

Nitric oxide (NO) sensing and signalling during  
early plant development and hypoxic stress in  
*Arabidopsis thaliana*

ISABEL MANRIQUE GIL

PhD Thesis - October 2022



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal

Instituto de Investigación en Agrobiotecnología (CIALE)

Facultad de Biología



VNiVERSIDAD  
D SALAMANCA



Nitric oxide (NO) sensing and signalling during  
early plant development and hypoxic stress  
in *Arabidopsis thaliana*

Isabel Manrique Gil

Salamanca, octubre 2022



Dr. D. **CARLOS NICOLÁS RODRÍGUEZ**, PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN AGROBIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la presente Memoria titulada "Nitric oxide (NO) sensing and signalling during early plant development and hypoxic stress in *Arabidopsis thaliana*" ha sido realizada por la graduada Dña. **ISABEL MANRIQUE GIL** en el Instituto de Investigación en Agrobiotecnología (CIALE) de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca, bajo la dirección del Dr. D. **ÓSCAR LORENZO SÁNCHEZ** y de la Dra. **M<sup>a</sup> INMACULADA SÁNCHEZ VICENTE** y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Agrobiotecnología con Mención "Doctorado Internacional".

Para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca a 14 de octubre de 2022.

A blue circular official stamp of the Instituto de Investigación en Agrobiotecnología (CIALE) of the University of Salamanca. The stamp contains the text "INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN AGROBIOTECNOLOGÍA • UNIVERSIDAD DE SALAMANCA" and "CIALE". To the left of the stamp is a handwritten signature in blue ink.

Fdo: Dr. D. Carlos Nicolás Rodríguez

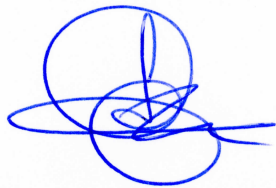


Dr. D. **ÓSCAR LORENZO SÁNCHEZ**, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA Y FISIOLÓGÍA VEGETAL DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y DRA. DÑA. **Mª INMACULADA SÁNCHEZ VICENTE**, INVESTIGADORA POSTDOCTORAL EN LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria titulada **“Nitric oxide (NO) sensing and signalling during early plant development and hypoxic stress in *Arabidopsis thaliana*”** ha sido realizada por la graduada Dña. **ISABEL MANRIQUE GIL** en el Instituto de Investigación en Agrobiotecnología (CIALE) de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca, bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Agrobiotecnología con Mención “Doctorado Internacional”.

Para que así conste, firmamos el presente certificado en Salamanca a 14 de octubre de 2022.



Fdo: Dr. D. Óscar Lorenzo Sánchez



Fdo. Dra. Mª Inmaculada Sánchez Vicente



Fdo: Dña. Isabel Manrique Gil



## Financiación y organismos implicados

Durante el desarrollo de mi Tesis Doctoral he disfrutado una ayuda para la formación de profesorado universitario FPU (FPU17/04650) otorgada por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.

Para la realización de la estancia, disfruté de una ayuda de movilidad para estancias breves en centros extranjeros para beneficiarios del Subprograma de Formación del Profesorado Universitario (EST21/00377).

Los experimentos realizados durante la presente Tesis Doctoral se han llevado a cabo en el Instituto de Investigación en Agrobiotecnología (CIALE) de la Universidad de Salamanca, bajo la dirección del Dr. Óscar Lorenzo Sánchez y la co-dirección de la Dra. M<sup>a</sup> Inmaculada Sánchez Vicente. Los proyectos de investigación que han permitido financiar este trabajo se exponen a continuación:

- “Descifrado de la señalización molecular del óxido nítrico (NO) en el desarrollo y la biotecnología de plantas”. MINECO (BIO2017-85758-R). IP: Dr. Óscar Lorenzo Sánchez. 2018-2020.
- “Percepción y señalización molecular del óxido nítrico (NO) durante el balance entre desarrollo y estrés en plantas”. MICINN PID2020-119731RB-I00. IP: Dr. Óscar Lorenzo Sánchez. 2021-2024.
- “Potencial biotecnológico de la señalización del óxido nítrico (NO) en la germinación de semillas y las respuestas a estrés”. Junta de Castilla y León UIC 152 (SA093U16). IP: Dr. Óscar Lorenzo Sánchez. 2016-2018.
- “Impacto biotecnológico del gasotransmisor óxido nítrico (NO) en el desarrollo y las respuestas a estrés de las plantas”. Junta de Castilla y León UIC 152 (SA313P18). IP: Dr. Óscar Lorenzo Sánchez. 2019-2021.
- “Aplicación de la biología translacional y el microbioma en la protección frente a estrés hídrico e hipoxia en plantas”. Junta de Castilla y León. (SA137P20). IP: Dr. Oscar Lorenzo Sánchez. 2020-2023.
- Unidad de Excelencia “Producción Agrícola y Medioambiente” CLU-2018-04 cofinanciado por los P.O. FEDER de Castilla y León (2014-2020). Director Dr. Oscar Lorenzo Sánchez. 2019-2023.



II

- “Caracterización del papel del óxido nítrico (NO) en la acumulación de los ácidos grasos y la tolerancia al frío en semillas”. Fundación Memoria de D. Samuel Solórzano Barruso (FS/26-2017). IP: Dra. María Inmaculada Sánchez Vicente. 2018.
- “Caracterización del papel del óxido nítrico (NO) durante la ramificación aérea y radicular en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*”. Fundación Memoria de D. Samuel Solórzano Barruso (FS/16-2019). IP: Dra. María Inmaculada Sánchez Vicente. 2019



**UNIÓN EUROPEA**  
Fondo Europeo de  
Desarrollo Regional



## Reconocimientos

En primer lugar, agradecer a mi director Prof. Óscar Lorenzo el haberme permitido realizar la Tesis Doctoral en el laboratorio 7 del CIALE.

A la Dra. Inmaculada Sánchez, quien empezó enseñándome las técnicas durante la realización de mi TFG y TFM y hemos continuado hasta día de hoy.

Al Dr. Alejandro Chamizo Ampudia por su ayuda en los aspectos bioquímicos y su orientación en los ensayos de Co-Inmunoprecipitación.

Al Dr. Alberto Paradela, del Servicio de proteómica del CNB-CSIC por los análisis de espectrometría de masas.

Al Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca (NUCLEUS) y al Servicio de Invernadero Experimental del Parque Científico de la Universidad de Salamanca, en especial a Tomás Velasco por su trabajo allí realizado.

A los técnicos de laboratorio que han pasado por el CIALE durante estos años: Luis, Santi, Inés, Fer y David. A Susana Fernández, por su apoyo técnico cuando empecé a trabajar en el laboratorio.

Respecto a los resultados obtenidos, quisiera agradecer al Prof. Pierdomenico Perata, de la Scuola Superiore Sant'Anna de Pisa, permitirme realizar la estancia en su laboratorio. Gracias a Luca Brunello por enseñarme todo lo relativo a los ensayos de hipoxia y encharcamiento.

A los Dres. Augustin Mot, Grigore Damian y a la Dra. Cezara Zagrean Tuza (Universidad Babeş-Bolyai) por su colaboración y la realización de los experimentos de EPR y ensayos de actividad recogidos en esta Tesis Doctoral.

Muchas gracias a todos por la ayuda recibida.



## Agradecimientos personales

Hace 10 años que empezó mi aventura en Salamanca cuando vine a estudiar el Grado en Biología y hace casi 7 años que entré en el laboratorio 7 por primera vez para realizar mi TFG. Nunca pensé que elegir el tema del TFG podría implicar estar hoy aquí escribiendo estas líneas. Gracias a Óscar, por animarme a realizar la Tesis Doctoral. Tu entusiasmo por el NO es contagioso. Gracias por el apoyo durante el doctorado, por ayudarme a creer en mí y en mi investigación.

Gracias a Inma, por ser la mejor maestra que pude imaginar. Por tu paciencia, tu cariño y tu enorme compañerismo.

Gracias al equipo inicial que me recibió en el L7: Susan, Guada, Tamara, Isa Mateos, Luis y Lola. A Susan, por tu infinito cariño; a Lola, por ser el alma del L7; y a Guada, por ser una amiga tanto dentro como fuera del lab.

Al increíble grupo de predocs: Isa T, Sara, Fátima, Andrea, Espe y Cylia. Gracias por saber escuchar y ser un apoyo en el día a día. Os quiero mucho. Mención especial a Isa T, compañera de tesis desde el día 1. Los memes y saber reírnos de nuestras desgracias han hecho el doctorado mucho más ameno.

A los postdoc Capi, Noe, Álvaro, Pablo, Mónica y Ceci. Gracias por todos los consejos durante las pausas del café, y por las aventuras fuera del laboratorio.

A la gente del PlantLab de Pisa: Eva, Luca, Rocco, Germán y Simone. Por acogerme como una más desde el primer día.

Saliendo del laboratorio, quiero dar las gracias a mi familia Manrique-Gil, desperdigada pero unida. A mamá y a papá, por recibirme siempre con ilusión y por ayudarme en cualquier circunstancia. A Manu y María, Eme y Camilo, por ser un apoyo incondicional a pesar de la distancia. A mi abuela Rosario, que me vio empezar pero no acabar. A toda la familia que siempre reencuentro al ir a Astudillo.

Gracias a las Palentinas por el mundo: Anita, Clara, Elvi, Merlo, Kelly, Chabe, Bea, Laura y Carol. Habéis sido un salvavidas para mí estos últimos meses, os lo agradeceré siempre.

## VI

A mis compañeros de Biología: Natalia, Ricardo, Carlos y sobre todo a David, por ser el mejor vecino y estar siempre dispuesto a echar un parlo mientras cenamos.

A Alba, por tu amistad desde la resi y por nuestras interminables conversaciones, que siempre ayudan.

A Ibón, con quien tuve la enorme suerte de empezar mi vida en Salamanca. Chema, Lurdes: sois geniales.

Por último a Villa, por ser un gran compañero durante tantos años. Por escucharme y hacerme reír cuando lo necesitaba. Gracias por haber aceptado un sándwich de queso.

Ha sido un viaje largo y con muchos altibajos. Gracias por haberlo recorrido conmigo y haberme ayudado a abrirme paso entre la maleza. No habría podido llegar hasta aquí sin vuestra compañía.

Isa



## Abbreviations

**ABA:** Abscisic acid

**ABI5:** ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5

**ADH1:** ALCOHOL DEHYDROGENASE 1

**Aux:** Auxin

**cPTIO:** 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide

**Cys:** Cysteine

**DTT:** Dithiothreitol

**EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid

**EPR:** Electron paramagnetic resonance spectroscopy

**ET:** Ethylene

**GFP:** GREEN FLUORESCENT PROTEIN

**GSH:** Glutathione

**GSNO:** S-nitrosoglutathione

**HRG:** Hypoxia-responsive-genes

**ICP-AES:** Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy

**JA:** Jasmonic acid

**KDa:** KiloDalton

**MAP:** METHIONINE AMINOPEPTIDASE

**Met:** Methionine

**MS/MS:** Tandem mass spectroscopy

**NEM:** N-Ethylmaleimide

**NIA1/2:** NITRATE REDUCTASE 1/2

**NO:** Nitric Oxide

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Nitrite

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>**: Nitrate

**NOA1**: NO-ASSOCIATED 1

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>**: Superoxide radical

**O<sub>2</sub>**: Molecular oxygen

**ONOO<sup>-</sup>**: Peroxynitrite

**PCO1**: PLANT CYSTEINE OXIDASE 1

**PDC1**: PYRUVATE DECARBOXYLASE 1

**PGB1**: PHYTOGLOBIN 1

**PRT6**: PROTEOLYSIS 6

**PTM**: Post-translational modification

**qRT-PCR**: Quantitative real-time PCR

**ROS**: Reactive oxygen species

**Rpm**: Revolutions per minute

**SNAP**: S-nitroso-N-acetylpenicillamine

**TF**: Transcription factor

**WT**: Wild-type



# RESUMEN GENERAL



## 1. El óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es una de las moléculas gaseosas diatómicas más pequeñas (30,006 g/mol). Contiene un doble enlace entre los átomos de nitrógeno y oxígeno y presenta un electrón desapareado.

Descrito en 1772 por Joseph Priestly como “aire nitroso”, fue únicamente considerado como un contaminante del aire hasta la década de los 80 del siglo pasado. Los estudios sobre la síntesis y señalización del NO en los seres vivos comenzaron con el descubrimiento del papel del NO en el sistema cardiovascular de mamíferos. Dos trabajos paralelos revelaron que el NO se libera en las células endoteliales durante la relajación del músculo liso (Palmer *et al.*, 1987; Ignarro *et al.*, 1987).

Este descubrimiento condujo a los autores a la obtención del premio Nobel en Fisiología y Medicina en 1998 y supuso un cambio en el paradigma de la bioquímica, revelando cómo la naturaleza es capaz de utilizar también las propiedades de pequeñas moléculas. Además, la revista Science nombró al NO como “molécula del año” en 1992.

Mientras tanto, las investigaciones del NO en plantas ya habían comenzado. Los primeros estudios revelaron que el NO presente en la atmósfera era capaz de influir en los procesos fisiológicos al entrar en contacto con las partes aéreas de las plantas (Wellburn *et al.*, 1972; Bennett and Hill, 1973; Anderson and Mansfield, 1979) y poco después se descubrió que las plantas son capaces de liberar NO al ambiente (Klepper, 1979). Casi veinte años más tarde, las investigaciones sobre el NO en plantas pasaron a una segunda fase, cuando se describió la implicación del NO en la regulación de las defensas de las plantas durante la interacción planta-patógeno (Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998). Desde entonces, el papel del NO en la regulación de procesos del desarrollo, metabolismo y respuestas a estrés ha sido ampliamente estudiado.

El NO, junto con el sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) y el monóxido de carbono (CO) son considerados gasotransmisores. Este término hace referencia a una molécula gaseosa (formada en el propio organismo o proveniente del entorno), con importante función señalizadora, percibiendo y transmitiendo

señales desde el ambiente y finalizando en cambios fisiológicos en el organismo (Lamattina and García-Mata, 2016).

## 2. Señalización del NO

Desde el punto de vista químico, al tener un electrón desapareado, el NO es un radical. Las especies radicales son por lo general inestables, con un gran poder reactivo y de vida media muy corta. Además, al ser una molécula pequeña y sin carga, difunde fácilmente en su entorno biológico, teniendo una naturaleza lipofílica. Si existe una concentración elevada de NO, las moléculas se moverán a favor de gradiente y al ser tan reactiva, su campo de difusión suele quedar muy próximo a la fuente de producción de NO.

El NO reacciona principalmente con dos dianas moleculares que incluyen moléculas que posean electrones desapareados y metales de transición. La reacción del NO con moléculas no metálicas resulta principalmente en dos efectos, como son la oxidación de nucleófilos y la formación de aniones nitrito y nitrato (relativamente estables). Los nucleófilos mejor estudiados son los tioles de cisteínas (presentes en proteínas y péptidos como glutatión reducido o GSH) y los anillos fenólicos del aminoácido tirosina. A nivel molecular, estas reacciones conducen a dos modificaciones post-traduccionales: la S-nitrosilación de cisteínas (Cys) y la nitración de tirosinas (Tyr). En concreto la nitración de Tyr no es llevada a cabo por el NO directamente, sino por el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ )

El NO también reacciona con metales de transición. Éstos se denominan así ya que presentan electrones alojados en el orbital *d*. Los metales de transición actúan como “hogar” para electrones desapareados. Generalmente no ocurre una transferencia completa del electrón desapareado sino que éste es compartido entre el radical (NO) y el metal de transición, en lo que se denomina enlace coordinado. El metal de transición más estudiado es el hierro (Fe), ya que forma enlaces tanto en su forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) como férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ). De esta manera, el NO puede modificar post-traduccionamente diferentes metaloproteínas. Por último, también se ha descrito que los ácidos grasos nitrados tiene un papel en la señalización del NO en plantas (Mata-Pérez *et al.*, 2017).

### 3. Homeostasis del NO

La concentración de NO en las células se regula en varios niveles, desde su biosíntesis hasta su detoxificación o eliminación, pasando por la formación de intermediarios estables para su transporte o secuestro. En los siguientes apartados se explican los diferentes mecanismos de síntesis y metabolismo del NO.

#### 3.1. Rutas de síntesis

La biosíntesis de NO en plantas ocurre principalmente a través de dos rutas: una reductora y una ruta oxidativa. La vía reductora engloba la reducción de nitrito a NO a través de distintas enzimas, mientras que la vía oxidativa origina NO a partir de diferentes moléculas precursoras.

##### 3.1.1. Vía reductora de producción de NO

Las vías o rutas reductoras originan NO a partir de la reducción de nitrito. La enzima nitrato reductasa (NR), es una enzima citosólica implicada en la asimilación y metabolismo de nitrógeno. Por lo general, cataliza la reducción de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ).



En *Arabidopsis*, dos genes homólogos codifican esta enzima (*NIA1* y *NIA2*) (Wilkinson and Crawford, 1993). La NR puede catalizar también la reducción de  $\text{NO}_2^-$  a NO, empleando NAD(P)H como donador de electrones en ambas reacciones, si bien su afinidad es mayor por el  $\text{NO}_3^-$ , por lo que la producción de NO está condicionada por los niveles de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  (Rockel *et al.*, 2002). La actividad de la NR aumenta en condiciones de pH bajo (Kaiser and Brendle-Behnisch, 1995; Chamizo-Ampudia *et al.*, 2017). En cuanto a la producción de NO a partir de NR, se induce por varios factores bióticos y abióticos, como elicitores de hongos patógenos (Shi and Li, 2008; Srivastava *et al.*, 2009), estrés osmótico (Kolbert *et al.*, 2010), estrés hídrico (Sang *et al.*, 2008) o hipoxia (Benamar *et al.*, 2008). La producción de NO por la enzima NR y a partir de la reducción de  $\text{NO}_2^-$  en la mitocondria tiene un papel importante en situaciones de hipoxia, el cual se explica en el **apartado 4**.

La enzima nitrito: óxido nítrico reductasa (NiNOR) también cataliza la formación de NO. Esta enzima se encuentra en la membrana plasmática de

células de raíz, reduciendo  $\text{NO}_2^-$  a NO y liberándolo al apoplasto. Esta enzima está posiblemente implicada en la percepción de los niveles de  $\text{NO}_3^-$  en el suelo y se ha descrito también su relación con la infección de hongos micorrícicos en la raíz (Meyer and Stöhr, 2002; Moche *et al.*, 2010).

La xantina óxido reductasa (XOR) localizada en los peroxisomas (Corpas *et al.*, 2001) también puede catalizar la reducción de  $\text{NO}_2^-$  a NO en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno (Millar *et al.*, 1998; Godber *et al.*, 2000). Es probable que esta enzima produzca superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) en condiciones de normoxia y NO en condiciones de hipoxia o anoxia.

Por último, se ha descrito también la producción de NO a partir de la reducción de  $\text{NO}_2^-$  por una vía no enzimática. Se ha identificado en el apoplasto de las células de aleurona en cebada, en condiciones de pH bajo, alta concentración de  $\text{NO}_3^-$  y presencia de agentes reductores como ácido ascórbico. Aunque minoritario, esto puede dar lugar a una rápida producción de NO (Bethke *et al.*, 2004).

### 3.1.2. Vía oxidativa de producción de NO

La vía oxidativa de producción de NO engloba la oxidación de diferentes moléculas. En animales, la enzima NO sintasa (NOS) cataliza la oxidación de L-Arginina (Arg) a L-Citrulina y NO. Esta desaminación es dependiente de NADPH y oxígeno ( $\text{O}_2$ ) (Palmer *et al.*, 1987). En plantas, sin embargo, no existe una enzima NOS similar a la de animales. A pesar de no tener homología en la secuencia con la NOS de animales, se describió una NOS en *Arabidopsis*, AtNOS1 (Guo *et al.*, 2003; Corpas *et al.*, 2006, 2009). Las principales evidencias que apoyaban la existencia de esta enzima NOS se basaban en la correlación entre la producción de NO y la suplementación de L-Arg o en el efecto de inhibidores de la enzima NOS animal sobre la producción de NO en plantas. Sin embargo, aunque el fenotipo del mutante de pérdida de función *atnos1* podía ser revertido con la aplicación de NO exógeno, este gen no codifica una NO sintasa auténtica en plantas. Investigaciones posteriores determinaron que AtNOS1 no es capaz de producir NO a partir de la oxidación directa de Arg. NOS1 se trata de una enzima de la familia de las GTPasas circulares (cGTPasa) que une e hidroliza GTP y podría participar en el ensamblaje de ribosomas mediante la

unión con RNA, funciones descritas en su homólogo más cercano YqeH en *Bacillus subtilis*. Por ello, se renombró como NO-associated protein1 (AtNOA1 o NOA1) (Moreau *et al.*, 2008). Sin embargo, aunque no exista una NOS en plantas como tal, sí existe una producción de NO a partir de L-Arg. Las líneas de Arabidopsis afectadas en la homeostasis del NO resultan de gran utilidad para el estudio de diferentes procesos en los que pueda participar esta molécula y analizar también si la fuente o lugar de producción de NO puede influir en su señalización. En el caso del mutante de pérdida de función del gen *AtNOA1*, *noa1*, acumula menos NO que el tipo silvestre. A nivel fenotípico, este mutante presenta un menor tamaño debido a una menor longitud de raíz y tallo, así como alteraciones en el desarrollo de las inflorescencias y menor fertilidad (Guo *et al.*, 2003).

También el doble mutante *nia1;nia2*, afectado en los dos genes que codifican la enzima NR presentan una menor acumulación de NO. Tanto en *noa1* como en el doble mutante *nia1;nia2*, aunque los niveles de NO basales son menores, se observa un aumento de la producción de NO en respuesta al ABA.

No obstante, el triple mutante *nia1;nia2;noa1-2* presenta el fenotipo más marcado de déficit de NO, mostrando una reducción aditiva de los niveles de NO con respecto al mutante simple (*noa1*) y doble (*nia1nia2*). En concreto, *nia1;nia2;noa1-2* presenta un contenido de NO aproximado al 10% con respecto al tipo silvestre (Col-0). A nivel fenotípico, *nia1;nia2;noa1-2* presenta también un menor tamaño, fertilidad y menor viabilidad de las semillas. Este mutante es además hipersensible al ABA, provocando una mayor dormición de las semillas y un cierre estomático más eficiente, lo que le confiere una mayor resistencia al déficit de agua o sequía (Lozano-Juste and León, 2010).

Otro de los sustratos en la vía oxidativa de producción de NO incluye a las poliaminas (PAs). Las PAs, como la espermina o espermidina, son moléculas policatiónicas constituidas por varios grupos amino, implicadas en numerosos procesos de desarrollo y respuestas a estreses bióticos y abióticos (Galston *et al.*, 1997; Bouchereau *et al.*, 1999; Alcázar *et al.*, 2010). Existe una correlación entre PAs y la producción de NO tanto en la síntesis como en el catabolismo de las PAs, y también mediante un mecanismo

indirecto, ya que las PAs aumentan la actividad de las enzimas NR y NOA a través de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Jahan *et al.*, 2019).

El primer paso en la ruta de síntesis de PAs es la descarboxilación de Arg para dar lugar a ornitina, reacción catalizada por la enzima Arginasa (ARGAH). Mutantes de pérdida de función *argah* presentan una sobreacumulación de NO, al aumentar los niveles de Arg (Flores *et al.*, 2008). Además, la aplicación exógena de las PAs espermidina y espermina incrementa la liberación de NO en la zona de elongación de la raíz y en las hojas primarias, específicamente en venas y tricomas (Tun *et al.*, 2006).

Las enzimas cobre amino oxidasa (CuAO) y poliamina oxidasa (PAO) están implicadas en el catabolismo de las PAs. Los mutantes de pérdida de función *cuao1* (*cuao1* y *cuao8*) y *pao2* presentan una menor producción de NO en respuesta al tratamiento con PAs y menor sensibilidad al ABA (Wimalasekera *et al.*, 2011, 2015). En el caso del mutante *cuao8*, los bajos niveles de NO se asocian a una mayor actividad arginasa (Groß *et al.*, 2017).

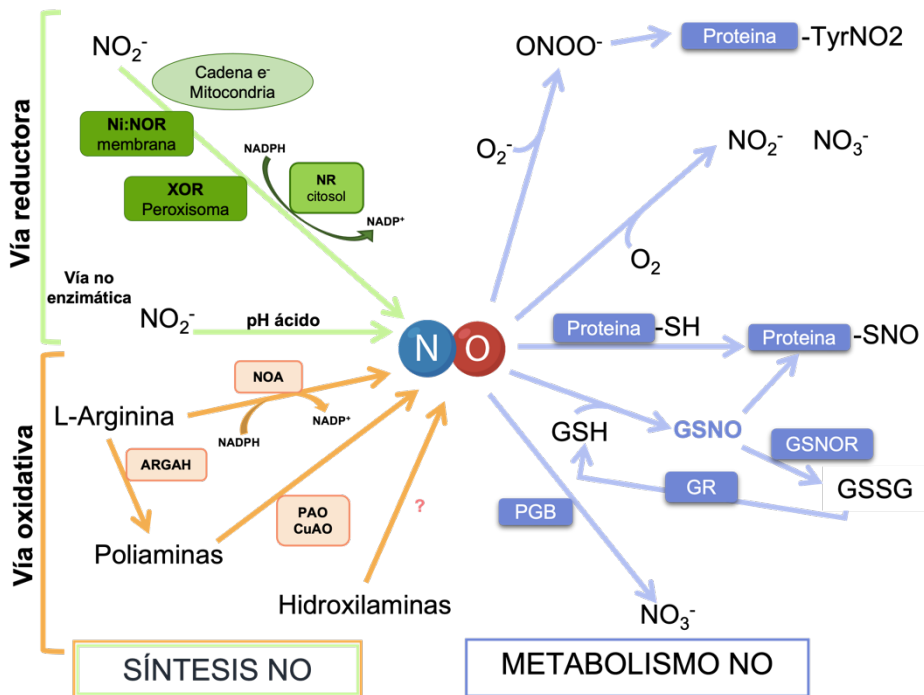
Además de los mutantes *argah*, otras líneas sobreacumuladoras de NO son los mutantes *cue/nox*. El gen *CUE1*, *CHLOROPHYL A/B BINDING PROTEIN (CAB) UNDEREXPRESSED 1*, codifica un translocador fosfoenolpiruvato/ fosfato (PPT) presente en el cloroplasto. La mutación de este gen afecta a la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis en las células del mesófilo. Como consecuencia de esta mutación, hay un incremento en el contenido de diferentes aminoácidos y metabolitos secundarios, como el  $\text{NO}_3^-$  o la Arg (Streatfield *et al.*, 1999). Ambas moléculas son precursoras de la biosíntesis de NO a través de la vía oxidativa que se ha comentado anteriormente.

Debido a que el gen *CUE* no se expresa en las células del mesófilo pero sí en las células de la vaina del haz, estos mutantes exhiben un fenotipo foliar pálido pero con las venas marcadas. También presentan defectos en el establecimiento fotoautotrófico debido a la carencia de carotenoides y clorofila (Li *et al.*, 1995), derivada de una diferenciación tardía de los cloroplastos y una reducción del tamaño de los plástidos y las granas (López-Juez *et al.*, 1998). Como resultado, los mutantes *cue1/nox* tienen un menor



tamaño de la roseta, hojas, cotiledones, y meristemo, así como menor longitud de raíz y una mayor apertura estomática.

Por último, también está descrita una síntesis de NO mediada por hidroxilaminas (HAs). Las HAs reaccionan con superóxido ( $O_2^-$ ) para formar NO, aunque la contribución a la síntesis de NO en general en plantas es mínima. Esta reacción es dependiente de especies reactivas del oxígeno (ROS) ya que la liberación de NO aumenta con tratamiento de peróxido de hidrógeno y se reduce en respuesta a la enzima catalasa (Rümer *et al.*, 2009). Aunque estas últimas fuentes de producción de NO puedan ser minoritarias, la síntesis de NO en un tejido específico o momento concreto puede tener una importante función en la señalización de NO. Las diferentes vías de síntesis de NO en plantas están resumidas en la parte izquierda de la **Figura 1**.



**Figura 1. Rutas de síntesis y metabolismo del NO descritas en plantas.** Verde: vía de síntesis reductora. Naranja: vías oxidativas. Morado: rutas del metabolismo del NO. NR: nitrato reductasa, Ni:NOR: nitrito: óxido nítrico reductasa; XOR: xantina óxido reductasa; ARGAH: arginasa; GR: glutatión reductasa; PGB: fitoglobina; CuAO: cobre amino oxidasa, PAO: poliamina oxidasa.

## 3.2. Mecanismos de secuestro y detoxificación del NO

Para prevenir niveles excesivamente altos de NO que puedan resultar tóxicos para la planta en momentos concretos del desarrollo o respuestas a estrés, existen diferentes mecanismos de detoxificación o secuestro del NO como la formación de GSNO, el ciclo de las fitoglobinas-NO y las reacciones con ROS (oxígeno, superóxido), tal y como se observa en la parte derecha de la **Figura 1**.

### 3.2.1. GSNO

El S-nitrosoglutatión (GSNO) se origina mediante la incorporación de una molécula de NO al grupo tiol del residuo de cisteína del glutatión reducido (GSH). El GSNO está considerado como un reservorio de NO (Sakamoto *et al.*, 2002) y su abundancia influencia la S-nitrosilación de numerosas proteínas (Park, 1988), por lo que la regulación del contenido de GSNO representa un paso importante en la regulación de los niveles de NO. El GSNO, al ser más estable químicamente, puede transportar NO a largas distancias en la planta.

Los niveles de GSNO están controlados por la enzima GSNO reductasa (GSNOR), la cual cataliza la oxidación de GSNO a GSSG, liberando amoníaco (NH<sub>3</sub>). A su vez, el GSSG sirve de sustrato para la glutatión reductasa (GR), formando de nuevo GSH (Corpas *et al.*, 2013).

Una vez formado el GSNO, éste puede directamente modificar post-traduccionalmente residuos de Cys de otras proteínas en una reacción de transnitrosilación, puesto que el NO es transferido del residuo de Cys del GSNO a una Cys de la proteína diana. Como modificación post-traducciona, ésta puede afectar a la estabilidad, actividad o localización de la proteína modificada. Además, la propia GSNOR se inhibe mediante S-nitrosilación (Frunghillo *et al.*, 2014)

En *Arabidopsis*, el mutante de pérdida de función del gen *GSNOR1-3*, *hot5-2* (SENSITIVE TO HOT TEMPERATURE5) se identificó en un screening de termotolerancia (Lee *et al.*, 2008), presenta niveles elevados de GSNO y una mayor proporción de proteínas S-nitrosiladas (Hu *et al.*, 2015). Esta mutación se traduce en efectos pleiotrópicos durante el desarrollo y respuestas a

estreses bióticos y abióticos. Los mutantes *hot* presentan alteraciones en el contenido de clorofila, tiempo de floración, pérdida de dominancia apical (ya que poseen numerosas ramas axilares), reducción en la elongación del hipocótilo y raíz primaria, defectos en la germinación y una menor producción de semillas (Chen *et al.*, 2009; Kwon *et al.*, 2012).

### 3.2.2. Fitoglobinas

Las fitoglobinas (inicialmente llamadas Hemoglobinas) o PGBs son hemoproteínas globulares capaces de unir moléculas como el O<sub>2</sub> y el NO, por lo que tienen un papel clave en la percepción de estas moléculas gaseosas. Las PGBs contienen un grupo prostético hemo, capaz de unir gases diatómicos como O<sub>2</sub>, CO y NO. La unión de O<sub>2</sub> y CO ocurre cuando el grupo hemo está en forma ferrosa (Fe<sup>2+</sup>), mientras que el NO se une a la forma ferrosa y férrica (Fe<sup>3+</sup>), teniendo mayor afinidad por la ferrosa (Hoy and Hargrove, 2008).

Según la nueva nomenclatura y clasificación (Hill *et al.*, 2016a), encontramos dos grupos de fitoglobinas simbióticas (SymPhytogb y Lb) y cuatro fitoglobinas no simbióticas (Phytogb0, 1, 2 y 3).

Las fitoglobinas simbióticas (SymPhytogb) son aquellas presentes en nódulos de plantas no leguminosas y las Leghemoglobinas (Lb) están localizadas en los nódulos de plantas leguminosas. Estas fitoglobinas intervienen en la nodulación con bacterias fijadoras de nitrógeno y su función principal es facilitar la difusión de O<sub>2</sub> en estos órganos (Appleby *et al.*, 1983; Ott *et al.*, 2005).

Las fitoglobinas no simbióticas engloban a las presentes en briófitos y gimnospermas (Phytogb0), en angiospermas (PGB1 y PGB2) y la PGB3, anteriormente conocida como grupo de las hemoglobinas truncadas, presentes en algas y plantas terrestres.

La PGB1 tienen una afinidad muy alta por el oxígeno, que resulta en una baja constante de disociación, por lo que estas proteínas no tienen una función importante en el transporte de O<sub>2</sub>, sino una función de detoxificación del NO (Igamberdiev *et al.*, 2005; Hebelstrup *et al.*, 2007). PGB1 posee actividad NO dioxigenasa, oxidando NO a NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, usando NADPH como donador de electrones (Perazzolli *et al.*, 2004). La expresión de PGB1 está inducida por

frío, hipoxia, etileno o infecciones por hongos fitopatógenos (Hunt *et al.*, 2001; Hartman *et al.*, 2019). La PGB2 tiene un papel en el desarrollo temprano y la embriogénesis somática (Vigeolas *et al.*, 2011; Godee *et al.*, 2017) y posee una mayor constante de disociación que PGB1, por lo que su función principal en la planta es el transporte de O<sub>2</sub> (Trevaskis *et al.*, 1997). La PGB3 es la menos estudiada, posee actividad NO dioxigenasa y está descrita su participación en la regulación de la longitud de la raíz y respuestas a estreses bióticos, como la infección por *Sclerotinia sclerotiorum* a través del control de los niveles de NO y ROS (Mukhi *et al.*, 2017). El control de los niveles de NO por las PGBs es específico de cada célula, tejido u órgano, como se observa por los patrones de expresión de los genes *PGBs*, revelados por un análisis de los elementos reguladores en *cis* de sus promotores (Stasolla *et al.*, 2019). El papel de las PGBs en la homeostasis del NO durante el estrés por hipoxia se explica en el **apartado 4**.

### 3.2.3. Reacciones no enzimáticas

El NO libre puede reaccionar con O<sub>2</sub> para formar NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Neill *et al.*, 2003), que a su vez pueden ser empleados por la NR o en la cadena de electrones de la mitocondria para formar de nuevo NO, si bien las reacciones se encuentran separadas espacialmente, ya que las vías reductoras de producción de NO se encuentran principalmente en tejidos hipóxicos o en oscuridad (Gupta *et al.*, 2005). El NO también reacciona con moléculas señalizadoras como son las ROS. La reacción del NO con ROS ocurre principalmente en peroxisomas (Corpas and Barroso, 2014). Así, el NO reacciona con el radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) para generar peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), compuesto más reactivo que el NO que puede aumentar el estrés nitrosativo. El ONOO<sup>-</sup> es capaz de reaccionar con residuos de Tyr de diferentes proteínas, llevando a cabo la modificación post-traduccional de nitración de Tyr.

#### 4. Biosíntesis y detoxificación del NO en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno

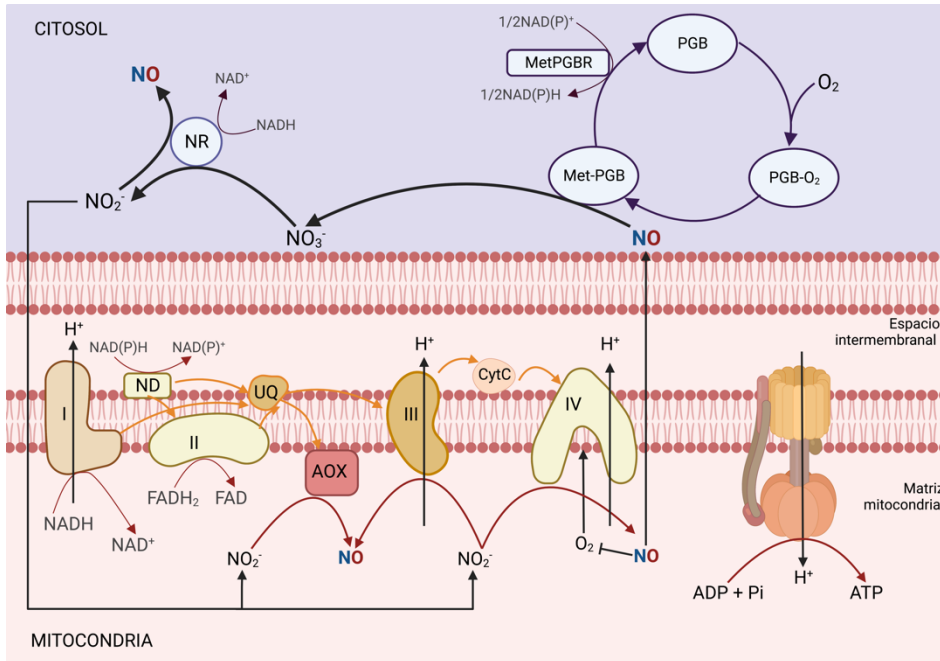
Las investigaciones del papel del NO en la tolerancia a hipoxia son bastante recientes, aunque los procesos descritos hasta la fecha tienen gran relevancia (revisados en Da-Silva and Amarante, 2022).

La producción de NO en respuesta a la hipoxia tiene un papel en la regulación del consumo de oxígeno, ahorrando su uso para posponer o evitar una situación de anoxia. Por ejemplo, en semillas de guisante, el aumento de la producción de NO se correlaciona con una reducción del consumo de oxígeno y ésta puede ser revertida con el uso del secuestrador de NO cPTIO (Borisjuk *et al.*, 2007; Benamar *et al.*, 2008).

Como se ha explicado anteriormente, la biosíntesis de NO en plantas ocurre por vía oxidativa y reductora. Sin embargo, en condiciones de bajo oxígeno, el papel de la vía oxidativa es muy limitado. En los tejidos expuestos a condiciones de hipoxia o anoxia, la producción de NO tiene lugar a partir de la reducción de  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ . Esta vía incluye la enzima citosólica nitrato reductasa (NR) y los complejos de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria (oxidasa alternativa, AOX, complejos III y IV, COX). Durante la hipoxia, la acidificación del citosol y la desfosforilación aumentan la actividad NR, así como también aumenta la expresión de los genes *NIA1* y *NIA2* (Botrel and Kaiser, 1997; Klok *et al.*, 2002; Morard *et al.*, 2004). Cuando los niveles de oxígeno en la célula disminuyen, los niveles de  $\text{NO}_2^-$  aumentan en las células de la raíz, ya que la reducción de  $\text{NO}_2^-$  a amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) se inhibe en respuesta a la hipoxia (Allegre *et al.*, 2004; Costa-Broseta *et al.*, 2020). En este contexto, la NR contribuye a la acumulación de NO a partir de la reducción de  $\text{NO}_2^-$  en una reacción dependiente de NAD(P)H.

El  $\text{NO}_2^-$  acumulado en el citosol es translocado al interior de la mitocondria y reducido a NO a través del complejo III, complejo IV o citocromo oxidasa (COX) y la oxidasa alternativa (AOX) (Gupta *et al.*, 2005, 2020; Stoimenova *et al.*, 2007; Kumari *et al.*, 2019) (**Figura 2**). Este proceso está asociado con la oxidación de NAD(P)H. Además, la reducción de  $\text{NO}_2^-$  por la COX y AOX permite el bombeo de protones de la matriz al espacio intermembrana de la mitocondria y explica la producción de ATP en la mitocondria en condiciones anaeróbicas pero suplementadas con nitrito (Stoimenova *et al.*, 2007; Gupta

and Igamberdiev, 2011). Esta vía de biosíntesis de NO a partir de  $\text{NO}_2^-$  en la mitocondria está considerada la principal fuente de NO en raíces en condiciones de bajo oxígeno (Planchet *et al.*, 2005; Gupta and Igamberdiev, 2011).



**Figura 2. Esquema del funcionamiento del ciclo PGB-NO en condiciones de hipoxia.** UQ: ubiquinona, AOX: oxidasa alternativa; NR: nitrato reductasa, ND: NADH deshidrogenasa mitocondrial; PGB: fitoglobina; CytC: citocromo c. Figura adaptada de Gupta *et al.* (2020).

En cuanto a los mecanismos de detoxificación del NO durante la hipoxia, el papel de las PGBs es crucial para controlar los niveles de NO y prevenir una acumulación excesiva de este gasotransmisor.

El NO producido en la mitocondria difunde al citosol, donde es oxidado por una PGB oxigenada ( $\text{PGB-O}_2$ ) para formar  $\text{NO}_3^-$ . La met-PGB resultante es de nuevo reducida a PGB por una reductasa (met-PGB Reductasa, MetPGBR), generando  $\text{NAD(P)H}$  (Igamberdiev *et al.*, 2006, 2011). Como resultado de la oxidación de NO, el  $\text{NO}_3^-$  es usado de nuevo por la NR para formar  $\text{NO}_2^-$ , cerrando así el ciclo de producción y secuestro de NO que se conoce como ciclo fitoglobina-NO (PGB-NO) (Dordas *et al.*, 2003a; Igamberdiev, 2004). El ciclo PGB-NO previene la sobreacumulación de  $\text{NAD}^+$  y permite la generación de ATP en situaciones de hipoxia, por lo que puede

considerarse una alternativa a las rutas de fermentación, aunque sea un proceso acidificador (Libourel *et al.*, 2006). La pérdida de función de la PGB aumenta la fermentación y genera menos ATP en condiciones de hipoxia, mientras que la sobreexpresión de las PGBs resulta en un mayor ratio ATP/ADP y aumenta la tolerancia frente a la hipoxia (Hartman *et al.*, 2019; Andrzejczak *et al.*, 2020).

Cabe destacar que las PGB no secuestran todo el NO de la célula y que las concentraciones basales de NO se mantienen para su correcta señalización celular. El aumento de los niveles de NO es crucial en las primeras horas del estrés por hipoxia, induciendo una señal sistémica que permite la aclimatación de las plantas. Además, niveles mínimos de NO permiten el correcto funcionamiento del sistema antioxidante que controla los niveles de ROS, así como cambios morfológicos en respuesta a hipoxia, como la formación de aerénquima o raíces adventicias (Chen *et al.*, 2016; Mira *et al.*, 2016b). Si bien el sistema de secuestro o detoxificación de NO incluye la participación de otros mecanismos como se ha explicado anteriormente, solo la PGB1 es capaz de secuestrar eficientemente el NO en condiciones de hipoxia.

## 5. Señalización del NO a través de la ruta proteolítica del extremo amino

La vida media de las proteínas varía enormemente, desde unos segundos hasta varios días (Belle *et al.*, 2006; Yen *et al.*, 2008). En eucariotas, la estabilidad de las proteínas está en gran parte controlada por el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS). La proteólisis mediada por el sistema UPS implica la conjugación de múltiples unidades del polipéptido ubiquitina (Ub, 8 kDa) a dianas específicas, marcándolas en residuos de lisina (Lys) para su degradación a través del proteasoma 26S (Hanna and Finley, 2007).

En la ruta proteolítica del extremo amino (Bachmair *et al.*, 1986; Varshavsky, 2011), la naturaleza del aminoácido en posición N-terminal determina si la proteína va a ser marcada para su degradación por el proteasoma. Así, los aminoácidos en posición N-terminal de las proteínas sustrato de esta ruta se pueden clasificar en residuos estabilizadores o desestabilizadores. Para su degradación, además de un residuo desestabilizador en el extremo N-

terminal, las proteínas deben presentar un residuo de Lys próximo al extremo N-terminal, en el cual se conjugarán las unidades de Ub (Bachmair and Varshavsky, 1989; Suzuki, 1999; Prakash *et al.*, 2004). Dentro de los residuos desestabilizadores, a su vez, se pueden dividir en residuos primarios, secundarios o terciarios (**Figura 3**). Así, podemos diferenciar:

- Residuo estabilizador: aminoácido en posición N-terminal que previene la degradación de la proteína. Estos residuos pueden ser Ala, Glu, Ser, Thr, Val, Met, Pro.
- Residuo desestabilizador primario: la proteína es directamente reconocida por una E3 ubiquitín-ligasa, marcándola para su degradación. Estos residuos se clasifican en tipo I o básicos (Arg, Lys, His) o de tipo II o hidrofóbicos (Phe, Trp, Tyr, Leu y Ile).
- Residuo desestabilizador secundario: residuos que deben ser modificados por aminoacil-transferasas, las cuales conjugan un residuo desestabilizador primario en el extremo N-terminal. En plantas, estos residuos son Asp, Glu y Cys-oxidada, los cuales son conjugados por una arginil-tRNA transferasa. En Arabidopsis, las proteínas ATE1 y ATE2 conjugan residuos de Arg a los residuos secundarios (Graciet *et al.*, 2009).
- Residuo desestabilizador terciario: Estos residuos deben ser modificados enzimática o químicamente antes de ser arginilados. Los aminoácidos Asn y Gln son desamidados por N-terminal<sup>Asn/Gln</sup> amidasas (Nt<sup>N/Q</sup>-amidasa) a Asp y Glu, respectivamente (Wang *et al.*, 2009). Las proteínas NTAN1 y NTAQ1 (Grigoryev *et al.*, 1996; Vicente *et al.*, 2019) son las responsables de estas reacciones en Arabidopsis. En el caso del aminoácido Cys, éste es oxidado por las enzimas dioxigenasas PCO1 y PCO2 (Weits *et al.*, 2014), empleando O<sub>2</sub> en la reacción.

Además de las proteínas descritas, el grupo de enzimas Metionina Aminopeptidasa (MAP) también participa en la ruta, pues son las primeras enzimas en procesar el extremo N-terminal, eliminando el primer residuo de Metionina (Met) con el que se traducen todas las proteínas.

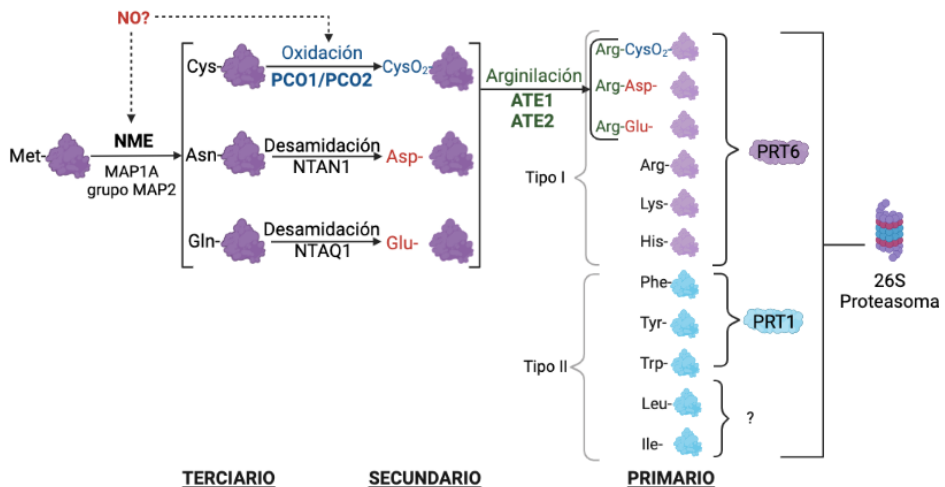
En otros sistemas, solo una proteína E3 ligasa participa en la ruta proteolítica del extremo amino, reconociendo los sustratos con residuos



desestabilizadores primarios. En levaduras, la proteína UBR1 reconoce residuos desestabilizadores primarios de tipo I y II, mientras que en plantas esta función está diversificada en al menos dos proteínas: PRT1 y PRT6. La proteína PRT1 reconoce sustratos con residuos desestabilizadores primarios de tipo II (Phe, Tyr y Trp), mientras que la proteína PRT6 reconoce sustratos con Arg en posición N-terminal y se especula que pueda reconocer al resto de aminoácidos de tipo I (Lys, His). Debido a esta diversificación, la comunidad científica planteó renombrar las diferentes ramas de la ruta proteolítica del extremo amino en plantas en función de la E3 Ub ligasa implicada (Varshavsky, 2019; Millar *et al.*, 2019). La existencia de varias E3 Ub ligasas para esta ruta proteolítica indica una regulación más compleja de esta ruta en plantas que en otros eucariotas (Holdsworth *et al.*, 2020).

La rama PRT6 de la ruta proteolítica del extremo amino está considerada como sensora de los niveles de O<sub>2</sub> y NO en plantas. El O<sub>2</sub> es requerido para la oxidación del residuo desestabilizador terciario Cys.

El NO es también indispensable para la degradación de los sustratos de la rama PRT6, por lo que la señalización del NO está al menos parcialmente controlada por esta rama, a través de una regulación directa o indirecta de algún componente de la ruta (Gibbs *et al.*, 2011, 2014; Licausi *et al.*, 2011).



**Figura 3. Esquema de la Ruta proteolítica del extremo amino.** NME: escisión de la metionina inicial; NTAN: N-terminal<sup>Asn</sup> amidasas; NTAQ1: N-terminal<sup>Gln</sup> amidasa.

## 6. Escisión de la Metionina inicial por Metionina aminopeptidasas (MAP)

La eliminación de la Met en posición N-terminal (*N-terminal methionine excision* o NME) es la primera modificación en el extremo N-terminal, ya que generalmente ocurre cuando las proteínas están aún unidas a los ribosomas durante su traducción. La escisión de la Met (NME) no ocurre en todas las proteínas, ya que es necesario que el segundo residuo en el extremo N-terminal sea un aminoácido sin carga (Gly, Cys, Pro, Ser, Ala) (Frottin *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2010), estimándose que ocurre en aproximadamente dos tercios de las proteínas traducidas en un organismo (Meinzel and Giglione, 2008; Martinez *et al.*, 2008).

Las enzimas responsables de esta modificación son Metionina Aminopeptidasas o MAPs. En *Arabidopsis thaliana*, las proteínas MAP1A, MAP2A y MAP2B se localizan en el citosol y son las implicadas en la ruta proteolítica del extremo amino (Giglione *et al.*, 2004; Meinzel *et al.*, 2006). Además de las MAPs citosólicas, se han descrito las proteínas MAP1B, MAP1C y MAP1D en plastos y mitocondria. En estos orgánulos también se encuentran otras enzimas, péptido deformilasas (PDF1A y PDF1B) que eliminan grupos formil unidos a la Met inicial (formilMet) en proteínas traducidas en los orgánulos. La acción de las PDFs expone al grupo amino de la primera Met, prerequisite para la subsecuente acción de las MAPs organulares.

Todas las enzimas MAPs llevan a cabo la misma reacción y tienen una estructura tridimensional muy similar. En el caso de las MAP del grupo 2 (MAP2A y MAP2B), tienen una organización idéntica de intrones y exones, producen mRNA del mismo tamaño y su ORF comparte un 86% de similitud (Ross *et al.*, 2005).

A nivel estructural, las MAPs son metaloproteínas que forman parte de la familia *pita-bread*. Poseen un centro metálico binuclear, con dos iones metálicos unidos por ligandos monodentados y bidentados (His, Glu, Asp). Todos los residuos que forman parte del centro activo están muy conservados evolutivamente (Lowther and Matthews, 2000). Además, las MAPs del grupo 2 tienen un subdominio helicoidal adicional de 60 aminoácidos en posición C-terminal.

Una inhibición completa de la actividad NME produce defectos en el desarrollo debido al incremento de la actividad proteolítica en la célula, al aumentar el número de proteínas marcadas para degradar al retener la Met inicial. Este aumento de la actividad proteolítica también aumenta el *pool* de aminoácidos libres y altera la homeostasis del glutatión (Frottin *et al.*, 2009). Durante mucho tiempo se ha considerado la NME como un proceso constitutivo, sin embargo, existen evidencias de un control de la actividad NME a nivel transcripcional y post-traducciona, regulándose durante el desarrollo y en respuesta a diferentes estreses. En *Arabidopsis*, la expresión del gen *PDF1B* se reduce en respuesta a estrés por ROS (Giglione *et al.*, 2000), y la expresión de *PDF1B* y *MAP1D* está inducida en flores y hojas en desarrollo (Serero *et al.*, 2001). En el caso de las MAPs citosólicas, el gen *MAP1A* no tiene expresión en silicuas y la expresión de *MAP1A*, *MAP2A* y *MAP2B* es mayor en los primeros estadios de desarrollo y varía en función del órgano o tejido (Ross *et al.*, 2005).

En uno de los primeros trabajos sobre las enzimas MAPs citosólicas en plantas, Ross *et al.*, (2005) describieron que la NME es esencial para el correcto desarrollo de la planta, ya que un nivel mínimo de actividad MAP en el citosol es indispensable para su supervivencia. Además, las enzimas *MAP1A* y el grupo *MAP2* son funcionalmente intercambiables y el grupo *MAP2s* es diana del compuesto fumagilina (Ingber *et al.*, 1990; Griffith *et al.*, 1997), conservándose el mecanismo existente en animales y hongos. La fumagilina es un compuesto natural producido por el hongo *Aspergillus fumigatus* (McCowen *et al.*, 1951), que se une mediante un enlace covalente a las proteínas *MAP2A* y *MAP2B* pero no tiene efecto sobre *MAP1A*. El empleo del compuesto fumagilina resulta una herramienta útil para inducir una desregulación reversible de la NME citosólica.



