNP. Sin embargo, la línea *pRGA:RGA-GFP* mostró mayor sensibilidad en presencia de SNP. Estos resultados indican que el NO podría estar inhibiendo la elongación del hipocotilo favoreciendo un aumento en la actividad o estabilidad de las proteínas DELLA o bien, induciendo su expresión.

Finalmente, para comprobar si la expresión de los genes *DELLA* estaba afectada por la adición de NO de forma exógena, se analizaron los niveles de expresión de *GAI*, *RGA* y *RGL1* en condiciones control y en tratamientos con SNP y cPTIO, mediante qRT-PCR. Los resultados obtenidos están reflejados en la Figura R.40., en la cual se observa como estos tres genes ven aumentada su expresión en tratamientos con el donador de NO, en comparación con la condición control o el secuestro de la molécula con cPTIO.

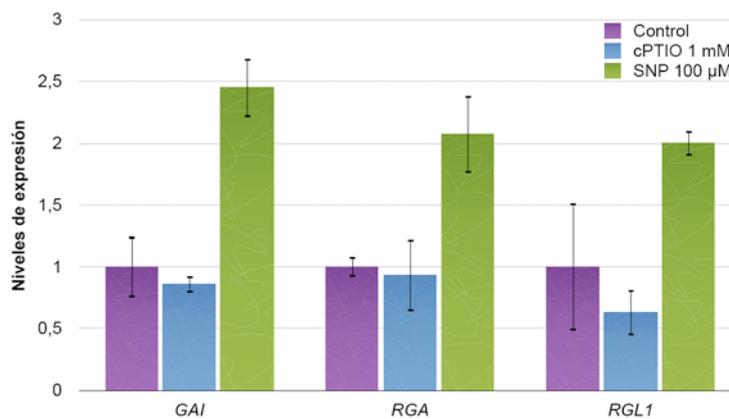
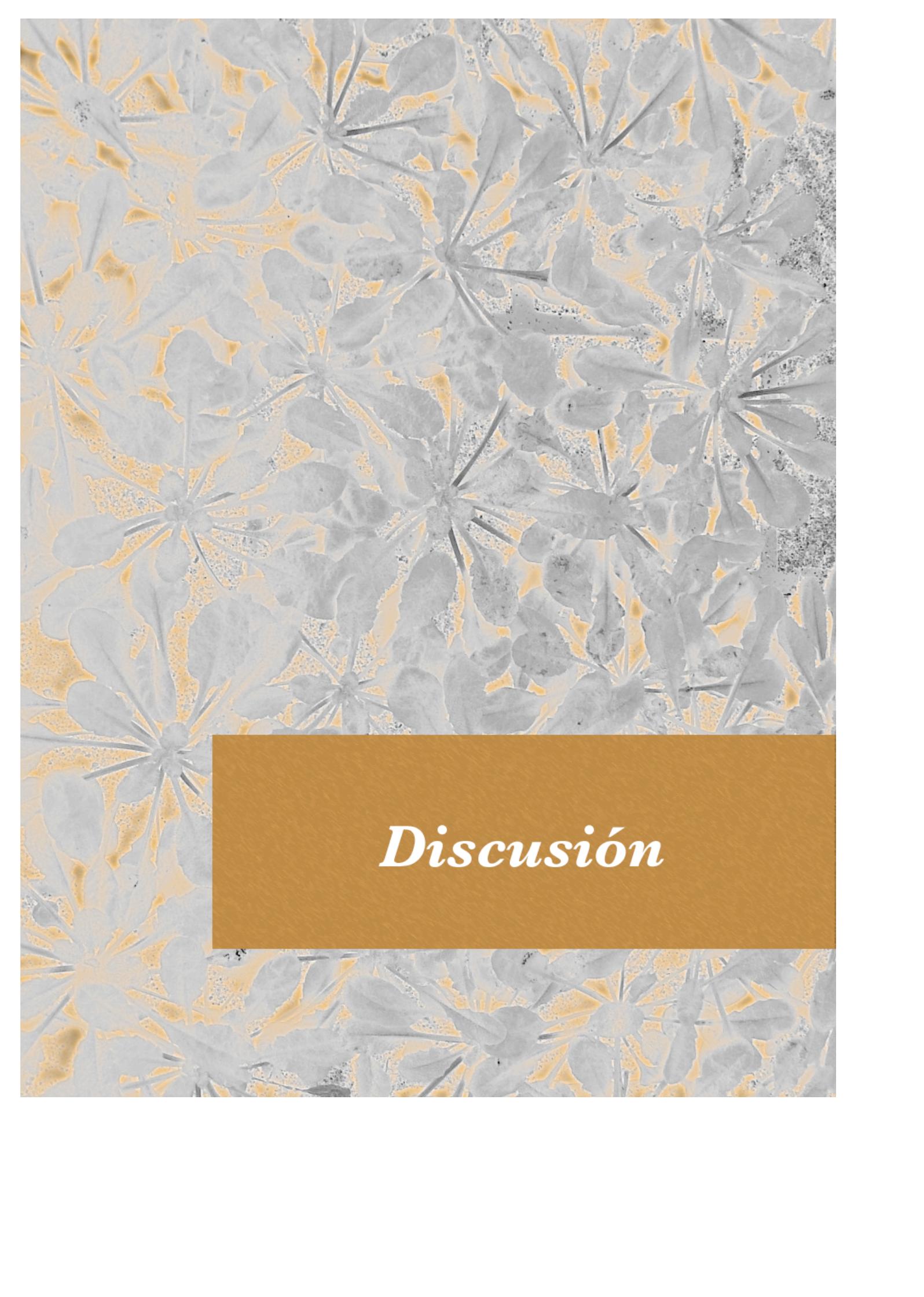


Figura R.40.- Niveles de expresión de tres de los cinco genes *DELLA* (*GAI*, *RGA* y *RGL1*) en presencia de SNP 100 μM y cPTIO 1 mM.



Discusión

El óxido nítrico (NO) es un radical libre gaseoso que ha adquirido una creciente importancia en las últimas décadas, debido a su papel como efector en la señalización molecular de diversos procesos fisiológicos. A pesar de los estudios realizados sobre su implicación en las respuestas de defensa frente a patógenos, las respuestas a estreses abióticos y diversos procesos del crecimiento y desarrollo de las plantas, los mecanismos bioquímicos y moleculares responsables de la participación del NO como molécula señalizadora están en su mayor parte por identificar.

La identificación de las enzimas que catalizan la síntesis de NO ha supuesto un gran avance en nuestro conocimiento sobre sus funciones en plantas. La primera enzima identificada fue la nitrato reductasa (NR), que cataliza la reducción de nitrato a NO usando NAD(P)H (Yamasaki y Sakihama, 2000). El NO producido por esta enzima es necesario en el cierre estomático inducido por ABA en células guarda de *Arabidopsis thaliana* (Desikan et al., 2002), lo que sugiere que el NO sintetizado a partir de nitrato por la acción de la NR estaría involucrado en los procesos de señalización del ABA. Posteriormente se identificó otra enzima en *A. thaliana* que presentaba homología con óxido nítrico sintetas (NOS) previamente descritas en animales. La proteína de *Arabidopsis* se denominó AtNOS1 (Guo et al., 2003), aunque posteriormente fue renombrada como AtNOA1 (Crawford et al., 2006) ya que no presenta actividad NOS *per se*. Esta enzima contiene un dominio de unión a GTP y suele presentar actividad GTPasa, localizándose en los plastos. AtNOA1 puede intervenir en la síntesis de NO relacionada con el cierre estomático inducido por ABA (Guo et al., 2003), el control de la floración (He et al., 2004) y las respuestas de defensa inducidas por lipopolisacáridos (Zeidler et al., 2004). El papel de AtNOA1 en el desarrollo de la planta se ha determinado a través del análisis de mutantes *atnos1* afectados en la síntesis de NO (Guo et al., 2003). Hay otros autores que proponen la existencia de otras enzimas involucradas en la síntesis de NO en plantas, como la nitrito-NO oxidoreductasa (Ni-NOR) (Stöhr y Stremalau, 2006), la xantina oxidoreductasa (XOR) (Millar et al., 1998) y el citocromo P450 (del Río et al., 2004), aún sin caracterizar.

1.- PRESENCIA DE ÓXIDO NÍTRICO DURANTE EL DESARROLLO TEMPRANO DEL VEGETAL.

La utilización de compuestos fluoróforos, de la familia de las diaminofluoresceínas (DAFs), es una herramienta muy útil para detectar la acumulación del NO endógeno y está ampliamente descrito en la bibliografía de plantas (Kojima et al., 1998; Foissner et al., 2000; Pedroso et al., 2000; Garces et al., 2001; Desikan et al., 2002; Neill et al., 2002a; Gould et al., 2003; Jih et al., 2003; Pagnussat et al., 2003; Xin et al., 2003; Huang et al., 2004; Prado et al., 2004, 2008; Tada et al., 2004; Kolbert et al., 2008). Durante el desarrollo temprano de *A. thaliana*, el NO endógeno se acumula principalmente en tres etapas o estadios esenciales para el establecimiento de la plántula (Figura R.1.): durante la germinación de las semillas, en la zona de diferenciación de raíces de plántulas y en hipocotilos en elongación, todos ellos procesos y tejidos donde trabajos previos han sugerido la existencia de fenotipos asociados al NO (Bethke et al., 2004b, 2006, 2007; Libourel et al., 2006; Liu et al., 2009; Lozano-Juste y León 2010a; 2010b; Lombardo et al., 2006; Beligni y Lamattina, 2000; Lamattina et al., 2003; Tonón et al., 2010). En semillas de *A. thaliana* en germinación, el NO se acumula en la capa de aleurona promoviendo la vacuolización de sus células, que secretan al medio enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular y provocan la rotura de la dormición, favoreciendo la germinación (Bethke et al., 2007). El NO permite la salida de la dormición en ecotipos con una fuerte dormición, como Emkheim y NIL DOG17-1, mientras que la ausencia de NO debido a la adición de cPTIO mantiene las semillas en dormición (Figura R.3.). Durante el crecimiento de la raíz el NO se acumula en las capas más externas de la raíz (cápsida y epidermis) y tiene un máximo en el comienzo de la zona de diferenciación de la raíz, donde las células finalizan su elongación y comienzan a diferenciarse en tipos celulares específicos, como son los tricoblastos que dan lugar a los pelos radiculares (Figura R.1D.). De manera interesante, el NO parece detectarse en la parte basal de los pelos radiculares, pero no en su parte apical. Un modelo equivalente al del estudio de los pelos radiculares, por su carácter de células muy diferenciadas, es el de la elongación del tubo polínico (Prado et al., 2004, 2008) donde al igual que sucede con los pelos radiculares se muestra que el NO se concentra en la parte basal del tubo polínico y es prácticamente indetectable en su parte apical, controlando la dirección de

crecimiento y/o elongación del tubo. Con el objeto de estudiar en profundidad el papel del NO en las células donde se está produciendo, hemos puesto a punto el aislamiento de células individuales de la epidermis en la zona de elongación de la raíz de *Arabidopsis* mediante la tecnología de microdissección por láser (Figura R.35.). Al igual que sucede en la raíz, el NO se detecta también en las capas más externas del hipocotilo formado por células en elongación (Figura R.1G.).

2.- APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL: FÁRMACOS Y MUTANTES.

En la realización de este trabajo se ha seguido una aproximación farmacológica, utilizando en un primer momento nitroprusiato sódico (SNP) como compuesto donador de NO. El SNP pertenece a la familia de donadores de NO que forman complejos con metales de transición. Es uno de los donadores de NO (NO⁺) más ampliamente utilizados, aunque se sabe que su descomposición no es espontánea, requiere luz o la pérdida de un electrón y esto, bajo condiciones fisiológicas, puede depender de distintos agentes reductores presentes en los sistemas biológicos, como ascorbato, tioles, hemoproteínas, NADH y NADPH (Wang et al., 2002). Debido a la controversia existente en torno a la utilización del SNP como compuesto donador de NO, por la liberación en paralelo de ácido cianhídrico (HCN) como consecuencia de la descomposición del SNP (Murgia et al., 2004), se ha utilizado además gas NO puro, así como otros dos compuestos donadores de NO como S-nitrosoglutatión (GSNO) y S-nitroso-N-acetil-D-penicilamina (SNAP). Estos compuestos pertenecen al grupo de los S-nitrosotioles (RSNOs), liberan exclusivamente NO y no necesitan ser reducidos para liberarlo (Floryszak-Wieczorek et al., 2006). La reversión del fenotipo asociada a altos niveles de NO se ha logrado utilizando un compuesto secuestrador (*scavenger*) de NO, el cPTIO. Asimismo, se han llevado a cabo estudios en paralelo mediante una aproximación genética utilizando diversos mutantes, previamente descritos, y que están afectados en la acumulación de NO (*nia1;nia2*: deficiente en nitrato reductasa 1 y 2, NR1 y NR2, *atnoa1*: deficiente en AtNOA1, *cue1/nox1*: deficiente en un translocador fosfoenolpiruvato/fosfato del cloroplasto, *argah1.2* y *argah2.1*: deficientes en arginina amidohidrolasa) (Wilkinson y Crawford, 1993; Guo et al., 2003; Crawford, 2006; Moreau et al., 2008; Streatfield et al., 1999; He et al., 2004; Flores et al., 2008).

3.- IDENTIFICACIÓN DE GENES MARCADORES DE RESPUESTA A ÓXIDO NÍTRICO.

Uno de los principales objetivos de este trabajo fue identificar genes específicamente inducidos y/o reprimidos por el NO. Para ello, utilizamos la colección de mutantes EXOTIC (Exon Trapping Insert Consortium), formada por unas 2500 líneas transgénicas de inserción de T-DNA de tipo *gene-trap*, que incluyen el marcador β -*GUS* bajo el control del propio promotor endógeno, y aplicamos exógenamente compuestos que liberan o secuestran NO (como el SNP o cPTIO, respectivamente). Las plántulas se crecieron durante 7 días y se realizaron inducciones durante tiempos cortos (3 h). De este modo, se pretendió identificar genes de respuesta rápida a la presencia o ausencia de NO, al mismo tiempo que se observan los lugares específicos de expresión y obtenemos mutantes de estos genes (normalmente de pérdida de función).

La aproximación experimental con líneas transgénicas de tipo *gene-trap* y *enhancer-trap* ha sido previamente utilizada por otros grupos en la bibliografía y ha permitido definir los patrones de expresión en la formación de pétalos y estambres durante el desarrollo floral (Nakayama et al., 2005), así como identificar genes relacionados con la germinación de semillas (Liu et al., 2005), respectivamente. En nuestro estudio, la concentración empleada de donador y secuestrador de NO fue de 100 μ M en ambos casos, coincidente con las condiciones experimentales descritas como idóneas en otros trabajos (Bethke et al., 2004b; 2006). Del análisis de la colección de aproximadamente 2500 líneas de inserción de T-DNA de tipo *gene-trap*, un 3.4% de los genes (73 genes) presentó un patrón de expresión diferencial del gen β -*GUS* en presencia o ausencia de NO. Así, 23 genes se mostraron inducidos por SNP, 21 reprimidos por SNP y 29 inducidos o reprimidos de forma diferencial dependiendo del tejido (Tabla R.1). Numéricamente, estos resultados son comparables a los obtenidos por Parani et al. (2004), que tras análisis por microarray de plantas (de 28 días) de *Arabidopsis* concluyen que aproximadamente un 2% del total de los genes analizados responde diferencialmente a NO. Asimismo, los patrones de expresión obtenidos fueron muy diversos, siendo más común la expresión del gen β -*GUS* en cotiledones y hojas primarias, y apreciándose también expresión en raíces, meristemas apicales de tallo y hojas primarias, evidenciando

de esta forma la diversidad de procesos fisiológica en los que está implicada esta molécula (Tabla I.1.).

Resultados obtenidos en el laboratorio, en los últimos años, han permitido identificar mediante TAIL-PCR algunos de estos genes específicamente inducidos o reprimidos por NO. Los genes descritos codifican proteínas implicadas en una amplia gama de procesos biológicos e incluyen proteínas cuyas actividades están relacionadas con la germinación y la regulación de ABA (lectina proteín-kinasa1 AtLecPK1, At5g01540; María Fernández Marcos, Trabajo de Grado), la muerte celular (hidrolasa, proteína relacionada con la muerte celular, At1g49650), el metabolismo de carbohidratos (poligalacturonasa, At3g61490), adaptación a estrés (heat shock protein, At4g13830), la biosíntesis de lignina (cinnamoyl CoA reductasa, At5g14700, Hector Rodríguez Sanz, Trabajo de Grado), la estructura de la membrana (proteína integral de membrana, At3g14380) y la formación de la pared celular en procesos de citocinesis (Patelina2, At1g22530, María Fernández Marcos, Tesis Doctoral) (Tabla R.1.). En resumen, los patrones de expresión obtenidos entre los genes inducidos o reprimidos por NO, y la identificación de 7 de ellos, corroboran la participación del NO en la regulación de la expresión génica en distintos procesos del desarrollo, tal y como habían sugerido otros autores mediante diversos tipos de aproximaciones experimentales (Polverari et al., 2003; He et al., 2004; Parani et al., 2004).

3.1.- AtLecPK1 es una proteín-kinasa, inducible por óxido nítrico, que actúa como regulador negativo de las respuestas a ABA durante la germinación.

Para profundizar en los mecanismos por los cuales el NO regula la expresión de genes específicos, en este trabajo se ha seleccionado una de las líneas inducibles por NO (*noi: nitric oxide inducible*) para su posterior caracterización. Esta línea presenta una expresión diferencial en las plántulas de 7 días, con una mayor expresión del gen β -GUS en los cotiledones de plántulas tratadas con SNP y ausencia de ésta en los cotiledones de las tratadas con cPTIO (Figura R.4.). Esta línea corresponde al mutante que hemos denominado *noi1*.

El gen afectado por la mutación *noi1*, y caracterizado en este estudio, codifica una proteína perteneciente al grupo de receptores de tipo lectina proteín-kinasa (LecRK) de *Arabidopsis*, llamados así por la presencia de un dominio extracelular similar a las lectinas de Leguminosas. Este gen fue identificado mediante TAIL-PCR (apartado 5.10.2. de Materiales y Técnicas), obteniendo un fragmento de aproximadamente 1200 nucleótidos, del cual se obtuvo la secuencia nucleotídica (Figura R.5.), y tras su comparación con las bases de datos de *Arabidopsis*, se puso de manifiesto la existencia de una elevada similitud, aproximadamente un 98%, con la secuencia del gen *AtLecPK1*, lo cual indica que el gen clonado se corresponde con este gen de *Arabidopsis thaliana*. Además, la comparación de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de nuestro gen con la base de datos TAIR, ha revelado la existencia de una elevada similitud con secuencias que codifican otros receptores del tipo lectina proteín-kinasas en *Arabidopsis*, lo cual sugiere que la proteína deducida de la secuencia nucleotídica pertenece a la familia de receptores lectina proteín-kinasas (LecRKs) (Figura R.6A.).

Las proteín-kinasas (PKs) catalizan la transferencia reversible del grupo γ -fosfato desde el ATP a determinados aminoácidos de distintas proteínas y, dependiendo del aminoácido que fosforilen, se denominan serina/treonina proteín-kinasas, tirosina proteín-kinasas e histidina proteín-kinasas (Stone y Walker, 1995). La fosforilación de proteínas en restos de serina, treonina o tirosina representa un importante mecanismo bioquímico para regular la actividad de muchas enzimas y participa en el control de numerosos procesos celulares.

Todas las PKs descritas hasta el momento, presentan a lo largo de su secuencia aminoacídica el dominio catalítico característico de estas proteínas, que contiene 11 regiones altamente conservadas. Dentro de estos 11 subdominios catalíticos aparecen dos secuencias muy importantes para la función que desempeñan estas proteínas (Hanks et al., 1988): la secuencia DLK..N dentro del dominio VIb, en la que los residuos correspondientes a aspartato (D) y asparragina (N), al igual que los DFG que se encuentran en el dominio catalítico VII, han sido implicados en la unión a ATP; además, dentro del dominio VIII, la secuencia consenso APE suele ser considerada como un indicador del dominio catalítico típico de las serina/treonina proteín-kinasas (Hanks et al., 1988).

Mediante análisis filogenéticos basados en el alineamiento de las secuencias que integran el dominio catalítico, las proteín-kinasas se han clasificado en 5 grupos principales, dentro de los cuales se encuentran las proteín-kinasas similares a receptores (RLKs). Los RLKs son una familia de proteín-kinasas de plantas con estructura similar a los receptores tirosina kinasa de animales (RTKs), pero se diferencian en su actividad catalítica, ya que los RTKs se autofosforilan en residuos de tirosina y los RLKs lo hacen en residuos de serina o treonina. Los RLKs presentan un dominio intracelular de tipo kinasa y un dominio extracelular que permite la unión a un ligando, que da lugar a la autofosforilación del dominio kinasa necesaria para la transmisión de la señal (Stone y Walker, 1995). Ambos dominios están unidos por una región central hidrofóbica, que constituye el dominio transmembrana.

El dominio proteín-kinasa de las RLKs está muy conservado, su longitud es de aproximadamente 250-300 aa y presenta, a lo largo de su secuencia de aminoácidos, el dominio catalítico característico de este tipo de proteínas con los 11 subdominios y las secuencias consenso descritas anteriormente.

La secuencia aminoacídica del gen *AtLecPK1* consta de 683 aa y contiene una zona de aproximadamente 300 aa (entre los aa 350 y 683) que corresponde al dominio proteín-kinasa, en el que se pueden observar los 11 subdominios catalíticos característicos de las PKs, representados en la Figura R.7A. y numerados del I al XI. La proteína *AtLecPK1* se incluye, debido a sus características, dentro del grupo de las serina/treonina proteín-kinasas, ya que dentro del subdominio VIb aparece la secuencia DLKPEN característica de las serina/treonina PKs, y dentro del subdominio VIII aparece también la secuencia GT.GY.APE característica de este tipo de PKs, aunque menos conservada (Figura R.8.) (Hanks et al., 1988).

Mientras que el dominio proteín-kinasa de los RLKs aparece muy conservado, el dominio extracelular es muy variable, por lo cual este tipo de PKs se han clasificado en 21 grupos distintos dependiendo de las características de este dominio (Shiu y Blecker, 2001). Uno de esos grupos lo constituyen las LecRKs, cuyo dominio extracelular está relacionado con las lectinas de Leguminosas. El gen caracterizado en este trabajo pertenece a esta clase de receptores kinasa, ya que al compararla con las bases de datos, presenta una elevada similitud con proteínas de esta familia.

El genoma de *Arabidopsis* contiene, al menos, 42 secuencias que codifican LecRKs, que se pueden agrupar en tres clases, denominadas A, B y C, y otras 9 secuencias adicionales que están relacionadas con lectinas solubles (Barre et al., 2002). Las proteínas de la clase B están estrechamente relacionadas con las lectinas de Leguminosas, mientras que las clases A y C parecen estar más distantes de este grupo. La comparación de 11 LecRKs diferentes de *Arabidopsis* con la proteína AtLecPK1 caracterizada en este estudio, revela que esta última pertenece a la clase A, es decir, aquellas LecRKs más alejadas de las lectinas de Leguminosas (Figura R.6B.). AtLecPK1 presenta una elevada similitud con LecRKs de *Medicago truncatula* que parecen estar implicadas en la simbiosis con *Sinorhizobium meliloti* (Navarro-Gochicoa et al., 2003), proceso en el cual el NO también desempeña una importante función.

Además de los dominios proteín-kinasa y lectina, AtLecPK1 presenta, en el extremo amino terminal, una serie de aminoácidos hidrofóbicos que se corresponden con el péptido señal, y una zona intermedia, claramente hidrofóbica, que corresponde al dominio transmembrana (Figura R.7.) (Shiu y Bleecker, 2001; Cock et al., 2002), como ya se ha descrito para las LecRKs de *Medicago* (Navarro-Gochicoa et al., 2003).

Los resultados presentados hasta el momento sugieren que AtLecPK1 es un receptor de tipo lectina proteín-kinasa que fosforila restos de serina/treonina y posiblemente se localiza en la membrana plasmática, ya que presenta un dominio transmembrana. El dominio lectina podría contener algún dominio no catalítico de unión a carbohidratos, debido a su homología con el correspondiente dominio lectina de Leguminosas. Además, puede intervenir en los procesos de señalización, ya que las proteín-kinasas intervienen en las cascadas de transducción de señales mediante la fosforilación de otras proteínas.

Una vez aislada y caracterizada la línea *noi1* inducible por NO, el siguiente paso planteado en este estudio ha sido utilizar el gen *AtLecPK1* como sonda para analizar su expresión en plántulas de *Arabidopsis*, mediante Northern blot, y la regulación de esta expresión por NO. Debido a la elevada similitud de AtLecPK1 con otras proteín-kinasas, como se observa en las Figura R.6., se utilizó una sonda específica, construída a partir de la región 3' no codificante, para conseguir una hibridación selectiva con el mRNA correspondiente a *AtLecPK1*.

Utilizando esta sonda específica, se detecta expresión de los transcritos correspondientes a *AtLecPK1* en plántulas de 7 días control (Figura R.9A.), que corresponden a la producción endógena de NO, observándose un aumento progresivo de la expresión a lo largo del tiempo. Este aumento en la acumulación de transcritos es más significativo en las plantas tratadas durante 3h con SNP 100 μ M, que aumenta los niveles de NO, mientras que la adición de cPTIO, que actúa secuestrando el NO, reduce la expresión del gen a lo largo del tratamiento, ya que los niveles de transcritos son inferiores al control a partir de 1h de tratamiento. Estos resultados coinciden con los obtenidos en nuestro ensayo de actividad GUS realizado en plántulas tratadas en las mismas condiciones (SNP o cPTIO) (Figura R.4.), donde se observa mayor expresión del gen reportador en plantas tratadas con SNP, y demuestran que la expresión (inducción/represión) del gen *AtLecPK1* está regulada por NO.

Resultados similares a los que hemos obtenido para el gen *AtLecPK1* por Northern blot, se habían puesto de manifiesto en un análisis transcriptómico global de las respuestas a NO en *Arabidopsis* (Parani et al., 2004). En ese estudio, analizando la cinética de expresión del gen, se observa que se produce una inducción en el tratamiento con SNP (+NO) comparado con el control en agua (control vs. SNP 1.0 mM). Sin embargo, al comparar el tratamiento control frente a plantas tratadas con cPTIO (-NO) (control vs. cPTIO 1.0 mM) se detecta una represión en la expresión del gen *AtLecPK1*.

Según todos los indicios, una de las primeras dianas del NO en las células vegetales, además de los segundos mensajeros como el Ca^{2+} , cADPR y cGMP, deben ser las PKs, y entre ellas las MAPKs. Se ha demostrado que el NO estimula MAPKs (mitogen activated protein-kinases) en tabaco y *Arabidopsis* (Clarke et al., 2000; Kumar y Klessig, 2000; Capone et al., 2004), y durante la inducción de raíces secundarias por ácido indolacético (IAA) en pepino, se activa una cascada de MAPKs dependiente de NO (Pagnussat et al., 2004).

Estos datos ya demostraron la participación de PKs en los procesos fisiológicos en los que interviene el NO. Sin embargo, conviene destacar que nuestros resultados demuestran, por primera vez en plantas, que la expresión de una lectina PK del tipo LecRK está regulada por NO.

Para estudiar la relevancia de este producto génico a lo largo del desarrollo de la planta, se estudió la expresión del gen en plantas adultas de *Arabidopsis* de 3-4 semanas. Los resultados del análisis por Northern blot muestran que los niveles de expresión del gen son similares en el control, donde se está produciendo NO endógeno, y en el tratamiento con SNP, tanto 100 μ M como 1 mM (Figura R.9B.), pero disminuye de forma notable en el tratamiento con cPTIO, llegando a ser prácticamente indetectables. Estos resultados sugieren que en las plantas adultas, el gen *AtLecPK1* está regulado por el NO endógeno, que parece ser suficiente para provocar la respuesta completa, ya que su expresión no se ve afectada por la adición de NO exógeno en forma de SNP, algo que sí ocurría en las plántulas de 7 días, probablemente debido a una menor producción de NO en las etapas tempranas del desarrollo. Por otra parte, se confirma que la inducción/represión de *AtLecPK1* depende del NO, ya que cuando se secuestra de las células con cPTIO, la expresión disminuye hasta casi anularse en plantas adultas, de forma aún más acusada que en las plántulas.

Finalmente, para identificar una posible función de esta proteína en los procesos del desarrollo en los que está implicado el NO, se analizó el fenotipo del mutante durante el proceso de dormición/germinación. El NO está implicado en la ruptura de la dormición favoreciendo la germinación de semillas y regulando el catabolismo del ABA durante el proceso de imbibición de las semillas (Beligni y Lamattina, 2000; Batak et al., 2002; Bethke et al., 2004b; Liu et al., 2009; Figura R.3., este trabajo). Nuestros resultados muestran que el mutante *noi1* presenta un mayor grado de dormición que el ecotipo silvestre Ler (Figura R.10A.), el cual se hace todavía más marcado cuando secuestramos el NO utilizando cPTIO (Figura R.10B.). Al igual que sucede con el triple mutante *nia1;nia2;noa1-2*, (Lozano-Juste y León, 2010a) con bajos niveles de NO, el mutante *noi1* es hipersensible al ABA ya que prácticamente no germina en presencia de ABA 0.5 μ M (Figura R.10C.). De acuerdo con estos resultados, estudios recientes demuestran la participación de LecPKs de la familia A, como *AtLecPK1*, en la regulación de las respuestas a ABA durante la germinación de semillas (Xin et al., 2009).

Como resumen, podemos concluir que las evidencias presentadas en este trabajo muestran que *AtLecPK1* es un receptor de tipo lectina proteín-kinasa inducido por NO, que se expresa en los cotiledones de plántulas de *Arabidopsis*. El análisis fenotípico del

mutante *noi1* demuestra que la proteína AtLecPK1 está implicada en el proceso de dormición y germinación de semillas, actuando como regulador negativo de las respuestas a ABA (Figura D.1.).

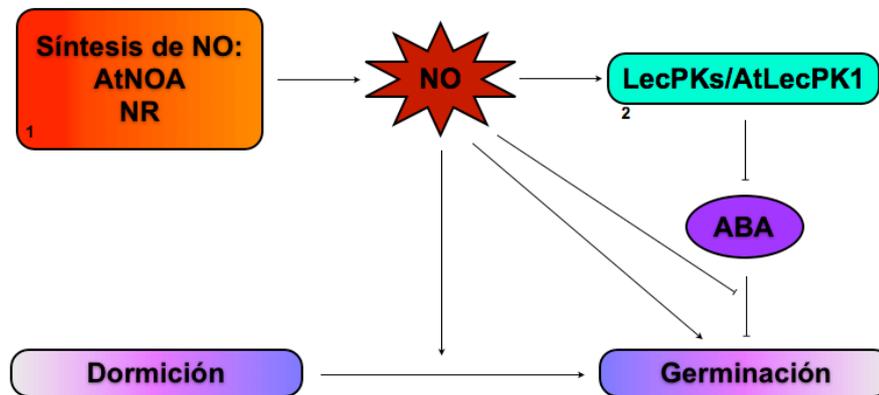


Figura D.1.- Modelo esquemático del papel que ejerce el NO en la dormición/germinación de semillas y la posible participación de AtLecPK1 en este proceso. ABA: ácido abscísico, LecPKs: lectina proteín-kinasas, NO: óxido nítrico, AtNOA: *A. thaliana* NO-associated 1, NR: nitrato reductasa. 1: Lozano-Juste y León (2010a), 2: Xin et al. (2009).

3.2.- AtPATL2 es una patelina reprimible por óxido nítrico que actúa en el proceso de citocinesis.

Otra de las líneas seleccionadas y caracterizadas en este trabajo ha sido una línea reprimible por NO (*nor*: *nitric oxide repressible*). Dicha línea presenta una expresión diferencial en plántulas de 7 días, siendo mayor la expresión del gen β -GUS en la raíz de plántulas tratadas con el secuestrador de NO, cPTIO, y menor expresión en la raíz de plántulas tratadas con el donador SNP (Figura R.20.). Esta línea corresponde al mutante que hemos denominado *nor1*.

El gen afectado por la mutación *nor1* codifica una proteína perteneciente al grupo de proteínas transportadoras de fosfatidilinositol (PITPs) de Arabidopsis. El gen fue identificado mediante TAIL-PCR (apartado 5.10.2. de Materiales y Técnicas), obteniendo un fragmento de aproximadamente 400 nucleótidos. Se obtuvo su secuencia nucleotídica (Figura R.21.), y tras su comparación en las bases de datos de Arabidopsis, se observó una elevada similitud, aproximadamente del 97%, con la secuencia del gen *AtPATL2*, lo cual indica que el gen clonado se corresponde con este gen de Arabidopsis.

Del mismo modo, la comparación de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de nuestro gen con la base de datos TAIR, ha revelado la existencia de una elevada similitud con secuencias que codifican otras PITPs de Arabidopsis, sugiriendo que la proteína deducida de la secuencia nucleotídica pertenece a la familia de las PITPs (Figura R.22.).

Las PITPs son proteínas capaces de unir fosfatidilinositol (PtdIns) y fosfatidilcolina (PtdCh) y transferirlos entre los sistemas de doble membrana (Allen-Baume et al., 2002). Estas proteínas se pueden clasificar en 3 clases en base a su secuencia. Las proteínas de las Clases I y II se pueden encontrar en eucariotas tanto unicelulares como multicelulares (mamíferos, insectos, nematodos), pero no en bacterias. Sin embargo, la Clase III está formada por las proteínas PITPs de levaduras y plantas. Estas últimas no tienen ninguna homología en secuencia o estructura con las Clases I y II. El genoma de Arabidopsis contiene 31 proteínas del tipo PITP de la Clase III que se dividen en 2 subfamilias; la subfamilia de las Sec14-nodulinas, que además del dominio Sec14 presentan en el dominio C-terminal un dominio nodulina, y la subfamilia Sec14-GOLD, también llamadas Patelinas (PATLs), que contiene el dominio GOLD (*Golgy dynamic*) involucrado en las funciones del aparato de Golgi (Anantharaman y Aravind, 2002).

La secuencia aminoacídica del gen *AtPATL2* consta de 684 aa y presenta un extremo amino terminal cuya longitud es de 350 aa (Figura R.23A.). Exceptuando la PATL6, el resto de miembros de esta familia presentan un elevado porcentaje de aminoácidos cargados (30-40%) en este dominio, mayoritariamente Glu (19-27%), siendo muy ácido (pI 4, aproximadamente), como queda reflejado en la Tabla S.6. donde se detallan las características y composición de aa de la proteína AtPATL2 (aa cargados 35.82%, Glu 16.08%, pI 4.86). Además, este dominio presenta secuencias que se corresponden con dominios *coiled-coil*, que es un motivo común en la oligomerización de proteínas (Burkhard et al., 2001), numerosas repeticiones EEK, típicas de proteínas triple H de neurofilamentos (Herrmann y Aebi, 2000) y diversos motivos PXXP, que son sitios de unión a dominios SH3 de interacción proteína-proteína (Feng et al., 1994). AtPATL2, al igual que AtPATL1, podría estar participando en la dinámica del citoesqueleto, en las rutas de señalización mediadas por tirosina kinasas y el tráfico de vesículas, ya que los

dominios SH3 participan en la interacción proteína-proteína en estos procesos (Kay et al., 2000).

A continuación del extremo amino terminal de la proteína AtPATL2 hay una zona claramente hidrofílica de aproximadamente 200 aa (entre los aa 360 y 578), que corresponde al dominio SEC14 y un dominio GOLD (Figura R.23.) en el extremo carboxilo terminal. Mientras que el dominio amino terminal de las PATLs descritas hasta el momento en Arabidopsis presentan una composición y longitud (81-357 aa) variables, los dominios SEC14 y GOLD están muy conservados. Dentro del dominio SEC14, AtPATL2 presenta un dominio característico CRAL-TRIO, representado en la Figura R.23.A. Este dominio se caracteriza por la presencia de una zona enriquecida en aminoácidos hidrofóbicos, como revela el perfil hidropático de la proteína (Figura R.23.B.), muy conservados en Sec14p y las PATLs (L179, V190, M191, Y193, F212, I214, F221, F225, L232, I240 y L242) (Sha et al., 1998; Sha y Luo, 1999). También presenta perfectamente conservados los residuos indispensables para la unión a PtdIns descritos en la Sec14p de *Saccharomyces cerevisiae* (E207, K239 y G266), lo cual sugiere que esta proteína puede interaccionar con fosfolípidos. Dentro del dominio GOLD hay una región enriquecida en Lys, que contiene un segundo sitio de unión a PtdIns (K(X₁₀)(K/R) KKK/M(ϕ_{2-3}) YR) descrito por Peterman et al. (2004) para las PATLs de Arabidopsis y que guarda semejanza con el descrito en otras proteínas involucradas en la formación de vesículas cubiertas de clatrina (Ford et al., 2001; Mao et al., 2001; Rohde et al., 2002). El gen caracterizado pertenece a la subfamilia Sec14-GOLD dentro de la Clase III de las PITPs, ya que al compararla en las bases de datos, presenta una elevada similitud con las proteínas de esta subfamilia y presenta dominios característicos de éstas, como el dominio GOLD.

Estos resultados sugieren que AtPATL2 es una PITP de Clase III perteneciente a la subfamilia Sec14-GOLD, que debido a la presencia de estos dos dominios y los residuos conservados que presenta en la caja de unión a lípidos, podría estar participando en el tráfico de vesículas, promoviendo la formación de éstas a partir de membranas. Además, podría estar involucrada en la expansión y maduración de la placa media en el proceso de citocinesis, debido a su elevada identidad y similitud de secuencia con

AtPATL1 (Peterman et al., 2004). En concreto, AtPATL1 presenta un papel esencial en el desarrollo de la placa media.

Una vez aislada y caracterizada la línea *nor1*, reprimible por NO, se analizó la expresión del gen *AtPATL2* en plántulas de *Arabidopsis* mediante Northern blot y su regulación por NO. Utilizando como sonda el gen *AtPATL2*, se detecta expresión de los transcritos correspondientes a este gen en plántulas de 7 días control (Figura R.24.), que corresponden a la producción endógena de NO, sin observarse un aumento en la expresión en plántulas tratadas con SNP 100 μ M y 1 mM. Mientras que la adición del secuestrador de NO, cPTIO, aumenta la expresión del gen a las 3 h de tratamiento, ya que los niveles de transcritos son superiores al control y a los tratamientos con el donador de NO. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el ensayo de actividad β -GUS realizado en plántulas en las mismas condiciones (Figura R.20.), donde se observa mayor expresión del gen reportador β -GUS en plántulas tratadas con cPTIO, demostrando así que la expresión del gen *AtPATL2* está regulada por NO, siendo el primer miembro de la familia de PITPs del que se muestra una regulación por NO. Una evidencia más de la regulación de este gen por NO, la encontramos en los datos obtenidos en el análisis transcriptómico donde el gen *AtPATL2* se encuentra reprimido por SNP vs control con un \log_2 ratio de -1.18 y SNP vs cPTIO de -1.31 (Tabla S.2.).

Uno de los procesos fisiológicos en los que intervine el NO es el crecimiento y desarrollo de la raíz. *AtPATL2* podría estar involucrada en este proceso debido a que los datos obtenidos de la actividad GUS en nuestra línea coinciden con los datos obtenidos de la base de datos Genevestigator y BAR, que confirman que *AtPATL2* se expresa en la raíz, principalmente en la zona EZ y en las zonas de pelos radiculares. Utilizando un mutante de inserción de T-DNA procedente del SALK 086866, ya que el mutante *nor1* aislado en nuestra búsqueda no es un mutante de pérdida de función (debido a que la inserción del transposón se ha producido en la región 5' no codificante) (Figura R.25A. y R.21.), no se observan diferencias significativas en el fenotipo de crecimiento de la raíz en plántulas tratadas con SNP o cPTIO, aunque este mutante presenta un acortamiento en la longitud de la raíz en condiciones control (Figura R.27.). Del mismo modo, experimentos de ganancia de función muestran que la sobreexpresión de *AtPATL2* no presenta ningún fenotipo significativo en presencia de SNP o cPTIO, mientras que sí se observa una

disminución en el crecimiento de la raíz en condiciones control (Figura R.27.). Nuestros resultados muestran que este acortamiento en la raíz primaria no es debido a cambios significativos en el tamaño o número de células que componen el meristemo, y sugieren que la alteración de los niveles de esta proteína pudiera afectar la tasa de división celular en las células del meristemo y/o el tamaño final de las células en la zona de elongación-diferenciación. Conviene destacar que la sobreproducción de *AtPATL2* provoca la aparición de divisiones asimétricas en la endodermis de plántulas de 7 días, que no aparecen en el control o en el mutante (Figura R.28.). Este resultado sugiere que *AtPATL2* podría estar involucrada en la formación de divisiones asimétricas que van a dar lugar a un *middle-cortex* prematuro en la raíz. La formación del *middle-cortex* en la raíz se produce por la aparición de divisiones asimétricas en células de la endodermis situadas cerca del córtex inicial (CI) en plántulas de 3 semanas. La interacción de *SCARECROW* (*SCR*) y *SHORTROOT* (*SHR*) es responsable de regular estas divisiones longitudinales para formar las dos capas de córtex en raíces de *Arabidopsis* (Di Laurenzio et al., 1996; Nakajima et al., 2001). Recientemente, Sozzani et al. (2010) sitúan a *AtPATL2* como uno de los primeros genes inducibles por acción de *SHR*. Asimismo, Cui y Benfey, 2009 describen la interacción, mediante doble híbrido, de *SCR* con *AtPATL3*, uno de los homólogos de *AtPATL2*. En línea con estos resultados, el dominio amino terminal de *SCR* presenta motivos de interacción proteína-proteína SH3 (Cui y Benfey, 2009), también presentes en *AtPATL2* (Figura R.23.).

Estos resultados, tomados en su conjunto, nos permiten sugerir un modelo donde la proteína *AtPATL2*, cuya expresión del gen correspondiente se reprime por NO, está regulada por *SHR-SCR* y pudiera participar de esta forma en el proceso de formación de divisiones asimétricas en la endodermis (Figura D.2.).

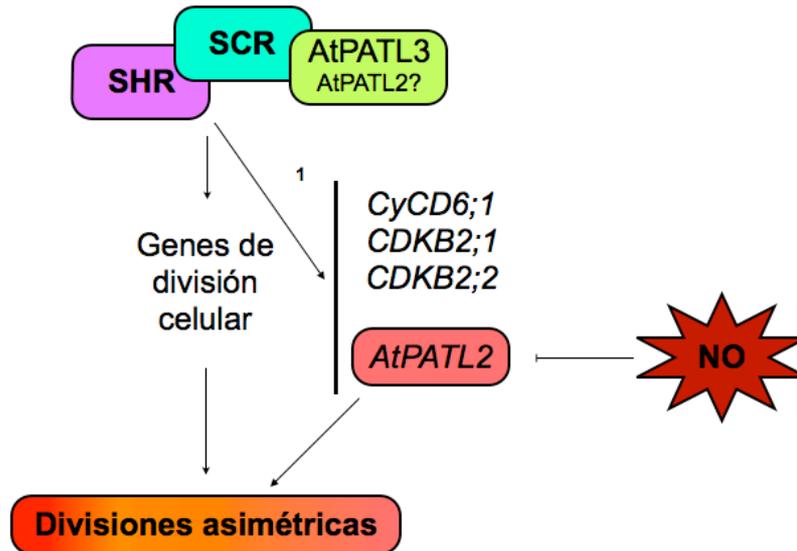


Figura D.2.- Modelo del posible papel del NO en la formación de divisiones asimétricas para dar lugar al *middle-cortex* y la implicación de AtPATL2 en este proceso. *AtPATL2*: gen que codifica la proteína Patelina2, *AtPATL3*: gen que codifica la proteína Patelina3, *CDKB2;1*: gen que codifica ciclina dependiente de la kinasa B2;1, *CDKB2;2*: gen que codifica ciclina dependiente de la kinasa B2;2, *CyCD6*: gen que codifica la ciclina D6, NO: óxido nítrico, SCR: SCARECROW, SHR: SHORTROOT. 1: Sozzani et al. (2010).

4.- LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL POR ÓXIDO NÍTRICO EVIDENCIA INTERACCIONES CON FITOHORMONAS Y LA REGULACIÓN DE FENILPROPANOIDES.

La segunda aproximación que se siguió para identificar genes específicamente inducidos o reprimidos por NO fue realizar un análisis transcriptómico, tras tiempos largos de tratamiento, en presencia o ausencia de NO. En estas condiciones, el tratamiento con NO conduce a una inhibición drástica del crecimiento de la plántula (Figura R.11.), que se debe a una menor tasa de producción de nuevas células en la raíz (Figura R.14.) y a una disminución en la tasa de elongación de las células en la zona de diferenciación (Figura R.15.) (Baluskda et al., 2006) Estos efectos tan relevantes darán lugar, sin duda, a una importante reprogramación genética. Estudios de los cambios en la expresión de genes de respuesta al NO mediante análisis por microarray en *Arabidopsis*, demuestran que aproximadamente un 2.0%, de un total de 24000 genes, responden a NO (Parani et al., 2004). Los análisis de genes de respuesta a NO realizados por microarray, Northern blot así como AFLPs (cDNA-amplification fragment length

polymorphism) en *Arabidopsis*, indican la participación del NO en la regulación de la expresión de numerosos genes (Polverari et al., 2003; He et al., 2004; Parani et al., 2004). Aunque estos análisis proporcionan una idea general bastante adecuada sobre las actividades biológicas del NO, nuestro conocimiento de la participación de esta molécula en funciones señalizadoras es aún muy escaso.

4.1.- Corregulación entre los genes inducidos por óxido nítrico y los genes inducibles por ABA o MeJA.

El análisis *in silico* de los resultados obtenidos mediante la aplicación BAR (<http://www.bar.utoronto.ca>) (Toufighi et al., 2005) evidencia una clara correulación entre los genes inducidos por NO y los genes inducidos por ABA o MeJA (Figura R.30), hormonas asociadas a la respuesta de la planta a situaciones de estrés y que también inhibien el crecimiento de la raíz tras su aplicación exógena (Staswick et al., 1992; Davies, 1995). Así, aproximadamente un 25% de los genes inducidos por NO son también inducibles por ABA y un 20% de los inducidos por NO lo son también por MeJA. Entre los genes regulados por ABA, se encuentran *ABI1* (*ABSCISIC ACID INSENSITIVE 1*) y genes relacionados con el estrés como *RD20* (*RESPONSIVE TO DESSICATION 20*), *RD22* (*RESPONSIVE TO DESSICATION 22*), *ERD3* (*EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 3*) y *P5CS2* (*DELTA 1-PYRROLINE-5-CARBOXYLASE SYNTHASE 2*). Del mismo modo, los datos del análisis transcriptómico muestran una serie de genes, inducidos por NO, utilizados como marcadores moleculares de las respuestas a herida y a JA (León et al., 1998), dentro de los cuales destacan *JR1* (*JASMONATE RESPONSIVE 1*), *VSP1* (*VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 1*), y varios *MBP* (*MYROSINASE-BINDING PROTEIN*) (*MBP1*, At1g52000 y At3g16390). Otros genes regulados por JA son los inducidos por coronatina *COR11* (*CORONATINE-INDUCED PROTEIN 1*) y *COR13* (*CORONATINE-INDUCED PROTEIN 3*), y genes relacionados con la biosíntesis de flavonoles y antocianinas. También aparecen inducidos genes de la biosíntesis del JA como *LOX2* (*LIPOXYGENASE 2*) y *AOC1* (*ALLEN OXIDE CYCLASE 1*), lo cual indica que el NO es capaz de inducir la expresión de genes involucrados en la biosíntesis del JA, corroborando los datos obtenidos por Huang et al. (2004). Estos resultados nos permiten concluir que plántulas crecidas en presencia de altas concentraciones de NO muestran

una respuesta génica similar a la mostrada en situaciones de estrés (que normalmente conllevan aumento en los niveles de ABA y JA).

4.2.- El óxido nítrico induce la acumulación de fenilpropanoides (flavonoles y antocianinas).

Uno de los grupos de genes significativamente inducidos por el NO son aquéllos implicados en la síntesis y metabolismo de los fenilpropanoides (Figura R.31.). Un posterior análisis metabólico confirma que esta inducción conlleva un aumento general de los flavonoides (flavonoles y antocianinas) en la planta. Los flavonoles tienden a acumularse en la parte apical de la raíz primaria y en los primordios de las raíces laterales (Figura R.32.). Los flavonoides son pigmentos no fotosintéticos que se producen en la planta, principalmente como protección frente al daño producido por la luz UV y el exceso de luz visible, secuestrando ROS antes de que provoquen daño en la planta (Jordan, 1996; Jansen et al., 1998). Conviene destacar que bajo condiciones de estrés, abiótico o biótico, se liberan conjuntamente NO y ROS, lo cual crea condiciones favorables para que se produzca la nitración, que es un indicador del estrés nitrosativo en las plantas (Valderrama et al., 2007; Corpas et al., 2008; Chaki et al., 2009). Es por ello, que la acumulación de flavonoides tras el tratamiento con NO pudiera responder a una necesidad de la planta por detoxificar los altos niveles de NO y ROS, como ya sugieren Delledone et al. (2005) en sus estudios durante la respuesta hipersensible de la planta al ataque por patógenos.

A parte de la posible función de los flavonoides en procesos de detoxificación, existe además, cierta controversia en la literatura respecto al papel de los flavonoles como reguladores del transporte polar de auxinas. Así, existen trabajos que los asocian una función de reguladores negativos de este transporte (Murphy et al., 2000; Brown et al., 2001; Peer et al., 2004; Peer y Murphy, 2006; revisado por Peer y Murphy, 2007). Sin embargo, otros autores les atribuyen un carácter de moduladores necesarios de dicho transporte en respuesta a estímulos como el gravitrópico (Santelia et al., 2008). En este sentido, nuestros resultados evidencian una clara disminución en la expresión de la línea reportadora de auxinas *DR5:GUS/GFP* y en la acumulación de la proteína transportadora

de auxinas PIN1-GFP en la raíz principal tras inducción con NO. Estos resultados, sin embargo, no nos permiten concluir que estas alteraciones sean consecuencia directa del incremento de flavonoides en la planta. En este sentido, sería necesario analizar la expresión de DR5 y la acumulación de PIN en mutantes genéticos con los niveles alterados de flavonoles (*tt3*, *tt7* y *tt4*, Koornneef, 1990; Buer y Muday, 2004;) tras inducciones con NO. No obstante, trabajos publicados previamente (Peer et al., 2004; Santelia et al., 2008) y evidencias indirectas obtenidas en nuestro trabajo nos sugieren que la disminución de la expresión de DR5 y de la acumulación de PIN1 pueda deberse a un efecto más general sobre el catabolismo de las auxinas o propio *turnover* proteico como respuesta al estrés originado. Así, la desaparición de PIN1 no se debe a una disminución de la expresión del gen (Figura R.19E.) y es independiente del proteosoma (Figura R.19A y B.). Del mismo modo, otros autores demuestran que aumentos en los niveles de flavonoles en la planta no producen disminución en los niveles de PIN1 (Peer et al 2004), y por el contrario sí producen cambios en la localización de PIN1 y PIN2 (Santelia et al., 2008), que no se observan en nuestras condiciones experimentales, donde solamente detectamos desaparición de PIN1. Además, la inhibición del transporte basipétalo de auxinas mediante compuestos como el NPA no produce como efecto ningún tipo de insensibilidad al NO (Figura R.18.). Sin embargo, de forma interesante, el mutante con niveles altos de flavonoles (*tt3;tt7*) presenta hipersensibilidad al NO en su fenotipo de inhibición de la raíz (Figura R.34.). Este resultado sugiere que la acumulación de flavonoles tras adición de NO contribuye a la inhibición del crecimiento de la raíz.

De todos estos datos se deduce que en la interacción entre altos niveles de NO y las auxinas pueden estar implicados otros componentes moleculares u otras rutas de señalización adicionales a las activadas por el aumento de flavonoles, y que sean responsables, en último término, del fenotipo de inhibición de crecimiento de la raíz primaria asociada al NO. Así, el NO a bajas concentraciones actúa como intermediario de las auxinas promoviendo la división celular (Ötvös et al., 2005), la formación de raíces laterales (Correa-Aragunde et al., 2006) y de raíces adventicias (Pagnussat et al., 2003). Sin embargo, a concentraciones altas pudiera estar actuando con una cinética de producción distinta (Kolbert et al., 2008) sobre el metabolismo de las auxinas, formando parte de una respuesta general de estrés, e inhibir de este modo procesos como la división y elongación celulares (Figura D.3.).

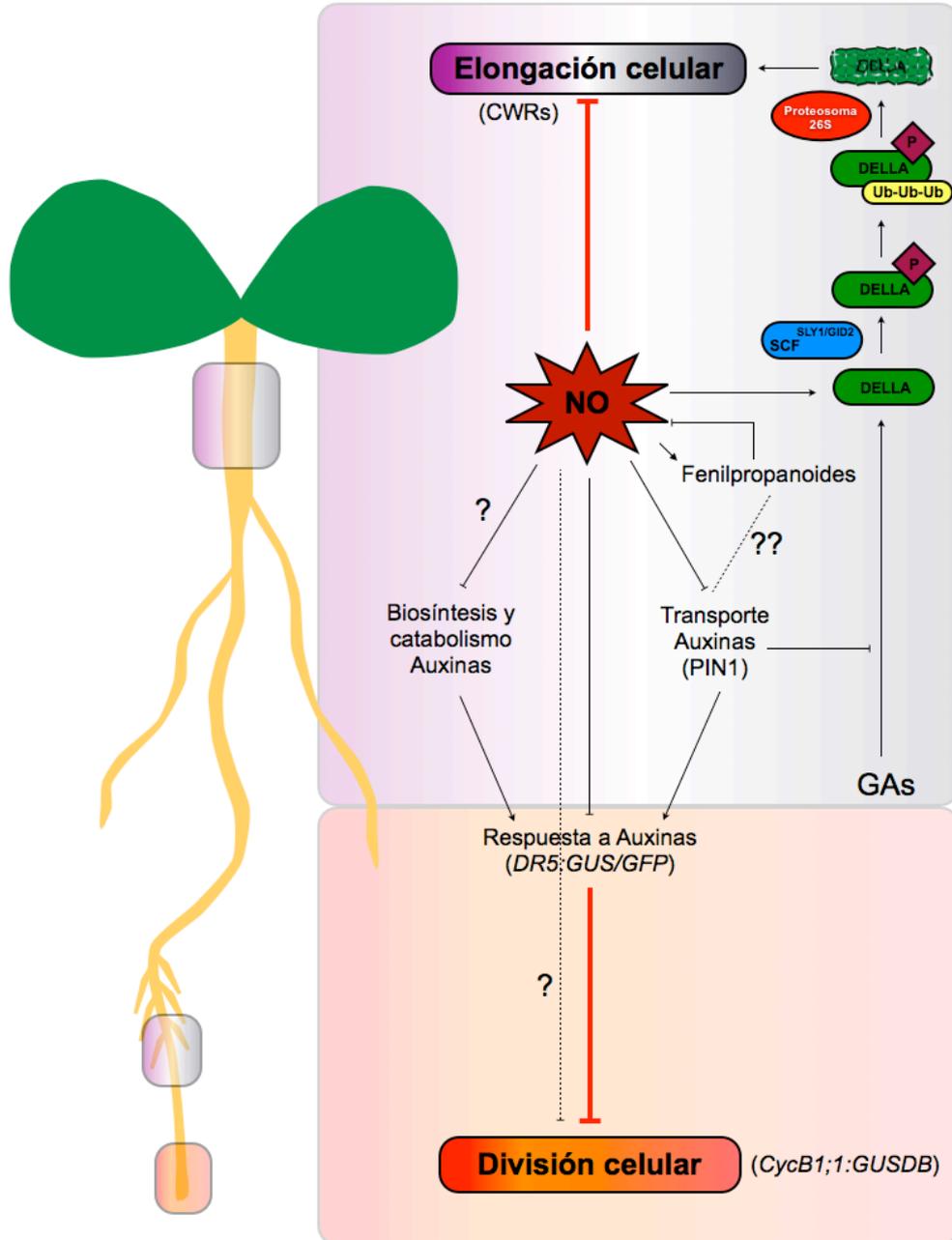


Figura D.3.- Representación esquemática del papel fisiológico del NO en el crecimiento y desarrollo de la raíz y del hipocotilo, fundamentalmente en los procesos de división y elongación celulares. CWRs: enzimas modificadoras de pared celular, *CycB1;1:GUSDB*: línea marcadora de la fase G2 del ciclo celular, DELLA: reguladores negativos de las respuestas a GAs, *DR5:GUS/GFP*: línea reportadora de las respuestas a auxinas, GAs: giberelinas, NO: óxido nítrico, PIN1: proteína transportadora de auxinas, SCF^{SLY1/GID2}: complejo SCF ubiquitina ligasa E3, P: fosfato, Ub: ubiquitina.

5.- NIVELES ELEVADOS DE ÓXIDO NÍTRICO INHIBEN LA DIVISIÓN CELULAR EN EL MERISTEMO DE LA RAÍZ PRIMARIA.

En animales el NO actúa como agente citostático regulando el balance entre la proliferación celular y la diferenciación celular (Peunova et al., 1996; Kuzin et al., 2000). En nuestro sistema de estudio, observamos un cambio en el número de células que componen el meristemo de plántulas de 5 días, siendo éste menor en plántulas tratadas con NO o en el mutante sobreproductor de NO, *cue1/nox1*, comparadas con el control (Figura R.12A y C.). Este efecto es revertido por cPTIO en presencia de donadores de NO (Figura R.12B.). Conviene destacar que en plántulas que no presentan NO de forma endógena por la adición de cPTIO, se observa una reducción en la elongación de las células en el meristemo basal (BM), sin afectar de forma significativa al número de células en división y la elongación de esas células en el meristemo apical (AM) y la zona de elongación (EZ) (Figuras R.12, 14 y 15). Tras analizar plántulas de 7 días en condiciones control y expuestas a tratamientos prolongados con cPTIO, no se observan diferencias significativas en el número de células que componen el meristemo, siendo 33 el número de células en ambos casos (Figura R.13.). Estos datos sugieren que el papel del NO endógeno podría ser dependiente de tejido (células del BM) y tener lugar durante un periodo corto en el tiempo (durante el establecimiento del meristemo de la raíz) (Dello Ioio et al., 2008). Por lo tanto, el NO endógeno podría estar afectando a la transición entre el BM y la EZ, modificando el número de células en el AM y acercando la transición BM-EZ al centro quiescente (QC) durante el establecimiento del meristemo de la raíz.

Se ha descrito que el BM está compuesto de células que presentan propiedades fisiológicas especiales, de ahí la importancia de esta zona en las respuestas de la raíz a una gran variedad de señales ambientales como la graviestimulación, estimulación electrotrópica, estrés por agua o las respuestas a auxinas (revisado por Ishikawa y Evans, 1995). De acuerdo con esto, las células de esta zona responde de forma diferente a las células que forma la EZ provocando, en muchos casos, respuestas diferentes ante un mismo estímulo. Un ejemplo concreto es la graviestimulación, que inhibe la elongación de células de en la EZ y promueve la elongación de las células situadas en la zona superior del BM. Nuestros resultados confirman que un aumento en la concentración de

NO promueve la elongación en el meristemo de la raíz, y con ello se produce una disminución en el *pool* de células con capacidad de dividirse como hemos observado en la línea *CycB1;1::GUSDB* al ser tratada con donadores de NO (Figura R.14.). Por el contrario, la ausencia de NO debido a la adición de cPTIO no aumenta el número de células en división, como ya ha descrito Ötvös et al., (2005), donde la adición del inhibidor de la síntesis de NO, L-NMMA (L-NG-monomethyl-L-arginine), no produce cambios significativos en la tasa de división celular en cultivos celulares de alfalfa.

6.- EL ÓXIDO NÍTRICO INHIBE LA ELONGACIÓN CELULAR A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE PROTEÍNAS DELLA.

Otro grupo de genes cuya expresión está afectada por el NO son aquéllos cuya actividad confiere plasticidad a la pared celular (CWRs) y favorecen de este modo la elongación celular. El análisis *in silico* de este grupo de genes, utilizando la aplicación BAR (Figura S.1.), sugiere que aquéllos que se reprimen tienden a concentrarse en la zona de diferenciación de la raíz, pudiendo conferir rigidez e impidiendo la elongación de las células en esta zona de la raíz. Conviene resaltar que el tamaño promedio de las células en el córtex de la raíz de plántulas tratadas con NO es menor que en la condición control, lo que confirma que los tratamientos con NO inhiben la tasa de elongación celular en la zona de diferenciación de la raíz. Estos resultados son coincidentes con los descritos previamente por Hu et al. (2005), donde los autores demuestran que un incremento en los niveles de NO en respuesta al estímulo gravitropico, reduce la elongación celular y favorece la formación de la curvatura gravitropica. Trabajos previos describen que las auxinas regulan el crecimiento de la raíz a través de las GAs (Fu y Harber, 2003), que a su vez son hormonas vegetales que promueven la división y elongación celular (de Lucas et al., 2008; Ubeda-Tomás et al., 2008, 2009; Achard et al., 2009). Su mecanismo de acción implica la inactivación de las proteínas represoras DELLA (GAI, RGA, RGL1, RGL2 y RGL3), lo que a su vez permite la activación de los genes de respuesta a GAs. Las proteínas DELLA actúan como reguladores negativos de los factores de transcripción PIFs (Phytochrome interacting factors) que están implicados en procesos de crecimiento como la elongación celular (de Lucas et al., 2008; revisado por Davière et al., 2008). En ausencia de GAs, se produce una acumulación de proteínas DELLA en el núcleo que

interaccionan con los factores de transcripción PIFs, impidiendo la unión de estos a sus dianas provocando inhibición en el crecimiento (revisado por Davière et al., 2008). Ensayos realizados en nuestro laboratorio sugieren que las GAs revierten el fenotipo de inhibición de la elongación producido por NO en la zona de diferenciación de la raíz, y que mutantes afectados en los genes *DELLA* son parcialmente insensibles al NO (Figura R.16.). Además dentro de los genes que podemos encontrar como inducidos por SNP en el microarray aparece *RGL1* (Tabla S.1.).

El crecimiento del hipocotilo en condiciones de oscuridad, conocido fisiológicamente como proceso de etiolación, es otro modelo adecuado para estudiar la implicación del NO en el control de la tasa de elongación celular, ya que la contribución de estos procesos de elongación al crecimiento global del hipocotilo es mayoritaria (Gendreau et al., 1997). Así, se ha descrito previamente en la bibliografía que la aplicación de NO exógeno afecta a la fotomorfogénesis produciendo una inhibición en el crecimiento del hipocotilo en condiciones de oscuridad en plántulas de lechuga y *Arabidopsis* (Beligni y Lamattina, 2000), datos que además corroboran los resultados obtenidos en el presente trabajo (Figura R.36.). De acuerdo con estos trabajos, nuestros resultados también muestran que mutantes sobreproductores de NO (*nox1/cue1*, *argah1.2* y *argah2.1*) presentan un fenotipo de hipersensibilidad al NO añadido exógenamente, mientras que los mutantes deficientes en NO (*atnoa1* y *nial1;nial2*) presentan una longitud del hipocotilo similar a la del control (Figura R.37.). El importante papel que desempeñan las GAs en los procesos de fotomorfogénesis es bastante conocido, fundamentalmente gracias a los estudios con variedades mutantes de rutas de síntesis y señalización (Alabadí et al., 2004; Achard et al., 2007, revisado por Fleet y Sun, 2005). Nuestros resultados evidencian que la adición de GAs conduce a una reversión parcial del fenotipo de inhibición de la elongación del hipocotilo asociada al NO (Figura R.38.). Asimismo, la insensibilidad al NO observada en mutantes afectados en los genes *DELLA* (Figura R.39.) nos permite concluir que el NO inhibe, en parte, la elongación del hipocotilo a través de la activación de las proteínas DELLA. De acuerdo con estos resultados, el análisis por qRT-PCR de la expresión de los genes *DELLA* muestra la inducción de varios genes que codifican estas proteínas (*GAI*, *RGA* y *RGL1*) (Figura R.40.) tras el tratamiento con NO.

Todos estos datos sugieren una posible interacción entre las rutas de señalización del NO y las GAs en el proceso de elongación en la raíz y el hipocotilo a través de la activación de la expresión de los genes *DELLA* (Figura D.3.).

7.- DISCUSIÓN GENERAL.

A lo largo de esta memoria hemos puesto de manifiesto la gran variedad de procesos fisiológicos en los que interviene el NO. Dentro del crecimiento y desarrollo de las plantas destacamos en primer lugar, el papel que ejerce el NO en la eliminación la dormición, favoreciendo la germinación de semillas y posiblemente actuando a través de *AtLecPK1*, que funciona como un regulador negativo de las respuestas a ABA (Xin et al., 2009) (Figura D.1.). Otro de los procesos en los que interviene el NO es la formación de divisiones asimétricas que van a dar lugar al *middle-cortex* a través de la represión de *AtPATL2*, que podría estar interaccionando con SCR para llevar a cabo este proceso (Cui y Benfey, 2009) (Figura D.2.). Además, el NO promueve la síntesis de flavonoles que, como ya se ha descrito, podrían estar actuando como moduladores del transporte de auxinas (Murphy et al., 2000; Brown et al., 2001; Peer et al., 2004; Peer y Murphy, 2006; revisado por Peer y Murphy, 2007). Los flavonoides, fundamentalmente las antocianinas, a su vez podrían estar implicados en la detoxificación de ROS y probablemente actuarían eliminando el exceso de NO (Delledonne et al., 2005) (Figura D.3.). Asimismo, la aplicación exógena de NO inhibe la elongación en las células en el hipocotilo y en las zonas de diferenciación de la raíz, a la vez que produce una menor tasa de división celular en el meristemo de la raíz principal, provocando un acortamiento del hipocotilo y la raíz en *Arabidopsis* (Figura D.3.). La división y elongación celulares son procesos regulados por la interacción de un conjunto de hormonas, entre ellas tienen especial importancia las auxinas, GAs, ET, CKs, ABA, y BRs. La aplicación de NO de forma exógena afecta a diferentes rutas hormonales de forma directa o indirecta, en diferentes puntos. En el caso de las auxinas, tras la exposición a NO se produce la inhibición del transporte de esta hormona (desaparición de PIN1), la alteración de las respuestas a auxinas (cambios en los patrones de expresión del reportador de respuesta a auxinas *DR5:GUS/GFP*), y posiblemente la alteración de la homeostasis (síntesis y catabolismo), lo cual inhibe la división celular en el meristemo de la raíz primaria. La inhibición del

transporte de auxinas, provocado por NO, previene la degradación de las proteínas DELLA a través del proteosoma impidiendo la elongación celular, de una forma similar a lo que proponen estudios genéticos que demuestran como las proteínas DELLA son responsables de los cambios en el crecimiento y desarrollo de las plantas en respuesta a variaciones en el transporte de auxinas (Fu y Harberd, 2003). Finalmente, el NO induce la expresión de proteínas DELLA, pudiendo de esta forma contribuir a reducir la elongación celular.

Las plantas necesitan regular los niveles de NO endógeno con el fin de modular los procesos fisiológicos en los cuales el NO está implicado, como la germinación de las semillas y el establecimiento de plántulas. Por ello, es necesaria una concentración endógena óptima, la cual se puede ver modificada en respuesta a los estímulos que recibe la planta dando lugar a modificaciones en estos procesos (Figura D.4.).

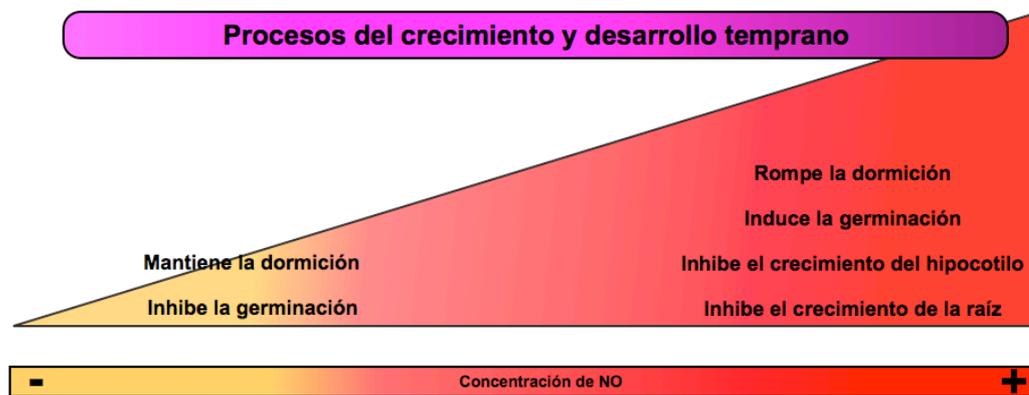
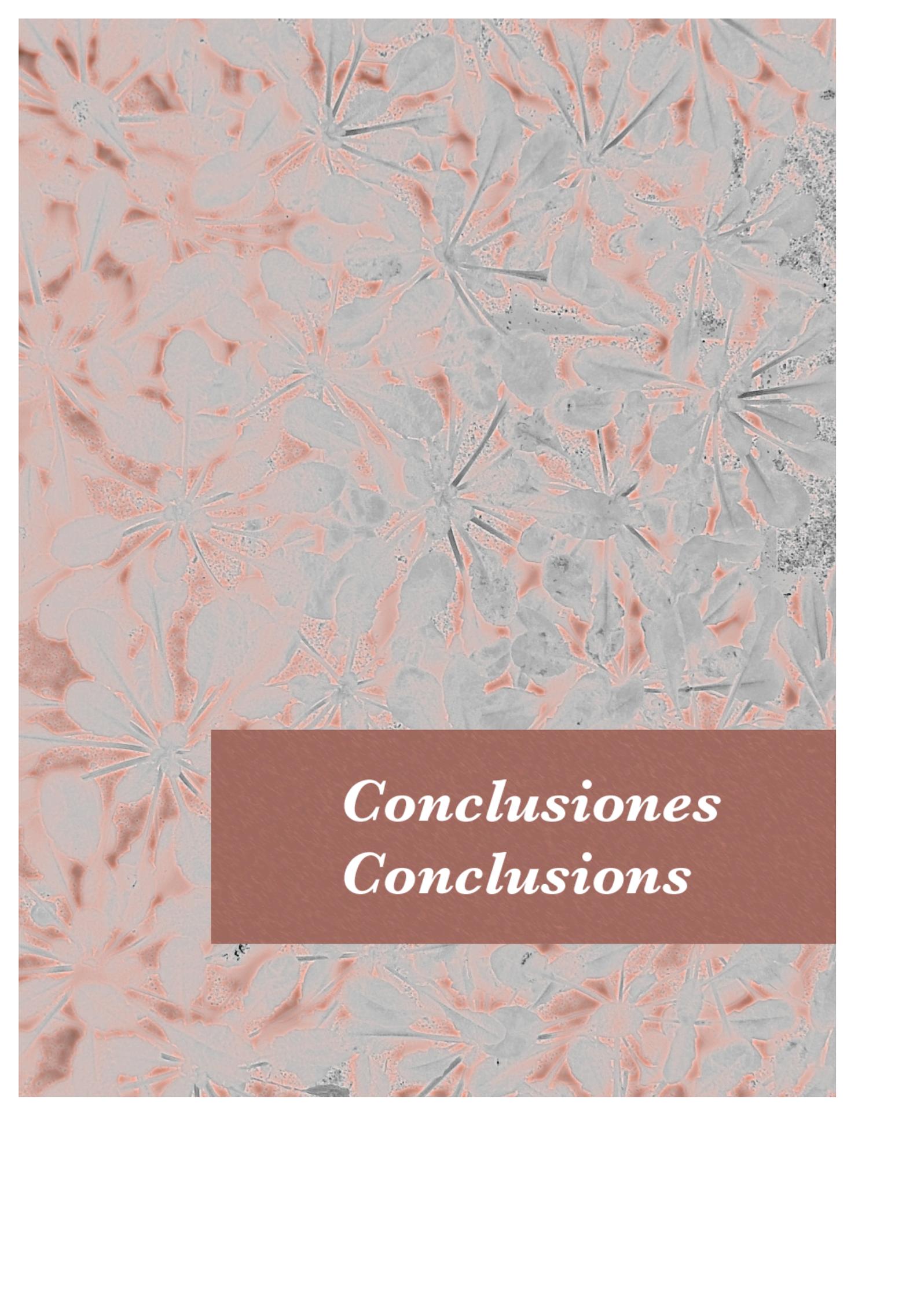


Figura D.4.- Representación esquemática de las respuestas de la planta a NO frente a la concentración de este gas. -: menor concentración de NO, +: mayor concentración de NO.



Conclusiones
Conclusions

Los resultados obtenidos de la caracterización fenotípica, molecular y genética de las respuestas a óxido nítrico (NO) durante los primeros estadios del desarrollo de *Arabidopsis*, así como su papel en los procesos de división y elongación celulares, han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1.- Durante el desarrollo temprano de *Arabidopsis thaliana*, el NO endógeno se acumula principalmente durante la germinación de las semillas, en la zona de diferenciación de raíces de plántulas y en hipocótilos en elongación, todos ellos etapas o estadios esenciales para el establecimiento de la plántula y tejidos donde trabajos previos han sugerido la existencia de fenotipos asociados al NO.

2.- El análisis de una colección de mutantes de inserción de T-DNA, que utiliza como gen reportador β -*GUS*, ha permitido la identificación de 7 genes inducidos o reprimidos por NO, cuyos patrones de expresión corroboran la participación del NO en la regulación de la expresión génica en distintos procesos del desarrollo vegetal.

3.- La identificación y caracterización del gen mutado *NOI1*, inducido por NO, ha permitido deducir que codifica la proteína AtLecPK1, que es un receptor de tipo lectina proteína-kinasa, expresado en los cotiledones de plántulas de *Arabidopsis*. El análisis fenotípico del mutante *noi1* demuestra su implicación en el proceso de dormición y germinación de semillas, actuando como regulador negativo de las respuestas a ABA.

4.- La identificación y caracterización del gen mutado *NOR1*, reprimido por NO, ha permitido comprobar que codifica la proteína AtPATL2 de Clase III, perteneciente a la subfamilia Sec14-GOLD de proteínas de transferencia de fosfatidil inositol. Además, los estudios de ganancia de función con este gen sugieren su participación en el proceso de formación de divisiones asimétricas en la endodermis radicular, pudiendo estar a su vez regulado por el complejo SCARECROW-SHORTROOT.

5.- El análisis transcriptómico de los genes regulados en presencia o ausencia de NO ha mostrado una coregulación entre genes inducidos por NO que al mismo

tiempo aumentan su expresión en presencia de las hormonas ABA o MeJA, sugiriendo que plántulas crecidas en presencia de altas concentraciones de NO muestran una respuesta génica similar a la observada en situaciones de estrés. Del mismo modo, altos niveles de NO promueven la acumulación de fenilpropanoides, fundamentalmente antocianinas y flavonoles, que contribuyen a la detoxificación del NO y la modulación del crecimiento en la raíz asociada al NO, respectivamente.

6.- La presencia de altos niveles de NO disminuye el patrón de expresión de la línea reportadora de respuesta a auxinas *DR5:GUS/GFP*, así como promueve la desaparición del transportador de auxinas PIN1, por un mecanismo independiente de su regulación transcripcional y de la acción degradadora del proteosoma, coincidiendo con la acumulación observada en flavonoles.

7.- El aumento en la concentración de NO, a través de la adición de donadores o de mutantes sobreproductores, promueve la elongación en las células del meristemo de la raíz, y con ello la disminución en el conjunto de células con capacidad de dividirse, como se confirma al analizar el patrón de expresión de la línea marcadora de la fase G2 del ciclo celular *CycB1;1::GUSDB*, observándose una menor tasa de división celular. Por el contrario, la ausencia de NO no tiene efectos significativos en el número de células en división, sugiriendo que el NO endógeno no regula directamente este proceso.

8.- La insensibilidad al NO observada en mutantes afectados en las proteínas DELLA, que actúan como reguladores negativos de las respuestas a GAs, sugiere que el NO inhibe tanto la elongación del hipocotilo como de las células de la zona de diferenciación de la raíz a través de la activación transcripcional de los genes *DELLA*.

9.- Como conclusión final, a lo largo de esta memoria hemos puesto de manifiesto la gran variedad de procesos fisiológicos en los que interviene el NO, tales como la ruptura de la dormición favoreciendo la germinación de semillas, o la inhibición del crecimiento de la raíz y del hipocotilo, posiblemente actuando a través de proteínas como AtLecPK1 y AtPATL2. Nuestros resultados sugieren que el NO modula estos procesos afectando, de forma directa o indirecta, a diferentes rutas de señalización hormonal como GAs, auxinas, ABA y JAs y a procesos metabólicos como la acumulación de fenilpropanoides.

Phenotypic, molecular and genetic analysis of nitric oxide (NO) responses during early *Arabidopsis* development and its role in both, cell division and cell elongation, allow us to conclude that:

1.- During early *Arabidopsis thaliana* development, endogenous NO is mainly accumulated during seed germination, in the differentiation zone in young roots and in elongated hypocotyls, all of them essential stages for seedling establishment.

2.- Analysis of a T-DNA insertion mutant collection, which uses β -*GUS* as a reporter gene, allow us to identify 7 genes up- or down-regulated by NO, whose expression patterns confirm the role of NO in the regulation of gene expression in different plant developmental processes.

3.- The identification and characterization of the NO-induced mutated gene *NOII*, have allowed us to conclude that it codifies for a AtLecPK1 protein, that is a lectin receptor-like protein kinase, expressed in *Arabidopsis* seedling cotyledons. Phenotypic analysis of *noi1* mutant suggests its role in seed dormancy and germination, as a negative regulator of ABA responses.

4.- The identification and characterization of the NO-repressed mutated gene *NORI*, have allowed us to conclude that it codifies for the AtPATL2 protein, a Class III phosphatidylinositol transfer protein-like, which contains a Sec14-GOLD domain. Moreover, gain-of-function analysis suggest its involvement during the activation of asymmetric cell divisions in the endodermis cell layer, probably regulated by SCARECROW- SHORTROOT complex.

5.- Microarray analysis of genes differentially expressed in the presence or absence of NO reveal an over-representation of ABA and MeJA-related genes among those induced by NO, suggesting similarities between NO-response and ABA and JA-stress responses. Furthermore, high levels of NO promote the accumulation of phenylpropanoids, mainly anthocyanins and flavonols, which play a role as free radical scavengers and in the NO-related inhibition of primary root growth, respectively.

6.- High levels of NO modify the expression pattern of the auxin-response marker *DR5:GUS/GFP*, and reduce auxin transport PIN1 abundance by a non-transcriptional regulation mechanism, independent on proteasome activity and in agreement with flavonols accumulation.

7.- Increase of NO levels by using NO-donors or NO-over-accumulator genetic backgrounds promotes cell elongation in root meristem cells, and therefore decreases the pool of dividing cells, confirmed by the expression of the *CycB1;1:GUSDB* G2 cell cycle marker. However, the absence of NO has not any significant effect in cell division rates, suggesting that this process is not directly regulated by endogenous NO.

8.- NO-insensitivity of *della* mutants, described as negative regulator of GA-responses, suggests that NO is able to inhibit hypocotyl elongation and cell elongation in the root differentiation zone through the transcriptional activation of *DELLA* genes.

9.- Taken together, our results allow us to highlight the broad range of physiological processes where NO is involved, such as the promotion of seed germination by breaking seed dormancy or the inhibition of primary root and hypocotyl growth, probably through AtLecPK1 and AtPATL2 molecular players. Our results also suggest that NO regulates these processes affecting, directly or indirectly, different hormonal signalling pathways such as GAs, auxins, ABA and JAs and metabolic processes such as the accumulation of phenylpropanoids.



Apéndices

1.- ABREVIATURAS Y SIGLAS.

Las abreviaturas y siglas utilizadas en este trabajo se muestran a continuación. Los nombres de unidades y sus símbolos han sido utilizados según el Sistema Internacional de Unidades y las sustancias químicas, según el sistema de nomenclatura de la IUPAC.

aa aminoácidos

ABA ácido abscísico

AM meristemo apical

Amp ampicilina

AtLecPK1 lectina proteín-kinasa de Arabidopsis

AtNOS1/AtNOA1 óxido nítrico sintasa de Arabidopsis/ *A. thaliana* NO-associated 1

AtPATL2 patelina 2 de Arabidopsis

BH₄ tetrabiopterina

BM meristemo basal

BRs brasinoesteroides

Ca²⁺ calcio

cADPR ADP ribosa cíclico

CaM calmodulina

cDNA ácido desoxirribonucleico complementario

CWRs enzimas modificadoras de pared celular

GC guanilato cilasa

cGMP guanosín monofosfato cíclico

Ci curios

CNGCs canales iónicos que se abren en respuesta a nucleótidos cíclicos

cPTIO 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide)

CTAB bromuro de cetil trimetilamonio

DAF-2DA diacetato de diaminofluoresceína

DEPC dietil pirocarbonato

DMSO dimetil sulfóxido

DNA ácido desoxirribonucleico

DNasa desoxirribonucleasa

dNTP deoxinucleótidos trifosfato

D.O. densidad óptica (nm)

DPBA ácido difenilbórico 2-aminoetil éster

DTT ditioneitol

EDRF *Endothelium Derived Relaxing Factor*: factor de relajación derivado del endotelio

EDTA ácido etilen-diamino tetraacético

EDZ *elongation-differentiation zone*: zona de elongación y diferenciación

EZ zona de elongación

FDA flavín adenín dinucleótido

FMN flavín mononucleótido

GAs giberelinas

GFP *green fluorescent protein*

GSNO S-Nitrosoglutation

GTP guanosín trifosfato

GUS β -glucuronidasa

h horas

HPLC cromatografía líquida de alta presión

IPR proteínas reguladoras de hierro

IREs elementos de respuesta a hierro

JA ácido jasmónico

Kan kanamicina

LB medio de cultivo de microorganismos Luria-Bertani

LecRK receptor proteín-kinasa de tipo lectina

LR raíces laterales

MAPK proteín-kinasa activada por mitógeno

MeJA jasmonato de metilo

MG132 inhibidor del proteosoma 26S

min minutos

MOPS ácido 3-morfolino propano sulfónico

mRNA ácido ribonucleico mensajero

MS medio de cultivo de plantas de Murashige y Skoog

N₂ nitrógeno líquido

NADPH nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)

Ni-NOR nitrito-NO oxidoreductasa

NO óxido nítrico

NO₃⁻ nitrato

NO₂⁻ nitrito

NOS óxido nítrico sintasa

NPA ácido 1-N-naftilftalámico

NR nitrato reductasa

pb pares de bases

PCR reacción en cadena de la polimerasa

PK proteín-kinasa

PR raíz primaria

PM meristemo principal

qRT-PCR *quantitative real time PCR*: PCR cuantitativa

Rif rifampicina

RLK proteín-kinasa similar a receptores

RNA ácido ribonucleico

RNasa ribonucleasa

ROS especies reactivas de oxígeno

rpm revoluciones por minuto

rRNA ácido ribonucleico ribosómico

RyR canales de calcio sensibles a rianodina o receptores de rianodina

SA ácido salicílico

SCG guanilato ciclase soluble

SDS dodecil sulfato sódico

seg segundos

SNAP S-Nitroso-N-acetil-DL-penicilamina

SNP *sodium nitroprusside*: nitroprusiato sódico

SOC medio de cultivo de microorganismos

SSC tampón salino de citrato sódico

TAIL-PCR *Thermal Asymmetric Interlaced PCR*: PCR térmicamente asimétrica y entrelazada

TBE tampón tris-borato-EDTA

T-DNA DNA transferente

TE tampón tris-EDTA

U unidades de enzima

UV ultravioleta

V voltios

v/v relación volumen/volumen

w/v relación peso/volumen

XOR xantina oxidoreductasa

2.- TABLAS SUPLEMENTARIAS.

Tabla S.1. Genes inducidos por SNP.

ID	M SNPvsSDW	M cPTIOvsSDW	M cPTIOvsSNP	AGI code	Símbolo
250868_at	4.75059576	1.016697555	-3.733898205	At5g03860	MLS
266503_at	4.575536637	0.331526537	-4.2440101	At2g47780	REF
256577_at	3.646632985	0.114621204	-3.532011781	At3g28220	
245928_s_at	3.399448552	0.221788661	-3.177659891	At5g24780	VSP1
257947_at	3.071063616	0.594256562	-2.476807054	At3g21720	ICL
259640_at	3.036785703	0.444739557	-2.592046145	At1g52400	BG1; BGL1
255795_at	2.95564914	0.332116414	-2.623532727	At2g33380	RD20
247951_at	2.707769901	0.951125903	-1.756643998	At5g57240	
250669_at	2.707648662	0.557398329	-2.150250333	At5g06870	PGIP2
265053_at	2.704971639	0.185356517	-2.519615122	At1g52000	
262373_at	2.5990177	0.095729345	-2.503288355	At1g73120	
247717_at	2.557704134	0.284386437	-2.273317697	At5g59320	LTP3
245624_at	2.411832949	-0.960948094	-3.372781043	At4g14090	
251770_at	2.386369362	0.150126786	-2.236242577	At3g55970	JRG21
263595_at	2.356974154	-0.063921199	-2.420895353	At2g01890	PAP8
253285_at	2.30454661	0.021423467	-2.283123144	At4g34250	KCS16
245628_at	2.22874101	-0.15365084	-2.38239185	At1g56650	PAP1
265091_s_at	2.213549725	-1.277540062	-3.491089787	At1g03495	
253041_at	2.172840222	0.447540375	-1.725299847	At4g37870	PCK1
262050_at	2.169561811	-0.102298973	-2.271860784	At1g80130	
264146_at	2.139900533	0.616631572	-1.523268961	At1g02205	CER1
248185_at	1.999269409	-0.814519984	-2.813789392	At5g54060	UF3GT
254232_at	1.972621999	0.605071226	-1.367550773	At4g23600	CORI3
248048_at	1.955689988	-0.87785818	-2.833548168	At5g56080	NAS2
258923_at	1.906162712	-0.285907309	-2.192070021	At3g10450	SCPL7

258151_at	1.882893767	0.067961414	-1.814932353	At3g18080	BGLU44
256139_at	1.850607472	0.061658423	-1.788949049	At1g48660	
260584_at	1.802667662	-0.097897297	-1.900564959	At2g43660	
254016_at	1.78972186	0.864389822	-0.925332037	At4g26150	CGA1/GATA22
262312_at	1.726324198	0.744695043	-0.981629155	At1g70830	MLP28
255443_at	1.721286428	0.140890563	-1.580395865	At4g02700	AST77
266555_at	1.720208235	0.23551303	-1.484695205	At2g46270	GBF3
260357_at	1.717619324	0.665832625	-1.051786699	At1g69260	AFP1
249215_at	1.700397149	-2.298022893	-3.998420042	At5g42800	DFR; TT3
247047_at	1.669915213	0.416405772	-1.253509441	At5g66650	
259573_at	1.653413612	0.639247174	-1.014166438	At1g20390	
253608_at	1.64688538	0.083259247	-1.563626134	At4g30290	XTH19
267266_at	1.638039176	0.250076322	-1.387962854	At2g23150	NRAMP3
247268_at	1.637260514	0.250657976	-1.386602537	At5g64080	
262830_at	1.552913427	-0.061484125	-1.614397552	At1g14700	
249817_at	1.541333122	0.530778868	-1.010554254	At5g23820	PAP3
258938_at	1.540629142	0.521832002	-1.018797139	At3g10080	
262281_at	1.53861167	0.335484043	-1.203127627	At1g68570	
258555_at	1.528613426	-0.166134281	-1.694747707	At3g06860	MFP2
260957_at	1.522914642	0.871766032	-0.65114861	At1g06080	ADS1
266743_at	1.501259568	-0.341954211	-1.843213779	At2g02990	RNS1
253753_at	1.483639733	0.205751697	-1.277888036	At4g29030	
254185_at	1.474336243	0.376493175	-1.097843068	At4g23990	ATCSLG3
263986_at	1.462729422	0.379661907	-1.083067515	At2g42790	CSY3
254508_at	1.460621925	0.581282051	-0.879339874	At4g20170	
256022_at	1.446857452	0.469620822	-0.97723663	At1g58360	AAP1
246917_at	1.437434958	0.99175545	-0.445679508	At5g25280	
252888_at	1.43075043	-1.034512918	-2.465263347	At4g39210	APL3
266142_at	1.42889317	-0.09664241	-1.52553558	At2g39030	GNAT
262357_at	1.425461331	0.068530695	-1.356930636	At1g73040	
246906_at	1.424775227	0.227095207	-1.19768002	At5g25475	
248764_at	1.414823096	0.361715552	-1.053107544	At5g47640	NF-YB2
267256_s_at	1.40746849	-0.949548755	-2.357017245	At2g23000	SCPL10
256970_at	1.402656557	0.196322705	-1.206333852	At3g21090	
250293_s_at	1.393680535	0.945158508	-0.448522027	At5g13360	
252618_at	1.390660017	0.372180006	-1.018480011	At3g45140	LOX2
267376_at	1.381987598	0.154097425	-1.227890174	At2g26330	ER
260719_at	1.37098534	0.643783926	-0.727201413	At1g48090	
257641_s_at	1.358644306	0.357678633	-1.000965672	At3g25760	AOC1
260948_at	1.349623119	0.098807744	-1.250815376	At1g06100	
264514_at	1.347845898	0.336003888	-1.01184201	At1g09500	
258641_at	1.341265183	0.331642091	-1.009623091	At3g08030	
246055_at	1.340020285	0.459519299	-0.880500986	At5g08380	ATAGAL1
249784_at	1.338061932	0.455181097	-0.882880835	At5g24280	GMI1
249895_at	1.333700213	-0.599519261	-1.933219474	At5g22500	FAR1
255723_at	1.33270659	0.592863407	-0.739843183	At3g29575	AFP3
245196_at	1.320467725	-0.04958569	-1.370053415	At1g67750	
265058_s_at	1.320049641	0.169726504	-1.150323138	At1g52040	MBP1
251060_at	1.319198573	0.903475421	-0.415723153	At5g01820	ATSR1
255786_at	1.315632948	-0.293767189	-1.609400137	At1g19670	ATCLH1

245422_at	1.312302373	0.19757406	-1.114728313	At4g17470	
254234_at	1.301311014	-0.227722672	-1.529033686	At4g23680	
261266_at	1.301053904	0.758980605	-0.542073299	At1g26770	ATEXPA10
254283_s_at	1.300738596	-2.0158338	-3.316572395	At4g22870	
259403_at	1.30028154	0.166845232	-1.133436308	At1g17745	PGDH
252365_at	1.29915841	-0.288867678	-1.588026088	At3g48350	
253382_at	1.29436947	0.270451435	-1.023918035	At4g33040	
262875_at	1.286423647	-0.534867463	-1.82129111	At1g64970	G-TMT
260875_at	1.285046997	0.885204182	-0.399842816	At1g21410	SKP2A
253994_at	1.280312825	0.530582353	-0.749730472	At4g26080	ABI1
252168_at	1.278374047	0.246574434	-1.031799612	At3g50440	MES10
250180_at	1.278163557	0.086060315	-1.192105255	At5g14450	
247155_at	1.277978547	0.068147991	-1.209830556	At5g65750	MAP24.10
262181_at	1.277237283	0.230865942	-1.046371341	At1g78060	
259661_at	1.256842886	0.394133591	-0.862709295	At1g55265	
262644_at	1.25477349	0.037458921	-1.217314569	At1g62710	BETA-VPE
261569_at	1.252982809	0.869967835	-0.383014974	At1g01060	LHY
262614_at	1.240687958	0.439197443	-0.801490515	At1g13980	GN
255900_at	1.239815278	0.310556512	-0.929258765	At1g17830	
247189_at	1.239516867	0.940332027	-0.29918484	At5g65390	AGP7
263979_at	1.236172891	0.899255927	-0.336916963	At2g42840	PDF1
266415_at	1.232237657	0.168595223	-1.063642434	At2g38530	LTP2
259391_s_at	1.224204431	0.35379538	-0.870409051	At1g06350	
259381_s_at	1.202407712	0.620059215	-0.582348497	At3g16390	NSP3
258252_at	1.196140814	-0.312455998	-1.508596812	At3g15720	
266988_at	1.188829356	0.243595846	-0.94523351	At2g39310	JAL22
250517_at	1.188118596	0.677369565	-0.510749032	At5g08260	SCPL35
245127_at	1.185297743	0.427892616	-0.757405127	At2g47600	ATMHX
253550_at	1.182256088	-0.097355093	-1.27961118	At4g30960	CIPK6
256676_at	1.180893329	-0.367982725	-1.548876054	At3g52180	DSP4
262230_at	1.173444889	-0.083122426	-1.256567315	At1g68560	XYL1
264019_at	1.170535368	0.064448282	-1.106087086	At2g21130	
261653_at	1.165045296	0.589165534	-0.575879762	At1g01900	ATSBT1.1
251563_at	1.157867104	0.881642436	-0.276224668	At3g57880	
264001_at	1.157184158	-0.109678834	-1.266862992	At2g22420	PER17
251775_s_at	1.15585063	0.25569612	-0.90015451	At3g55610	P5C52
262736_at	1.153153486	-0.37116424	-1.524317726	At1g28570	
255521_at	1.148442416	0.186132896	-0.962309521	At4g02280	SUS3
264052_at	1.147955368	0.383698406	-0.764256962	At2g22330	CYP79B3
246908_at	1.138908883	0.179601234	-0.95930765	At5g25610	RD22
265443_at	1.138204791	0.365280916	-0.772923874	At2g20750	ATEXPB1
251713_at	1.136417268	-0.097544806	-1.233962073	At3g56080	
262682_at	1.131827329	-0.869870634	-2.001697963	At1g75900	EXL3
252011_at	1.130137426	0.863427313	-0.266710113	At3g52720	CAH1
267612_at	1.128656542	0.473095787	-0.655560754	At2g26690	NTP2
248921_at	1.123923223	-1.134014546	-2.257937769	At5g45950	
267175_s_at	1.12189182	0.681115987	-0.440775833	At2g37620	ACT1
264360_at	1.116137554	-0.687157319	-1.803294873	At1g03310	ISA2
246829_at	1.110998067	0.484616311	-0.626381756	At5g26570	PWD

262786_at	1.110951082	0.696382671	-0.414568411	At1g10740	
262360_at	1.102344984	0.499095095	-0.603249889	At1g73080	PEPR1
267035_at	1.099013294	0.305901514	-0.79311178	At2g38400	AGT3
264909_at	1.096848406	0.338092301	-0.758756105	At2g17300	
265452_at	1.096600059	0.06759889	-1.02900117	At2g46510	ATAIB
260541_at	1.087884105	-1.402597288	-2.490481394	At2g43530	DEFL
259375_at	1.085102541	-0.124617233	-1.209719774	At3g16370	
259383_at	1.077113097	0.018737794	-1.058375304	At3g16470	JR1
259616_at	1.075017403	0.435219949	-0.639797454	At1g47960	C/VIF1
248689_at	1.069152797	0.671309303	-0.397843494	At5g48150	PAT1
262103_at	1.068876279	-0.29354614	-1.36242242	At1g02940	ATGSTF5
248382_at	1.065401357	0.560462109	-0.504939248	At5g51890	
265377_at	1.064890112	0.59091468	-0.473975432	At2g05790	
257949_at	1.063004973	0.29172868	-0.771276292	At3g21750	UGT71B1
257954_at	1.060241309	0.795509684	-0.264731624	At3g21760	HYR1
245501_at	1.056517741	0.023720724	-1.032797017	At4g15620	
249866_at	1.049829236	0.788688588	-0.261140648	At5g23010	MAM1
262109_at	1.036739425	0.316563697	-0.720175728	At1g02730	ATCSLD5
246687_at	1.032486931	0.034490668	-0.997996263	At5g33370	
265795_at	1.030789492	0.633727889	-0.397061603	At2g35780	SCPL26
250083_at	1.030362886	-1.773799598	-2.804162484	At5g17220	ATGSTF12
266170_at	1.026288946	0.576448743	-0.449840203	At2g39050	
248613_at	1.019050864	0.723195418	-0.295855446	At5g49555	
250960_at	1.014807741	-0.476666857	-1.491474599	At5g02940	
259329_at	1.010892229	-0.408095988	-1.418988217	At3g16360	AHP4
264508_at	1.008150714	0.510708104	-0.49744261	At1g09570	PHYA
257600_at	1.005752046	0.300029149	-0.705722897	At3g24770	CLE41
257974_at	1.004101587	0.528636253	-0.475465334	At3g20820	
260141_at	1.003476626	0.159433664	-0.844042962	At1g66350	RGL1

Tabla S.2. Genes reprimidos por SNP.

ID	M SNPvsSDW	M cPTIOvsSDW	M cPTIOvsSNP	AGI code	Simbolo
248844_s_at	-3.942057513	1.071958353	5.014015866	At5g46900	LTP
253301_at	-3.828926238	-0.866468767	2.962457471	At4g33720	
266330_at	-3.750239278	0.125977374	3.876216652	At2g01530	MLP329
247965_at	-3.696043097	-0.045519669	3.650523427	At5g56540	AGP14
266353_at	-3.55382548	0.419673015	3.973498496	At2g01520	MLP328
253073_at	-3.356371137	-0.494731404	2.861639732	At4g37410	CYP81F4
251438_s_at	-3.308146278	0.276006358	3.584152637	At3g59930	DEFL
245555_at	-3.217135339	-0.510756105	2.706379235	At4g15390	
245393_at	-3.205469713	-0.351150551	2.854319162	At4g16260	
264923_s_at	-3.121153117	-0.214100133	2.907052984	At1g60740	Peroxiredosina tipo2
254914_at	-3.012843477	-0.404924817	2.60791866	At4g11290	
262131_at	-2.915669234	-0.857118694	2.05855054	At1g02900	RALFL1
254820_s_at	-2.860485894	0.806407036	3.66689293	At4g12510	LTP
262838_at	-2.848308196	-0.783306666	2.06500153	At1g14960	MLP
262427_s_at	-2.846902052	-0.407289863	2.439612189	At1g47600	BGLU34

252170_at	-2.845613213	-0.335453549	2.510159663	At3g50480	HR4
256994_s_at	-2.806740422	-0.787392046	2.019348376	At3g25830	TPS-CIN
257264_at	-2.781893371	-0.398363896	2.383529475	At3g22060	
259276_at	-2.667365887	0.556819909	3.224185796	At3g01190	PER27
253985_at	-2.576837891	-0.343109154	2.233728737	At4g26220	
262260_at	-2.547656477	-0.266844121	2.280812356	At1g70850	MLP34
257774_at	-2.509754415	-0.725169142	1.784585273	At3g29250	
260101_at	-2.498402858	-0.181844465	2.316558393	At1g73260	ATKTI1
253515_at	-2.465639331	-0.854518567	1.611120764	At4g31320	SAUR
262349_at	-2.457485855	0.763407348	3.220893203	At2g48130	
248252_at	-2.424655598	-0.262711048	2.16194455	At5g53250	AGP22
259570_at	-2.391668262	-0.078500595	2.313167667	At1g20440	COR47
249289_at	-2.380278988	-0.739802188	1.6404768	At5g41040	
267209_at	-2.35231718	-0.859463334	1.492853847	At2g30930	
263216_s_at	-2.31992137	0.019047381	2.338968752	At1g30720	
252537_at	-2.266492617	-0.136845639	2.129646978	At3g45710	POT
258419_at	-2.266188038	0.838953317	3.105141354	At3g16670	
254828_at	-2.259802193	1.318350337	3.57815253	At4g12550	AIR1
260234_at	-2.14839663	0.036174596	2.184571226	At1g74460	
247604_at	-2.082889567	-0.532572648	1.550316919	At5g60950	COBL5
267385_at	-2.071689607	-0.235899401	1.835790205	At2g44380	
254361_at	-2.057186269	0.411079168	2.468265437	At4g22212	DEFL
253582_at	-2.029855208	-0.566510963	1.463344245	At4g30670	
257162_s_at	-2.026696099	0.295112253	2.321808352	At3g24290	AMT1;5
264157_at	-2.026420717	-0.379646258	1.646774459	At1g65310	XTH17
265611_at	-2.014552674	-0.264176678	1.750375996	At2g25510	
249195_s_at	-2.010716942	-0.249629566	1.761087376	At5g42500	
245399_at	-1.999288394	0.309116775	2.308405169	At4g17340	TIP2;2
246390_at	-1.985236088	-0.305522335	1.679713752	At1g77330	
267053_s_at	-1.969803226	-0.070347163	1.899456063	At2g38390	
253024_at	-1.966813935	0.803576815	2.77039075	At4g38080	
249918_at	-1.961248542	-0.098406737	1.862841805	At5g19240	
248725_at	-1.94012615	-0.997070518	0.943055632	At5g47980	
256933_at	-1.932953176	0.456939789	2.389892964	At3g22600	
248801_at	-1.907774845	-0.993426678	0.914348168	At5g47370	HAT2
265048_at	-1.886561326	-0.742149417	1.144411909	At1g52050	
252374_at	-1.865457577	-0.883456535	0.982001042	At3g48100	ARR5
249037_at	-1.858537874	0.02901676	1.887554634	At5g44130	FLA13
265948_at	-1.843127888	-0.511178054	1.331949834	At2g19590	ACO1
254474_at	-1.8374571	0.278115853	2.115572954	At4g20390	
264577_at	-1.804871082	-0.021382204	1.783488878	At1g05260	RCI3
253957_at	-1.793026351	0.568348097	2.361374448	At4g26320	AGP13
265049_at	-1.776966345	-0.551589466	1.225376879	At1g52060	
246203_at	-1.768448792	-0.34744521	1.421003582	At4g36610	
254487_at	-1.738889489	-0.967834381	0.771055108	At4g20780	CML42
250983_at	-1.737560984	-0.219399231	1.518161753	At5g02780	GSTL1
249009_at	-1.712477053	-0.410932489	1.301544564	At5g44610	MAP18
265116_at	-1.693953914	-0.086623864	1.60733005	At1g62480	
252612_at	-1.691063611	-0.736609235	0.954454376	At3g45160	

267121_at	-1.687001524	-0.402223711	1.284777813	At2g23540	
264342_at	-1.671054449	0.57653172	2.247586169	At1g12080	
247755_at	-1.665371629	0.849634938	2.515006567	At5g59090	ATSBT4.12
257635_at	-1.627231661	-0.919084351	0.70814731	At3g26280	CYP71B4
248551_at	-1.612705699	-0.383529701	1.229175999	At5g50200	WR3
248208_at	-1.612134712	-0.649231696	0.962903017	At5g53980	ATHB52
247136_at	-1.611136897	-0.362876463	1.248260434	At5g66170	STR18
259311_at	-1.597158053	-0.939473859	0.657684194	At3g05060	
245889_at	-1.595774527	-0.710999393	0.884775133	At5g09480	
247354_at	-1.592786565	-0.689931201	0.902855364	At5g63590	FLS3
255005_at	-1.587730276	-0.624041545	0.963688731	At4g09990	
256937_at	-1.585089469	0.899885648	2.484975117	At3g22620	LTP
251107_at	-1.567799206	-0.846740229	0.721058976	At5g01610	
259925_at	-1.550552553	-0.816052057	0.734500497	At1g75040	PR5
265050_at	-1.548684285	-0.064760182	1.483924103	At1g52070	
259561_at	-1.54157029	-0.239622213	1.301948077	At1g21250	WAK1
266276_at	-1.536965188	-0.652729888	0.8842353	At2g29330	TRI
254534_at	-1.528387656	-0.967630172	0.560757484	At4g19680	IRT2
266292_at	-1.526136617	-0.851864885	0.674271732	At2g29350	SAG13
250500_at	-1.524761736	0.58914799	2.113909726	At5g09530	
267128_at	-1.519207814	-0.62470493	0.894502884	At2g23620	MES1
263836_at	-1.518616159	-0.137985846	1.380630313	At2g40330	PYL6
249545_at	-1.517665261	-0.290641461	1.2270238	At5g38030	
249346_at	-1.512207516	-0.312468946	1.19973857	At5g40780	LHT1
249061_at	-1.502545767	0.096511385	1.599057152	At5g44550	
260419_at	-1.487816501	-0.592976292	0.894840209	At1g69730	
254543_at	-1.479903437	-0.771533221	0.708370217	At4g19810	
265067_at	-1.474180525	-0.171388781	1.302791744	At1g03850	
247477_at	-1.4699321	0.675030277	2.144962377	At5g62340	
266055_at	-1.46985377	-0.983004443	0.486849326	At2g40650	
256935_at	-1.469010073	-0.076771733	1.392238339	At3g22570	LTP
253353_at	-1.448839726	-0.799403957	0.649435769	At4g33730	
264910_at	-1.443963649	-0.77696666	0.666996989	At1g61100	
258617_at	-1.44055159	-0.027232528	1.413319062	At3g03000	
254044_at	-1.432480284	-0.828998439	0.603481846	At4g25820	XTR9
249094_at	-1.42894329	-0.982627462	0.446315828	At5g43890	YUCCA5
252639_at	-1.428795834	-0.826870066	0.601925768	At3g44550	FAR5
261240_at	-1.428079173	-0.126214122	1.301865051	At1g32940	SBT3.5
255904_at	-1.424427379	-0.706075137	0.718352241	At1g17860	
250764_at	-1.422436833	-0.121315996	1.301120836	At5g05960	
253660_at	-1.421970471	0.046221217	1.468191688	At4g30140	CDEF1
254726_at	-1.421210052	-0.502790092	0.91841996	At4g13660	PRR2
266336_at	-1.418485689	0.160822062	1.579307751	At2g32270	ZIP3
254705_at	-1.412240863	-0.867708965	0.544531898	At4g17870	PYR1/ RCAR11
246911_at	-1.408856092	-0.495275939	0.913580153	At5g25810	TINY
251918_at	-1.408624384	-0.086550435	1.322073948	At3g54040	
248518_at	-1.407637516	-0.314007139	1.093630377	At5g50560	
249375_at	-1.406154384	-0.587913678	0.818240706	At5g40730	AGP24
263673_at	-1.400883667	0.07947964	1.480363307	At2g04800	
261500_at	-1.394141058	-0.64789581	0.746245247	At1g28400	

245325_at	-1.389101215	0.616788325	2.00588954	At4g14130	XTR7
247297_at	-1.388350533	0.266344676	1.654695209	At5g64100	
259443_at	-1.381363185	-0.703890316	0.677472869	At1g02360	
246809_s_at	-1.377474065	-0.723532736	0.653941329	At5g27140	
265679_at	-1.371247659	-0.010795291	1.360452368	At2g32240	
258751_at	-1.367739383	0.155061532	1.522800914	At3g05890	RCI2B
263208_at	-1.363825785	-0.647056048	0.716769736	At1g10480	ZFP5
265962_at	-1.358356376	-0.646439081	0.711917295	At2g37460	
247337_at	-1.353306405	-0.097222824	1.25608358	At5g63660	PDF2.5
262317_at	-1.349664088	1.12274487	2.472408958	At2g48140	EDA4
261999_at	-1.34725263	-0.590581319	0.756671311	At1g33800	
247954_at	-1.342637571	0.873996204	2.216633775	At5g56870	BGAL4
254818_at	-1.341806753	-0.274132641	1.067674112	At4g12470	AZI1
251124_s_at	-1.340552893	-0.441917675	0.898635218	At5g01040	LAC8
247586_at	-1.336334279	0.756050137	2.092384415	At5g60660	PIP2;4
247406_at	-1.329138158	-0.115742465	1.213395694	At5g62920	ARR6
248178_at	-1.326945338	0.018820146	1.345765484	At5g54370	
251013_at	-1.319241421	-0.466754154	0.852487267	At5g02540	
267169_at	-1.313790854	-0.446558141	0.867232713	At2g37540	
264872_at	-1.308737319	-0.088258924	1.220478396	At1g24260	AGL9
259365_at	-1.307521407	0.924936261	2.232457668	At1g13300	HRS1
248566_s_at	-1.305356838	-0.080408548	1.224948291	At5g49730	FRO6
265439_at	-1.295977908	-0.862936778	0.43304113	At2g21045	
264404_at	-1.29400607	-0.624644177	0.669361894	At2g25160	CYP82F1
262947_at	-1.291739512	0.377863201	1.669602714	At1g75750	GASA1; GASA5
263970_at	-1.288358088	-0.553507654	0.734850434	At2g42850	CYP718
259952_at	-1.285355131	-0.980658175	0.304696955	At1g71400	ATRLP12
261099_at	-1.284227637	-0.790227839	0.493999799	At1g62980	ATEXPA18
252833_at	-1.282521173	-0.100990274	1.181530899	At4g40090	AGP3
254291_at	-1.280420712	-0.511139395	0.769281318	At4g23010	UTR2
253618_at	-1.277138686	-0.264620126	1.01251856	At4g30420	
264647_at	-1.275370318	-0.33500213	0.940368188	At1g09090	ATRBOHB
247645_at	-1.265347548	-0.665809855	0.599537692	At5g60530	
256759_at	-1.263014382	-0.497427861	0.765586521	At3g25640	
258145_at	-1.261761615	0.344187865	1.60594948	At3g18200	
265545_at	-1.257369928	-0.881029537	0.37634039	At2g28250	
264010_at	-1.256246307	-0.401783464	0.854462842	At2g21100	
260059_at	-1.252827077	-0.188636476	1.064190601	At1g78090	ATTPPB
254392_at	-1.245408337	-0.5191033	0.726305037	At4g21600	ENDO5
247540_at	-1.242873737	-0.468060973	0.774812764	At5g61590	
257625_at	-1.241054528	-0.776102716	0.464951812	At3g26230	CYP71B24
256683_at	-1.236005793	-0.996750862	0.239254932	At3g52220	
266712_at	-1.232346342	0.233497313	1.465843656	At2g46750	
267457_at	-1.230281565	0.929428266	2.15970983	At2g33790	AGP30
249522_at	-1.229412118	-0.848195576	0.381216542	At5g38700	
258545_at	-1.228781512	-0.983855595	0.244925916	At3g07050	
245401_at	-1.225101725	-0.713131753	0.511969971	At4g17670	
267127_at	-1.220024403	-0.634980919	0.585043484	At2g23610	MES3
265326_at	-1.219705537	-0.927348553	0.292356983	At2g18220	

250230_at	-1.217878341	0.578209275	1.796087616	At5g13900	
258017_at	-1.21665664	-0.692309906	0.524346734	At3g19370	
261930_at	-1.21465215	-0.61156578	0.603086369	At1g22440	
253527_at	-1.212911062	0.002855403	1.215766465	At4g31470	
254673_at	-1.207958071	-0.716339659	0.491618412	At4g18430	ATRABA1E
246000_at	-1.206274946	0.273712715	1.479987661	At5g20820	
266669_at	-1.206097244	0.310446987	1.516544231	At2g29750	UGT71C1
254231_at	-1.20562098	-0.37764372	0.82797726	At4g23810	WRKY53
252098_at	-1.202032687	0.89963674	2.101669427	At3g51330	
263935_at	-1.20115258	0.097937598	1.299090178	At2g35930	PUB23
254056_at	-1.193584389	0.220569598	1.414153987	At4g25250	
252589_s_at	-1.192544792	-0.581696367	0.610848424	At3g45650	NAXT1
250200_at	-1.191636569	0.688205843	1.879842412	At5g14130	
260582_at	-1.187877178	-0.666428455	0.521448723	At2g47200	
265031_at	-1.187635662	0.410167872	1.597803534	At1g61590	
249372_at	-1.186724932	-0.948736712	0.23798822	At5g40760	G6PD6
261926_at	-1.185352538	0.126397663	1.3117502	At1g22530	PATL2
262444_at	-1.177621077	-0.085800804	1.091820273	At1g47480	
250741_at	-1.175353746	-0.086883843	1.088469904	At5g05790	
245305_at	-1.171946249	0.363635615	1.535581864	At4g17215	
264624_at	-1.168303459	0.871906815	2.040210273	At1g08930	ERD6
245736_at	-1.167870337	0.679954072	1.847824409	At1g73330	ATDR4
266708_at	-1.164446813	-0.366613638	0.797833175	At2g03200	
266808_at	-1.160644317	-0.884975017	0.275669299	At2g29995	
256137_at	-1.158419264	-0.503483371	0.654935893	At1g48690	
266093_at	-1.155907933	-0.992278257	0.163629676	At2g37990	
247955_at	-1.153683767	-0.999966844	0.153716923	At5g56950	NAP1;3
253743_at	-1.150299662	-0.544991335	0.605308327	At4g28940	
246861_at	-1.148169511	-0.405020686	0.743148825	At5g25890	IAA28
256243_at	-1.146358465	0.424124571	1.570483035	At3g12500	ATHCHIB
247522_at	-1.145387303	0.098380009	1.243767312	At5g61340	
253971_at	-1.140056723	0.566324934	1.706381657	At4g26530	
245172_at	-1.13995947	-0.425074754	0.714884716	At2g47540	
258765_at	-1.139500727	-0.936835934	0.202664793	At3g10710	RHS12
246229_at	-1.131077007	-0.52352867	0.607548338	At4g37160	SKS15
266977_at	-1.119859842	-0.651947662	0.467912181	At2g39420	
266670_at	-1.11812469	-0.129262534	0.988862156	At2g29740	UGT71C2
261886_s_at	-1.115623097	-0.717566531	0.398056566	At1g80700	
263064_at	-1.115138026	-0.440782394	0.674355632	At2g18160	GBF5
249942_at	-1.113140452	-0.356089619	0.757050832	At5g22300	NIT4
249532_at	-1.108295586	-0.984895088	0.123400498	At5g38780	
263594_at	-1.101160788	-0.682489229	0.41867156	At2g01880	PAP7
255127_at	-1.100956824	-0.43768646	0.663270364	At4g08300	
246108_at	-1.099649574	-0.434362414	0.66528716	At5g28630	
248146_at	-1.094145546	-0.617454765	0.47669078	At5g54940	
252502_at	-1.090463069	-0.331621323	0.758841746	At3g46900	COPT2
250774_at	-1.088935977	-0.72473939	0.364196587	At5g05450	
260894_at	-1.088104557	-0.755093898	0.333010659	At1g29220	
257952_at	-1.087698032	-0.657124959	0.430573073	At3g21770	PER30
251368_at	-1.087170362	-0.950733665	0.136436696	At3g61380	

259502_at	-1.086836145	0.848126612	1.934962757	At1g15670	
253667_at	-1.085737051	0.564389613	1.650126664	At4g30170	
256217_at	-1.083393499	0.270173546	1.353567045	At1g56320	
263766_at	-1.080919503	-0.98346841	0.097451093	At2g21440	
247046_at	-1.077739963	-0.801922127	0.275817836	At5g66540	
263947_at	-1.077733698	-0.392586196	0.685147502	At2g35820	
260933_at	-1.07516578	-0.552645824	0.522519956	At1g02470	
246311_at	-1.069082476	-0.868167897	0.200914579	At3g51880	HMGB1
266711_at	-1.066224741	-0.335945635	0.730279106	At2g46740	
254385_s_at	-1.065521742	0.249775347	1.31529709	At4g21830	ATMSRB7
259010_at	-1.06544349	-0.802330348	0.263113142	At3g07340	
265722_at	-1.057268793	-0.378841525	0.678427268	At2g40100	LHCB4.3
247765_at	-1.055727176	-0.020382704	1.035344472	At5g58860	CYP86A1
253975_at	-1.053614659	-0.716488788	0.337125871	At4g26600	
249576_at	-1.053238535	-0.014233668	1.039004867	At5g37690	
259478_at	-1.052148359	-0.090425894	0.961722465	At1g18980	
264346_at	-1.051386185	0.027370499	1.078756684	At1g12010	
256750_at	-1.049385999	-0.239712971	0.809673028	At3g27150	
259264_at	-1.039046372	-0.523822316	0.515224056	At3g01260	
262756_at	-1.037646818	0.065147031	1.102793849	At1g16370	OCT6
258143_at	-1.036900328	-0.558239391	0.478660938	At3g18170	
255929_at	-1.034125858	-0.944536689	0.08958917	At1g12650	
248708_at	-1.032460354	-0.637757121	0.394703233	At5g48560	
263284_at	-1.032360616	0.576218334	1.60857895	At2g36100	
252045_at	-1.028519641	-0.144125791	0.88439385	At3g52450	PUB22
257512_at	-1.019849697	-0.427974856	0.591874841	At1g35250	
251219_at	-1.019664142	-0.649074925	0.370589217	At3g62390	TBL6
249057_at	-1.019627123	-0.198748854	0.82087827	At5g44480	DUR
253545_at	-1.018196775	-0.68362548	0.334571295	At4g31310	
253227_at	-1.017350759	-0.697483397	0.319867362	At4g35030	
254025_at	-1.014150272	-0.373123759	0.641026512	At4g25790	
247002_at	-1.013453451	-0.941524538	0.071928913	At5g67320	HOS15
254313_at	-1.01012367	0.295352824	1.305476494	At4g22460	
263376_at	-1.009167373	-0.836766612	0.17240076	At2g20520	FLA6
267240_at	-1.007502568	-0.528520882	0.478981686	At2g02680	
252224_at	-1.006360155	-0.547665441	0.458694714	At3g49860	ATARLA1B
263998_at	-1.005606482	0.45806223	1.463668712	At2g22510	
259056_at	-1.004675264	-0.979970355	0.024704909	At3g03420	
267523_at	-1.001629345	0.378911559	1.380540904	At2g30610	

Table S.3.- Tiempo retención (Rt), longitud de onda de máxima absorción en la región visible (λ_{\max}), datos del espectro de masas y posible identificación de los flavonoles detectados en plántulas de Arabidopsis.

Picos	Rt (min)	λ_{\max} (nm)	Ión molecular [M+H] ⁺ (m/z)	MS ² (m/z)	Identificación
1	9.5	332	385	223	Sinapoyl-glycoside ester.
2	16.5	358	-	-	Unknown.
3	18.1	320	-	-	Unknown.
4	20.3	346	755	609.447.301	Quercetin glycoside (2 rhamnosyl + 1 glucosyl moieties).
5	21.7	328	339	223	Sinapoyl-malic acid ester.
6	24.2	354	609	447.301	Quercetin 3-O-glucoside 7-O-glucoside.
7	31.3	346	593	447.285	Kaempferol 3-O- rhamnoside 7-Oglucoside.
8	32.6	348	593	447.301	Quercetin 3-O- rhamnoside 7-Orhamnoside.
9	35.0	352	623	477.315	Isorhamnetin 3-O- rhamnoside 7-Oglucoside.
10	42.6	344	577	477.285	Kaempferol 3-O-rhamnoside-7-Orhamnoside.
11	47.8	368	447	301	Quercetin rhamnoside.
12	52.6	366	431	285	Kaempferol rhamnoside.

Table S.4.- Tiempo retención (Rt), longitud de onda de máxima absorción en la región visible (λ_{\max}), datos del espectro de masas y posible identificación de las antocianinas detectadas en plántulas de Arabidopsis.

Picos	Rt (min)	λ_{\max} (nm)	Ión molecular [M+H] ⁺ (m/z)	MS ² (m/z)	Identificación
1	19.7	540	-		Unknown cyanidin derivative 1.
2	25.4	544	1341		Cyanidin 3-O-[2-O-(sinapoyl)- β -xylopyranosyl]-6-O-(4-O-(β -glucopyranosyl)-p-coumaroyl)- β -glucopyranoside]-5-O[6-O-(malonyl) β -glucopyranoside] <i>Isomer 1</i> .
3	32.9	540	-		Unknown cyanidin derivative 2.
4	41.5	538	1341	1179.1095.629.591.449.287	Cyanidin 3-O-[2-O-(sinapoyl)- β -xylopyranosyl]-6-O-(4-O-(β -glucopyranosyl)-p-coumaroyl)- β -glucopyranoside]-5-O[6-O-(malonyl) β -glucopyranoside] <i>Isomer 2</i> .
5	49.3	534	1179		Cyanidin 3-O-[2-O-(sinapoyl)- β -xylopyranosyl]-6-O-(4-O-(β -glucopyranosyl)-p-coumaroyl)]-5-O[6-O-(malonyl) β -glucopyranoside].

Tabla S.5.- Características y composición de aa de la proteína AtLecPK1.

Características de la proteína	
Longitud	683 aa
Peso molecular	75.9 KDa
Punto isoeléctrico	9.15
Carga pH 7.0	13.00

Aminoácidos	Números	% Frecuencia
Cargados (RKHYCDE)	185	27.09
Ácidos (DE)	67	9.81
Básicos (KR)	78	11.42
Polares (NCQSTV)	181	26.50
Hidrofóbicos (AILFWV)	238	34.85
Ala (A)	35	5.12
Cya (C)	4	0.59
Asp (D)	32	4.69
Glu (E)	35	5.12
Phe (F)	36	5.27
Gly (G)	58	8.49
His (H)	13	1.90
Ile (I)	38	5.56
Lys (K)	36	5.27
Leu (L)	71	10.40
Met (M)	14	2.05
Asn (N)	37	5.42
Pro (P)	33	4.83
Gln (Q)	19	2.78
Arg (R)	42	6.15
Ser (S)	62	9.08
Thr (T)	36	5.27
Val (V)	51	7.47
Trp (W)	7	1.02
Tyr (Y)	23	3.37

Tabla S.6. Características y composición de aa de la proteína AtPATL2.

Características de la proteína	
Longitud	684 aa
Peso molecular	76.1 KDa
Punto isoeléctrico	4.86
Carga pH 7.0	-31.59

Aminoácidos	Números	% Frecuencia
Cargados (RKHYCDE)	245	35.82
Ácidos (DE)	130	19.01
Básicos (KR)	98	14.33
Polares (NCQSTV)	147	21.49
Hidrofóbicos (AILFWV)	237	34.65
Ala (A)	66	9.65
Cya (C)	1	0.15
Asp (D)	20	2.92
Glu (E)	110	16.08
Phe (F)	28	4.09
Gly (G)	20	2.92
His (H)	2	0.29
Ile (I)	28	4.09
Lys (K)	81	11.84
Leu (L)	34	4.97
Met (M)	3	0.44
Asn (N)	11	1.61
Pro (P)	46	6.73
Gln (Q)	17	2.49
Arg (R)	17	2.49
Ser (S)	45	6.58
Thr (T)	59	8.63
Val (V)	74	10.82
Trp (W)	7	1.02
Tyr (Y)	14	2.05
Glx (Z)	1	0.15

3.- FIGURAS SUPLEMENTARIAS.

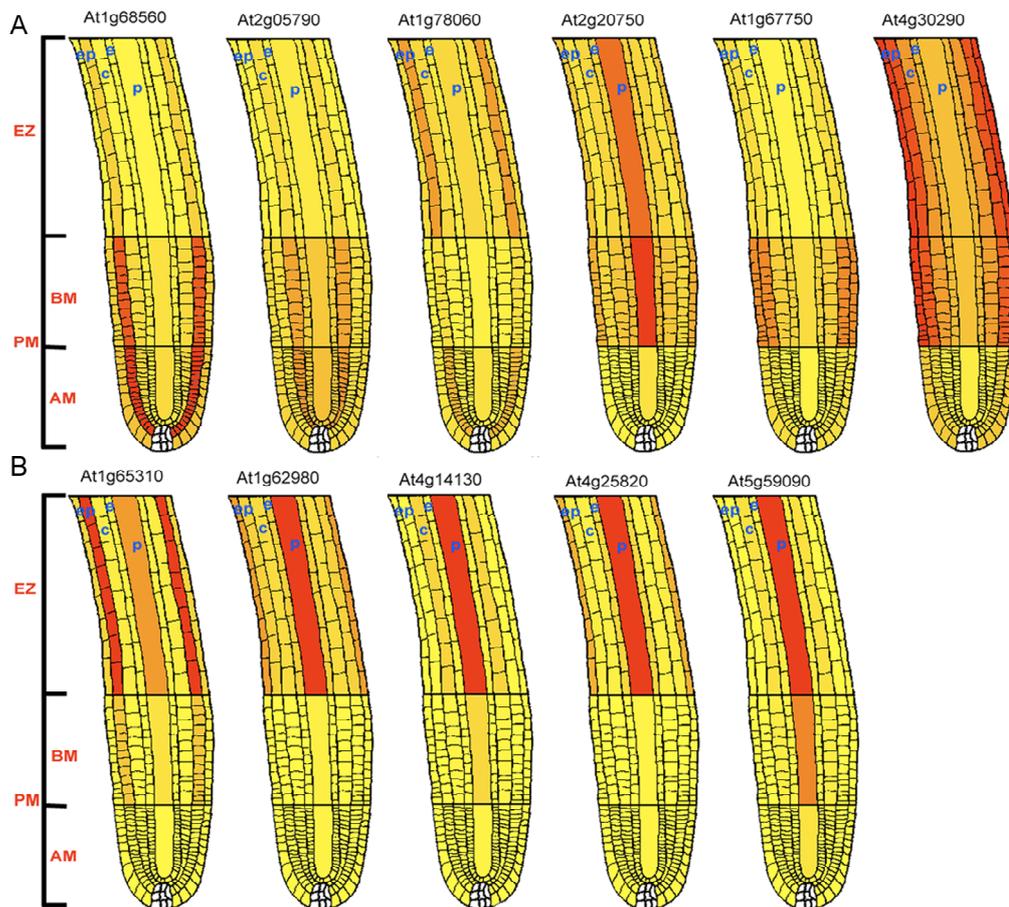


Figura S.1.-Patrón de expresión de genes que codifican enzimas de pared celular (CWRs) que presentan una expresión diferencial en respuesta a NO (BAR: <http://www.bar.utoronto.ca>) (Winter et al., 2007). (A) Genes inducidos por NO: At1g68560, At2g05790, At1g78060, At2g20750, At1g67750 y At4g30290. (B) Genes reprimidos por NO: At1g65310, At1g62980, At4g14130, At4g25820 y At5g59090. PM: meristemo primario, EZ: zona de elongación, AM: meristemo apical, BM: meristemo basal.



Bibliografía

- Achard, P., Liao, L., Jiang, C., Desnos, T., Bartlett, J., Fu, X. y Harberd, N.P.** (2007). DELLAs contribute to plant photomorphogenesis. *Plant Physiol.* **143**, 1163-1172.
- Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., Beemster, G.T. y Genschik, P.** (2009). Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in Arabidopsis. *Curr Biol.* **19**, 1188-1193.
- Ahern, G., Klyachko, V. y Jackson, M.** (2002). cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends Neurosci.* **25**, 510-517.
- Ahlfors, R., Brosché, M., Kollist, H. y Kangasjärvi, J.** (2008). Nitric oxide modulates ozone-induced cell death, hormone biosynthesis and gene expression in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **58**, 1-12.
- Aitchitt, M., Ainsworth, C. y Thangavelu, M.** (1993). A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from mature leaves of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Plant Molecular Biology Reporter.* **11**, 317-319.
- Alabadí, D., Gil, J., Blázquez, M.A. y García-Martínez, J.L.** (2004). Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol.* **134**, 1050-1057.
- Allen, G., Chu, S., Schumacher, K., Shimazaki, C., Vafeados, D., Kemper, A., Hawke, S., Tallman, G., Tsien, R., Harper, J., Chory, J. y Schroeder, J.** (2000). Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in Arabidopsis det3 mutant. *Science.* **289**, 2338-2342.
- Allen-Baume, V., Ségui, B. y Cockcroft, S.** (2002). Current thoughts on the phosphatidylinositol transfer protein family. *FEBS Lett.* **531**.
- An, L.Z., Liu, Y.H. y Zhang, M.X.** (2005). Effect of nitric oxide on growth of maize seedling leaves in the presence or absence of ultraviolet-B radiation. *J. Plant Physiol.* **162**, 317-326.
- Anantharaman, V. y Aravind, L.** (2002). The GOLD domain, a novel protein module involved in Golgi function and secretion. *Genome Biol.* **3**, 0023.0021-0023.0027.
- Badri, D., Loyola-Vargas, V., Du, J., Stermitz, F., Broeckling, C., Iglesias-Andreu, L. y Vivanco, J.** (2008). Transcriptome analysis of Arabidopsis roots treated with signaling compounds: a focus on signal transduction, metabolic regulation and secretion. *New Phytol.* **179**, 209-223.
- Ball, L., Accotto, G.P., Bechtold, U., Creissen, G., Funck, D., Jimenez, A., Kular, B., Leyland, N., Mejia-Carranza, J., Reynolds, H., Karpinski, S. y Mullineaux, P.M.** (2004). Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell.* **16**, 2448-2462.
- Baluska, F., Mancuso, S. y Volkmann, D.** (2006). *Communication in Plants.* (Springer).
- Barceló, A., Pomar, F., Ferrer, M., Martínez, P., Ballesta, M. y Pedreño, M.** (2002). In situ characterization of a NO-sensitive peroxidase in the lignifying xylem of *Zinnia elegans*. *Physiol Plant.* **114**, 33-40.

- Barre, A., Hervé, C., Lescure, B. y Rougé, P.** (2002). Lectin receptor kinases in plants. *Crit Rev Plant Sci.* **21**, 379-399.
- Batak, I., Devic, M., Giba, Z., Grubisic, D., Poff, K. y Konjevic, R.** (2002). The effects of potassium nitrate and NO donors on phytochrome A- and phytochrome B-specific induced germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Seed Sci Res.* **12**, 253-259.
- Beck, K., Eberhardt, W., Frank, S., Huwiler, A., Messmer, U., Muhl, H. y Pfeilschifter, J.** (1999). Inducible NO synthase: role in cellular signalling. *J Exp Biol.* **202**, 645-653.
- Belenghi, B., Acconcia, F., Trovato, M., Perazzolli, M., Bocedi, A., Polticelli, F., Ascenzi, P. y Delledonne, M.** (2003). AtCYS1, a cystatin from *Arabidopsis thaliana*, suppresses hypersensitive cell death. *Eur J Biochem.* **270**, 2593-2604.
- Beligni, M. 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., Fath, A., Bethke, P., Lamattina, L. y Jones, R.** (2002). Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. *Plant Physiol.* **129**, 1642-1650.
- Beligni, M.V. y Lamattina, L.** (1999). Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. *Planta.* **208**, 337-344.
- Benjamini, Y. y Hochberg, Y.** (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc. B.* **57**, 289-300.
- Benkova, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertova, D., Jurgens, G. y Friml, J.** (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell.* **115**, 591-602.
- Besson-Bard, A., Gravot, A., Richaud, P., Auroy, P., Duc, C., Gaymard, F., Tacannat, L., Renou, J.P., Pugin, A. y Wendehenne, D.** (2009). Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiol.* **149**, 1302-1315.
- Bethke, P., Badger, M. y Jones, R.** (2004a). Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell.* **16**, 332-341.
- Bethke, P., Libourel, I. y Jones, R.** (2006). Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* **57**, 517-526.
- Bethke, P., Libourel, I., Aoyama, N., Chung, Y., Still, D. y Jones, R.** (2007). The *Arabidopsis* aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Physiology.* **143**, 1173-1188.
- 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.
- Bevan, M.** (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* **12**, 8711-8721.
- Bewley, J.** (1997). Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell.* **9**, 1055-1066.

- Bhalerao, R., Eklof, J., Ljung, K., Marchant, A., Bennett, M. y Sandberg, G.** (2002). Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* **29**, 325-332.
- Birnboim, H.C. y Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* **7**, 1513-1523.
- Bloor, S. y Abrahams, S.** (2002). The structure of the major anthocyanin in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry.* **59**, 343-346.
- Bradford, 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.
- Bray, E.** (1997). Plant responses to water deficit. *Trend in PLant Sciences.* **2**, 48-54.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S. y Neill, S.J.** (2006). ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J.* **45**, 113-122.
- Brown, D.E., Rashotte, A.M., Murphy, A.S., Normanly, J., Tague, B.W., Peer, W.A., Taiz, L. y Muday G.K.** (2001). Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**, 524-535.
- Bryan, N.S.** (2006). Nitrite in nitric oxide biology: cause or consequence? A systems-based review. *Free Radic Biol Med.* **41**, 691-701.
- Bryan, N.S., Fernandez, B.O., Bauer, S.M., Garcia-Saura, M.F., Milsom, A.B., Rassaf, T., Maloney, R.E., Bharti, A., Rodriguez, J. y Feelisch, M.** (2005). Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues. *Nat Chem Biol.* **1**, 290-297.
- Buchanan-Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., Mathas, E., Navabpour, S., Page, T. y Pink, D.** (2003). The molecular analysis of leaf senescence-A genomic approach. *Plant Biotechnol. J.* **1**, 3-22.
- Buer, C.S. y Muday, G.K.** (2004). The transparent testa4 mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of *Arabidopsis* roots to gravity and light. *Plant Cell.* **16**, 1191-1205.
- Burkhard, P., Stetefeld, J. y Strelkov, S.V.** (2001). Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.* **11**, 82-88.
- Burnett, E., Desikan, R., Moser, R. y Neill, S.** (2000). ABA activation of an MBP kinase in *Pisum sativum* epidermal peels correlates with stomatal responses to ABA. *J Exp Bot.* **51**, 197-205.
- Burnette, W.N.** (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* **112**, 195-203.
- Bushart, T.J. y Roux, S.J.** (2007). Conserved features of germination and polarized cell growth: a few insights from a pollen-fern spore comparison. *Ann Bot.* **99**, 9-17.

- Capone, R., Tiwari, B. y Levine, A.** (2004). Rapid transmission of oxidative and nitrosative stress signals from roots to shoots in Arabidopsis. *Plant Physiol Biochem.* **42**, 425-428.
- Casal, J. y Sanchez, R.** (1998). Phytochromes and seed germination. *Seed Sci Res.* **8**, 317-329.
- Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G. y Bennett, M.** (2003). Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends Plant Sci.* **8**, 165-171.
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inze, D., Sandberg, G., Casero, P. y Bennett, M.** (2001). Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *Plant Cell.* **13**, 843-852.
- Cecconi, D., Orzetti, S., Vandelle, E., Rinalducci, S., Zolla, L. y Delledonne, M.** (2009). Protein nitration during defense response in Arabidopsis thaliana. *Electrophoresis.* **30**, 2460-2468.
- Chaki, M., Fernández-Ocaña, A.M., Valderrama, R., Carreras, A., Esteban, F.J., Luque, F., Gómez-Rodríguez, M.V., Begara-Morales, J.C., Corpas, F.J. y Barroso, J.B.** (2009). Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower-mildew interaction. *Plant Cell. Physiol.* **50**, 265-279.
- Clarke, A., Desikan, R., Hurst, R., Hancock, J. y Neill, S.** (2000). NO way back: nitric oxide and programmed cell death in Arabidopsis thaliana suspension cultures. *Plant J.* **24**, 667-677.
- Clough, S.J. y Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **16**, 735-743.
- Cock, J., Vanoosthuysse, V. y Gaude, T.** (2002). Receptor kinase signalling in plants and animals: distinct molecular systems with mechanistic similarities. *Curr Opin Cell Biol.* **14**, 230-236.
- Colón-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T. y Doerner, P.** (1999). Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.* **20**, 503-508.
- Cooper, C.E.** (1999). Nitric oxide and iron proteins. *Biochim Biophys Acta.* **1411**, 290-309.
- Corpas, F.J., Chaki, M., Fernández-Ocaña, A., Valderrama, R., Palma, J.M., Carreras, A., Begara-Morales, J.C., Airaki, M., del Río, L.A. y Barroso, J.B.** (2008). Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant Cell Physiol.* **48**, 1711-1722.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M. y Lamattina, L.** (2004). Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta.* **218**, 900-905.
- Correa-Aragunde, N., Lombardo, C. y Lamattina, L.** (2008). Nitric oxide: an active nitrogen molecule that modulates cellulose synthesis in tomato roots. *New Phytol.* **179**, 386-396.

- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., Chevalier, C. y Lamattina, L.** (2006). Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *J Exp Bot.* **57**, 1341-1351.
- Crawford, N. y Guo, F.** (2005). New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends Plant Sci.* **10**, 195-200.
- Crawford, N.M.** (2006). Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *J Exp Bot.* **57**, 471-478.
- Cui, H. y Benfey, P.N.** (2009). Interplay between SCARECROW, GA and LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 in ground tissue patterning in the Arabidopsis root. *Plant J.* **58**, 1016-1027.
- Dangl, J. y Jones, J.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature.* **411**, 826-833.
- Dangl, J., Dietrich, R. y Thomas, H.** (2000). Senescence and programmed cell death. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants.*, G.W.a.J.R. Buchanan BB., esd., ed (Rockville, MD: American Society of Plants Biologists.), pp. 1044-1100.
- Davière, J.M., de Lucas, M. y Prat, S.** (2008). Transcriptional factor interaction: a central step in DELLA function. *Curr Opin Genet Dev.* **18**, 295-303.
- Davies, P.J.** (1995). *The plant hormones: their nature, occurrence and functions.* (Dordrecht: Kluwer Press).
- De Grauwe, L., Vandenbussche, F., Tietz, O., Palme, K. y Van Der Straeten, D.** (2005). Auxin, ethylene and brassinosteroids: tripartite control of growth in the Arabidopsis hypocotyl. *Plant Cell Physiol.* **46**, 827-836.
- de Lucas, M., Davière, J.M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blázquez, M.A., Titarenko, E. y Prat, S.** (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature.* **451**, 480-484.
- de Pinto, M., 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.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M. y Leemans, J.** (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* **13**, 4777-4788.
- 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.
- Delledonne, M.** (2005). NO news is good news for plants. *Curr Opin Plant Biol.* **8**, 390-396.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A. y Lamb, C.** (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature.* **394**, 585-588.

- 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 U S A.* **98**, 13454-13459.
- Dello Ioio, R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M.T., Aoyama, T., Costantino, P., y Sabatini, S.** (2008). A genetic framework for control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science.* **322**, 1380-1384.
- Desikan, R., Hancock, J. y Neill, S.** (2003). Oxidative stress signaling. In *Topics in current genetics.*, S.K. Hirt H, eds., ed (UK: Springer-Verlag), pp. 121-150.
- 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 U S A.* **99**, 16314-16318.
- Desikan, R., Cheung, M., Bright, J., Henson, D., Hancock, J. y Neill, S.** (2004). ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *J Exp Bot.* **55**, 205-212.
- Di Laurenzio, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J.E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M.G., Feldmann, K.A. y Benfey, P.N.** (1996). The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell.* **86**, 423-433.
- Di Paola-Naranjo, R., Sánchez-Sánchez, J., González-Paramás, A. y Rivas-Gonzalo, J.** (2004). Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of anthocyanin composition of dark blue bee pollen from *Echium platagineum*. *Journal of Chromatography A.* **1054**, 205-210.
- 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 Lett.* **542**, 136-139.
- DiDonato, R.J., Roberts, L., Sanderson, T., Eisley, R. y Walker, E.** (2004). *Arabidopsis* Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. *Plant J.* **39**, 403-414.
- Dill, A. y Sun, T.P.** (2001). Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics.* **159**, 777-785.
- Dordas, C., Hasinoff, B.B., Igamberdiev, A.U., Manac'h, N., Rivoal, J. y Hill, R.D.** (2003). Expression of a stress-induced hemoglobin affects NO levels produced by alfalfa root cultures under hypoxic stress. *Plant J.* **35**, 763-770.
- Durner, J. y Klessig, D.F.** (1999). Nitric oxide as a signal in plants. *Curr Opin Plant Biol.* **2**, 369-372.
- Durner, J., Wendehenne, D. y Klessig, D.** (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 10328-10333.

- Farmer, E.E., Weber, H. y Vollenweider, S.** (1998). Fatty acid signaling in Arabidopsis. *Planta*. **206**, 167-174.
- 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 U S A*. **102**, 8054-8059.
- Feijó, J.A., Costa, S.S., Prado, A.M., Becker, J.D., y Certal, A.C.** (2004). Signalling by tips. *Curr Opin Plant Biol*. **7**, 589-998.
- Feng, S., Chen, J.K., Yu, H., Simon, J.A. y Schreiber, S.L.** (1994). Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science*. **266**, 1241-1247.
- Finkelstein, R. y Gibson, S.** (2002). ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd? *Curr Opin Plant Biol*. **5**, 26-32.
- Fleet, C.M. y Sun, T.P.** (2005). A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol*. **8**, 77-85.
- Flores, T., Todd, C.D., Tovar-Mendez, A., Dhanoa, P., Correa-Aragunde, N., Hoyos, M.E., Brownfield, D.M., Mullen, R.T., Lamattina, L. y Polacco, J.C.** (2008). Arginase-negative mutants of Arabidopsis exhibit increased nitric oxide signaling in root development. *Plant Physiol*. **147**, 1936-1946.
- Flores-Pérez, U., Sauret-Güeto, S., Gas, E., Jarvis, P. y Rodríguez-Concepción, M.** (2008). A mutant impaired in the production of plastome-encoded proteins uncovers a mechanism for the homeostasis of isoprenoid biosynthetic enzymes in Arabidopsis plastids. *Plant Cell*. **20**, 1303-1315.
- Floryszak-Wieczorek, J., Milczarek, G., Arasimowicz, M. y Ciszewski, A.** (2006). Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? *Planta* **224**, 1363-1372.
- Foissner, I., Wendehenne, D., Langebartels, C. y Durner, J.** (2000). In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *Plant J*. **23**, 817-824.
- Ford, M.G., Pearse, B.M., Higgins, M.K., Vallis, Y., Owen, D.J., Gibson, A., Hopkins, C.R., Evans, P.R. y McMahon, H.T.** (2001). Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P₂ and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science*. **291**, 1051-1055.
- Forman, H.J., Fukuto, J.M., Miller, T., Zhang, H., Rinna, A. y Levy, S.** (2008). The chemistry of cell signaling by reactive oxygen and nitrogen species and 4-hydroxynonenal. *Arch Biochem Biophys*. **477**, 183-195.
- Friml, J.** (2003). Auxin transport - shaping the plant. *Curr Opin Plant Biol*. **6**, 7-12.
- Fu, X. y Harberd, N.** (2003). Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. *Nature*. **421**, 740-743.
- Fukuda, H.** (1996). Xylogenesis: initiation, progression, and cell death. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. **47**, 299-325.

- Gabaldon, C., Gomez Ros, L., Pedreno, M. y Ros Barcelo, A.** (2005). Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans*. *New Phytol.* **165**, 121-130.
- Garces, H., Durzan, D. y Pedroso, M.C.** (2001). Mechanical stress elicits nitric oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot.* **87**, 567-574.
- Garcia-Mata, C. y Lamattina, L.** (2001). Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiology.* **126**, 1196-1204.
- Garcia-Mata, C. y Lamattina, L.** (2002). Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant Physiol.* **128**, 790-792.
- Garcia-Mata, C. y Lamattina, L.** (2003). Abscisic acid, nitric oxide and stomatal closure - is nitrate reductase one of the missing links? *Trends Plant Sci.* **8**, 20-26.
- Garcia-Mata, C., Gay, R., Sokolovski, S., Hills, A., Lamattina, L. y Blatt, M.** (2003). Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 11116-11121.
- Gendreau, E., Traas, J., Desnos, T., Grandjean, O., Caboche, M. y Höfte, H.** (1997). Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **114**, 295-305.
- Giba, Z., Grubisic, D., Todorovic, S., Sajc, L., Stojakovic, D. y Konjevic, T.** (1998). Effect of nitric oxide-releasing compounds on phytochrome-controlled germination of Empress tree seeds. *Plant Growth Reg.* **26**, 175-181.
- Gibson, A. y Garbers, D.** (2000). Guanylyl cyclases as a family of putative odorant receptors. *Annu Rev Neurosci.* **23**, 417-439.
- Gladwin, M.T., Schechter, A.N., Kim-Shapiro, D.B., Patel, R.P., Hogg, N., Shiva, S., Cannon, R.r., Kelm, M., Wink, D.A., Espey, M.G., Oldfield, E.H., Pluta, R.M., Freeman, B.A., Lancaster, J.R.J., Feelisch, M. y Lundberg, J.O.** (2005). The emerging biology of the nitrite anion. *Nat Chem Biol.* **1**, 308-314.
- Glazebrook, J.** (2001). Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*-2001 status. *Curr Opin Plant Biol.* **4**, 301-308.
- Gould, K.S., Lamotte, O., Klinguer, A., Pugin, A. y Wendehenne, D.** (2003). Nitric oxide production in tobacco leaf cells: A generalized stress response? *Plant Cell Environ.* **26**, 1851-1862.
- Graham, T.** (1998). Flavonoids and flavonol glycoside metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem.* **36**, 165-144.
- Grappin, P., Bouinot, D., Sotta, B., Miginiac, E. y Jullien, M.** (2000). Control of seed dormancy in *Nicotiana glauca*: post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta.* **210**, 279-285.
- Graziano, M., Beligni, M. y Lamattina, L.** (2002). Nitric oxide improves internal iron availability in plants. *Plant Physiol.* **130**, 1852-1859.

- Groover, A. y Jones, A.M.** (1999). Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiol.* **119**, 375-384.
- Grün, S., Lindermayr, C., Sell, S. y Durner, J.** (2006). Nitric oxide and gene regulation in plants. *J Exp Bot.* **57**, 507-516.
- Guo, F. y Crawford, N.** (2005). Arabidopsis nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell.* **17**, 3436-3450.
- Guo, F., Okamoto, M. y Crawford, N.** (2003). Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science.* **302**, 100-103.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166**, 557-580.
- Hanks, S., Quinn, A. y Hunter, T.** (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science.* **241**, 42-52.
- Hara, M.R., Agrawal, N., Kim, S.F., Cascio, M.B., Fujimuro, M., Ozeki, Y., Takahashi, M., Cheah, J.H., Tankou, S.K., Hester, L.D., Ferris, C.D., Hayward, S.D., Snyder, S.H. y Sawa, A.** (2005). S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat Cell Biol.* **7**, 665-674.
- He, Y., Tang, R., Hao, Y., Stevens, R., Cook, C., Ahn, S., Jing, L., Yang, Z., Chen, L., Guo, F., Fiorani, F., Jackson, R., Crawford, N. y Pei, Z.** (2004). Nitric oxide represses the Arabidopsis floral transition. *Science.* **305**, 1968-1971.
- Herrmann, H. y Aebi, U.** (2000). Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol.* **12**, 79-90.
- Holdaway-Clarke, T.L. y Hepler, P.K.** (2003). Control of pollen tube growth: role of ion gradients and fluxes. *The New Phytologist.* **159**, 539-563.
- Holtgreffe, S., Gohlke, J., Starmann, J., Druce, S., Klocke, S., Altmann, B., Wojtera, J., Lindermayr, C. y Scheibe, R.** (2008). Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications. *Physiol Plant.* **133**, 211-228.
- Howard, C.J.** (1980). *Stratospheric chemistry and the ozone problem.* (New York: Academic Press).
- Hu, X., Neill, S., Tang, Z. y Cai, W.** (2005). Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiol.* **137**, 663-670.
- Huang, S., Kerschbaum, H., Engel, E. y Hermann, A.** (1997). Biochemical characterization and histochemical localization of nitric oxide synthase in the nervous system of the snail, *Helix pomatia*. *J Neurochem.* **69**, 2516-2528.

- Huang, X., von Rad, U. y Durner, J.** (2002). Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta*. **215**, 914-923.
- Huang, X., Stettmaier, K., Michel, C., Hutzler, P., Mueller, M. y Durner, J.** (2004). Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. **218**, 938-946.
- Imanishi, S., Kito-Nakamura, K., Matsuoka, K., Morikami, A. y Nakamura, K.** (1997). A major jasmonate-inducible protein of sweet potato, ipomoelin, is an ABA-independent wound-inducible protein. *Plant Cell Physiol*. **38**, 643-652.
- Inoue, H., Nojima, H. y Okayama, H.** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *Gene*. **96**, 23-28.
- Irizarry, R., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y., Antonellis, K., Scherf, U. y Speed, T.** (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. **4**, 249-264.
- Ishikawa, H. y Evans, M.** (1995). Specialized zones of development in roots. *Plant Physiol*. **109**, 725-727.
- Jacobsen, J., Pearce, D., Poole, A., Pharis, R. y Mander, L.** (2002). Abscisic acid, phaseic acid and gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley. *Physiol Plant*. **115**, 428-441.
- Jansen, M.A.K., Gaba, V. y Greenberg, B.M.** (1998). Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trend Plant Sci*. **3**, 131-135.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. y Bevan, M.W.** (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*. **6**, 3901-3907.
- 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.
- Jordan, B.R.** (1996). The effects of ultraviolet-B radiation on plants: a molecular perspective. *Adv Bot Res*. **22**, 97-161.
- Kay, B.K., Williamson, M.P. y Sudol, M.** (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J*. **14**, 231-241.
- Klotz, L.O., Schroeder, P. y Sies, H.** (2002). Peroxynitrite signaling: receptor tyrosine kinases and activation of stress-responsive pathways. *Free Radic Biol Med*. **33**, 737-743.
- Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y. y Nagano, T.** (1998). Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem*. **70**, 2446-2453.

- Kolbert, Z., Bartha, B. y Erdei, L.** (2008). Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordia. *J Plant Physiol.* **165**, 967-975.
- Koornneef, M.** (1990). Mutations affecting the testa color in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Information Services.* **27**, 1-4.
- Koornneef, M., Bentsink, L. y Hilhorst, H.** (2002). Seed dormancy and germination. *Curr Opin Plant Biol.* **5**, 33-36.
- Kopyra, M. y Gwozdz, E.A.** (2003). Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiol.* **41**, 1011-1017.
- Kozela, C. y Regan, S.** (2003). How plants make tubes. *Trends Plant Sci.* **8**, 159-164.
- 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.
- Kuzin, B., Regulski, M., Stasiv, Y., Scheinker, V., Tully, T. y Enikolopov, G.** (2000). Nitric oxide interacts with the retinoblastoma pathway to control eye development in *Drosophila*. *Curr Biol.* **10**, 459-462.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.
- Lamattina, L., Beligni, M.V. y Garcia-Mata, C.** (2001). Method of enhancing the metabolic function and the growing conditions of plants and seeds. US Patent. **US 6242384B**.
- 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.
- Lander, H.M., Sehajpal, P., Levine, D.M. y Novogrodsky, A.** (1993). Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds. *J Immunol.* **150**, 1509-1516.
- Leitner, M., Vandelle, E., Gaupels, F., Bellin, D. y Delledonne, M.** (2009). NO signals in the haze: nitric oxide signalling in plant defence. *Curr Opin Plant Biol.* **12**, 451-458.
- León, J., Rojo, E. y Sanchez-Serrano, J.J.** (2001). Wound signalling in plants. *J Exp Bot.* **52**, 1-9.
- León, J., Rojo, E., Titarenko, E. y Sánchez-Serrano, J.** (1998). Jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways are differentially regulated by Ca²⁺/calmodulin in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet.* **258**, 412-419.
- Leshem, Y. y Pinchasov, Y.** (2000). Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria ananassa* (Duch.) and avocados *Persea americana* (Mill.). *J Exp Bot.* **51**, 1471-1473.
- Leshem, Y.Y.** (2001). *Nitric Oxide in Plants*. (London: Kluwer Academic Publishers).

- Leshem, Y.Y. y Haramaty, 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.
- Leshem, Y.Y., Kuiper, P.J., Erdei, L., Lurie, S. y Perl-Treves, R.** (1998). Do Selye's mammalian "GAS" concept and "co-stress" response exist in plants? *Ann N Y Acad Sci.* **851**, 199-208.
- Libourel, I.G., Bethke, P.C., De Michele, R. y Jones, R.L.** (2006). Nitric oxide gas stimulates germination of dormant *Arabidopsis* seeds: use of a flow-through apparatus for delivery of nitric oxide. *Planta.* **223**, 813-820.
- Lim, P., Woo, H. y Nam, H.** (2003). Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **8**, 272-278.
- Lin, J. y Wu, S.** (2004). Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant J.* **39**, 612-628.
- Lindermayr, C., Saalbach, G. y Durner, J.** (2005). Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **137**, 921-930.
- Lira, V. y Arredondo, R.** (2004). Óxido nítrico: un héroe disfrazado de villano. *Elementos.* **53**, 11-17.
- Liu, P., Koizuka, N., Homrichhausen, T., Hewitt, J., Martin, R. y Nonogaki, H.** (2005). Large-scale screening of *Arabidopsis* enhancer-trap lines for seed germination-associated genes. *Plant J.* **41**, 936-944.
- Liu, Y., Mitsukawa, N., Oosumi, T. y Whittier, R.** (1995). Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.* **8**, 457-463.
- Liu, Y., Shi, L., Ye, N., Liu, R., Jia, W. y Zhang, J.** (2009). Nitric oxide-induced rapid decrease of abscisic acid concentration is required in breaking seed dormancy in *Arabidopsis*. *New Phytol.* **183**, 1030-1042.
- Lombardo, M., Graziano, M., Polacco, J. y Lamattina, L.** (2006). Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant Signaling & Behavior.* **1**, 28-33.
- Lozano-Juste, J. y León, J.** (2010a). Enhanced abscisic acid-mediated responses in *nia2noal-2* triple mutant impaired in NIA/NR- and AtNOA1-dependent nitric oxide biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **152**, 891-903.
- Lozano-Juste, J. y León, J.** (2010b). Nitric oxide modulates sensitivity to ABA. *Plant Signal Behav.* **5**, 314-316.
- Ludidi, N. y Gehring, C.** (2003). Identification of a novel protein with guanylyl cyclase activity in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* **278**, 6490-6494.
- 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.

- Malamy, J.** (2005). Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ.* **28**, 67-77.
- Malamy, J. y Benfey, P.** (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development.* **124**, 33-44.
- Mallick, N., Mohn, F.H., Rai, L. y Soeder, C.J.** (2000). Impact of physiological stresses on nitric oxide formation by green alga, *Scenedesmus obliquus*. *J Microbiol Biotechnol.* **10**, 300-306.
- Mao, Y., Chen, J., Maynard, J.A., Zhang, B. y Quioco, F.A.** (2001). A novel all helix fold of the AP180 amino-terminal domain for phosphoinositide binding and clathrin assembly in synaptic vesicle endocytosis. *Cell.* **104**, 433-440.
- McAinsh, M., Clayton, H., Mansfield, T. y Hetherington, A.** (1996). Changes in stomatal behavior and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress. *Plant Physiol.* **111**, 1031-1042.
- McCourt, P.** (1999). Genetic analysis of hormone signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **50**, 219-243.
- Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A. y Giraudat, J.** (2001). The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant J.* **25**, 295-303.
- Millar, T.M., Stevens, C.R., Benjamin, N., Eisenthal, R., Harrison, R. y Blake, D.R.** (1998). Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Lett.* **427**, 225-228.
- Minetti, M., Mallozzi, C. y Di Stasi, A.M.** (2002). Peroxynitrite activates kinases of the src family and upregulates tyrosine phosphorylation signaling. *Free Radic Biol Med.* **33**, 744-754.
- Modolo, 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.
- Monteiro, H.P., Arai, R.J. y Travassos, L.R.** (2008). Protein tyrosine phosphorylation and protein tyrosine nitration in redox signaling. *Antioxid Redox Signal.* **10**, 843-889.
- Moreau, M., Lindermayr, C., Durner, J. y Klessig, D.** (2009). NO synthesis and signaling in plants - where do we stand? *Physiol Plant.* **138**, 372-383.
- Moreau, M., Lee, G., Wang, Y., Crane, B. y Klessig, D.** (2008). AtNOS/AtNOA1 is a functional *Arabidopsis thaliana* cGTPase and not a nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* **283**, 32957-32967.
- Mouradov, A., Cremer, F. y Coupland, G.** (2002). Control of Flowering Time: Interacting Pathways as a Basis for Diversity. *Plant Cell.* **14**, 111-130.
- Mulsch, A., Mordvintcev, P., Vanin, A. y Busse, R.** (1993). Formation and release of dinitrosyl iron complexes by endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **196**, 1303-1308.

- Murashige, T. y Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. **15**, 437-497.
- Murata, Y., Pei, Z., Mori, I. y Schroeder, J.** (2001). Abscisic acid activation of plasma membrane Ca²⁺ channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. *Plant Cell*. **13**, 2513-2523.
- Murgia, I., Delledonne, M. y Soave, C.** (2002). Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. *Plant J*. **30**, 521-528.
- Murgia, I., de Pinto, M.C., Delledonne, M., Soave, C. y De Gara, L.** (2004). Comparative effects of various nitric oxide donors on ferritin regulation, programmed cell death, and cell redox state in plant cells. *J Plant Physiol*. **161**, 777-783.
- Murphy, A., Peer, W. y Taiz, L.** (2000). Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta*. **211**, 315-324.
- Nakajima, K., Sena, G., Nawy, T. y Benfey, P.N.** (2001). Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature*. **413**, 307-311.
- Nakayama, N., Arroyo, J., Simorowski, J., May, B., Martienssen, R. y Irish, V.** (2005). Gene trap lines define domains of gene regulation in *Arabidopsis* petals and stamens. *Plant Cell*. **17**, 2486-2506.
- Nathan, C. y Xie, Q.** (1994). Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. **78**, 915-918.
- Navarro-Gochioa, M., Camut, S., Timmers, A., Niebel, A., Herve, C., Boutet, E., Bono, J., Imberty, A. y Cullimore, J.** (2003). Characterization of four lectin-like receptor kinases expressed in roots of *Medicago truncatula*. Structure, location, regulation of expression, and potential role in the symbiosis with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Physiol*. **133**, 1893-1910.
- Neill, S., Desikan, R., Clarke, A. y Hancock, J.** (2002a). Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol*. **128**, 13-16.
- Neill, S., Desikan, R., Bright, J. y Hancock, J.** (2003). Nitric oxide is a mediator of abscisic acid signalling in guard cell. In *Nitric oxide signalling in higher plants*, S.R. Magalhaes JR, Passon LP, eds., ed (Houston, USA: The Science Tech Publisher, LCC).
- Neill, S., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. y Hancock, J.** (2002b). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot*. **53**, 1237-1247.
- Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Morris, P., Ribeiro, D. y Wilson, I.** (2008). Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J Exp Bot*. **59**, 165-176.
- Nishimura, H., Hayamizu, T. y Yanagisawa, Y.** (1986). Reduction of NO₂ to NO by rush and other plants. *Environ Sci Technol*. **20**, 413-416.
- Orozco-Cardenas, M. y Ryan, C.** (2002). Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiol*. **130**, 487-493.

- Otvös, K., Pasternak, T.P., Miskolczi, P., Domoki, M., Dorjgotov, D., Szucs, A., Bottka, S., Dudits, D. y Fehér, A.** (2005). Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *Plant J.* **43**, 849-860.
- Pagnussat, G., Lanteri, M. y Lamattina, L.** (2003). Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiol.* **132**, 1241-1248.
- Pagnussat, G., Simontacchi, M., Puntarulo, S. y Lamattina, L.** (2002). Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol.* **129**, 954-956.
- Pagnussat, G., Lanteri, M., Lombardo, M. y Lamattina, L.** (2004). Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. *Plant Physiol.* **135**, 279-286.
- Palmer, R., Ferrige, A. y Moncada, R.** (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* **327**, 524-526.
- Parani, M., Rudrabhatla, S., Myers, R., Weirich, H., Smith, B., Leaman, D. y Goldman, S.** (2004). Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in Arabidopsis. *Plant Biotech J.* **2**, 359-366.
- Parker, R.E.** (1989). Utilización de la chi-cuadrado. Estadística para biólogos. (Barcelona).
- Pedroso, M.C., Magalhaes, J.R. y Durzan, D.** (2000). Nitric oxide induces cell death in *Taxus* cells. *Plant Sci.* **157**, 173-180.
- Peer, W. y Murphy, A.** (2006). Flavonoids as signal molecules. (Springer).
- Peer, W., Bandyopadhyay, A., Blakeslee, J., Makam, S., Chen, R., Masson, P. y Murphy, A.** (2004). Variation in expression and protein localization of the PIN family of auxin efflux facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transport in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell.* **16**, 1898-1911.
- Peer, W.A. y Murphy, A.S.** (2007). Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends Plant Sci.* **12**, 556-563.
- Peer, W.A., Brown, D.E., Tague, B.W., Muday, G.K., Taiz, L. y Murphy, A.S.** (2001). Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **126**, 536-548.
- Pei, Z., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G., Grill, E. y Schroeder, J.** (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature.* **406**, 731-734.
- Perazzolli, M., Romero-Puertas, M.C. y Delledonne, M.** (2005). Modulation of nitric oxide bioactivity by plant haemoglobins. *J Exp Bot.* **57**, 479-488.
- Perazzolli, M., Dominici, P., Romero-Puertas, M.C., Zago, E., Zeier, J., Sonoda, M., Lamb, C. y Delledonne, M.** (2004). Arabidopsis nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell.* **16**, 2785-2794.

- Peterman, T.K., Ohol, Y.M., McReynolds, L.J. y Luna, E.J.** (2004). Patellin1, a Novel Sec14-Like Protein, Localizes to the Cell Plate and Binds Phosphoinositides. *Plant Physiol.* **136**, 3080-3094.
- Peunova, N., Kuzin, B., Roberts, I., O'Kane, C. y Enikolopov, G.** (1996). Nitric oxide, cell multiplication, and cell survival. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **61**, 417-426.
- Pich, A., Manteuffel, R., Hillmer, S., Scholz, G. y Schmidt, W.** (2001). Fe homeostasis in plant cells: does nicotianamine play multiple roles in the regulation of cytoplasmic Fe concentration? *Planta.* **213**, 967-976.
- Pierson, E.S., Miller, D.D., Callaham, D.A., van Aken, J., Hackett, G. y Hepler, P.K.** (1996). Tip-localized calcium entry fluctuates during pollen tube growth. *Dev Biol.* **174**.
- Pii, Y., Crimi, M., Cremonese, G., Spena, A. y Pandolfini, T.** (2007). Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. *BMC Plant Biol.* **7**, 21.
- Polverari, A., Molesini, B., Pezzotti, M., Buonauro, R., Marte, M. y Delledonne, M.** (2003). Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact.* **16**, 1094-1105.
- Prado, A.M., Porterfield, D. y Feijo, J.** (2004). Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development.* **131**, 2707-2714.
- Prado, A.M., Colaco, R., Moreno, N., Silva, A.C. y Feijo, J.A.** (2008). Targeting of pollen tubes to ovules is dependent on nitric oxide (NO) signaling. *Mol Plant.* **1**, 703-714.
- Qiao, W. y Fan, L.M.** (2008). Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stresses. *J Integr Plant Biol.* **50**, 1238-1246.
- Reed, R., Brady, S. y Muday, G.** (1998). Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **118**, 1369-1378.
- Reiner, A., Yekutieli, D. y Benjamini, Y.** (2003). Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics.* **19**, 368-375.
- Reyes-Harde, M., Potter, B., Galione, A. y Stanton, P.** (1999). Induction of hippocampal LTD requires nitric-oxide-stimulated PKG activity and Ca²⁺ release from cyclic ADP-ribose-sensitive stores. *J Neurophysiol.* **82**, 1569-1576.
- Roberts, K. y McCann, M.C.** (2000). Xylogenesis: the birth of a corpse. *Curr Opin Plant Biol.* **3**, 517-522.
- Rohde, G., Wenzel, D. y Haucke, V.** (2002). A phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding site within mu2-adaptin regulates clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol.* **158**, 209-214.
- Romero-Puertas, M., Perazzolli, M., Zago, E. y Delledonne, M.** (2004). Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol.* **6**, 795-803.

- Romero-Puertas, M., Laxa, M., Mattè, A., Zaninotto, F., Finkemeier, I., Jones, A., Perazzolli, M., Vandelle, E., Dietz, K. y Delledonne, M.** (2007). S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell*. **19**, 4120-4130.
- Romero-Puertas, M.C., Campostrini, N., Mattè, A., Righetti, P.G., Perazzolli, M., Zolla, L., Roepstorff, P. y Delledonne, M.** (2008). Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana* undergoing hypersensitive response. *Proteomics*. **8**, 1459-1469.
- Saeed, A., Sharon, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovsky, I., Liu, Z., Vinsavich, A., Trush, V. y Quackenbush, J.** (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*. **34**, 374-378.
- 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 Physiol*. **47**, 689-697.
- Sakihama, Y., Nakamura, S. y Yamasaki, H.** (2002). Nitric oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative NO production pathway in photosynthetic organisms. *Plant Cell Physiol*. **43**, 290-297.
- Salmi, M.L., Morris, K.E., Roux, S.J. y Porterfield, D.M.** (2007). Nitric oxide and cGMP signaling in calcium-dependent development of cell polarity in *Ceratopteris richardii*. *Plant Physiol*. **144**, 94-104.
- Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (New York.).
- Sánchez-Fernández, R., Ardiles-Díaz, W., Van Montagu, M., Inze, D. y May, M.J.** (1998). Cloning of a novel *Arabidopsis thaliana* RGA-like gene, a putative member of the VHIID-domain transcription factor family. *J Exp Bot*. **49**, 1609-1610.
- Sandermann, H.** (2001). *Ozon Entstehung, Wirkung, Risiken*.
- Santelia, D., Henrichs, S., Vincenzetti, V., Sauer, M., Bigler, L., Klein, M., Bailly, A., Lee, Y., Friml, J., Geisler, M. y Martinoia, E.** (2008). Flavonoids redirect PIN-mediated polar auxin fluxes during root gravitropic responses. *J Biol Chem*. **283**, 31218-31226.
- Saslowsky, D.E., Dana, C.D. y Winkle-Shirley, B.** (2000). An allelic series for the chalcone synthase locus in *Arabidopsis*. *Gene*. **255**, 127-138.
- Schmidt, H. y Walter, U.** (1994). NO at work. *Cell*. **78**, 919-925.
- Schroeder, J., Allen, G., Hugouvieux, V., Kwak, J. y Waner, D.** (2001). Guard cell signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. **52**, 627-658.
- Serpa, V., Vernal, J., Lamattina, L., Grotewold, E., Cassia, R. y Terenzi, H.** (2007). Inhibition of AtMYB2 DNA-binding by nitric oxide involves cysteine S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun*. **361**, 1048-1053.

- Severina, I., Bussygina, O., Pyatakova, N., Malenkova, I. y Vanin, A.** (2003). Activation of soluble guanylate cyclase by NO donors-S-nitrosothiols, and dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands. *Nitric Oxide*. **8**, 155-163.
- Sha, B. y Luo, M.** (1999). PI transfer protein: the specific recognition of phospholipids and its functions. *Biochim Biophys Acta*. **1441**, 268-277.
- Sha, B., Phillips, S.E., Bankaitis, V.A. y Luo, M.** (1998). Crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* phosphatidylinositol-transfer protein. *Nature*. **391**, 506-510.
- Shi, S., Wang, G., Wang, Y., Zhang, L. y Zhang, L.** (2005). Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B radiation. *Nitric Oxide*. **13**, 1-9.
- Shirley, B.W.** (1999). Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiol Plant*. **107**, 142-149.
- Shiu, S. y Bleecker, A.** (2001). Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**, 10763-10768.
- Silverstone, A.L., Mak, P.Y., Martínez, E.C. y Sun, T.P.** (1997). The new RGA locus encodes a negative regulator of gibberellin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. **146**, 1087-1099.
- Silverstone, A.L., Jung, H.S., Dill, A., Kawaide, H., Kamiya, Y. y Sun, T.P.** (2001). Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **13**, 1555-1566.
- Simpson, G.G. y Dean, C.** (2002). *Arabidopsis*, the Rosetta stone of flowering time? *Science*. **296**, 285-289.
- Singh, A.K., Sharma, L. y Mallick, N.** (2004). Antioxidative role of nitric oxide on copper toxicity to a chlorophycean alga, *Chlorella*. *Ecotoxicol*. **59**, 223-227.
- Song, F. y Goodman, R.** (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.
- Sozzani, R., Cui, H., Moreno-Risueno, M.A., Busch, W., Van Norman, J.M., Vernoux, T., Brady, S.M., Dewitte, W., Murray, J.A. y Benfey, P.N.** (2010). Spatiotemporal regulation of cell-cycle genes by *SHORTROOT* links patterning and growth. *Nature*. **466**, 128-132.
- Staswick, P.E., Su, W. y Howell, S.H.** (1992). Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**, 6837-6840.
- Stöhr, C. y Stremlau, S.** (2006). Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *J Exp Bot*. **57**, 463-470.
- Stone, J. y Walker, J.** (1995). Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiol*. **108**, 451-457.
- Streatfield, S.J., Weber, A., Kinsman, E.A., Häusler, R.E., Li, J., Post-Beittenmiller, D., Kaiser, W.M., Pyke, K.A., Flügge, U.I. y Chory, J.** (1999).

The phosphoenolpyruvate/phosphate translocator is required for phenolic metabolism, palisade cell development, and plastid-dependent nuclear gene expression. *Plant Cell*. **11**, 1609-1622.

Sun, T.P., Goodman, H.M. y Ausubel, F.M. (1992). Cloning the Arabidopsis GAI locus by genomic subtraction. *Plant Cell*. **4**, 119-128.

Tada, Y., Spoel, S., Pajeroska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J. y Dong, X. (2008). Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science*. **321**, 952-956.

Tada, Y., Mori, T., Shinogi, T., Yao, N., Takahashi, S., Betsuyaku, S., Sakamoto, M., Park, P., Nakayashiki, H., Tosa, Y. y Mayama, S. (2004). Nitric oxide and reactive oxygen species do not elicit hypersensitive cell death but induce apoptosis in the adjacent cells during the defense response of oat. *Mol Plant Microbe Interact*. **17**, 245-253.

Takahashia, M., Teradab, Y., Nakaib, I., Nakanishic, H., Yoshimurac, E., Moric, S. y Nishizawa, N. (2003). Role of nicotianamine in the Intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *The Plant Cell*. **15**, 1263-1280.

Taylorson, R. y Hendricks, S. (1997). Dormancy in seeds. *Annu Rev Plant Physiol*. **28**, 331-354.

Thimm, O., Blaesing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krueger, P., Selbig, J., Mueller, L., Rhee, S. y Stitt, M. (2004). MapMan: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J*. **37**, 914-939.

Tian, Q.Y., Sun, D.H., Zhao, M.G. y Zhang, W.H. (2007). Inhibition of nitric oxide synthase (NOS) underlies aluminum-induced inhibition of root elongation in *Hibiscus moscheutos*. *New Phytol*. **174**, 322-331.

Tonón, C., Cecilia Terrile, M., José Iglesias, M., Lamattina, L. y Casalengué, C. (2010). Extracellular ATP, nitric oxide and superoxide act coordinately to regulate hypocotyl growth in etiolated Arabidopsis seedlings. *J Plant Physiol*. **167**, 540-546.

Toufighi, K., Brady, S.M., Austin, R., Ly, E. y Provart, N.J. (2005). The Botany Array Resource: e-Northern, Expression Angling, and promoter analyses. *Plant J*. **43**, 153-163.

Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **76**, 4350-4354.

Tsugeki, R., Kochieva, E.Z. y Fedoroff, N.V. (1996). A transposon insertion in the Arabidopsis SSR16 gene causes an embryo-defective lethal mutation. *Plant J*. **10**, 479-489.

Ubeda-Tomás, S., Swarup, R., Coates, J., Swarup, K., Laplaze, L., Beemster, G.T., Hedden, P., Bhalerao, R. y Bennett, M.J. (2008). Root growth

in Arabidopsis requires gibberellin/DELLA signalling in the endoderm. *Nat Cell Biol.* **10**, 625-628.

Ubeda-Tomás, S., Federici, F., Casimiro, I., Beemster, G.T., Bhalerao, R., Swarup, R., Doerner, P., Haseloff, J. y Bennett, M.J. (2009). Gibberellin signaling in the endodermis controls Arabidopsis root meristem size. *Curr Biol.* **19**, 1194-1199.

Uchida, A., Jagendorf, A.T., Hibino, T., Takabe, T. y Takabe, T. (2002). Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Sci.* **163**, 515-523.

Ueno, T. y Yoshimura, T. (2000). The physiological activity and in vivo distribution of dinitrosyl dithiolato iron complex. *Jpn J Pharmacol.* **82**, 95-101.

Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G. y Guilfoyle, T.J. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell.* **9**, 1963-1971.

Usadel, B., Nagel, A., Thimm, O., Redestig, H., Blaesing, O., Palacios-Rojas, N., Selbig, J., Hannemann, J., Conceição Piques, M., Steinhauser, D., Scheible, W.-R., Gibon, Y., Morcuende, R., Weicht, D., Meyer, S. y Stitt, M. (2005). Extension of the visualisation tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of corresponding genes and comparison with known responses. *Plant Physiol.* **138**, 1195-1204.

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. y Barroso, J.B. (2007). Nitrosative stress in plants. *FEBS Lett.* **581**, 453-461.

van der Viet, A., Eiserich, J.P., Halliwell, B. y Cross, C.E. (1997). Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite—a potential additional, mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J Biol Chem.* **272**, 7617-7625.

Vanin, A.F., Svistunenko, D.A., Mikoyan, V.D., Serezhenkov, V.A., Fryer, M.J., Baker, N.R. y Cooper, C.E. (2004). Endogenous superoxide production and the nitrite/nitrate ratio control the concentration of bioavailable free nitric oxide in leaves. *J Biol Chem.* **279**, 24100-24107.

Wang, P., Xian, M., Tang, X., Wu, X., Wen, Z., Cai, T. y Janczuk, A. (2002). Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. *Chem Rev.* **102**, 1091-1134.

Wang, S., Zhang, J., Kern, S. y Danner, R.L. (2008). Nitric oxide-p38 MAPKS signaling stabilizes RNA through AU-rich element-dependent and -independent mechanisms. *J Leukoc.* **83**, 982-990.

Wang, Y., Ries, A., Wu, K., Yang, A. y Crawford, N.M. (2010). The arabidopsis prohibitin gene PHB3 functions in nitric oxide-mediated responses and in hydrogen peroxide-induced nitric oxide accumulation. *Plant Cell.* **22**, 249-259.

- Wang, Y., Feechan, A., Yun, B., Shafiei, R., Hofmann, A., Taylor, P., Xue, P., Yang, F., Xie, Z., Pallas, J., Chu, C. y Loake, G.** (2009). S-nitrosylation of AtSABP3 antagonizes the expression of plant immunity. *J Biol Chem.* **284**, 2131-2137.
- Wendehenne, D., Durner, J. y Klessig, D.** (2004). Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr Opin Plant Biol.* **7**, 449-455.
- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D. y Durner, J.** (2001). Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.* **6**, 177-183.
- Wettenhall, J., Simpson, K., Satterley, K. y Smith, G.** (2006). affyImGUI: a graphical user interface for linear modeling of single channel microarray data. *Bioinformatics.* **22**, 897-899.
- Wilkinson, J. y Crawford, N.** (1993). Identification and characterization of a chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes NIA1 and NIA2. *Mol Gen Genet.* **239**, 289-297.
- Willmott, N., Sethi, J., Walseth, T., Lee, H., White, A. y Galione, A.** (1996). Nitric oxide-induced mobilization of intracellular calcium via the cyclic ADP-ribose signaling pathway. *J Biol Chem.* **271**, 3699-3705.
- Wilson, I.D., Neill, S.J. y Hancock, J.T.** (2008). Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environ.* **31**, 622-631.
- Wilson, R.N. y Somerville, C.R.** (1995). Phenotypic suppression of the gibberellin-insensitive mutant (*gai*) of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **108**, 495-502.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. y Provart, N.** (2007). An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE.* **2**, e718.
- Xin, L., Shuqiu, Z. y Chenghou, L.** (2003). Involvement of nitric oxide in the signal transduction of salicylic acid regulating stomatal movement. *Chinese Science Bulletin.* **48**, 449-452.
- Xin, Z., Wang, A., Yang, G., Gao, P. y Zheng, Z.L.** (2009). The *Arabidopsis* A4 subfamily of lectin receptor kinases negatively regulates abscisic acid response in seed germination. *Plant Physiol.* **149**, 434-444.
- Xu, J. y Scheres, B.** (2005). Cell polarity: ROPing the ends together. *Curr Opin Plant Biol.* **8**, 613-618.
- Xu, L., Eu, J., Meissner, G. y Stamler, J.** (1998). Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science.* **279**, 234-237.
- Yamaguchi, S. y Kamiya, Y.** (2001). Gibberellins and Light-Stimulated Seed Germination. *J Plant Growth Regul.* **20**, 369-376.
- Yamasaki, H.** (2000). Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition in vivo. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sc.* **355**, 1477-1488.

- Yamasaki, H. y Sakihama, Y.** (2000). Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett.* **468**, 89-92.
- Yoshida, S.** (2003). Molecular regulation of leaf senescence. *Curr Opin Plant Biol.* **6**, 79-84.
- Zagotta, W. y Siegelbaum, S.** (1996). Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Annu Rev Neurosci.* **19**, 235-263.
- 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.
- Zemojtel, T., Frohlich, A., Palmieri, M.C., Kolanczyk, M., Mikula, I., Wyrwicz, L.S., Wanker, E.E., Mundlos, S., Vingron, M., Martasek, P. y Durner, J.** (2006). Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends Plant Sci.* **11**, 524-525.
- Zhang, L., Wang, Y., Zhao, L., Shi, S. y Zhang, L.** (2006). Involvement of nitric oxide in light-mediated greening of barley seedlings. *J Plant Physiol.* **163**, 818-826.
- Zhang, M., An, L. y Feng, H.** (2003). The cascade mechanisms of nitric oxide as a second message of ultraviolet B in inhibiting mesocotyl elongation. *Photochem. Photobiol.* **77**, 219-225.
- Zhang, Y.Y., Liu, J. y Liu, Y.L.** (2004). Nitric oxide alleviates the growth inhibition of maize seedlings under salt stress. *J. Plant Physiol.* **30**, 455-459.
- Zhao, M.G., Tian, Q.Y. y Zhang, W.H.** (2007b). Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **144**, 206-217.
- Zhao, M.G., Zhao, X., Wu, Y.X. y Zhang, L.X.** (2007a). Enhanced sensitivity to oxidative stress in *Arabidopsis* nitric oxide synthesis mutant. *J Plant Physiol.* **164**, 737-745.
- Zhao, M.G., Chen, L., Zhang, L.L. y Zhang, W.H.** (2009). Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **151**, 755-767.



María Fernández Marcos



Luis Sanz Andreu
Codirector



Oscar Lorenzo Sánchez
Director

El óxido nítrico (NO) es un radical libre gaseoso, que ha adquirido una creciente importancia en las últimas décadas debido a su papel como efector en la señalización molecular de diversos procesos fisiológicos. A pesar de los estudios realizados sobre su implicación en las respuestas de defensa frente a patógenos, las respuestas a estreses abióticos y diversos procesos del crecimiento y desarrollo de las plantas, los mecanismos bioquímicos y moleculares responsables de la participación del NO como molécula señalizadora están en su mayor parte por identificar. A lo largo de esta memoria se ha puesto de manifiesto la participación del NO en una gran variedad de procesos fisiológicos: la dormición y germinación de semillas, el crecimiento de la raíz primaria y el desarrollo del hipocotilo, actuando posiblemente a través de las proteínas AtLecPK1 y AtPATL2. Finalmente, se establece la interacción del NO con diferentes rutas hormonales entre ellas auxinas, GAs, ABA y JAs, y la acumulación de fenilpropanoides.

Research over the last decades has identified nitric oxide (NO) as a bioactive molecule that plays an essential role during different plant stress and developmental responses. In spite of the extensive research, our knowledge about the biochemical and molecular mechanisms responsible of NO action is still limited. Our results allow us to highlight the broad range of physiological processes where NO is involved: seed dormancy and germination, primary root and hypocotyl growth, probably acting through AtLecPK1 and AtPATL2 molecular players. Our results also suggest that NO regulates these processes interacting with different hormonal signalling pathways such as auxins, GAs, ABA and JAs and metabolic processes such as the accumulation of phenylpropanoids.