



Universidad de Granada



Estación Experimental
del Zaidín

Técnicas de imagen y proteómicas aplicadas
al seguimiento de la interacción virus-planta
huésped

Mónica Pineda Dorado

Tesis Doctoral

Granada 2007

Técnicas de imagen y proteómicas aplicadas al
seguimiento de la interacción virus-planta huésped

Imaging and proteomic techniques for monitoring
the interactions virus-host plant

Memoria presentada para optar al grado de Doctora por la Licenciada en
Biología Mónica Pineda Dorado

Fdo.: Mónica Pineda Dorado

Con el Vº Bº de la directora del trabajo:

Fdo.: Matilde Barón Ayala
Dra. en Ciencias Biológicas
Investigador Científico del CSIC
Estación Experimental del Zaidín, Granada

Granada, 2007

El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas de la Estación Experimental del Zaidín de Granada (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), con la ayuda de una beca predoctoral del Ministerio de Educación y Ciencia y un contrato asociado a proyecto (BIO2004-04968-CO2-02). El trabajo ha sido financiado por los proyectos del Programa Nacional de Biotecnología BIO2001-1937-CO2-02 y BIO2004-04968-CO2-02.

Los resultados de este trabajo han sido presentados en los siguientes Congresos:

- XII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología (SEF). Lloret de Mar, Gerona (España). 2004.
- International Satellite Meeting: Photosynthesis and post-genomic era, “From Biophysics to Molecular Biology, a path in the research of Photosystem II”. Trois-Rivières, Québec (Canadá). 2004.
- 13th International Congress of Photosynthesis. Montreal (Canadá). 2004
- XXVII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). Lérida (España). 2004.
- Photosynthesis and stress; Biophysical and Biochemical Methods in Photosynthesis. Research Central-European Conference. Brno (República Checa). 2005.
- Sustainability, Environmental Stress and the Bases of Plant Resistance. Sofia (Bulgaria) 2006.

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido expuestos por la Licenciada M. Pineda en el seminario “Fluorescencia roja de la clorofila: Una herramienta para la detección del estrés vegetal”, celebrado en la Estación Experimental La Mayora (Algarrobo-Costa, Málaga) en marzo de 2006.

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

- Sajnani, C., Pérez-Bueno, M.L., Pineda, M., García-Luque, I., Nedbal, L., Benedikty, Z., Roncel, M., Ortega, J.M., Ducruet, J.M., Römer, S. y Barón, M. (2005) The chloroplast as target of biotic stress: damage and defence during viral pathogenesis. En: *Photosynthesis: Fundamental aspects to global perspectiva*. Van Der Est, A. y Bruce, D. eds. ACG Publishing, Lawrence, KS. pp 610-611.

- Chaerle, L., Pineda, M., Romero-Aranda, R., Van Der Straeten, D. y Barón, M. (2006) Robotized thermal and chlorophyll fluorescence imaging of Pepper Mild Mottle Virus infection in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell. Physiol.* 47: 1323-1336.

Durante todos estos años de realización de Tesis Doctoral, mucha gente ha contribuido a que mi trabajo aquí en Granada o en los lugares donde he realizado estancias, haya sido una de las mejores experiencias que me tenía reservada la vida. Me gustaría dar las gracias a todos ellos, espero acordarme de todos y si alguno se me queda en el tintero, ruego sea capaz de perdonarme, pues el olvido es fruto del despiste y no de la falta de cariño. A todos: GRACIAS. Todas las cosas buenas que se pueden encontrar en esta Tesis es consecuencia de vuestra ayuda, todos los fallos son sólo míos.

Si estos agradecimientos tuvieran que seguir un orden cronológico, en primer lugar me gustaría agradecerle a Cayo Ramos, buen profesor y mejor persona, el que fuera el primero que “científicamente” confió en mí. Siempre trabajaré con la esperanza de no defraudar esa confianza.

De la misma manera, me he esforzado por no defraudar la confianza de aquella que a su vez confió en Cayo y me “adoptó” en su laboratorio, ofreciéndome todo tipo de facilidades para que mi trabajo y mi vida en Granada fueran lo más fáciles y agradables posible. Por eso, quiero agradecer a mi directora de Tesis, Matilde Barón, todo el empeño que ha puesto para que este trabajo saliera adelante contra viento y marea, por seguir pensando que podía sacar algo bueno de mi aun cuando los resultados iniciales no fueron todo lo satisfactorios que yo hubiera deseado, por darme la oportunidad de viajar y por seguir queriéndome en su laboratorio.

Gracias a Carmen Lluch Plá, mi tutora de tercer ciclo porque su ayuda ha sido enorme, haciendo fácil algo tan difícil como es superar con éxito toda la burocracia que rodea a la Tesis.

Gracias a Isabel García Luque y Maite Serra, por recibirme con los brazos abiertos en su laboratorio del CIB, por su gran apoyo logístico, por dar siempre buenos consejos y por el material biológico cedido a nuestro laboratorio.

Gracias a Carlota y a Marisa, excelentes maestras en la poyata del laboratorio. Su enorme calidad como científicas sólo se ve superada por su calidad

humana. Su amistad es uno de los tesoros que me llevo conmigo. Muchas gracias por la paciencia, los consejos, las horas dedicadas a enseñarme, los ánimos, las risas, por ser paño de lágrimas y por ¡la terapia de grupo!

Gracias a Abdel, por estar siempre dispuesto a regar mis plantas durante vacaciones y fines de semana, por ayudarme con el medio de cultivo hidropónico y por enseñarme tantas cosas de la cultura marroquí y de la religión musulmana. Aunque no consiga convencerme de muchas de esas cosas, lo que sí ha conseguido es que las respete aún más.

Gracias a Iratxe, porque aunque haya llegado hace poco tiempo, ha traído frescura al laboratorio. Gracias por su compañía, por su ayuda y por estar siempre dispuesta a darla.

Gracias a Juan José Lázaro, por su habitual buen humor y carácter, por interesarse siempre por nuestro trabajo y apoyarlo, incluso compartiendo material científico y dejándonos usar su laboratorio, donde utilizamos aparatos cuyo ruido continuo no es precisamente agradable.

Gracias a Paquita, por aguantar con tan buen humor ese ruido y por su inestimable ayuda con mis plantas, la bibliografía, las fotocopias, etc.

Gracias a Laura, porque siempre estaba dispuesta a compartir sus conocimientos con los demás, y me ayudó mucho cuando quisimos que en nuestro laboratorio se hiciera, además de Bioquímica, Biología Molecular.

Gracias a Sergio, compañero de penas y alegrías, siempre pendiente de mi trabajo y animándome, lo que me he reído con él, y lo que he sufrido cuando me martirizaba con el *reggaeton*.

Gracias a Iván, porque aunque también ha llegado hace poco, se ha acoplado perfectamente a nosotros y se ha convertido en un miembro indispensable de nuestra “familia”.

Gracias a Laci, uno de los mejores húngaros que hay, y eso que los hay muy buenos. Gracias por tratarme tan bien en Budapest, donde me siento como en mi

casa y donde siempre quiero volver, por su ayuda con mi trabajo allí y aquí, por su buen humor aunque las cosas se tuerzan en el laboratorio, y por su amistad.

Gracias miles a los compañeros de pasillo con los que tantísimas risas he compartido, son los mejores: José Ángel, Juande, Antonio, Álvaro, Sol, Amada (que no era del pasillo, pero como si lo fuera), Eloy..., cómo echo de menos a los que están fuera. Gracias a Mari Carmen, José Carlos y Ana Vílchez por ser como son. Gracias a María, Raúl y Antonio por ayudarme a recuperar archivos importantes (vitales, debería decir). Gracias a todos los demás compañeros “precarios” de la Estación Experimental del Zaidín, sois muchos para enumeraros, me gustaría que todos os sintierais incluidos en este agradecimiento. Gracias a Andrés Berver por prestarnos material de laboratorio y ayudarnos a encontrar el material de centrífuga misteriosamente desaparecido. Gracias a Alberto Bago por dejarme usar su microscopio con cámara de fotos que ayudó a que mi primera publicación científica viera la luz, y a la ya doctora Adriana Marulanda por enseñarme a usarlo, y por ser sufrida y cariñosa compañera en el largo camino del doctorado. Gracias a Mariam y a Ana Chueca, y a Julio López Gorgé. Gracias a Antonio Jesús Castro por darme un buen consejo sobre proteómica. Mis geles de proteínas en el rango básico no existirían de no ser por él. Gracias a Tino Krell por su ayuda en la parte de esta tesis dedicada a proteómica. Gracias a todos los empleados de mantenimiento y del departamento de informática, y sobre todo, a Antonio Melgar, por estar pendiente de las cámaras de cultivo, día y noche, fines de semana, festivos, vacaciones..., gracias por todas esas veces que le he hecho venir y él lo ha hecho sin rechistar.

Gracias a todos mis compañeros de fatigas del CIB, que hacían que a una le entraran ganas de levantarse por las mañanas y enfrentarse al día a día cuando el estado de ánimo no es el mejor. Gracias al “dostol” Alfonso, Margot, Miriam, Gema, Antonio, Mercedes, Carolina y Pablo. Gracias por tantos y tan buenos momentos.

Gracias a Pili, la mejor compañera de piso del mundo. Gracias por estar siempre dispuesta a hablar y a escuchar, por ser como es. Siempre nos quedará el Athenas... (aunque cada vez nos cobren un precio diferente).

Gracias a mi otra compañera de piso en Madrid, Esther, porque aunque no pueda decir que es la mejor compañera de piso (entre otras cosas porque apenas aparecía por allí), sí que puedo afirmar que cuando se le conoce se le quiere incondicionalmente.

Gracias a Merce Romero, por ser mi guía en el mundo del intercambio de gases. Su entusiasmo es contagioso, da gusto trabajar con ella. Gracias también a Enrique Moriones, Jesús Navas y Rafael Fernández, así como a todos los que nos juntábamos en el cuarto de becarios y alrededor de la mesa del desayuno en La Mayora, en especial a Elena, mi compañera de tapas.

Gracias también a los becarios de Cayo: "Isas", Luis y Clara Todos forman un grupo excelente, con el que da gusto colaborar.

I would like to say thanks to Zuzana Benedikty for making easier my first stay abroad in such a place like Nové Hradý (probably, Zuzana cannot understand why I say "such a place"). Also, I should say thanks to Julie Soukupová and Ladislav Nedbal, because they are very good hosts, always taking care about us when we go to the Czech Republic, and helping us with FluorCam in Granada. In this point, I have to thank also Martin Trtílek, our favourite fluorometer designer.

I would like to say thanks to Dominique Van Der Straeten and Laury Chaerle for receiving me in their lab and for being so helpful with me.

I would like to say thanks to Eva Sarvari, Magdolna Droppa, Karoli Bokak and Zoltan Zsigeti for making me feel like home in Budapest, for showing me very interesting demonstrations, Balaton Lake, the excellent Hungarian food, and, over everything, for being so very good people.

Gracias a toda mi familia y amigos, por todo ese apoyo que me dan y que nunca me puede faltar. A la familia de Pepe, por preguntar siempre "eso que tú haces, ¿para qué sirve?". Especiales gracias a Antonio, Raquel, Karmele,

Guillermo y Miguel, porque siempre confiaron en mi. Especiales gracias también a Paco, por interesarse siempre en lo que yo hacía, desde que estudiaba en la universidad.

Hay cuatro personas para los que la palabra GRACIAS (así, con mayúsculas) se me queda pequeña. Es imposible expresar con palabras mi enorme gratitud, pero lo intentaré. A mis padres, Manuel y Carmen, GRACIAS por estar siempre ahí, por empeñarse en que yo tuviera una educación universitaria, por querer siempre lo mejor para mí. Me han dado todo lo mejor que unos padres puedan dar a sus hijos. Lucho a diario por estar a la altura de sus expectativas y por no defraudarlos jamás, pues se merecen todo lo mejor, y sin embargo, se conforman conmigo. A mi hermana, Mari Carmen, GRACIAS por cuidar siempre de su hermana pequeña, por no olvidar jamás un cumpleaños y por ser la mejor hermana que se puede desear y de la que me gustaría poder disfrutar más. A mi pareja, Pepe, GRACIAS por dar alegría a mi vida como sólo él sabe hacerlo, por todo lo que significa para mí, pasado, presente, y sobre todo, futuro. Os quiero mucho a los cuatro, GRACIAS por devolverme tanto amor.

A mis padres

A mi hermana

A Pe

*“Si he conseguido ver más lejos
es porque me he aupado en hombros de gigantes”*

Sir Isaac Newton

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| ABREVIATURAS..... | 19 |
| RESUMEN | 23 |
| SUMMARY | 25 |
| A. INTRODUCCIÓN | 27 |
| A.1. El estrés en las plantas. La interacción planta-virus como modelo de estrés biótico en el cloroplasto | 27 |
| A.2. Técnicas biofísicas de imagen aplicadas al estudio de la detección precoz del estrés vegetal | 34 |
| A.2.1. Termografía | 35 |
| A.2.1.1. La transpiración: el origen del calor desprendido por las plantas | 35 |
| A.2.1.2. Termografía, una técnica de imagen..... | 37 |
| A.2.1.3. Aplicaciones de la termografía a la biología vegetal | 39 |
| A.2.1.3.1. Selección de mutantes..... | 39 |
| A.2.1.3.2. Cultivo de vegetales en el espacio | 39 |
| A.2.1.3.3. Transporte hídrico en plantas..... | 40 |
| A.2.1.3.4. Tolerancia a la congelación | 41 |
| A.2.1.3.5. Calidad de los frutos | 41 |
| A.2.1.3.6. Alteraciones ocasionadas por patógenos | 41 |
| A.2.1.3.7. Muerte celular | 43 |
| A.2.1.3.8. Teledetección | 44 |
| A.2.2. Fluorescencia verde-azul | 46 |
| A.2.2.1. Origen de la fluorescencia verde-azul | 48 |
| A.2.2.2. Cocientes de fluorescencia | 50 |
| A.2.2.3. Fluorescencia inducida por luz UV de imagen ... | 51 |

| | |
|---|----|
| A.2.2.4. Aplicaciones de la fluorescencia inducida por luz UV | 54 |
| A.2.2.4.1. Exposición a la luz UV | 54 |
| A.2.2.4.2. Crecimiento y desarrollo..... | 55 |
| A.2.2.4.3. Deficiencias y/o excesos de minerales..... | 55 |
| A.2.2.4.4. Calidad de los frutos | 56 |
| A.2.2.4.5. Estrés hídrico | 57 |
| A.2.2.4.6. Temperatura..... | 58 |
| A.2.2.4.7. Hojas variegadas..... | 58 |
| A.2.2.4.8. Respuestas a patógenos..... | 59 |
| A.2.2.4.9. Teledetección | 60 |
| A.2.3. Fluorescencia roja de la clorofila | 61 |
| A.2.3.1. Origen de la fluorescencia roja de la clorofila..... | 61 |
| A.2.3.2. Cinética de inducción de la fluorescencia I: el efecto Kautsky | 63 |
| A.2.3.3. Cinética de inducción de la fluorescencia II: análisis de los coeficientes de <i>quenching</i> | 65 |
| A.2.3.4. Los componentes del <i>quenching</i> no fotoquímico (NPQ)..... | 67 |
| A.2.3.4.1. <i>Quenching</i> ligado a la transición de estado o qT | 68 |
| A.2.3.4.2. <i>Quenching</i> ligado a la Fotoinhibición o qI | 68 |
| A.2.3.4.3. <i>Quenching</i> dependiente del gradiente de pH transtilacoidal o qE..... | 69 |
| A.2.3.5. Medida de la emisión de fluorescencia roja de la clorofila. Fluorímetros de imagen..... | 72 |

| | |
|--|-----|
| A.2.3.6. Aplicaciones de la fluorescencia de la clorofila de imagen | 74 |
| A.2.3.6.1. Seguimiento de la infección fúngica | 74 |
| A.2.3.6.2. Seguimiento de la infección bacteriana..... | 78 |
| A.2.3.6.3. Seguimiento de la infección viral | 79 |
| A.2.3.6.4. Seguimiento de los daños ocasionados por herbívoros | 82 |
| A.2.3.6.5. Seguimiento de los daños post-cosecha..... | 82 |
| A.2.3.6.6. Teledetección | 84 |
| A.3. Proteómica de plantas..... | 84 |
| A.3.1. Espectrometría de masas..... | 86 |
| A.3.1.1. Preparación de la muestra..... | 86 |
| A.3.1.2. Separación proteica..... | 87 |
| A.3.1.3. Digestión e ionización de la muestra | 89 |
| A.3.1.4. Separación e identificación de los iones..... | 91 |
| A.3.2. Proteómica de plantas empleando geles bidimensionales: estudio de proteínas con punto isoeléctrico en el rango básico (pH>7)..... | 94 |
| A.3.3. Proteómica de las interacciones planta-patógeno | 96 |
| B. OBJETIVOS..... | 99 |
| OBJECTIVES | 100 |
| C. RESULTADOS | 101 |
| C.1. Robotized thermal and chlorophyll-fluorescence imaging of pepper mild mottle virus infection in <i>Nicotiana benthamiana</i> | 101 |
| C.2. Multi-colour fluorescence imaging: an useful tool to visualise systemic viral infection in plants..... | 131 |

| | |
|--|-----|
| C.3. Conventional and combinatorial chlorophyll fluorescence imaging of tobamovirus-infected plants..... | 167 |
| C.4. Changes induced by the pepper mild mottle tobamovirus on the chloroplast proteome of <i>Nicotiana benthamiana</i> | 191 |
| D. DISCUSIÓN | 225 |
| E. CONCLUSIONES..... | 251 |
| CONCLUDING REMARKS..... | 253 |
| F. BIBLIOGRAFÍA | 255 |
| G. ANEXOS | 303 |

ABREVIATURAS

- 1D: monodimensional
2D: bidimensional
2D-DIGE: electroforesis bidimensional empleando fluoróforos (*2-D difference gel electrophoresis*)
 Φ_{PSII} : rendimiento cuántico del fotosistema II
AB: abaxial
ABA: ácido abscísico
AD: adaxial
AS: asintomática
BGF: fluorescencia verde-azul (*blue-green fluorescence*)
BN-PAGE: geles de poliacrilamida nativos azules (*blue native gels*)
CCD: charge-coupled device
CF₁: porción catalítica de la ATP sintasa
Chl: clorofila
Chl a: clorofila a
Chl b: clorofila b
Chl-F: fluorescencia emitida por la clorofila
Chl-FI: fluorescencia emitida por la clorofila de imagen
CMV: virus del mosaico del pepino (*cucumber mosaic virus*)
CP: proteína de cubierta del virus (*coat protein*)
Cyt. f: citocromo f
dpi: días post-inoculación
F440: fluorescencia azul
F520: fluorescencia verde
F690: fluorescencia roja
F740: fluorescencia en el rojo lejano

FL-FIS: sistema de fluorescencia de imagen inducida por una lámpara de flashes (*flash lamp - fluorescence imaging system*)

F₀: fluorescencia mínima

F'₀: fluorescencia mínima alcanzada después de la inducción de la fluorescencia y el apagado de la luz actínica.

Fig.: figura

F_p: fluorescencia máxima alcanzada con luz actínica

F_M: fluorescencia máxima en un estado adaptado a la oscuridad

F'_M: fluorescencia máxima en un estado adaptado a la luz

FNR: ferredoxin-NADP⁺ reductasa

FTICR: Espectrómetro de masas (*Fourier-transform ion cyclotron resonance*)

F_v: fluorescencia variable

F_v/F_M: máximo rendimiento cuántico del PSII

gox: glicolato oxidasa

GS: glutamina sintetasa

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución (*high performance liquid chromatography*)

HR: reacción hipersensible (*hypersensitive reaction*)

Hsp70: proteínas chaperonas pertenecientes a la familia *heat shock* de 70 kDa

IEF: isoelectroenfoque (*isoelectric focusing*)

IPG: gradiente inmobilizado de pH (*immobilized pH gradient*)

IT: trampa iónica (*ion trap*)

LC: cromatografía líquida (*liquid chromatography*)

LHC: complejo de antena (*light harvesting complex*)

Lhc: proteína de unión a clorofila

LIF: fluorescencia inducida por láser (*laser induced fluorescence*)

MCFI: fluorescencia de imagen inducida por luz UV (*multicolour fluorescence imaging*)

MS: espectrometría de masas (*mass spectrometry*)

MS/MS: espectrometría de masas en tándem
m/z: cociente masa/carga
NPQ: quenching no fotoquímico (*non-photochemical quenching*)
OEC: complejo de fotólisis/oxidación del agua (*oxygen evolving complex*)
PAM: *pulse amplitude modulation*
PGK: fosfoglicerato-quinasa
pI: punto isoelectrónico
pmf: fuerza protón motriz (*proton motive force*)
PMF: huella peptídica (*peptide mass fingerprinting*)
PMMoV: virus del moteado suave del pimiento (*pepper mild mottle virus*)
PMMoV-I y -S: cepas italiana y española del virus del moteado suave del pimiento
PR: (proteínas) relacionadas con la patogénesis (*pathogenesis-related*)
PRK: fosforibulo-quinasa
Psa-: proteínas pertenecientes al fotosistema I
Psb-: proteínas pertenecientes al fotosistema II
PSI: fotosistema I
PSII: fotosistema II
PTM: modificación post-traducciona (*post-translational modification*)
Q: cuadrupolo
qN: quenching no fotoquímico
qP: quenching fotoquímico
RbcL: subunidad mayor de la RuBisCO
RbcS: subunidad menor de la RuBisCO
RC: centro de reacción
Rca: RuBisCO activasa
ROS: especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*)
RuBisCO: ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
S: sintomática
SA: ácido salicílico (*salicylic acid*)

SAR: respuesta sistémica adquirida (*systemic acquired response*)

SBPase: sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa

SDS: dodecilsulfato sódico (*sodium dodecylsulfate*)

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (*sodium dodecylsulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*)

SFBA: sedoheptulosa/fructosa-bisfosfato aldolasa

T: temperatura

t: tiempo

TL: termoluminiscencia

TOF: espectrómetro de masas mediante “tiempo de vuelo” (*time-of-flight*)

TOF/TOF: espectrómetro de masas mediante “tiempo de vuelo” en tándem

TMV: virus del mosaico del tabaco

UV: ultravioleta

WT: silvestre (*wild type*)

RESUMEN

Trabajos previos de nuestro grupo han demostrado que la infección por el virus del moteado suave del pimiento (PMMoV) en *Nicotiana benthamiana* induce un descenso en los niveles de proteínas de la cadena transportadora de electrones y del ciclo de Calvin, así como cambios en la expresión de diversos genes de proteínas del cloroplasto, tanto de codificación nuclear como cloroplastídica. Las medidas de termoluminiscencia mostraron alteraciones en el lado donador del PSII y en el potencial asimilatorio, la inducción de un transporte cíclico de electrones en torno al PSI para atender una mayor demanda de ATP en las plantas infectadas y la presencia de estrés oxidativo. Las técnicas de captación de imágenes de fluorescencia roja emitida por la clorofila demostraron ser de utilidad para realizar un seguimiento de la infección por este tobamovirus y de los mecanismos de defensa que el cloroplasto desarrolla durante la patogénesis.

Continuando con estos trabajos, en la presente Tesis Doctoral hemos utilizado tres técnicas biofísicas de captación de imágenes para estudiar el estrés causado por PMMoV en *Nicotiana benthamiana*. (i) La termografía de imagen permitió el seguimiento de los cambios en el patrón de transpiración de las hojas mediante la visualización de los cambios de temperatura en su superficie. Hemos demostrado que las plantas infectadas sufrían un incremento progresivo de temperatura en las hojas asintomáticas, que afectaba primero a las venas principales y se extendía posteriormente al resto del limbo foliar; este fenómeno precedía a la entrada del virus en este tipo de hojas. En las hojas sintomáticas, el incremento de temperatura era homogéneo y no progresivo, siendo posterior a la aparición de síntomas. En ambos casos, este aumento de temperatura se

correlacionó con un descenso de la transpiración de la hoja ocasionado por el cierre estomático inducido por la infección viral. Las medidas de fluorescencia roja de la clorofila de imagen, simultáneas a las térmicas, mostraron que las alteraciones en el patrón de emisión de fluorescencia se correlacionan con la distribución del virus en las hojas asintomáticas. (ii) Las técnicas de imagen de captación de fluorescencia inducida por luz UV han registrado un aumento de la fluorescencia verde y azul, muy acentuado en la cara abaxial de las hojas de plantas infectadas. Asimismo, el análisis por HPLC de extractos de hoja nos ha permitido establecer que la sustancia responsable de este aumento de fluorescencia verde y azul en las plantas infectadas es el ácido clorogénico. Los cocientes de fluorescencia F440/F690 y F440/F740 han demostrado además ser adecuados para el seguimiento de la infección viral tanto en la cara adaxial como abaxial de las hojas. (iii) Las técnicas de imagen de detección de la fluorescencia roja de la clorofila nos han demostrado que, incluso en ausencia de síntomas, el NPQ es un buen indicador de la infección viral. Utilizando métodos estadísticos avanzados, hemos conseguido encontrar parámetros obtenidos a partir de la cinética de inducción de la fluorescencia que, a diferencia de los parámetros convencionales, no reflejan ningún proceso fisiológico, pero sus imágenes permiten un seguimiento de la infección con PMMoV y la detectan antes de la entrada del virus en las hojas asintomáticas.

La última parte del presente trabajo, continúa con la aproximación proteómica al cloroplasto de *Nicotiana benthamiana* y el análisis de los cambios que el virus induce en el mismo. Los geles bidimensionales, realizados en este caso en el rango de pH 6-11, nos han permitido ampliar el número de proteínas identificadas en el proteoma del cloroplasto de la planta huésped, y comprobar cómo la infección por PMMoV lleva a un incremento o descenso en los niveles de expresión de algunas de ellas.

SUMMARY

In previous works our research group has shown that the infection of *Nicotiana benthamiana* plants with the pepper mild mottle virus (PMMoV) induces a decrease of the levels of some chloroplastidic proteins and their encoding mRNAs. Thermoluminescence measurements showed the presence of oxidative stress in infected plants, disturbances both on the PSII donor side and assimilatory potential in the host plant, as well as the induction of a PSI cyclic electron transport to attend the increasing ATP demand due to the viral infection. The chlorophyll fluorescence imaging appeared also as an useful tool to follow plant virus infection, as well as to analyse the protective mechanisms developed by the chloroplast against biotic stress.

In the present Ph.D. work, we have used three imaging techniques to study the impact of PMMoV in *Nicotiana benthamiana*. (i) Thermographic imaging allowed the visualization of changes in the transpiration pattern of the leaves by measuring their temperature. We could demonstrate that asymptomatic leaves from infected plants suffered a progressive temperature increase, starting in the tissues surrounded the main veins and expanding later to the rest of the leaf blade. This effect preceded the virus entrance on the leaf. Temperature increment on symptomatic leaves was homogeneous and occurred after symptom appearance. In both cases, the temperature increase correlated with a transpiration decrease, due to the viral induced-stomatal closure. Simultaneous measurements of red chlorophyll fluorescence imaging showed alterations on the fluorescence pattern of the asymptomatic leaves correlated with the viral entrance and spreading on these leaves. (ii) Imaging UV-induced fluorescence showed an increment in the blue-

green fluorescence, especially in the abaxial surface of the leaves from infected plants. HPLC analysis of leaf extract has shown that chlorogenic acid is the main emitter of this kind of fluorescence. We have also shown that the fluorescence ratios F440/F690 and F440/F740 were suitable for following the infection with PMMoV in both adaxial and abaxial surfaces of the leaves. (iii) Red chlorophyll fluorescence imaging showed that NPQ is a good indicator of the viral infection in the absent of symptoms. We could detect the infection in the asymptomatic leaves previously to viral immunolocalization by means of advanced statistical approaches using data obtained from the fluorescence kinetics.

The last part of this work continues the analysis of the chloroplast proteome of *Nicotiana benthamiana* as well as of the changes induced by the infection with PMMoV. Using bidimensional electrophoresis in the pH range 6-11, we have increased the number of proteins identified in this proteome and showed some of them that were up-(PsbQ) or down-regulated (PSI proteins, RuBisCO large subunit, ribosomal protein) by the viral infection.

A. INTRODUCCIÓN

A.1. EL ESTRÉS EN LAS PLANTAS. LA INTERACCIÓN PLANTA-VIRUS COMO MODELO DE ESTRÉS BIÓTICO EN EL CLOROPLASTO

El término estrés fue definido por primera vez en los años 30 por Hans Selye (1936). Desde entonces, el concepto se ha ido modificando y mejorando hasta elaborarse definiciones más específicas de estrés para las plantas. El estrés vegetal se definiría como la alteración del estado fisiológico provocada por factores, de naturaleza abiótica y biótica, que tienden a alterar el equilibrio (Gaspar et al. 2002), o bien como cualquier condición desfavorable para el metabolismo, crecimiento y desarrollo de los vegetales que, en la mayor parte de los casos, pueden recuperarse cuando desaparecen los agentes estresantes (Lichtenthaler 1998). Sin embargo, cuando se exceden los límites de tolerancia de la planta y se sobrepasa la capacidad adaptativa de la misma, el resultado puede ser el daño permanente o incluso la muerte (Larcher 1987). La respuesta de la planta al estrés consta de cuatro fases: respuesta o reacción de alarma, resistencia, fase final o de agotamiento cuando se sobrecarga la respuesta adaptativa de la planta y finalmente, la fase de regeneración parcial o total de las funciones fisiológicas cuando el factor causante del estrés desaparece (Lichtenthaler 1998). El concepto de estrés se ha extendido aún más diferenciando entre *eu-estrés* y *dis-estrés*. El primero es un estrés suave que activa el metabolismo celular y estimula la actividad fisiológica de la planta, siendo un elemento positivo y una fuerza impulsora del crecimiento vegetal. En cambio, el segundo es cualquier condición desfavorable, bien de alta intensidad o de larga duración, que afecta negativamente a la planta, sobrecargando los mecanismos que

permiten hacer frente al estrés, causando daño y, eventualmente, la muerte. La diferenciación entre *eu* y *dis-estrés* pone especial énfasis en que el estrés es dependiente de la dosis y del tiempo (Lichtenthaler 1998). Finalmente, el estrés actuaría como un factor de selección, una fuerza impulsora de la mejora de la resistencia vegetal y de la evolución adaptativa de las plantas (Gaspar et al. 2002).

Los cloroplastos desempeñan un importante papel en la respuesta de defensa de la planta frente a factores de estrés biótico y abiótico, que, por otra parte, pueden desencadenar en los vegetales mecanismos de ajuste o reparación similares (Goodman et al. 1986, Barón et al. 1995, Balachandran et al. 1997, Rahoutei et al. 2000). El fotosistema II (PSII), complejo de las membranas tilacoidales responsable del desprendimiento de oxígeno fotosintético, es una pieza clave en la respuesta del cloroplasto a perturbaciones ambientales que afectan su funcionalidad, y presenta por ello numerosos mecanismos de adaptación a condiciones adversas (Baker 1991, Barber 1995, 1998, Barón et al. 1995a y b, Lichtenthaler 1996). Siendo la fotosíntesis el principal proceso metabólico de los vegetales, no es de extrañar que la disminución de la fotosíntesis de las plantas estresadas en general, o infectadas en particular, sea un fenómeno muy bien documentado (Goodmann et al. 1986). Este fenómeno tiene lugar en plantas infectadas por insectos (Lin et al. 1999, Zangerl et al. 2002, Aldea et al. 2006, Tang et al. 2006), por hongos (Scholes et al. 1994, Scholes y Rolfe 1996, Chou et al. 2000, Meyer et al. 2001, Repka 2002, Berger et al. 2004, Scharte et al. 2005, Swarbrick et al. 2006), por bacterias (Berger et al. 2007, Bonfig et al. 2006) y por virus (Balachandran y Osmond 1994, Balachandran et al. 1994, 1997, Osmond et al. 1998, Lohaus et al. 2000, Rahoutei et al. 2000, Funayama-Noguchi 2001).

Los mecanismos concretos por los que los virus inhiben la fotosíntesis en la planta huésped son, en su mayoría, desconocidos. La interacción de virus de distintos grupos con el cloroplasto y especialmente con el PSII ha sido estudiada por diversos grupos (Naidu et al. 1984a y b, Goodman et al. 1986, Hodgson et al. 1989, Reinero y Beachy, 1986, 1989, Gunasinghe y Berger 1991, Banerjee et al.

1995). La inhibición observada se atribuyó bien a la interacción de algún componente viral, como la proteína de cubierta o CP, con el PSII (Reinero y Beachy 1989, Banerjee et al. 1995) o, alternativamente, a un descenso en los niveles de sus proteínas constituyentes (Lehto et al. 2003), principalmente las relacionadas con el complejo de fotólisis/oxidación del agua (OEC) (Naidu et al. 1986, Takahashi et al. 1991, Takahashi y Ehara 1992, Rahoutei 2000, Rahoutei et al. 2000, Pérez-Bueno 2003, Pérez-Bueno et al. 2004). Para algunos autores, la interferencia de ciertos componentes virales con procesos como la síntesis o el transporte al cloroplasto de proteínas del PSII y/o del ciclo de Benson-Calvin codificadas en el núcleo, podría ser el mecanismo responsable de las alteraciones en el cloroplasto durante la infección viral (Lindbeck et al. 1991, Dawson 1992).

Nuestro grupo, en colaboración con el de la Dra. Isabel García Luque (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid), ha estudiado durante los últimos años el efecto de la infección viral en fotosíntesis y de los correspondientes mecanismos de defensa en interacciones planta-virus compatibles (Barón et al. 1995a, Rahoutei et al. 1998, 1999, 2000, Pérez-Bueno 2003, Pérez-Bueno et al. 2004, Sajnani 2005, Pérez-Bueno et al. 2006). Utilizando el sistema modelo *Nicotiana benthamiana*-tobamovirus (PMMoV: virus del moteado suave del pimiento, PaMMV, virus del moteado suave de la paprika) hemos constatado que el PSII es uno de los puntos principales de la acci3n viral y que el OEC es el principal afectado, registrándose una disminuci3n de la actividad oxigénica y una inhibici3n preferente del transporte electr3nico en el PSII (Bar3n et al. 1995a, Rahoutei et al. 1999, 2000, Rahoutei 2000, Sajnani 2005). El análisis de los cambios inducidos en el patr3n proteico cloroplastídico revel3 que las proteínas constituyentes del OEC, PsbO, PsbP y PsbQ, codificadas por genes nucleares, son las principales afectadas, pero de forma diferencial, detectándose una drástica bajada en los niveles de acumulaci3n de las dos últimas y de sus correspondientes transcritos durante el desarrollo de los síntomas, sin observarse cambios en la primera (Rahoutei et al. 1998, Rahoutei et al. 2000, Pérez-Bueno 2003). La

caracterización de las proteínas OEC durante la infección puso de manifiesto la existencia de familias proteicas y multigénicas para las proteínas PsbO y PsbP en *Nicotiana benthamiana*; además las isoformas de las proteínas PsbP aparecen influenciadas de forma diferencial por la infección viral, indicando la existencia de mecanismos reguladores de su expresión durante la patogénesis (Rahoutei et al. 1998, Pérez-Bueno 2003, Pérez-Bueno et al. 2004, Sajnani 2005). Este hecho podría constituir una respuesta defensiva de la planta frente al estrés biótico. Asimismo, se demostró que la regulación de las proteínas del OEC tiene lugar a nivel transcripcional, comprobando además que la inhibición de los genes cloroplastídicos es posterior a la de los genes nucleares (Pérez-Bueno 2003). Para algunos autores (Takahashi et al. 1991, Takahashi y Ehara 1992.) la inhibición parcial de la actividad oxigénica por un descenso diferencial en los polipéptidos OEC podría estar asociada a los procesos moleculares primarios de expresión de síntomas en algunas combinaciones huésped-parásito, y aportan además evidencias junto con otros autores de que la síntesis de los miembros individuales de una familia multigénica puede ser estimulada o reprimida por distintos estímulos medioambientales (DeRocher y Bohnert 1993, Argüello-Astorga y Herrera-Estrella 1998).

Las medidas de termoluminiscencia (TL) realizadas sobre hojas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con PMMoV nos confirmaron también daños en el lado donador del PSII, así como alteraciones en el potencial asimilatorio de las hojas y la inducción de un transporte cíclico en torno al fotosistema I (PSI) para atender a una mayor demanda de ATP durante la patogénesis (Rahoutei et al. 1999, Sajnani 2005). La mayor demanda energética del tejido infectado se corresponde con la activación de los mecanismos de defensa y con la síntesis de proteínas inducidas por el estrés (Ayres et al. 1996, Balachandran et al. 1997), así como con el empleo de la maquinaria celular del huésped por parte del virus para replicarse (Lucas et al. 1993). Otros grupos de investigación apoyan nuestras conclusiones sobre el daño en el lado donador del PSII debido a la infección viral (Bertamini et al. 2004),

demostrando que incluso los niveles de la proteína PsbO pueden descender debido a la infección por TMV (virus del mosaico del tabaco), cuya helicasa muestra gran afinidad por esta proteína del OEC (Abbink et al. 2002). Nuestro grupo también ha demostrado que el estrés abiótico es capaz de producir cambios en la acumulación de las proteínas de este complejo (Barón et al. 1995a).

Además de la bajada en la eficiencia fotosintética, en la mayoría de interacciones planta-patógeno compatibles, también tiene lugar un incremento en respiración, cambios en la partición del fotosintato y alteraciones en la acumulación de almidón (Lucas et al. 1993, Shalitin y Wolf 2000, Hull 2002, Maule et al. 2002).

El estudio de la acción de los virus vegetales más allá de la fase luminosa de la fotosíntesis ha demostrado que en las plantas infectadas se producen graves alteraciones en el metabolismo de carbohidratos (acumulación de almidón y azúcares solubles en hoja), y en su transporte a través del floema, que podrían afectar la expresión génica y rutas metabólicas del huésped, y llevar a una síntesis deficiente de complejos, enzimas y pigmentos fotosintéticos en la planta infectada (Scholes et al. 1994, Wright et al. 1995b, Havelda y Maule 2000, Herbers et al. 2000). Los azúcares, directa o indirectamente, provocan la retroinhibición de la fotosíntesis (Krapp y Stitt 1995), la regulación de la expresión génica (Herbers et al. 2000) e incluso la represión transcripcional de genes fotosintéticos (Sheen et al. 1990). La iluminación de tejidos con alto contenido en hidratos de carbono puede llevar a una sobre-reducción de la cadena de transporte electrónico y a la desorganización del aparato fotosintético a través de efectos selectivos sobre la expresión génica de proteínas de membrana y estromáticas (Maxwell et al. 1995). Algunos autores proponen que las señales redox procedentes del cloroplasto y el contenido de azúcares son reguladores activos de la expresión de genes nucleares codificadores de proteínas cloroplastídicas (Oswald et al. 2001), mientras que para otros es todavía una incógnita si el control de la expresión génica en las plantas infectadas se realiza por señales redox o por los niveles de carbohidratos (Osmond

et al. 1998, Lohaus et al. 2000). Herbers et al. (2000) muestran, en fases tempranas de la infección con potyvirus, una regulación transcripcional de genes *cab* (que codifican proteínas de unión a clorofila a y b) como la proteína del complejo mayor de antena del PSII (LHCII), y el gen *rbcS* (subunidad menor de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa) de la RuBisCO. Para estos autores, los azúcares también podrían actuar como amplificadores de las respuestas de defensa durante la interacción planta-patógeno.

Además, se ha visto que la infección viral puede afectar procesos como los de apertura estomática (Chaerle et al. 1999, Chaerle et al. 2004) o difusión en el mesófilo, que controlan la asimilación de CO₂ (Sampol et al. 2003). También, la infección viral puede afectar al metabolismo secundario vegetal, propiciando la acumulación de compuestos de naturaleza fenólica (Nicholson y Hammerschmidt 1992, Dixon y Paiva, 1995, Kofalvi y Nassuth 1995, Dixon et al. 2002) que absorben luz ultravioleta y/o fluorescen en el verde o el azul (Buschmann y Lichtenthaler 1998, Cerovic 1999, Buschmann et al. 2000, Balogun y Teraoka 2004). Estudios de nuestro grupo con hojas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con PMMoV e iluminadas con luz ultravioleta confirman estos datos (Sajnani 2005).

Actualmente, al aparato fotosintético se le asigna una función dual, fijando por un lado la energía solar y por otro, actuando como sensor ambiental mediante la generación de señales redox que pueden actuar en conexión con las de otros orgánulos celulares, regulando la expresión de los genes fotosintéticos cloroplastídicos y nucleares en respuesta a los distintos factores de estrés (Pfannschmidt 2003). El cloroplasto está implicado en el equilibrio entre procesos fotoprotectores y procesos fotoinhibitorios. Los primeros tratan de disipar la energía de excitación excesiva que no puede utilizarse en fotosíntesis, mientras que los segundos tienen lugar cuando se excede la capacidad de fotoprotección y antioxidante de la planta y se inicia la fotooxidación de los complejos fotosintéticos, fundamentalmente el PSII, por una superproducción de especies

reactivas de oxígeno (ROS) (van Kooten et al. 1990, Balachandran y Osmond 1994, Balachandran et al. 1997, Rahoutei et al. 2000, Chow et al. 2002). Este hecho es de suma importancia puesto que el proceso de infección por patógenos está modulado específicamente por las condiciones de iluminación durante el crecimiento vegetal (Karpinski et al. 2003). El cloroplasto ha de adaptarse a las altas y bajas intensidades lumínicas para optimizar el uso de la luz absorbida en fotosíntesis, mantener un estado energético y un balance NADPH/ATP óptimos y minimizar la formación de ROS que se derivan de estos procesos. Si bien estos ROS pueden ser potencialmente dañinos, son señales necesarias para inducir las respuestas de defensa del vegetal, como la respuesta sistémica adquirida (SAR) (Karpinsky et al. 1999) o la regulación a la baja de la actividad del PSII (Mullineaux y Karpinsky 2002, Fryer et al. 2003); estas señalizaciones, por otra parte, pueden ser comunes a estreses de tipo biótico y abiótico (Dat et al. 2000).

Una de las principales características de la infección por patógenos es que no hay una alteración uniforme del metabolismo foliar, de la actividad fotosintética ni del desarrollo de síntomas. El diseño de sistemas de captación de imagen de fluorescencia (azul, verde, roja o en el rojo lejano), radiación infrarroja o térmica, autoluminiscencia (emisión espontánea de fotones), bioluminiscencia (luminiscencia emitida por reacciones enzimáticas), o reflectancia (espectro visual) ha permitido estudiar la heterogeneidad de la respuesta vegetal al estrés (Lichtenthaler y Miehe 1997, Buschmann y Lichtenthaler 1998, Cerovic et al. 1999, Buschmann et al. 2000, Chaerle y Van Der Straeten 2000, 2001, Havaux et al. 2006, Chaerle et al. 2007a). Estos sistemas tienen la ventaja de ser métodos de diagnóstico no invasivos y pre-sintomáticos. Nuestro grupo, (Pérez-Bueno 2003, Sajnani 2005, Pérez-Bueno et al. 2006, Chaerle et al. 2006) ha realizado notables aportaciones en este campo utilizando técnicas de fluorescencia roja de imagen para el seguimiento de la infección por PMMoV en *N. benthamiana*. En el presente trabajo se amplían estos estudios incorporando nuevas técnicas de imagen para el seguimiento de esa interacción huésped-patógeno.

A.2. TÉCNICAS BIOFÍSICAS DE IMAGEN APLICADAS AL ESTUDIO DE LA DETECCIÓN PRECOZ DEL ESTRÉS VEGETAL

Cuando una planta muestra síntomas visibles de estrés, puede estar ya dañada irreversiblemente. Tradicionalmente, los cambios inducidos por factores de estrés en las plantas han sido detectados mediante un muestreo destructivo, seguido de una serie de tediosas determinaciones bioquímicas y moleculares, lo que puede retrasar varios días un diagnóstico (Lichtenthaler 2003), y ocasionar pérdidas de cosechas enteras. Por este motivo, se buscaron técnicas alternativas que permitieran una detección precoz del estrés vegetal y los grandes avances tecnológicos de las últimas décadas han acudido en ayuda de bioquímicos, fisiólogos y patólogos vegetales. Actualmente, diversas técnicas biofísicas que permiten la detección inmediata de las situaciones de estrés antes de que los síntomas visuales aparezcan y los efectos adversos se establezcan, están emergiendo como herramientas prometedoras para la gestión de los cultivos. Especial atención merecen las técnicas de imagen, debido a la información espacial que proporcionan, puesto que las situaciones de estrés generalmente no afectan por igual a toda la superficie de la planta. Según Lichtenthaler (2003), en las etapas iniciales del estrés ya aparecen gradientes metabólicos y fotosintéticos en las hojas de las plantas afectadas. Técnicas de imagen como la fluorescencia y la termografía han demostrado su poder para detectar cambios inducidos por el estrés en el patrón de emisión de luz de las hojas (Chaerle y Van Der Straeten 2001, Nedbal y Whitmarsh 2004, Chaerle et al. 2007a). Pueden ser aplicadas para detectar el estrés en un estadio temprano, tanto a escala microscópica como en teledetección, y ser de utilidad para la búsqueda en los cultivos de poblaciones de mutantes que muestren mayor tolerancia al estrés (Chaerle y Van Der Straeten 2000, 2001, Chaerle et al. 2007a).

En los siguientes apartados se detallarán los avances experimentados en la aplicación de las técnicas de fluorescencia y termografía. Describiremos el origen de estas emisiones lumínicas, la metodología empleada para registrarlas y su

utilidad como detectores precoces del estrés vegetal, haciendo especial hincapié en las técnicas de imagen empleadas en la elaboración de la presente Tesis Doctoral.

A.2.1. Termografía

A menudo pensamos en el concepto de temperatura como la medición del calor desprendido por el cuerpo de los animales; de hecho, solemos clasificarlos como de “sangre fría” o “sangre caliente”. Sin embargo, nos es más difícil relacionar la temperatura con el mundo vegetal, aún cuando es posible medir la temperatura de la superficie de las hojas mediante la detección de la radiación infrarroja que todos los objetos, a temperatura ambiente, emiten con una longitud de onda de 8-14 μm (Chaerle y Van Der Straeten 2000, 2001). La termografía es la técnica que posibilita la medida de la radiación infrarroja y se ha aplicado extensamente en medicina (para un breve resumen de muchas de sus aplicaciones que escapan a los objetivos de esta tesis, ver Chaerle 2000) y es ampliamente utilizada por los ejércitos para detectar, mediante el calor que emiten, objetos en situaciones de escasa o nula visibilidad (www.militaryinfrared.com).

El calor desprendido por el metabolismo vegetal tiene un papel muy secundario en la temperatura de los vegetales, con una notable excepción: las flores de las plantas “termogénicas”, la mayoría pertenecientes a la familia *Araceae*, que pueden controlar su temperatura mediante el control de la respiración (Chaerle 2000, Chaerle y Van Der Straeten 2000, 2001). Los cambios en la temperatura de las hojas en plantas no termogénicas resultan, principalmente, de alteraciones en la transpiración y dependen, por tanto, de la conductancia estomática (Fuchs y Tanner 1966, Jones et al. 1998).

A.2.1.1. La transpiración: el origen del calor desprendido por las plantas

La transpiración en las plantas es un proceso que está finamente regulado para evitar las pérdidas excesivas de agua, al tiempo que se maximiza el intercambio de gases necesario para la fotosíntesis. La regulación se lleva a cabo en

las células oclusivas de los estomas. Cuando están abiertos, en la evaporación de agua, al igual que la sudoración en animales, se consume gran cantidad de calor y la consecuencia es la refrigeración de los tejidos y un descenso en la temperatura de la superficie foliar. Por el contrario, cuando los estomas se cierran, ya sea durante la noche o ante situaciones de estrés como la falta de agua, la temperatura de la hoja aumenta debido a la falta de transpiración (Fig. 1).

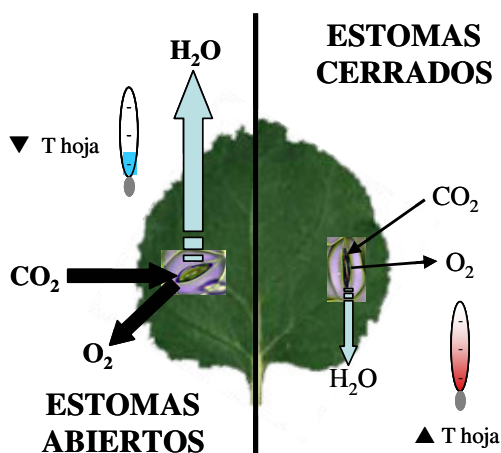


Fig. 1: **Relación** entre apertura estomática, transpiración y temperatura de las hojas. T: temperatura.

La correlación entre temperatura de la superficie foliar y transpiración, así como entre temperatura y conductancia estomática ha sido demostrada por diversos autores. Chaerle et al. (1999) mostraron, mediante medidas simultáneas de porometría y termografía, cambios paralelos en la temperatura y transpiración de la hoja, durante la reacción hipersensible (HR) en plantas de tabaco infectadas con TMV. Mediante el empleo de un IRGA (*infrared gas analyser*), Chaerle et al. (2001) establecieron que los cambios en la temperatura de las hojas tras sufrir muerte celular están precedidos por el cierre estomático del tejido colapsado. El uso de *peelings* de la epidermis y de impresiones epidérmicas ha sido igualmente

de utilidad para relacionar el comportamiento de los estomas y los consecuentes cambios en la temperatura de las hojas (Boccaro et al. 2001). Porómetros o IRGAs e impresiones epidérmicas también han sido usados simultáneamente a tal fin (Lindenthal et al. 2005, Oerke et al. 2006). Jones (1999) demostró que la termografía de imagen tiene suficiente resolución espacial como para proporcionar información sobre la variabilidad de la conductancia estomática a lo largo de la superficie de una hoja de *Phaseolus vulgaris*. Más recientemente, Jones (2004a y b) subraya que los recientes avances de la termografía la capacitan para el estudio de los cambios en la conductancia estomática, y señala que “la termografía ha demostrado ser más que un método para obtener imágenes bonitas; posee particulares ventajas para el análisis cuantitativo de la información fisiológica espacial y dinámica”.

A.2.1.2. Termografía, una técnica de imagen

Como veremos a lo largo de toda la presente Tesis Doctoral, las técnicas de imagen proporcionan una mayor información que las medidas puntuales. Su gran poder resolutivo permite mostrar el valor que un determinado parámetro presenta en todos los puntos de la superficie de una hoja, e incluso en plantas completas. De esta forma, podemos visualizar gradientes o cambios locales que, con mediciones puntuales, pasarían desapercibidos. En el caso de la termografía, el desarrollo de esta técnica ha permitido visualizar imágenes de la temperatura de los objetos.

En termografía de imagen, la radiación infrarroja emitida por todo objeto con temperatura superior al cero absoluto, es captada por un detector sensible a longitudes de onda en el rango de los 4-14 μm . Para objetos que poseen una temperatura parecida a la del ambiente, se emplean detectores sensibles a $\lambda=8-14 \mu\text{m}$; las cámaras infrarrojas que operan con $\lambda=4-8 \mu\text{m}$ se utilizan para el seguimiento de procesos a altas temperaturas. Un software apropiado transforma esta radiación en imágenes termales donde la temperatura del objeto es mostrada aplicando una escala de falsos colores. Los sistemas de termografía usados

actualmente tienen una resolución entre 0,08-0,03°C. El sistema de termografía empleado en la realización de la presente tesis doctoral, poseía una resolución de 0,08°C y tenía la ventaja adicional de estar acoplado a una cámara CCD (*charge-coupled device*) que captaba imágenes de fluorescencia roja de la clorofila (Chl-F) (véase apartados A.2.3.5. y C.1.) y una cámara de vídeo que captaba imágenes en color de la reflectancia de las hojas. Estas tres cámaras (infrarroja, CCD y vídeo) estaban armadas en el brazo de un robot que se movía automáticamente tras programar en el ordenador las coordenadas correspondientes a las posiciones de las hojas (Fig. 2). Debido a que el cierre estomático también afecta a la fotosíntesis, las imágenes de Chl-F son complementarias a las de termografía (Chaerle 2000, Chaerle y Van Der Straeten 2000, 2001, Chaerle et al. 2007a). Este extremo fue confirmado por Daley et al. (1989) y Omasa y Takayama (2003), demostrando que una vez superado un determinado umbral de luz, el cierre estomático inducido por la aplicación exógena de ácido abscísico (ABA) y calculado a partir de imágenes térmicas, ocasiona un incremento del quenching no fotoquímico y un descenso del fotoquímico (calculados a partir de la Chl-F de imagen).

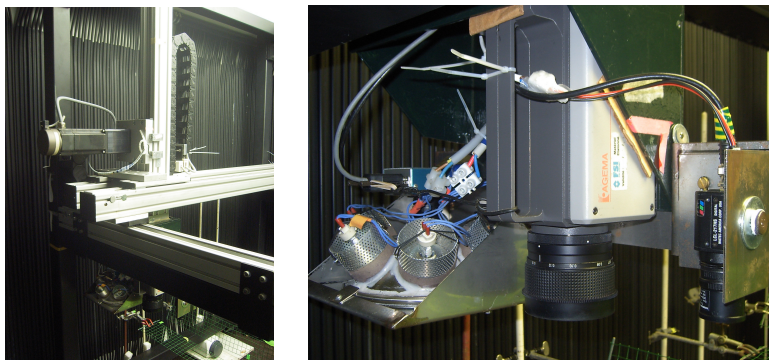


Fig. 2: A la izquierda, brazo del **robot** para la obtención de imágenes termales, de reflectancia y de Chl-FI, perteneciente al grupo de la Dra. Dominique van der Straeten, de la Universidad de Gante. A la derecha, detalle de las cámaras armadas en el brazo del robot: de fluorescencia, de termografía y de reflectancia (de izquierda a derecha, respectivamente).

A.2.1.3. Aplicaciones de la termografía a la biología vegetal

A.2.1.3.1. Selección de mutantes. La temperatura de las hojas puede usarse como indicador en la detección de mutantes con el control de los estomas alterado. Mutantes de cebada con estomas insensibles a ABA muestran una temperatura significativamente más baja tras un tratamiento con esta hormona que el tipo salvaje, y son posibles de detectar entre una amplia población de plantas gracias a la termografía (Raskin y Ladyman 1988). Más recientemente, la termografía ha posibilitado el aislamiento de dos mutantes de *Arabidopsis* (ost1-1 y ost1-2, Fig. 3) que aparecían con temperaturas más bajas que el tipo silvestre bajo estrés hídrico (Merlot et al 2002, y revisado en Wang et al. 2004). El gen ost1 está implicado en la ruta de señalización del ABA (Mustilli et al. 2002). Boccara et al. (2001) propusieron la termografía como una técnica útil para la selección de mutantes afectados en la respiración, al relacionar la respuesta de un mutante mitocondrial tras la infección con un elicitor bacteriano, con el descenso de su temperatura foliar. La termografía también podría usarse para la búsqueda de mutantes en la ruta de señalización de dichos elicitores.

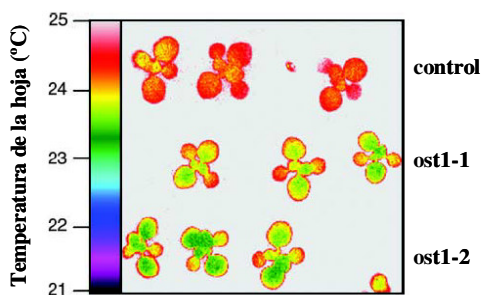


Fig. 3: Los **mutantes** de *Arabidopsis* ost1-1 y ost1-2 fueron aislados usando termografía de imagen (tomado de Mustilli et al. 2002).

A.2.1.3.2. Cultivo de vegetales en el espacio. La conquista del espacio no será posible sin las plantas. Los largos viajes espaciales requieren una continua producción de alimentos, conversión de CO₂ en O₂ y la purificación del agua, necesidades que las plantas pueden cubrir. Sin embargo, el crecimiento de las mismas fuera de nuestro planeta está comprometido, debido a la escasa convección

del aire bajo condiciones de microgravedad, que limita el intercambio de calor y gases entre las hojas y el aire, reduciéndose así el crecimiento vegetal. Mediante el estudio termográfico de plantas en vuelos parabólicos se ha demostrado que la temperatura de las hojas aumenta en condiciones de microgravedad (Fig. 4). El objetivo de estas investigaciones es fabricar cámaras cerradas con sistemas de circulación del aire (*space plant box*) que permitan el cultivo de plantas durante largos periodos de tiempo bajo condiciones de microgravedad en el espacio (Kitaya et al. 2001, 2003).

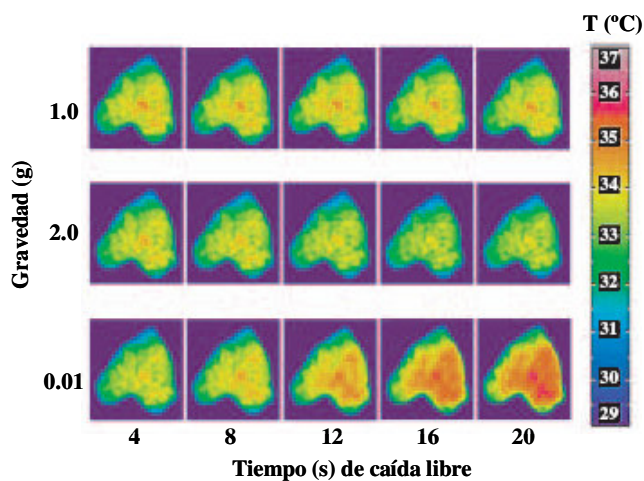


Fig. 4: Relación entre temperatura de las hojas y **gravedad** (tomado de Kitaya et al. 2003).

A.2.1.3.3. Transporte hídrico en plantas. La termografía de imagen ha sido usada para detectar anomalías en el ascenso de la savia en leñosas, ya que esta técnica permite la visualización de las variaciones térmicas a lo largo de los vasos de los árboles en tiempo real (Alfondillo et al. 1993). La discontinuidad de los tejidos vasculares produce una diferencia en la conductividad termal que provoca una distribución no homogénea de las temperaturas superficiales. La termografía también se ha aplicado en la detección de las cavitaciones provocadas por hongos fitopatógenos en sicomoros (*Acer pseudoplatanus*) (Catena 1992).

A.2.1.3.4. Tolerancia a la congelación. La congelación es un factor de estrés importante en determinados climas, que inflige daños económicos en cultivos y limita la distribución de los mismos, así como la de especies silvestres. La supervivencia de estas plantas depende de su habilidad para tolerar algún grado de congelación. Por tanto, entender el fenómeno de la congelación y cómo perjudica a las plantas es de gran importancia. Las mejoras en los métodos de imagen, entre los que destaca la termografía, que incluso puede suministrar imágenes en tiempo real, están proporcionando una descripción precisa de la naturaleza del daño que ocasiona, dónde se inicia y cómo avanza el hielo, así como su tasa de crecimiento (Wisniewski et al. 1997, Pearce y Fuller 2001, Pearce 2001). La termografía ha proporcionado información sobre el efecto de diversas sustancias en la nucleación del hielo (Gusta et al. 2004) y parece ser una buena herramienta para ensayar estrategias de protección contra la congelación.

A.2.1.3.5. Calidad de los frutos. La monitorización no destructiva post-cosecha de las frutas y los vegetales es importante para su control de calidad. La termografía infrarroja es apta para la evaluación del daño superficial que afecta negativamente a la vida del fruto (Tollner et al. 1993). El secado de los frutos es un proceso que puede alterar su calidad y vida media, si se aplica más calor y durante más tiempo de los necesarios. La termografía de imagen se ha probado para controlar la temperatura de la superficie de las naranjas valencianas durante el proceso de secado, permitiendo así determinar el momento en el que el proceso ha acabado sin alterar la calidad del fruto (Fito et al. 2004).

A.2.1.3.6. Alteraciones ocasionadas por patógenos. El estudio mediante termografía de imagen de la HR en plantas de tabaco resistentes (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi NN) e infectadas con TMV, reveló un incremento presintomático de la temperatura de la superficie de las hojas, que coincidía con la posterior lesión necrótica característica (Fig. 5A). Dicho incremento de

temperatura se asoció a un cierre estomático localizado, ocasionado por la síntesis de ácido salicílico (SA) ligado a la HR. La desaparición de este efecto en la oscuridad se corresponde con un cierre estomático generalizado, que enmascara las diferencias locales de transpiración (Chaerle et al. 1999). Previamente se había demostrado que el SA provoca un incremento en la ruta respiratoria alternativa en plantas termogénicas, elevando la temperatura de las mismas (Raskin et al. 1987); y que la aplicación exógena de SA en tejidos no termogénicos eleva la temperatura de los mismos, debido al incremento de la respiración total y de la alternativa (Van Der Straeten et al. 1995). La infección por el hongo *Phyllosticta* en varias especies de coníferas, también ocasiona un aumento de temperatura en las zonas circundantes al punto de infección (Aldea et al. 2006), y el cierre estomático se asocia a un descenso en la eficiencia fotosintética del PSII y a un incremento del quenching no fotoquímico (NPQ). Estos mismos autores describen también un aumento de temperatura en las lesiones producidas por insectos herbívoros, debido a la desecación que sufren los tejidos tras ser devorados.

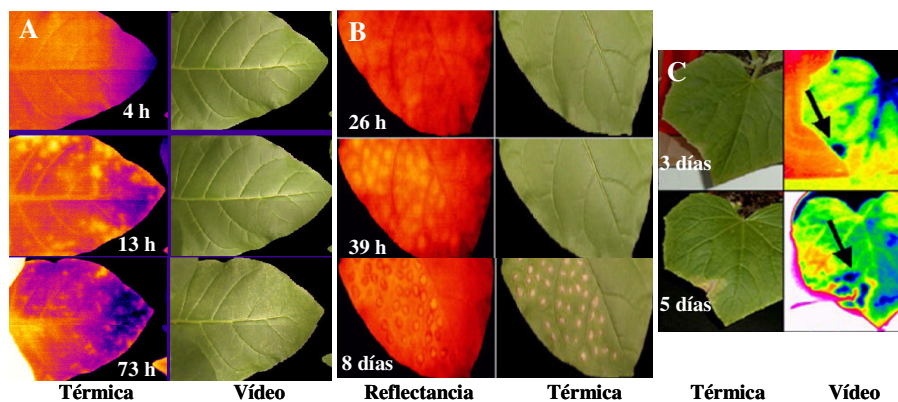


Fig. 5: A) Las **lesiones necróticas** producidas por TMV en hojas de tabaco Xanthi XX y B) las espontáneas en tabaco transgénico bO, se detectan presintómicamente gracias a la termografía de imagen (tomado de Chaerle 2000). C) El descenso de temperatura ocasionado por *P. cubensis* en pepino también se detecta presintómicamente gracias a esta técnica (tomado de Lindenthal et al. 2005).

El efecto opuesto al de TMV en tabaco resistente, se registró en plantas de *Nicotiana sylvestris* inoculadas con un elicitor bacteriano (*harpin*) (Boccarda et al. 2001). El descenso de temperatura se correlacionó con un mayor número de estomas abiertos. La discrepancia entre los efectos de TMV y el elicitor bacteriano puede deberse que la resistencia vegetal a virus y a bacterias sigan rutas diferentes (Murphy et al. 1999). Chaerle et al. (2004) encontraron que la infección por *Cercospora beticola* en plantas de remolacha también produce un descenso de temperatura, que en esta ocasión fue atribuido a que el hongo utiliza los estomas como puerta de entrada al mesófilo, o bien a la producción de toxinas fúngicas que afectan a la polaridad/permeabilidad de las membranas de las células epidérmicas. Los mismos principios pueden aplicarse al descenso presintomático de temperatura (Fig. 5C) registrado mediante termografía en plantas de pepino tras la infección por el hongo *Pseudoperonospora cubensis* (Lindenthal et al. 2005, Oerke et al. 2006). También se ha registrado un descenso de temperatura en las lesiones provocadas por himenópteros, dípteros y ácaros en las hojas de varias coníferas (Aldea et al. 2006), así como en el tejido circundante a las mordeduras de larvas de lepidópteros en hojas de *Arabidopsis thaliana* (Tang et al. 2006). Esta alteración en el transporte hídrico podría incrementar el transporte de nutrientes hacia el patógeno en desarrollo (Aldea et al. 2006).

La termografía también se empleó en el estudio de los tumores que *Agrobacterium tumefaciens* causa en plantas de *Ricinus communis*, estableciéndose que el tumor es un sumidero patológico en la planta huésped (Schurr et al. 1996).

A.2.1.3.7. Muerte celular. Existen mutantes de arroz, maíz y *Arabidopsis* capaces de mimetizar las lesiones necróticas producidas por patógenos sin la necesidad de que éstos intervengan (*lsd*, *lesions simulating disease*). Además, algunas plantas transgénicas forman lesiones necróticas espontáneas parecidas a la HR y acumulan ácido salicílico. Chaerle et al. (2001) realizaron el seguimiento mediante termografía de imagen de la muerte celular en el mutante *lsd2* de

Arabidopsis y en tabaco bO transgénico, que sobreexpresa una bacterio-opsina. Las lesiones localizadas, desencadenadas por un cambio en la temperatura de crecimiento, eran similares a la HR producidas por TMV en tabaco, y la respuesta térmica presintomática era la misma (Fig. 5B), comprobándose asimismo que el cierre estomático precedía al colapso de los tejidos. En el caso del tabaco bO, algunas hojas mostraban una respuesta térmica uniforme.

A.2.1.3.8. Teledetección. La teledetección es un método de adquisición e interpretación de las medidas realizadas sobre un objeto sin mediar contacto físico entre éste y el equipo de medida. El objeto puede ser analizado en multitud de ocasiones sin que sufra daños. Las propiedades específicas de la vegetación, sana o bajo condiciones de estrés, condicionan la cantidad y la calidad de la radiación reflejada o emitida por hojas y cultivos (Nilsson 1995a y b). El término teledetección está restringido a los instrumentos que miden la radiación electromagnética emitida o reflejada por un objeto en varias partes del espectro: ultravioleta, visible, infrarrojo, microondas, etc. Las metodologías empleadas en teledetección incluyen cámaras dotadas de filtros, radiómetros, sistemas de video, sónar, radar, etc., y pueden estar instaladas en gran diversidad de plataformas, alturas y distancias (satélites, helicópteros, globos, brazos hidráulicos, etc. (Nilsson 1995a y b). Entre las técnicas susceptibles de ser empleadas en teledetección se encuentran la termografía y la fluorescencia de imagen, por lo que realizaremos un pequeño repaso de las aplicaciones realizadas hasta la fecha, con fecha posterior a las excelentes revisiones de Nilsson (1995a y b).

La mayoría de los cultivos son altamente sensibles a los pequeños cambios en la disponibilidad de agua, teniendo éstos gran impacto en la productividad y en la calidad de las cosechas (Jones et al. 2002). El sector de la agricultura emplea más de las dos terceras partes del agua disponible (Chaerle et al. 2005). Por otra parte, en los últimos tiempos, el cambio climático está ocasionando la escasez de agua en determinadas zonas del planeta. En nuestro país, los años 2005 y 2006 han

sido especialmente secos, y las demandas de agua, crecientes. Por tanto, el uso racional y responsable de los recursos hídricos y la adopción de un régimen de riego eficiente es de vital importancia. La termografía de imagen ha demostrado su eficacia en este terreno, ya que la temperatura de los cultivos es un poderoso indicador del estado hídrico de las plantas y una herramienta potente para proporcionar información sobre el uso del agua en agricultura, permitiendo desarrollar regímenes de riego apropiados (Cohen et al. 2005, Leigh et al. 2006). Jones (2004b) revisa los diversos métodos disponibles para establecer regímenes de riego, y subraya la importancia de la termografía entre todos ellos. El reciente desarrollo de cámaras térmicas portátiles ha extendido enormemente las oportunidades de análisis de las propiedades térmicas de cultivos y ha expandido la información disponible relativa a las condiciones de crecimiento de las plantas. Esta técnica permite el análisis semiautomático de grandes áreas de cultivo con una mayor reproducibilidad de la que podría conseguirse con la porometría. (Jones et al. 2002). Recientemente, Leigh et al. (2006) han desarrollado un método para medir fidedignamente la temperatura de los cultivos bajo luz solar directa.

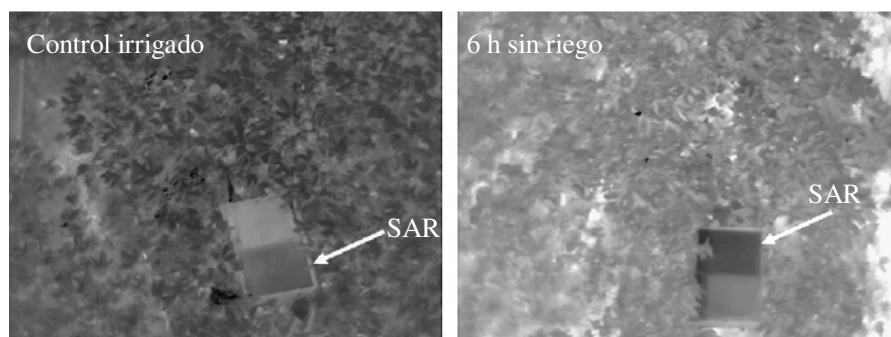


Fig. 6: **Teledetección:** estimación de la temperatura de los cultivos de algodón empleando una cámara térmica situada a 5 m de distancia del cultivo. SAR: superficie artificial de referencia (tomado de Cohen et al. 2005).

El empleo de la termografía en teledetección requiere el uso de superficies de referencia con temperaturas conocidas, (Fig. 6), como pueden ser hojas cubiertas con vaselina para evitar la transpiración (superficie seca) y hojas pulverizadas con agua (superficie húmeda), que se usaron en las medidas térmicas de cultivos de vid (Jones 2002, Leinonen y Jones 2004). Cohen et al. (2005) emplearon superficies de referencia artificiales en sus medidas realizadas en cultivos de algodón. Estas mediciones permitieron diseñar índices que evalúan el estrés hídrico de los cultivos.

Cualquier estrés de origen biótico o abiótico que interfiera con la toma de agua por las raíces o en el transporte del agua impulsado por la transpiración, o en ambos, es susceptible de una detección previsual mediante termografía (Chaerle 2000). Un ejemplo lo encontramos en la detección de la infestación de cultivos de remolacha con el nematodo *Heterodera schachtii* (Schmitz et al. 2004), que parasita la raíz de las plantas de remolacha y reduce la evaporación de agua por las hojas; de tal forma, que las bajas y las altas densidades de poblaciones de nematodos pueden ser distinguidas en función de la temperatura de las hojas de las plantas afectadas. Así la termografía de imagen puede ser una herramienta útil para la monitorización de cultivos desde el aire, que suplemente a otras técnicas de teledetección desde satélites. Hay que tener en cuenta que la termografía (o cualquier otra técnica empleada en teledetección), por sí sola, no identifica el factor de estrés causante del cambio de temperatura (Nilsson 1995a y b), por lo que una combinación con otras técnicas puede proporcionar *firmas* específicas de actuación de un determinado factor de estrés (Chaerle et al. 2004), siendo más fácil atajar el problema antes de que los síntomas sean visibles.

A.2.2. Fluorescencia verde-azul

Cuando una planta es expuesta a la luz ultravioleta (UV) de larga longitud de onda (UV-A, 320-380 nm), emite fluorescencia, con máximos de emisión en el azul (440 nm), verde (520 nm), rojo (690 nm) y rojo lejano (740 nm) (Fig. 7),

conocidos como F440, F520, F690 y F740, respectivamente (Buschmann y Lichtenthaler 1998). El máximo en el verde a veces no está bien definido y se presenta como un hombro, por lo que suele asociarse con la fluorescencia azul. En este caso, hablamos de fluorescencia verde-azul (BGF, del inglés *blue-green fluorescence*). Por su origen común, F690 y F740 se conocen como fluorescencia de la clorofila (Chl-F), puesto que la clorofila a (Chl a) es el único fluoróforo presente en las hojas que emite en esta parte del espectro, ya que la Chl b transfiere toda su energía de excitación a la Chl a *in vivo* (Cerovic et al. 1999). En este capítulo, abordaremos la descripción de la BGF, mientras que la Chl-F merece un capítulo aparte. Como se detallará a continuación, la emisión de F440, F520, F690 y F740 va a cambiar en función del origen de la hoja, especie vegetal, cantidad de pigmentos foliares, edad, si consideramos el haz o el envés, o de las condiciones ambientales a las que ha sido expuesta la planta.

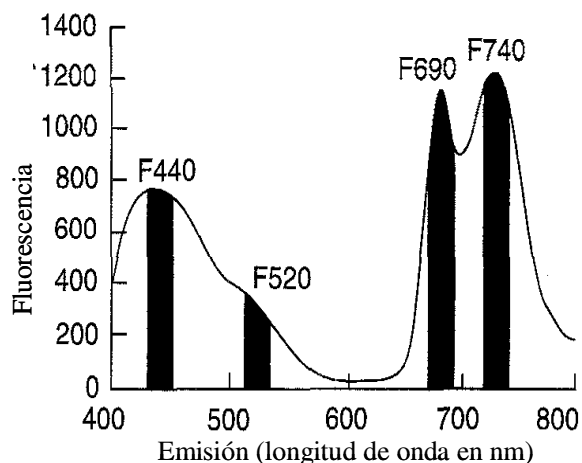


Fig. 7: **Espectro de emisión de fluorescencia inducido por luz UV** en una hoja verde de maíz. Los máximos de emisión están indicados (tomado de Lichtenthaler y Miehé 1997).

A.2.2.1. Origen de la fluorescencia verde-azul

A diferencia de la Chl-F, el origen de la BGF es heterogéneo, puesto que son varias las sustancias que pueden fluorescer en el verde y en el azul. Generalmente, estos fluoróforos son productos del metabolismo secundario biosintéticamente relacionados con la ruta del shikimato, y se conocen como fenoles, polifenoles o fenilpropanoides (Cerovic et al. 1999). Sin embargo, no todos los fenoles participan por igual en la emisión de BGF: los fenoles solubles no emiten fluorescencia (Lichtenthaler y Schweiger 1998), mientras que los que están covalentemente unidos a las paredes celulares de las células epidérmicas y las venas de las hojas son emisores (Bongi et al. 1994, Stober et al. 1994, Buschmann y Lichtenthaler 1998, Buschmann et al. 2000). Se ha descrito el ácido ferúlico como el principal responsable de la BGF (Morales et al. 1996, Lichtenthaler y Schweiger 1998, Meyer et al. 2003), aunque el ácido cumárico y el ácido clorogénico también podrían participar en menor medida (Lichtenthaler y Schweiger 1998, Cerovic et al. 1999). Por último, se sabe que algunas nicotinamidas, (NAD, NADH) flavinas (FMN, FAD, riboflavina) y co-enzimas (piridoxal-5'-fosfato) también fluorescen en el verde y en el azul, si bien su aportación está enmascarada por la mayor concentración del resto de fluoróforos y necesita de fluorímetros altamente sensibles tipo PAM (*pulse-amplitude modulation*) para detectarla (Cerovic et al. 1999).

En un corte transversal de la hoja de una planta dicotiledónea como *Nicotiana benthamiana*, la fluorescencia no está homogéneamente distribuida, debido a que dichas hojas presentan dos caras bien definidas. Por un lado, la cara adaxial (AD) o haz, expuesta a la luz, con una epidermis gruesa y un parénquima en empalizada, compuesto por células altamente empaquetadas. Por el otro, la cara abaxial (AB) o envés, con una epidermis más fina y un parénquima lagunar, donde las células dejan entre sí grandes espacios intercelulares. En estas hojas, la mayor parte de la BGF procede, como ya se ha dicho, de la cutícula, de las paredes celulares de la epidermis y el tejido vascular, mientras que la Chl-F procede del

mesófilo y de los cloroplastos de las células oclusivas de los estomas, ya que la epidermis carece de cloroplastos. (Fig. 8). La asimetría de las hojas bifaciales explica por qué, en general, la emisión de fluorescencia inducida por el UV es mayor en la cara AB que en la AD, donde el alto grado de empaquetamiento del parénquima en empalizada favorece la reabsorción de la fluorescencia emitida por parte de las Chls (Buschmann y Lichtenthaler 1998, Cerovic et al. 1999).

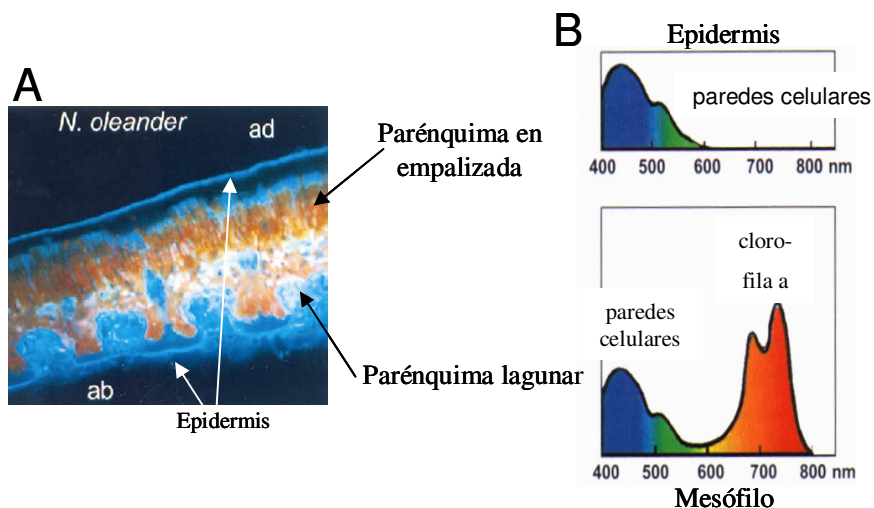


Fig. 8: **Asimetría de una hoja bifacial** de dicotiledónea como *Nerium oleander* (adelfa). A) micrografía de epifluorescencia (200x) de la emisión en el visible de una sección transversal de una hoja de adelfa. Adaxial, ad; abaxial, ab. Se ha indicado la posición de la epidermis AD y AB, que fluoresce en el azul; así como la situación del parénquima en empalizada y el lagunar, que lo hace en el rojo (tomado de Mantha et al. 2001). B) Espectros de emisión de la epidermis AD y de las células del mesófilo bajo la misma. La intensidad de la BGF de las células del mesófilo es menor que la de la epidermis libre de pigmentos fotosintéticos, ya que BGF es reabsorbida por las Chls (tomado de Buschmann et al. 2000).

Dados los distintos orígenes de BGF y Chl-F y que cada una de ellas puede variar independientemente en respuesta a factores ambientales o fisiológicos, además de influirse mutuamente, a veces es necesario emplear cocientes de fluorescencia en lugar de valores de fluorescencia absolutos. A continuación,

detallaremos los cocientes más empleados para describir las respuestas de las plantas al estrés.

A.2.2.2. Cocientes de fluorescencia

El cociente F690/F740 (y su inversa, F740/F690, equivalente a F735/F700) fue el primer cociente empleado por el grupo del Prof. Lichtenthaler (Lichtenthaler et al 1986, Gitelson et al. 1999). Dado que la Chl *in vivo* absorbe en la región cercana a los 690 nm (Gitelson et al. 1998), cuanto mayor es la concentración de Chl en las hojas, mayor es la reabsorción de la fluorescencia emitida. Sin embargo, esto no ocurre con la fluorescencia en el rojo lejano, que es independiente de la concentración de Chl. Por tanto, existe una relación inversa entre el contenido total de Chl y el cociente F690/F740 (Babani y Lichtenthaler 1996, Gitelson et al. 1998, 1999, Buschmann et al. 2000). Dicha relación se ha probado en varias especies vegetales y durante el reverdecimiento de plantas etioladas (Stober y Lichtenthaler 1992). Gitelson et al. (1998) demostraron que los valores de este cociente están muy poco influenciados (menos del 7%) por la morfología y estructura de las hojas.

Los cocientes F440/F690 y F440/F740 han demostrado ser los más sensibles y rápidos a la hora de diagnosticar el estrés (Schweiger et al. 1996), reflejando, además, la existencia de dos mecanismos fotoprotectores en las plantas. 1) La cantidad de sustancias que absorben en el verde y el azul (fluorescentes o no) presentes en la epidermis condiciona la emisión de Chl-F, pues filtran la luz incidente, de tal manera que la cantidad de luz que llega al mesófilo es menor, disminuyendo consecuentemente la Chl-F y aumentando el valor de los cocientes. 2) También se ha postulado que las sustancias fluorescentes en el verde y el azul podrían proporcionar fotones a las moléculas de Chl del mesófilo vía emisión de fluorescencia. En este caso, la luz resultante, altamente energética pero no dañina para la planta, podría utilizarse en los procesos fotosintéticos (Schweiger et al. 1996, Mantha et al. 2001) o bien re-emitirse mediante Chl-F, por lo que se

registraría un aumento de la misma y un descenso de los cocientes (Schweiger et al. 1996). Ambos mecanismos fotoprotectores funcionan a la vez. Sin embargo y dependiendo de las condiciones de crecimiento, de la especie vegetal en cuestión y del tipo de estrés aplicado, uno u otro mecanismo actúa en mayor o menor medida. Schweiger et al. (1996) también demostraron que la luz UV no es necesaria para que los mecanismos fotoprotectores tengan lugar, sino que otros estreses (como el hídrico o el ocasionado por el calor) pueden desencadenarlos. Asimismo, también es sabido que los patógenos potencian la síntesis de fenilpropanoides, conocidos como fitoalexinas (Nicholson y Hammerschmidt 1992, Dixon y Paiva, 1995, Kofalvi y Nassuth 1995, Dixon et al. 2002).

Por último, el cociente F440/F520 también se emplea como indicador de estrés, ya que la banda verde puede presentar un aumento con respecto a la azul a largo plazo bajo varios estreses ambientales, aparentemente por la acumulación de fluoróforos verdes (Buschmann y Lichtenthaler 1998).

A.2.2.3. Fluorescencia inducida por luz UV de imagen

Como ya hemos visto, la fluorescencia inducida por luz UV nos proporciona información acerca de los procesos fotoquímicos de la hoja (Chl-F), de su contenido en Chl (F690/F740) y de la presencia y acumulación de productos del metabolismo secundario (BGF). En el mercado existen gran variedad de espectrofluorímetros que miden los espectros de emisión de fluorescencia al excitar las hojas mediante lámparas de xenon o láseres (en este caso, hablamos de fluorescencia inducida por láser o LIF, del inglés *laser-induced fluorescence*). Sin embargo, estos espectrofluorímetros nos ofrecen información de pequeñas áreas foliares seleccionadas aleatoriamente, por lo que perdemos información espacial cuando existen gradientes de fluorescencia a lo largo de las hojas, o bien los cambios están localizados en una parte de la misma (Fig. 9A). De hecho, los estreses que actúan a corto plazo o los ataques causados por patógenos, rara vez afectan a la hoja completa (Lichtenthaler y Miehe 1997). Por este motivo se diseña-

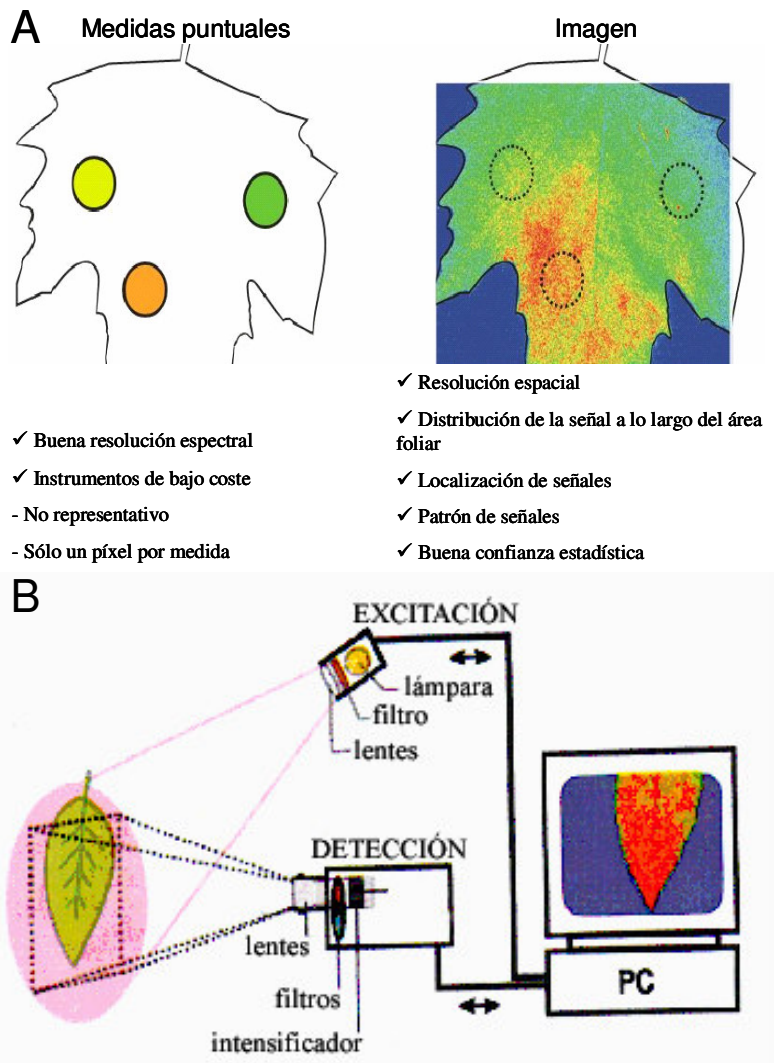


Fig. 9: A) **Ventajas de la fluorescencia de imagen** con respecto a medidas puntuales de la hoja, según se muestra en hojas de arce. La heterogeneidad espacial de la fluorescencia y sus cocientes se muestra en las imágenes y no mediante medidas puntuales, aunque se realicen varias en una misma hoja (tomado de Lichtenthaler et al. 2005). B) **Esquema del sistema de fluorescencia de imagen** de Karlsruhe (tomado de Buschmann et al. 2000).

ron fluorímetros de imagen que proporcionaran información espacial de las distintas bandas de fluorescencia inducidas por el UV, de mucha más calidad que las medidas puntuales empleadas hasta ese momento (Lang et al. 1996, Lichtenthaler et al. 1996, Lichtenthaler y Miehé 1997). Varios laboratorios han desarrollado sus propios aparatos de fluorescencia de imagen inducida por el UV (MCFI, por *multicolour fluorescence imaging*), ya que no existen prototipos comerciales. Describiremos el diseñado por el grupo de Lichtenthaler en Karlsruhe, ya que en nuestros experimentos llevados a cabo en la Universidad Eötvös Lóránd de Budapest, empleamos un aparato muy similar.

En el sistema de fluorescencia de imagen FL-FIS (del inglés *flash lamp - fluorescence imaging system*), la luz UV de excitación proviene de una lámpara de xenon que emite flashes de luz a 355 nm, acoplada a un filtro que deja pasar sólo luz UV (Fig. 9B). Las imágenes son adquiridas mediante una cámara CCD (del inglés *charge-coupled device*) sincronizada con la lámpara de flashes. Las imágenes de F440, F520, F690 y F740 son adquiridas secuencialmente para el mismo campo de visión, cada una con el filtro apropiado. Dichos filtros están montados en una ruleta frente a la cámara CCD y se cambian automáticamente. La adquisición de las imágenes de emisión de fluorescencia requirió, en nuestro caso, 800 flashes de luz UV. Las imágenes se procesan con ayuda del software Camille 1.05, que corrige las imágenes frente a la excitación no uniforme de la muestra y calcula, además, los cocientes de fluorescencia. La imagen que resulta se presenta en escala de grises, pero es posible la aplicación de una escala de falsos colores (Buschmann y Lichtenthaler 1998, Buschmann et al. 2000, Lichtenthaler y Babani 2000).

Sin embargo, el primer aparato diseñado para visualizar la fluorescencia inducida por UV de imagen fue el microscopio de fluorescencia de transmisión o de epi-fluorescencia (Cerovic et al. 1999; ver Fig. 8), que ha proporcionado abundante información acerca de la localización exacta de los fluoróforos vegetales

(Stober y Lichtenthaler 1993b, Agati et al. 2002, Mantha et al. 2001, Hideg et al. 2002).

A escala macroscópica, la efectividad de la MCFI ha sido probada en numerosas ocasiones (Heisel et al. 1996, Lang et al. 1996, Lichtenthaler et al. 1996, Lichtenthaler y Miché 1997, Langsdorf et al. 2000, Krizek et al. 2001, Lichtenthaler et al. 2005, Lenk y Buschmann 2006).

Otra ventaja que ofrece la MCFI es la posibilidad de su aplicación para la detección de estreses en campo, incluso mediante teledetección.

A.2.2.4. Aplicaciones de la fluorescencia inducida por luz UV

La MCFI se puede emplear en la identificación y clasificación de plantas, puesto que los compuestos implicados en la absorción en el UV y en la BGF son marcadores quimiotaxonómicos. En este caso, el cociente F440/F690 es idóneo puesto que la BGF de las monocotiledóneas en general, y especialmente las herbáceas, es mayor que en las dicotiledóneas (Chappelle et al. 1985). Sin embargo, la BGF por sí sola no garantiza la clasificación y es necesario recurrir a la anatomía de las hojas y al análisis de la combinación de los diferentes pigmentos presentes en ellas. Además, la MCFI puede proporcionar mucha información sobre el crecimiento y el desarrollo de los vegetales, constituyendo una herramienta muy útil para monitorizar el crecimiento de los cultivos y valorar el impacto ambiental. A continuación, enumeraremos diferentes situaciones en las que la fluorescencia inducida por luz UV (acoplada o no a la captación de imágenes) se ha empleado con éxito.

A.2.2.4.1. Exposición a la luz UV. Las plantas pueden protegerse de los efectos nocivos de la luz UV mediante la acumulación en la epidermis foliar de sustancias que absorben en el UV (fluorescentes o no) y evitan que las radiaciones nocivas penetren en el mesófilo (Stober y Lichtenthaler 1993a, Stober et al. 1994, Lenk et al. 2006). Por ello, las plantas crecidas en el campo emiten mayor BGF y/o

menor Chl-F que las plantas crecidas en invernadero. Stober y Lichtenthaler (1993a) establecieron que el cociente F440/F690 incrementa gradualmente a medida que aumenta la intensidad lumínica utilizada durante el crecimiento vegetal. Con respecto a plantas crecidas en interior, el cociente F690/F740 puede ser mayor o menor en plantas crecidas al aire libre (Buschmann y Lichtenthaler 1998, Babani et al. 2005), mientras que el cociente F440/F520 disminuye drásticamente, posiblemente debido a la mayor acumulación de fluoróforos verdes en comparación con los azules (Buschmann y Lichtenthaler 1998). Así los cocientes F440/F690 y F440/F740 pueden ser de gran utilidad a la hora de valorar el grado de protección de una planta frente a la luz UV.

A.2.2.4.2. Crecimiento y desarrollo. El contenido de Chls y de compuestos que absorben en el UV depende de la edad de la hoja y de la luz a la que ha estado expuesta. Las hojas etioladas emiten mayoritariamente BGF, aunque también presentan una mínima señal de Chl-F que hace pensar en la presencia de trazas de Chl en sus células (Stober y Lichtenthaler 1993b). Durante el proceso de síntesis de Chl en las hojas etioladas, los cocientes BGF/Chl-F se correlacionan de forma inversa con el contenido total de Chls de las hojas que reverdecen (Stober y Lichtenthaler 1992, Babani y Lichtenthaler 1996, Babani et al. 1996). Se han detectado también incrementos de la BGF en hojas senescentes de maíz (Meyer et al. 2003), mientras que en hojas de alcachofa se ha registrado una caída de la BGF como consecuencia de la pérdida de ácido clorogénico (principal emisor de fluorescencia azul y verde en la alcachofa) durante la senescencia (Morales et al. 2005).

A.2.2.4.3. Deficiencias y/o excesos de minerales. Heisel et al. (1996) estudiaron varias deficiencias nutricionales en plantas de maíz, estableciendo que los cocientes BGF/Chl-F son de gran utilidad en este tipo de ensayos. Muchos han sido los estudios realizados en plantas con deficiencias en nitrógeno (Langsdorf et

al. 2000, Apostol et al. 2003, Corp et al. 2003, Mercure et al. 2004, Lichtenthaler et al. 2005). Este tipo de estrés generalmente ocasiona incrementos en F_{440}/F_{690} y F_{440}/F_{740} (Fig. 10), mucho antes de que el déficit de nitrógeno cause una pérdida del contenido de Chls (por tanto, los índices señalados son detectores del estrés más tempranos que el cociente F_{690}/F_{740}). Se sabe que la carencia de este nutriente provoca la acumulación de fenoles en la epidermis de las hojas, que absorben la radiación y dejan pasar menos cantidad de luz al mesófilo. Gracias a la fluorescencia inducida por UV se ha podido realizar un mapa de la disponibilidad de nitrógeno en un campo de maíz (Apostol 2006). La fluorescencia inducida por luz UV también ha sido de gran utilidad a la hora de detectar deficiencias de hierro (Morales et al. 1994), toxicidad por exceso de cinc (Schuerger et al. 2003) o déficit de potasio (Chappelle et al. 1984).

A.2.2.4.4. Calidad de los frutos. La fluorescencia inducida por luz UV ha demostrado ser de utilidad en la detección mediante técnicas no destructivas de golpes en manzanas aparentemente intactas, ya que se registran cambios tanto en BGF como en Chl-F. Asimismo, la oxidación de rodajas de plátanos pudo ser detectada antes de que el característico color marrón fuese visible mediante cambios en la BGF (Wulf et al. 2003, Zude 2006).

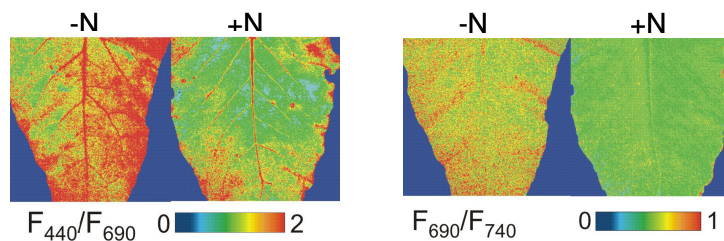


Figura 10: **Imágenes de los cocientes** $F_{440}/690$ y F_{690}/F_{740} en hojas de remolacha crecidas con (+N) o sin (-N) aporte de nitrógeno (tomado de Lichtenthaler et al. 2005).

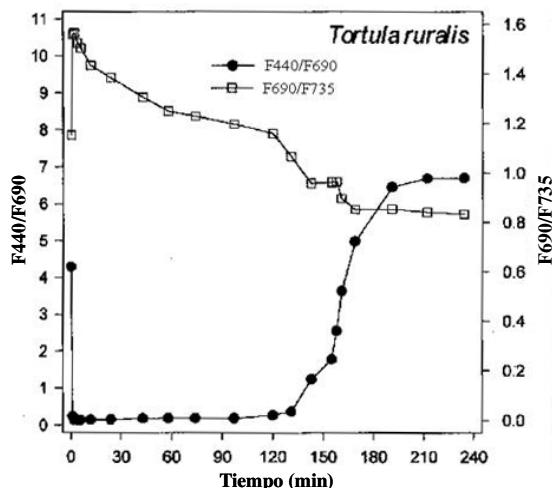


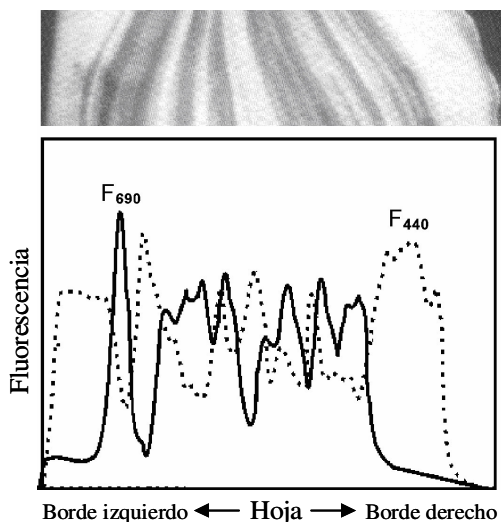
Fig. 11: Cambios en los cocientes de fluorescencia azul/rojo y rojo/rojo lejano durante la rehidratación (respuesta rápida en 30 s) y el lento proceso de desecación (240 min) en las hojas verdes del musgo *Tortula rurales*. El cero en el eje X representa el estado seco antes de la rehidratación del musgo (tomado de Takács et al. 2000).

A.2.2.4.5. Estrés hídrico. Cuando se somete a estrés hídrico a plántulas de calabaza, se produce un fuerte incremento de la BGF, por lo que los cocientes BGF/Chl-F aumentan (Schweiger et al. 1996). Una sequía prolongada en plantas de tabaco ocasiona un incremento de BGF y Chl-F, si bien la primera aumenta proporcionalmente más que la segunda, por lo que los cocientes F440/F690 y F440/F740 aumentan progresivamente a medida que se reduce el contenido hídrico de la planta (Lang et a. 1996). No se detectó una tendencia clara en el cociente F690/F740, mientras que F440/F520 ni siquiera mostró correlación con el contenido de agua de la planta. La planta *Haberlea rhodopensis* también muestra un aumento de los cocientes BGF/Chl-F mientras sufre desecación, debido a un aumento de la BGF y un descenso de la Chl-F, recuperando los valores normales durante la etapa de rehidratación (Georgieva et al. 2006). Takács et al. (2000) en experimentos con plantas criptógamas tolerantes a la desecación concluyen que los aumentos rápidos, 1 ó 2 h dependiendo de la especie, en los cocientes de fluorescencia durante el estrés hídrico, sólo podían deberse a los cambios producidos en las propiedades ópticas de las hojas por la pérdida de volumen de sus células y no por la acumulación de sustancias fenólicas (Fig. 11).

A.2.2.4.6. Temperatura. Las altas temperaturas provocan aumentos en la emisión de BGF y Chl-F, más acusado en la primera, aumentando así el cociente BGF/Chl-F (Schweiger et al. 1996). Un brusco descenso de temperatura también ocasiona un incremento reversible de la BGF, pero no de la Chl (Bongi et al. 1994, Morales et al. 1996, 1998, Cerovic et al. 1999). Existen claras evidencias de que estos cambios provienen tanto de los fluoróforos de la epidermis como del microambiente en el que éstos se encuentran (Morales et al. 1998, Saito et al. 1998).

A.2.2.4.7. Hojas variegadas. Las partes claras de las hojas variegadas emiten gran cantidad de BGF en comparación con las partes verdes; si trazáramos un transepto a lo largo de una hoja variegada, veríamos que F440 y F690 muestran un contraste negativo (Lichtenthaler et al. 2005) (Fig. 12). Además, las zonas claras poseen trazas de Chl no funcional (Lichtenthaler et al. 1996), por lo que los cocientes F440/F690 y F440/F740 son mucho mayores que en las partes verdes de las mismas (Buschmann y Lichtenthaler 1998).

Figura 12: Imagen en blanco y negro de una hoja variegada de *Campelia zonania* L. con un análisis del perfil de emisión de F440 (línea discontinua) y F690 (línea continua) a lo largo de la superficie de la hoja, realizado a partir de las respectivas imágenes de fluorescencia. Se aprecia el **contraste negativo** entre F440 y F690 (tomado de Lichtenthaler et al. 2005).



A.2.2.4.8. Respuestas a patógenos. Se ha comprobado que las plantas infectadas por hongos sufren un incremento en el contenido de ácidos fenólicos (Niemann et al. 1991) y de BGF, que en un principio se atribuyó a la propia autofluorescencia del hongo (Lüdeker et al. 1996). Sin embargo, hoy día existen pruebas de que los patógenos inducen un aumento de sustancias de naturaleza fenólica (Nicholson y Hammerschmidt 1992, Kofalvi y Nassuth 1995) conocidas como fitoalexinas, involucradas en la defensa contra patógenos (Dixon y Paiva, 1995, Dixon et al. 2002). En el caso de los hongos, las fitoalexinas tendrían por misión inhibir el crecimiento fúngico o evitar la colonización del hospedador estrechando las paredes celulares en los puntos de entrada (Cerovic et al. 1999), y dada su naturaleza fenólica, podrían fluorescer bajo la luz UV. De hecho, recientemente se ha detectado un aumento de compuestos fenólicos que fluorescen al iluminarse con luz UV en plantas de cebada resistentes al hongo *Blumeria graminis* (Swarbrick et al. 2006). Dichas plantas expresan el gen de resistencia *Mla12*, que está íntimamente asociado a la muerte de las células epidérmicas tras el intento de infección del hongo. Por su parte, Buschmann y Lichtenthaler (1998) detectaron mediante MCFI las lesiones ocasionadas por moscas blancas en hojas de tabaco, así como los daños ocasionados por ácaros. Éstos succionan los cloroplastos de la cara AB de las hojas, y producen un descenso de Chl-F que se visualiza en los cocientes F440/F690 y F440/F740. En cuanto a infecciones virales, Szigeti et al. (2002) informaron del aumento de los cocientes F440/F690, F440/F740 y F690/F740 en hojas de col china infectadas con el virus del mosaico amarillo del nabo. Más recientemente, Chaerle et al. (2007b) mostraron un aumento de la BGF durante la HR provocada por el virus del mosaico del tabaco (TMV) en estas plantas, y lo correlacionaron con un aumento de escopoletina. Se ha detectado un aumento en la BGF de plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con PMMoV en estadios tempranos de la infección, más acusado en la cara AB que en la AD, probablemente asociado a un incremento de ácido

clorogénico (Sajnani 2005). También se ha demostrado mediante técnicas diferentes a la fluorescencia, que las plántulas de tomate infectadas con el Virus X de la Patata (PVX) y/o el Virus del Mosaico del Tabaco (TMV) acumulan fenoles esterificados en las paredes celulares, alterando incluso el tipo de componente fenólico en las plantas infectadas con respecto a los controles (Balogun y Teraoka 2004).

A.2.2.4.9. Teledetección. Todos los trabajos descritos anteriormente y algunos otros (Luedeker et al. 1997, Apostol et al. 2003, Moya et al. 2003, Apostol et al. 2006, y una completa revisión de Nilsson 1995a) avalan la utilidad de la fluorescencia inducida por luz UV a la hora de monitorizar el estado de las cosechas o masas forestales, incluso desde satélites. El control de las plagas y la fertilización de los cultivos son las principales dianas de las técnicas de teledetección. Dado que la BGF está directa y casi linealmente correlacionada con la temperatura de la hoja, podría considerarse la posibilidad de emplear esta técnica como un termómetro para teledetección en cultivos (Morales et al. 1998). Richards et al. (2003) demostraron que la fluorescencia inducida por UV es una herramienta útil para la teledetección bajo gran diversidad de condiciones lumínicas, incluyendo la oscuridad completa y ambientes con rápidos cambios de luz, similares a los que ocurren en días parcialmente nublados. Sin embargo, esta técnica presenta aún ciertas limitaciones, todavía por resolver (Buschmann y Lichtenthaler 2000): gran cantidad de estreses provocan el aumento del cociente F440/F690, por lo que esta técnica por sí sola carecería de especificidad, siendo necesaria la combinación con otras técnicas biofísicas (Cerovic et al 1999, Apostol et al 2003). Además, ya que las relaciones hídricas cambian los cocientes de fluorescencia en plantas criptógamas tolerantes a la desecación, las comunidades dominadas por tales plantas no son dianas apropiadas para la teledetección del estrés vegetal vía fluorescencia de imagen usando los cocientes de fluorescencia desarrollados para plantas superiores (Takács et al. 2000).

A.2.3. Fluorescencia roja de la clorofila

Como apuntábamos en el capítulo dedicado a la BGF (A.2.2), las moléculas de Chl a, cuando son excitadas con luz de longitud de onda larga, emiten una señal de fluorescencia en el rojo (F690) y en el rojo lejano (F740). En el presente apartado, analizaremos con detalle la fluorescencia en la región roja del espectro de la Chl (Chl-F), ya que durante los últimos 70 años ha sido de gran utilidad para la comprensión del fenómeno de la fotosíntesis, y durante las últimas tres décadas, se ha convertido en una de las herramientas más usadas para el seguimiento de las reacciones fotosintéticas *in vivo* (Nedbal y Whitmarsh 2004), hasta el punto de que ningún estudio sobre estrés y fotosíntesis parece estar completo sin datos de fluorescencia (Maxwell y Johnson 2000). Ofrece además, las ventajas de ser una técnica no destructiva, precisa y de gran rapidez en las medidas (Lichtenthaler 1996).

A.2.3.1. Origen de la fluorescencia roja de la clorofila

Las hojas fotosintéticamente activas recogen la energía de la luz solar gracias a los pigmentos presentes en los complejos mayores de antena del PSII y el PSI (LHC II y LHC I, respectivamente; LHC: *light harvesting complex*). Esta energía se transfiere, posteriormente, a los centros de reacción (RC) P680 y P700, donde la energía se utiliza para la separación de cargas (Fig. 13). En este proceso participan las Chls a y b, así como los denominados carotenoides primarios (Lichtenthaler y Rinderle 1988). Se sabe que, a temperatura ambiente, la emisión de Chl-F procede fundamentalmente de la Chl a del PSII (Kyle et al. 1983, Cerovic et al. 1999); de esta forma, el PSII controla y distribuye equilibradamente la energía captada por los dos fotosistemas (Lichtenthaler y Rinderle 1988).

La energía lumínica que llega al PSII es convertida en energía química mediante los procesos fotoquímicos (Fig. 14). Una pequeña parte de la energía, la que no puede ser empleada en fotosíntesis, se disipa en forma de calor (procesos no fotoquímicos) o bien en forma de fluorescencia, con objeto de que el exceso de

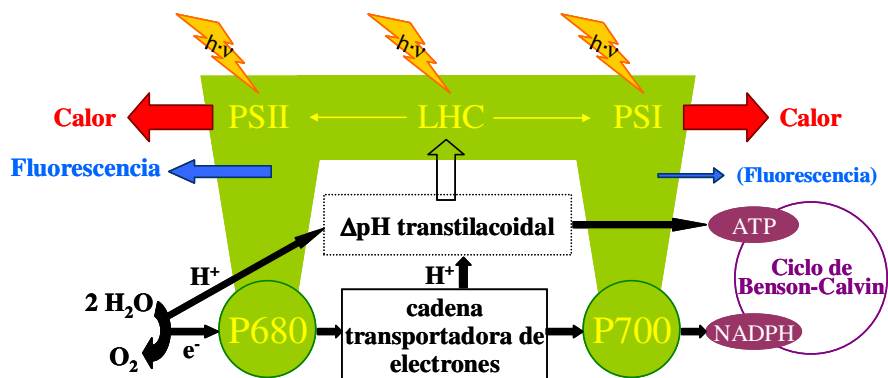


Fig. 13: Transformación de la luz absorbida por las antenas de ambos fotosistemas en tres distintos tipos de energía: fotosintética (procesos fotoquímicos), fluorescencia y calor (procesos no fotoquímicos).

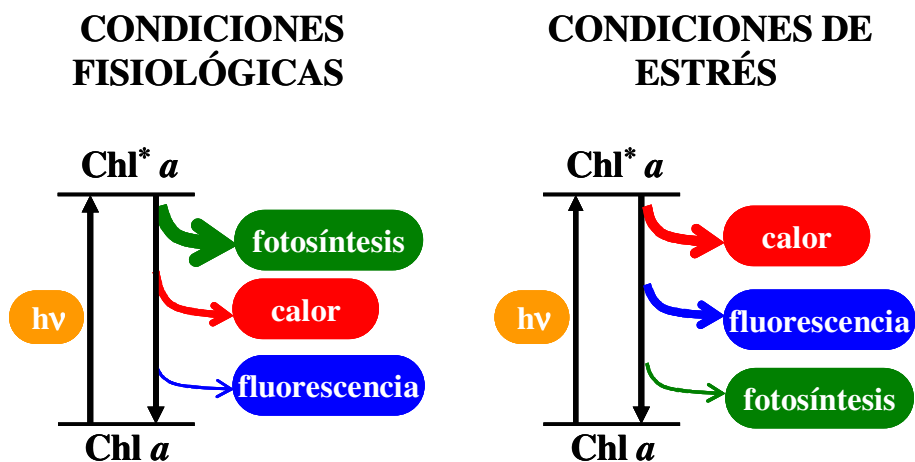


Fig. 14: La clorofila excitada por la luz (Chl^*) vuelve a su estado basal mediante tres procesos en equilibrio. Bajo condiciones fisiológicas, los procesos fotoquímicos son los predominantes. Bajo situaciones de estrés, los procesos no fotoquímicos y la fluorescencia aumentan en detrimento de la fotosíntesis.

energía no dañe a ambos fotosistemas. En condiciones fisiológicas normales, la fotosíntesis predomina sobre los procesos disipativos; sin embargo, cuando la planta se enfrenta a situaciones adversas, la maquinaria fotosintética no puede trabajar a pleno rendimiento y la energía sobrante debe disiparse. Como consecuencia, los procesos no fotoquímicos y la fluorescencia, aumentan. Por tanto, la medida de la emisión de fluorescencia remite a la de la eficiencia fotosintética, con la que muestra una relación inversa, y puede proporcionar evidencias directas del mecanismo y dinámica de los primeros eventos de la fotosíntesis (Sauer y Debreczeny 1996).

A.2.3.2. *Cinética de inducción de la fluorescencia I: el efecto Kautsky*

Kautsky y Hirsch (1931) registraron por primera vez, utilizando un filtro especial y con sus propios ojos, la emisión de fluorescencia de una planta adaptada a la oscuridad y expuesta después a la luz azul. Pudieron comprobar que la emisión de fluorescencia no era estable, alcanzando al principio un máximo de un tono rojo brillante, pero que posteriormente decrecía. Esta observación supuso la primera descripción de la cinética de la Chl-F, y desde entonces lleva el nombre del primero de sus autores.

En efecto, una planta adaptada a la oscuridad tiene todos sus RC “abiertos”, con Q_A completamente oxidada (Fig. 15A), y a la espera de la separación de cargas inducida por la luz. En esta situación, en las plantas se registra una fluorescencia mínima, también llamada F_0 o *quenching* de antena (Fig. 15B). Cuando una luz intensa incide sobre las antenas, los centros de reacción se “cierran” y Q_A se reduce totalmente, de forma que la energía que sigue llegando a los fotosistemas se encuentra en exceso, por lo que se disipa en forma de fluorescencia, alcanzándose un máximo. Si la luz empleada a tal efecto es actínica, este máximo se conoce como F_P , mientras que si la luz es saturante, recibe el nombre de F_M (fluorescencia máxima). La diferencia entre F_M y F_0 se denomina fluorescencia variable o F_V . A partir de estos valores de fluorescencia, se puede calcular un parámetro básico

conocido como máximo rendimiento cuántico del PSII o F_V/F_M , que nos indica la eficiencia fotosintética máxima de nuestro sistema. Normalmente, una planta sana de cualquier especie tiene un índice F_V/F_M cercano a 0,8 (Björkman y Demming 1987), pero cuando se enfrenta a situaciones de estrés, este valor suele disminuir.

Continuando con la cinética de inducción de fluorescencia de Kautsky, tras el inicial aumento de fluorescencia, se registra un descenso de la misma, debido a que Q_A va cediendo electrones a la cadena transportadora y los centros de reacción se van “abriendo”. Este descenso en la emisión de fluorescencia hasta un estado estacionario de equilibrio (F_S) se conoce como *quenching*, y tiene dos orígenes: el fotoquímico (qP, ocasionado por el desencadenamiento de la fotosíntesis) y el no fotoquímico (qN).

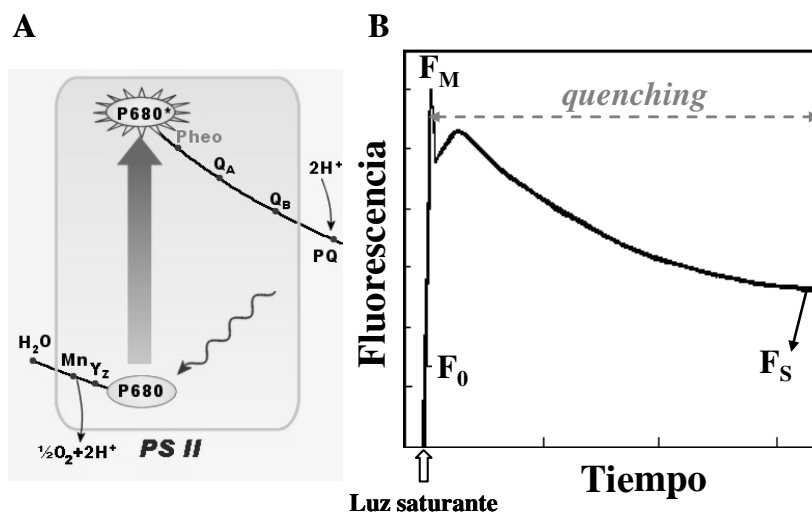


Fig. 15: A) Esquema de la cadena de transporte de electrones en el PSII, donde Q_A es uno de los aceptores de electrones (tomado de www.uqtr.ca/labcarpentier/eng/research.htm). B) Cinética de inducción de la fluorescencia: el efecto Kautsky.

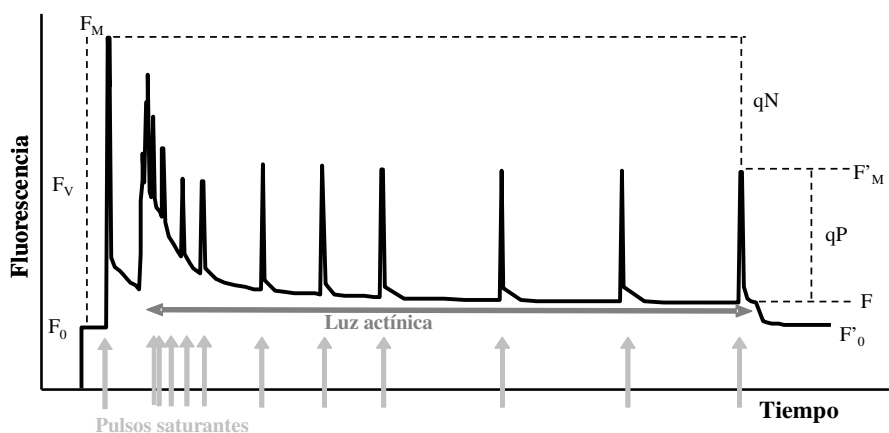


Fig. 16: **Cinética de la inducción de la fluorescencia y análisis de los coeficientes de *quenching*** mediante la aplicación de pulsos de luz saturantes (para una descripción del protocolo detallado, ver Pérez-Bueno et al. 2006).

A.2.3.3. *Cinética de inducción de la fluorescencia II: análisis de los coeficientes de quenching*

Determinar qué fracción del fenómeno de *quenching* puede ser atribuida a los procesos fotoquímicos y cuál a los no fotoquímicos es un proceso complejo. Para ello se recurre al protocolo de análisis de los coeficientes de *quenching*, mediante la aplicación de pulsos de luz saturantes durante el período de iluminación con luz actínica en la cinética de la inducción de la fluorescencia (Fig. 16). Cada nuevo máximo de fluorescencia obtenido se denomina F'_M , cuyo valor no alcanza nunca al de F_M , lo que indica que los mecanismos de *quenching* no fotoquímico están actuando. De esta forma, la diferencia entre F_M y F'_M se debe al qN , mientras que la diferencia entre F'_M y el valor de fluorescencia anterior al pulso de luz saturante se corresponde con qP .

El cálculo de qP requiere el conocimiento de la F'_0 (fluorescencia mínima tras la inducción de la fluorescencia y el apagado de la luz actínica). Sin embargo, existe una aproximación a qP , denominada rendimiento cuántico del PSII (Φ_{PSII}),

que cuantifica la proporción de energía absorbida por el PSII que es utilizada en el transporte electrónico fotosintético y que suele ser proporcional a la tasa de fijación de CO₂ (Genty et al. 1989). Se expresa como:

$$\Phi_{PSII} = \frac{F'_M - F'_l}{F'_M} = \frac{\Delta F}{F'_M}$$

Por otra parte, en la literatura sobre fluorescencia roja de la clorofila, es más común hablar de NPQ, de cálculo sencillo y correlacionado con la emisión de calor, que de qN. Según Bilger y Björkman (1990):

$$NPQ = \frac{F_M - F'_M}{F'_M} = \frac{\Delta F_M}{F'_M}$$

Nuevas ecuaciones matemáticas desarrolladas por diversos autores, proponen otros coeficientes de *quenching* (*quenching* total, *quenching* no fotoquímico completo, etc.) distintos a los aquí descritos; revisiones como la de Roháček y Bartak (1999) y Maxwell y Johnson (2000) recogen una gran variedad de ellos. La mayoría describen las señales de fluorescencia anteriormente citadas pero de forma diferente (Buschmann 1999). Algunos autores como Lichtenthaler, prefieren usar el parámetro Rfd o índice de vitalidad de las plantas (Lichtenthaler y Miché 1997). Todos estos coeficientes de fluorescencia reflejan cambios en algún proceso fisiológico del vegetal, por lo que son los preferidos de fisiólogos y patólogos. Sin embargo, están surgiendo otros puntos de vista en estudios más biofísicos, a la búsqueda de parámetros matemáticos que sean buenos indicadores de estrés - a ser posible presintomáticos- aunque no se correspondan directamente con un proceso del metabolismo vegetal. Soukupová et al. (2003), en estudios con toxinas fúngicas, desarrollaron un algoritmo experimental simple que consiguió identificar un parámetro de Chl-F (F_0/F_M) que, de forma presintomática, maximizaba el

contraste entre tejidos tratados y no tratados, o bien entre tejidos sanos e infectados. F_0/F_M no tiene significado fisiológico, pero intuitivamente es muy similar a F_V/F_M , y ya fue usado con éxito en la predicción de la calidad post-cosecha de limones (Nedbal et al. 2000b). Más recientemente, este parámetro también ha demostrado su validez señalando el punto de inoculación de varias roseotoxinas en manzanas (Žabka et al. 2006). El grupo del Dr. Ladislav Nedbal (Nové Hradky, República Checa), continúa tratando de introducir nuevas formas de análisis de los datos arrojados por la Chl-F mediante análisis de “discriminabilidad”, que resulta de la resta de los valores de fluorescencia de plantas control y plantas estresadas dividido por la resta de sus respectivas desviaciones típicas, o la “selección de características” (*feature selection*). Esta última consiste en la aplicación de métodos estadísticos avanzados para encontrar una combinación de imágenes que ofrezca el mayor contraste entre plantas sanas y plantas estresadas. La “selección de características” se ha empleado con éxito en plantas de *Arabidopsis thaliana* infectadas con la bacteria *Pseudomonas syringae* (Berger et al. 2007, Matouš et al. 2007), detectándose la infección de forma presintomática mediante un parámetro elegido por este sistema, 18 h antes que con el parámetro F_V/F_M (no presintomático).

A.2.3.4. *Los componentes del quenching no fotoquímico (NPQ)*

NPQ ha demostrado en estudios anteriores de nuestro grupo (Rahoutei et al. 2000, Pérez-Bueno 2003, Sajnani 2005, Pérez-Bueno et al. 2006) y de otros autores (Scholes y Rolfe 1996, Osmond et al. 1998, Chou et al. 2000, Lohaus et al. 2000, Swarbrick et al. 2006) ser un parámetro de gran utilidad para el seguimiento de las infecciones por patógenos y del efecto de otros factores de estrés, hecho que se confirma en el presente estudio. Pero el origen de NPQ sigue siendo todavía objeto de controversia.

El aparato fotosintético es altamente dinámico y capaz de responder rápidamente a los estímulos ambientales. En condiciones en las que la energía de la

luz absorbida supera a la capacidad de transformación en energía química de la cadena de transporte electrónico, el NPQ constituiría un mecanismo de protección frente a daños fotoinhibitorios de suma importancia para la adaptación a corto plazo frente a cambios en las condiciones ambientales. Tres son los mecanismos que constituyen el NPQ (Maxwell y Johnsson 2000, Horton et al. 2005) y pueden medirse con un fluorímetro tipo PAM: qT (ligado a la transición de estado), qI (componente de fotoinhibición) y qE (*quenching* dependiente del gradiente de pH transtilacoidal), de tal forma que:

$$NPQ = qT + qI + qE$$

A.2.3.4.1. *Quenching* ligado a la transición de estado o qT. La rápida reorganización de las antenas es un mecanismo por el cual se ajusta la absorción de energía de los dos fotosistemas en respuesta a cambios en el espectro y/o intensidad de la luz incidente. Cuando la actividad del PSII supera a la del PSI, proteínas de la antena del PSII son fosforiladas de forma reversible, provocando la disociación de trímeros de LHCII que se desplazan y unen al PSI, disminuyendo así el tamaño de las antenas del PSII en favor del PSI y procurando una distribución más equilibrada de la absorción de energía por ambos fotosistemas (Walters y Horton, 1991, van Wijk et al. 1993, Szabó et al. 2005). Por el contrario, cuando las condiciones de iluminación favorecen preferentemente al PSI, el proceso inverso tiene lugar mediante la desfosforilación del LHCII. Se piensa que qT está relacionado con el estado de activación de la ferredoxina-NADP⁺ reductasa (Schansker et al. 2006). La contribución de qT al total del *quenching* es muy pequeña y sólo se detecta a bajas intensidades de luz (Maxwell y Johnson 2000).

A.2.3.4.2. *Quenching* ligado a la fotoinhibición o qI. Cuando la luz incidente es excesiva o, debido a la presencia adicional de algún factor de estrés en condiciones de iluminación moderada, se activa la producción de ROS que pueden

causar daños oxidativos a pigmentos, proteínas y lípidos, componentes de la maquinaria fotosintética. La consiguiente disminución de la eficiencia fotosintética es conocida como fotoinhibición y tiene lugar en el plazo de horas (Maxwell y Johnson 2000). Parece ser que los carotenoides previenen la oxidación disipando la energía en exceso (Szabó et al. 2005). Otros autores proponen que qI podría estar vinculado a la presencia de PSII no funcionales (centros disipativos), normalmente dañados en su lado donador (van Wijk et al. 1993).

A.2.3.4.3. *Quenching* dependiente del gradiente del pH transtilacoidal o qE.

Este componente se define como la porción rápidamente reversible del *quenching* que no está asociada a la separación de cargas (Horton et al. 1996, Demmig-Adams y Adams 2000, Maxwell and Johnson 2000). Es el mecanismo de *quenching* no fotoquímico que sigue la cinética de inducción más rápida y el que mayor cantidad de energía disipa (80%, Holt et al. 2004), hasta el punto de que es considerado un factor ecofisiológico de suma importancia en la adaptación de las plantas al exceso de luz incidente (Niyogi et al. 2005). qE se caracteriza por requerir el establecimiento del gradiente de pH generado en la membrana tilacoidal durante la fotosíntesis y la participación de la proteína PsbS del PSII, y está asociado con un cambio en la absorción a los 535 nm (ΔA_{535}) (Holt et al. 2004, Szabó et al. 2005).

El mecanismo de activación de qE, para el que se han propuesto numerosos modelos, es objeto de amplia discusión (Niyogi et al. 2005, Codgell 2006).

Según Holt et al. (2004) y Niyogi et al. (2005), el primer paso necesario para que qE tenga lugar es la protonación de dos residuos de glutamato de la proteína PsbS, debido al establecimiento del gradiente de pH transtilacoidal generado durante la fotosíntesis. Dicho gradiente activaría también a la enzima violaxantina-de-epoxidasa, que sintetizaría zeaxantina a partir de violaxantina, vía ciclo de las xantofilas. La proteína PsbS protonada, que actuaría en forma de dímero, tendría la capacidad de unirse a zeaxantina. Crouchman et al (2006) han propuesto recientemente que en tales condiciones, PsbS es responsable de la activación de

cambios conformacionales que llevan al establecimiento del NPQ. La protonación de PsbS activaría el sitio de unión a zeaxantina y, como resultado, se obtendría el cambio en el espectro de absorción de ésta (ΔA_{535}) (Holt et al. 2004, Niyogi et al. 2005, Szabó et al. 2005). Ante la falta de estructura cristalográfica de PsbS, Haripal et al. (2006) han propuesto un modelo teórico de esta proteína que confirmaría la validez de este modelo.

Horton et al. (2005) complican un poco más el modelo para explicar cómo se generan qE y también qI, mediante mecanismos de acción muy similares (Horton y Ruban 2005, Fig. 17A y B). Describen la forma en que la de-epoxidación y la protonación controlan la conformación de las antenas del PSII, dando lugar a nuevas interacciones entre pigmentos dentro de las subunidades proteicas (Horton y Ruban 2005).

Un paso que podría ser previo a estos mecanismos de *quenching* en las antenas ha sido encontrado en mutantes de cebada (Finazzi et al. 2004). Estas plantas poseían un mecanismo de NPQ independiente de zeaxantina que resultó estar ligado al RC. Estos autores postulan que el *quenching* de RC podría ser el primero en activarse, y que sería un estado de transición rápidamente reemplazado por un *quenching* fotoquímico, o bien por un *quenching* de antena.

qE también podría estar regulado por diversos factores que contribuyen a la acidificación del lumen, como la activación de la reacción de la peroxidasa de Mehler o el flujo cíclico electrónico alrededor del PSI (Kanazawa y Kramer 2002, Avenson et al. 2004).

La rápida activación de qE sugiere que este componente del NPQ aparece como respuesta a condiciones ambientales fluctuantes (Kanazawa y Kramer, 2002), que podrían modular el transporte electrónico fotosintético lineal, lo que se conoce como “sensibilidad de qE” (Avenson et al. 2004). El transporte electrónico fotosintético, acoplado a la translocación de protones desde el estroma al lumen, origina el establecimiento de una fuerza protón motriz transtilacoidal (pmf, del inglés *proton motive force*) que gobierna la síntesis de ATP. De esta forma, dismi-

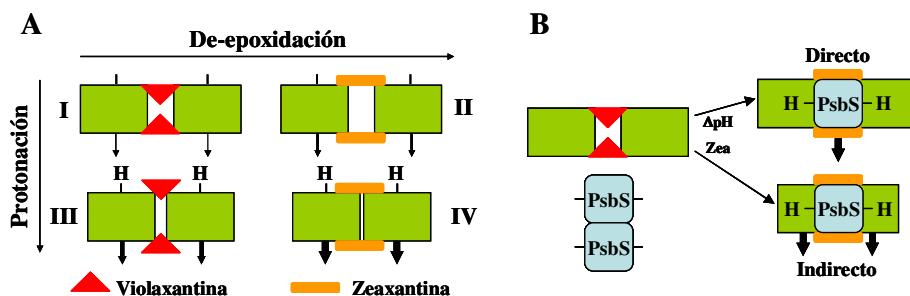


Fig. 17: A) **Modelo del cambio conformacional del LHCII** (rectángulos verdes) **para el NPQ**. La proximidad entre los rectángulos (LHCII) representa la extensión del cambio conformacional que causa la disipación de la energía y que controla la eficiencia del *quenching*. El grosor de las flechas indica la cantidad de energía disipada en cada estado. Los estados de *quenching* van del I-IV. I representa el estado adaptado a oscuridad, mientras que IV es el estado de qE predominante, que se alcanza después de varios minutos de exposición a la luz. El estado III es el estado de transición de qE que se alcanzaría inmediatamente después de encender la luz y antes de que la de-epoxidación tenga lugar. El estado II es un estado de “memoria”, que se encontraría a los pocos minutos de apagar la luz tras haber expuesto la planta previamente a la luz, y se correspondería con qI. B) **Posibles mecanismos de actuación de PsbS**. El *quenching* sería directo, si PsbS protonada y unida a zeaxantina actuara disipando el exceso de energía en forma de calor; en cambio, el *quenching* indirecto tendría lugar si la proteína PsbS protonada indujera el *quenching* de antena catalizando los cambios conformacionales entre los estados I y III, y entre II y IV (reproducido a partir de Horton et al. 2005).

nuyendo la conductividad de la ATP sintasa de membrana a los protones, podría incrementarse la pmf y regularse la “sensibilidad de qE” (Kanazawa y Kramer, 2002). Más recientemente se ha argumentado que la pmf aporta contribuciones significativas al componente de potencial eléctrico de membrana ($\Delta\psi$) del tilacoide. Se postula que cambiando las aportaciones relativas de la pmf a $\Delta\psi$ y a ΔpH se alterarían necesariamente la “sensibilidad de qE” al total de la pmf. Por tanto, este modelo establece que $\Delta pH/pmf$ podría cambiar con el estado fisiológico de las plantas. Es más, la fracción de pmf guardada como $\Delta\psi$ o como ΔpH es

importante en el balance del papel dual de pmf: permitir la síntesis de ATP mientras se mantiene el pH del lumen dentro de un rango donde la captura de luz pueda ser regulada mediante qE (Avenson et al. 2004).

A.2.3.5. *Medida de la emisión de fluorescencia roja de la clorofila.*
Fluorímetros de imagen

En los últimos tiempos, la interpretación de la emisión de Chl-F ha evolucionado hasta el punto de que existen diversos fluorímetros comerciales que se usan rutinariamente para el ensayo de la actividad de la fotosíntesis en plantas, algas y cianobacterias (Nedbal et al. 2000b). Existen fluorímetros que realizan medidas puntuales de las hojas, de mayor o menor complejidad, como el PEA (*plant efficient analyser*, de Hansatech Instruments, Norfolk, Inglaterra) o el PAM (Waltz, Effeltrich, Alemania), este último de gran eficacia en el cálculo de los diferentes coeficientes de *quenching*. Sin embargo, y como ha quedado convenientemente explicado a lo largo de la presente Tesis Doctoral, las medidas puntuales son en la mayor parte de los casos, insuficientes.

Por tanto, el desarrollo de instrumentos capaces de registrar imágenes de la emisión de Chl-F por parte de células, tejidos, hojas e incluso plantas completas, ha supuesto un gran avance en la comprensión de los procesos fotosintéticos. La fluorescencia de imagen (Chl-FI) revela un amplio rango de características internas de las hojas, incluyendo variaciones espaciales debidas a diferencias en la fisiología, desarrollo, estado nutricional, distribución de pigmentos, morfología y propiedades ópticas. La heterogeneidad en la señal de fluorescencia a lo largo de una hoja puede estar causada por factores internos, tales como las variaciones en la fisiología de las hojas durante el desarrollo, o por factores externos como los estreses bióticos y abióticos (Nedbal y Whitmarsh, 2004), y podría reflejar alteraciones en las relaciones fuente-sumidero inducidas por el patógeno (Swarbrick et al. 2006).



Fig. 18: **Modelo abierto del FluorCam** (PSI, www.psi.cz) con sus distintos componentes.

Actualmente existen dos casas comerciales que suministran sistemas de medición de Chl-FI: Walz (www.walz.com) y PSI (*Photon System Instruments*, www.psi.cz). PSI produce gran variedad de fluorímetros de imagen, incluso para técnicas de microscopía. De todos ellos, describiremos brevemente el “FluorCam abierto”, ya que es el sistema de imagen empleado en el laboratorio de la Dra. Barón y con el que se ha realizado una gran parte de la presente Tesis Doctoral.

El FluorCam está basado en el modelo descrito por Nedbal et al. (2000a), con algunas modificaciones. Consiste en una unidad de excitación (luz actínica y luz saturante), una unidad de detección (cámara CCD) y una unidad de control (Fig. 18). La luz actínica (con una modulación de 10 μs de duración) es suministrada por dos paneles de diodos que emiten luz naranja (620 nm) y que iluminan de forma homogénea la muestra consiguiendo hasta 350 $\mu\text{mol (fotones)}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, mientras que la luz saturante proviene de una lámpara halógena de tungsteno de 250 W provista de un obturador y que es capaz de generar pulsos de hasta 2000 $\mu\text{mol (fotones)}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. Las imágenes se graban de forma sincronizada con los flashes de medida gracias a un obturador electrónico presente en la cámara

y que permite minimizar las interferencias de señales no moduladas. Por lo tanto, el FluorCam permite en su conjunto captar en paralelo las señales de fluorescencia y las correspondientes al “ruido de fondo” en imágenes separadas. Éstas son restadas posteriormente para generar una imagen de la fluorescencia real emitida por la muestra como resultado de la iluminación aplicada. Igualmente esta técnica permite un cálculo muy exacto de F_0 , señal de fluorescencia que otros fluorímetros no son capaces de captar. Posteriormente, gracias a un ordenador, podemos obtener dichas imágenes y componer otras correspondientes a los coeficientes de *quenching* que deseemos. Asimismo, los valores numéricos de dichos coeficientes pueden obtenerse y utilizarse en programas de cálculo como Excel o SigmaPlot.

A.2.3.6. Aplicaciones de la fluorescencia de la clorofila de imagen

Las bondades de la fluorescencia de la clorofila han hecho que esta técnica haya sido ampliamente usada en los últimos años y se haya considerado como el “estetoscopio de los fisiólogos vegetales” (Valcke 2003). Revisar todas sus aplicaciones escapa a los objetivos de esta tesis, por lo que nos centraremos fundamentalmente en el seguimiento del estrés biótico mediante Chl-FI. Desde el estudio pionero de Björn y Forsberg (1979) para revelar la respuesta del aparato fotosintético al ataque por patógenos, se han realizado multitud de estudios de estrés biótico aplicando Chl-FI.

A.2.3.6.1. Seguimiento de la infección fúngica. La bibliografía disponible sobre Chl-FI relativa a la infección fúngica es muy amplia. Ya desde 1995, Esfeld y sus colaboradores la utilizaron para estudiar las relaciones fuente-sumidero en plantas de garbanzo infectadas con el hongo *Ascochyta rabiei*. Pudieron comprobar que la infección fúngica conduce a una rápida inducción de Chl-F como resultado de un aporte metabólico procedente de otros tejidos fuente actuando, por tanto, el tejido infectado como sumidero.

En el caso de plantas de judía infectadas con el hongo *Uromyces appendiculatus*, la Chl-FI demostró que en los puntos de infección la emisión de fluorescencia era heterogénea en el tiempo y el espacio, precediendo a los síntomas visuales en 3 ó 4 días (Peterson y Aylor 1995). Estos autores concluyeron que la capacidad fotosintética de las áreas infectadas estaba alterada, pero no pudieron establecer la magnitud del daño. Similares resultados fueron obtenidos en la misma planta, pero en esta ocasión, infectada con el hongo *Colletotrichum lindemuthianum*, registrándose una inhibición de la fotosíntesis en áreas foliares aparentemente sanas. En esta ocasión, el descenso en la tasa fotosintética fue correlacionado con un cierre estomático (Meyer et al. 2001). Scharte et al. (2005) también registraron un descenso en la tasa de transporte electrónico fotosintético acoplado a cierre estomático en plantas de tabaco infectadas con el hongo *Phytophthora nicotianae*.

El patrón heterogéneo en la emisión de fluorescencia (tanto espacial como temporal) también tiene lugar en hojas de avena infectadas con el hongo *Puccinia coronata* (Scholes y Rolfe 1996). La tasa fotosintética de las zonas infectadas disminuyó al comienzo de la infección, extendiéndose progresivamente al resto de la hoja. El patrón de qN fue más complejo, disipando más o menos energía en forma de calor dependiendo de la zona de la hoja, invadida o no por el hongo, y del estadio de la infección.

Resultados similares se obtuvieron en *Arabidopsis* infectada con *Albugo candida* y en hojas de cebada infectadas con *Blumeria graminis*, si bien la bajada en la tasa de fotosíntesis estaba restringida al área infectada hasta muy avanzado el ciclo infectivo. Las imágenes de Φ_{PSII} y de NPQ durante la inducción de la emisión de fluorescencia revelaron una compleja heterogeneidad metabólica dentro de la hoja infectada (Chou et al. 2000, Swarbrick et al. 2006) (Fig. 19A).

La infección de hojas de roble por *Erysiphe cichoracearum* y la de *Botrytis cinerea* en tomate provoca igualmente alteraciones en el metabolismo de la planta, dando lugar a varios anillos con diferentes tasas fotosintéticas fácilmente

distinguibles gracias a las técnicas de Chl-FI. Las zonas que muestran una baja tasa fotosintética coinciden con aquellas que mostraban un mayor NPQ (Repka 2002, Berger et al. 2004).

Estos resultados contrastan con los de Aldea et al. (2006), quienes detectaron un descenso de actividad fotosintética incluso en áreas alejadas del punto de inoculación de *Phyllosticta* en varias coníferas como consecuencia del daño físico infligido por el hongo en los RC del PSII (Fig. 19B).

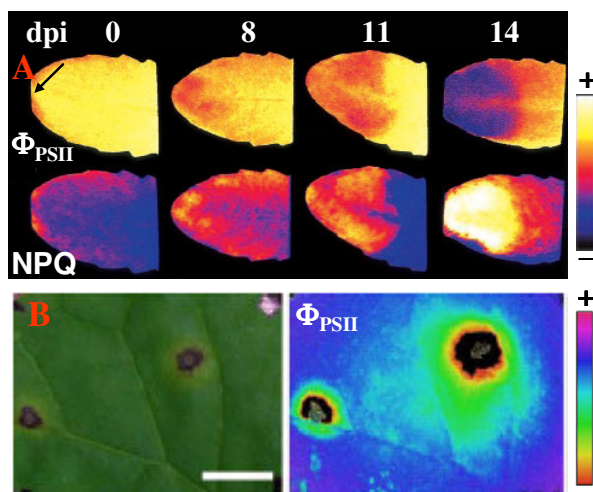


Fig. 19: Heterogeneidad espacio- temporal en la fotosíntesis de plantas infectadas por hongos. A) Evolución de la infección por *Albugo candida* (punto de inoculación indicado por una flecha) en hojas de *Arabidopsis thaliana* (tomado de Chou et al. 2000). B) Infección por *Phyllosticta* en hojas de *Cercis canadensis* (tomado de Aldea et al. 2006).

Soukupová et al. (2003) detectaron de forma presintomática el efecto causado por destruxinas, toxinas procedentes del hongo *Alternaria brassicae*, en hojas de *Brassica napus* y *Sinapis alba*. Estos autores desarrollaron un algoritmo simple para encontrar las señales de fluorescencia que mejor mostraran las diferencias entre plantas tratadas con destruxinas y las control.

La emisión de fluorescencia de hojas de remolacha aumenta antes de la aparición de síntomas en el punto de inoculación del hongo *Cercospora beticola*, a la par que se registra un descenso de la temperatura en el mismo punto (Chaerle et al. 2004). La infección por TMV en tabaco también registra un aumento de fluorescencia, acompañado de un incremento de la temperatura, por lo que estos autores concluyen que las interacciones planta-patógeno pueden distinguirse mediante métodos de imagen antes de que el daño sea visible, y que la combinación de diferentes métodos tiene el potencial para generar *firmas* específicas de este tipo de interacciones, a modo de huellas dactilares, para la identificación temprana del patógeno.

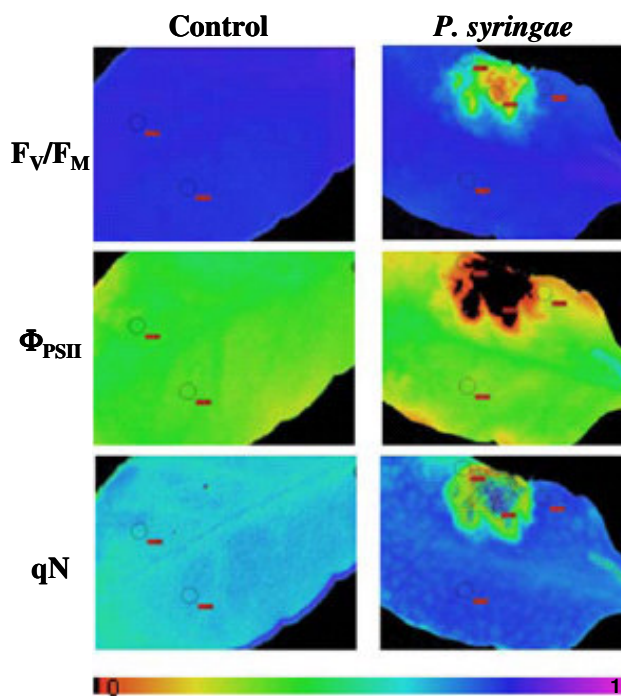


Fig. 20: La infección con *Pseudomonas syringae* en *Arabidopsis thaliana* produce un descenso de los parámetros de *quenching* indicados en la imagen (tomado de Bonfig et al. 2006).

A.2.3.6.2. Seguimiento de la infección bacteriana. Paradójicamente, la infección bacteriana ha suscitado poca curiosidad para aquellos que trabajan en Chl-FI, si bien, en los últimos tiempos este campo ha experimentado un creciente interés por parte de los investigadores. La infección producida por *Pseudomonas syringae* en *Arabidopsis thaliana* provocó un descenso presintomático de F_v/F_m , Φ_{PSII} y qN en el sitio de infección, si bien había cierta graduación desde el borde hacia el centro de la zona de inoculación (de mayor a menor, Fig. 20) (Bonfig et al. 2006). Los cambios en qN son un poco más complejos, y si la zona central está muy dañada, se registra un aumento del mismo. La respuesta de *Arabidopsis* a *P. syringae* es más o menos rápida en función a si la cepa bacteriana es virulenta (ocasionando infección sistémica) o avirulenta (induciendo HR). Estos autores concluyeron de su trabajo que *P. syringae* afecta directamente los RC del PSII.

Usando el mismo modelo experimental, Berger et al. (2007) detectaron un descenso de F_v/F_m y del índice de vitalidad y un aumento de NPQ. Sin embargo, la variabilidad que registró este último planteó a estos autores la posibilidad de utilizar la “selección de características” para encontrar parámetros que detectaran mejor la diferencia entre plantas control e infectadas, consiguiendo un total de 8 imágenes combinatorias que revelaron la infección presintomáticamente, y encontrando que la bacteria avirulenta inducía cambios más drásticos.

El grupo del Dr. Ramos y el Ldo. Rodríguez-Moreno han estudiado, en colaboración con nuestro grupo, los efectos de la infección con varios patovares de *P. syringae* en judía. Se ha comprobado que la infección bacteriana induce cambios tanto espaciales como temporales en la eficiencia fotosintética y en el NPQ. Los distintos valores de éste dentro de la hoja infectada pudieron correlacionarse con la concentración bacteriana dentro de la hoja infectada.

Otra posibilidad que ofrecen las técnicas de Chl-FI es su uso con propósitos de biorremediación. En este sentido, la Chl-FI ha demostrado ser un método rápido y fiable para la detección de la biodegradación de herbicidas mediante una bacteria que degrada linurón (*Variovorax paradoxus* WDL1). Las plantas crecidas con

linurón suministrado en su solución nutritiva, sufrieron más daños que aquellas que crecieron con linurón más la mencionada bacteria, lo que fue rápidamente descubierto mediante Chl-FI, mientras que la termografía de imagen detectó el efecto de forma mucho más tardía (Chaerle et al. 2003).

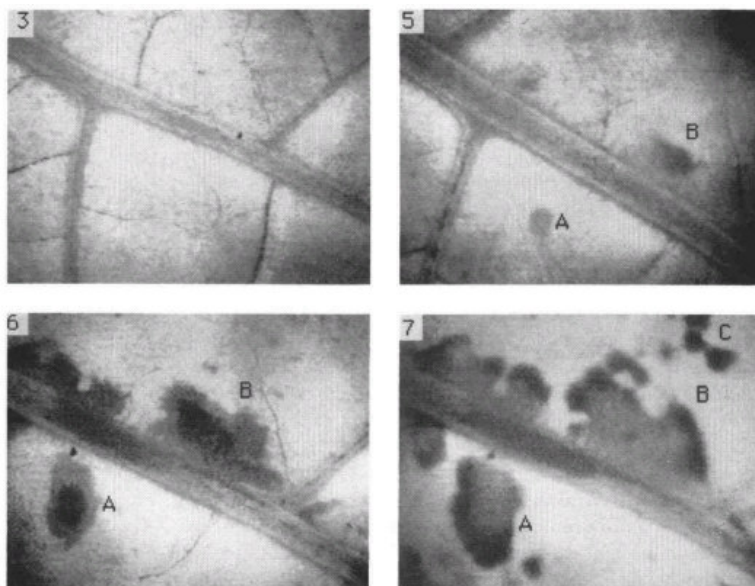


Fig. 21: Emisión de fluorescencia de una hoja de tabaco infectada con **TMV** a diferentes días post-inoculación (indicados en cada panel). El patrón de emisión es heterogéneo en el espacio y en el tiempo (tomado de Balachandran et al. 2004).

A.2.3.6.3. Seguimiento de la infección viral. El modelo experimental tabaco-TMV ha sido objeto de estudio de la Chl-FI en varias ocasiones. Osmond et al. (1990) y Balachandran et al. (1994) estudiaron la reacción sistémica de la planta a este virus, demostrando que la infección provoca una emisión de fluorescencia variable en el tiempo y en el espacio, detectable de forma presintomática (Fig. 21). La HR inducida por TMV en tabaco fue estudiada por Chaerle et al. (2004), quienes registraron un aumento de fluorescencia en el punto de inoculación del virus. Sajjani (2005) estudió la emisión de fluorescencia y los coeficientes de

quenching en la infección sistémica de tabaco silvestre (WT) y tabaco transgénico por TMV. Las plantas transgénicas sobreexpresaban la enzima β -carotínhidroxilasa, por lo que son capaces de incrementar la tasa y velocidad de síntesis de zeaxantina en condiciones de alta intensidad lumínica (Götz et al. 2002). Los mejores parámetros para el seguimiento de la infección viral fueron NPQ y Φ_{PSII} , que demostraron una relación inversamente proporcional, si bien la magnitud de los cambios era mucho menor en el caso de este último. Los experimentos se llevaron a cabo a media y alta intensidad lumínica. Aún en las drásticas condiciones de estrés que supone la infección bajo alta intensidad lumínica, la línea transgénica de tabaco no mostraba diferencias en su comportamiento fotosintético con respecto a la WT y en definitiva, tampoco ventajas.

De forma similar a la infección por hongos que provoca heterogeneidad espacial en la fotosíntesis de las plantas infectadas, la infección por el virus del mosaico del pepino (CMV) en plantas de calabaza también provoca la diferenciación de varias regiones circulares con diferentes tasas de fotosíntesis y distintos niveles de emisión de fluorescencia (Técsi et al. 1994).

Mediante Chl-FI se pudo comprobar que el NPQ refleja el estado de desarrollo de los síntomas provocados por el geminivirus restringido a floema, Abutilon mosaic virus, en plantas de *Abutilon striatum* Dicks. (Osmond et al. 1998, Lohaus et al. 2000).

La infección de *Eupatorium makinoi* por geminivirus da lugar a plantas variegadas muy usadas en decoración en los jardines japoneses. El descenso de Chl de las hojas provoca bajas tasas fotosintéticas (Funayama-Noguchi 2001).

En colaboración con el del Dr. Roland Valcke, nuestro grupo, empleando el sistema experimental *Nicotiana benthamiana*-cepa italiana de PMMoV (PMMoV-I), demostró que el NPQ fue el parámetro de *quenching* que mejor distinguió las plantas infectadas de las sanas en hojas que nunca muestran síntomas (asintomáticas) (Pérez-Bueno 2003, Pérez-Bueno et al. 2006). A los 14-17 dpi se registró un aumento de NPQ en los tejidos adyacentes a las venas principales,

rodeados de una delgada línea de bajo NPQ (Fig. 22). Este patrón espacio-temporal es muy característico de este tobamovirus en *N. benthamiana*, pudiéndose correlacionar la zona de alto NPQ con el patrón de distribución del virus en las hojas asintomáticas.

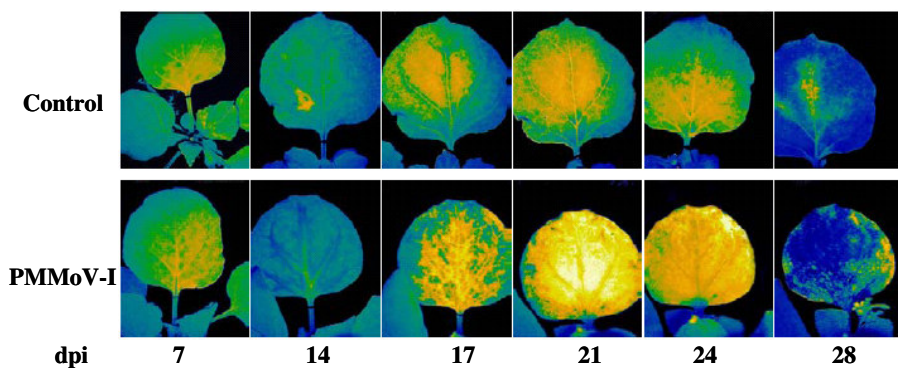


Fig. 22: La infección de *N. benthamiana* por **PMMoV-I** da lugar a un patrón de NPQ espacio-temporal heterogéneo en hojas asintomáticas (tomado de Pérez-Bueno 2003).

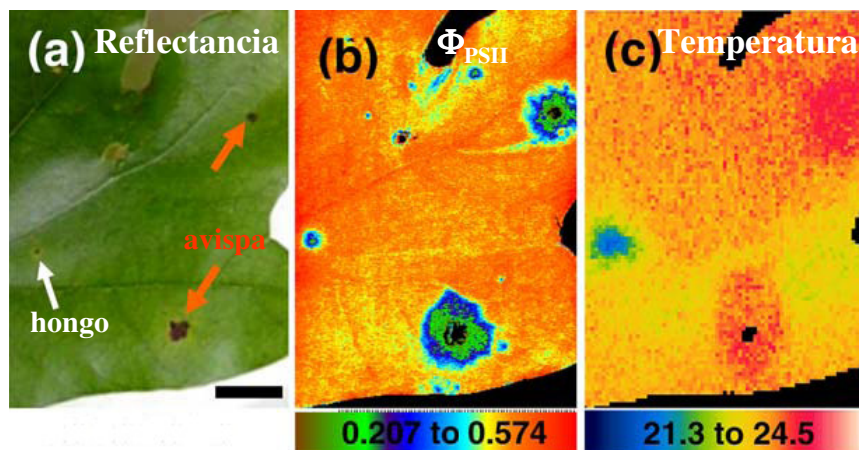


Fig. 23: El daño ocasionado por **insectos** y por **hongos** causa un descenso de la actividad fotosintética más allá del área afectada y provoca efectos antagonistas en la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) de las hojas (tomado de Aldea et al. 2006).

A.2.3.6.4. Seguimiento de los daños ocasionados por herbívoros. Los insectos herbívoros producen graves pérdidas en prados y masas forestales; sin embargo, el impacto que generan en plantas individuales no puede calcularse sólo por la cantidad de tejido devorado por los herbívoros, debido a que su impacto en fotosíntesis es mayor que la suma de los agujeros provocados (Zangerl et al. 2002). Muchos de los fenómenos que median los efectos del daño en fotosíntesis han pasado desapercibido a los investigadores porque las medidas puntuales realizadas mediante métodos convencionales de intercambio de gases en pequeñas áreas de las hojas han sido técnicamente imposibles (Zangerl et al. 2002). El desarrollo de las técnicas de Chl-FI ha solventado estas limitaciones, proporcionando imágenes de grandes áreas de las hojas y un completo análisis de *quenching*. Así, se ha demostrado que los efectos adversos de los herbívoros en la fotosíntesis se extienden mucho más allá del área afectada (hasta 6 veces más que el tamaño de ésta) (Zangerl et al. 2002, Aldea et al. 2006), y varían incluso en función del estadio larvario del insecto (Tang et al. 2006). Las zonas donde se registra un descenso de F_v/F_M o Φ_{PSII} , normalmente registran un aumento de NPQ, aunque la Chl-FI es capaz de detectar cierta heterogeneidad y distinguir zonas con bajo NPQ (Tang et al. 2006). La combinación entre Chl-FI y la termografía de imagen resulta un arma poderosa a la hora de valorar el daño provocado por los herbívoros e incluso ayudaría a distinguir entre diferentes estreses bióticos por el efecto antagonista que estos provocan en ambas radiaciones electromagnéticas (Fig. 23, Aldea et al. 2006, Tang et al. 2006).

A.2.3.6.5. Seguimiento de los daños post-cosecha. Los vegetales una vez cosechados también son susceptibles del ataque por patógenos. Dado que los frutos poseen Chl, su emisión de fluorescencia es susceptible de ser medida mediante Chl-FI y es posible utilizar esta técnica como una herramienta de control de calidad. Mientras maduran, los frutos van perdiendo Chl y su emisión de Chl-F es

menor, por lo que esta técnica también puede emplearse para determinar el grado de madurez y vida media de los mismos (Ciscato 2000, Nedbal et al. 2000b).

La Chl-FI pudo poner de manifiesto presintómicamente la infección de limones por *Penicillium digitatum* (Fig. 24) (Nedbal et al. 2000b). Más recientemente, el daño ocasionado por toxinas de *Trichothecium roseum* o por podredumbre negra en manzanas también pudo detectarse mediante Chl-FI (Ariana et al. 2006, Žabka et al. 2006).

Butz et al. (2005) han realizado una revisión sobre los métodos desarrollados para el control no destructivo de la calidad de los frutos, concluyendo que la combinación de diferentes técnicas, entre las que se encuentran las de imagen, es la mejor opción para conseguir este propósito.

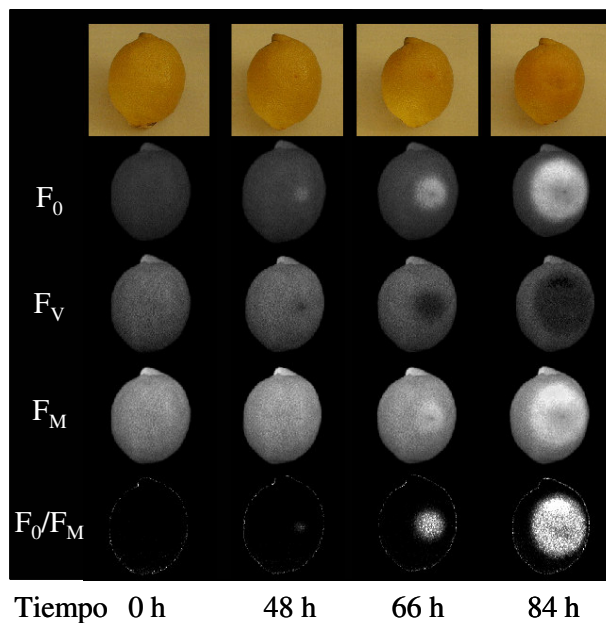


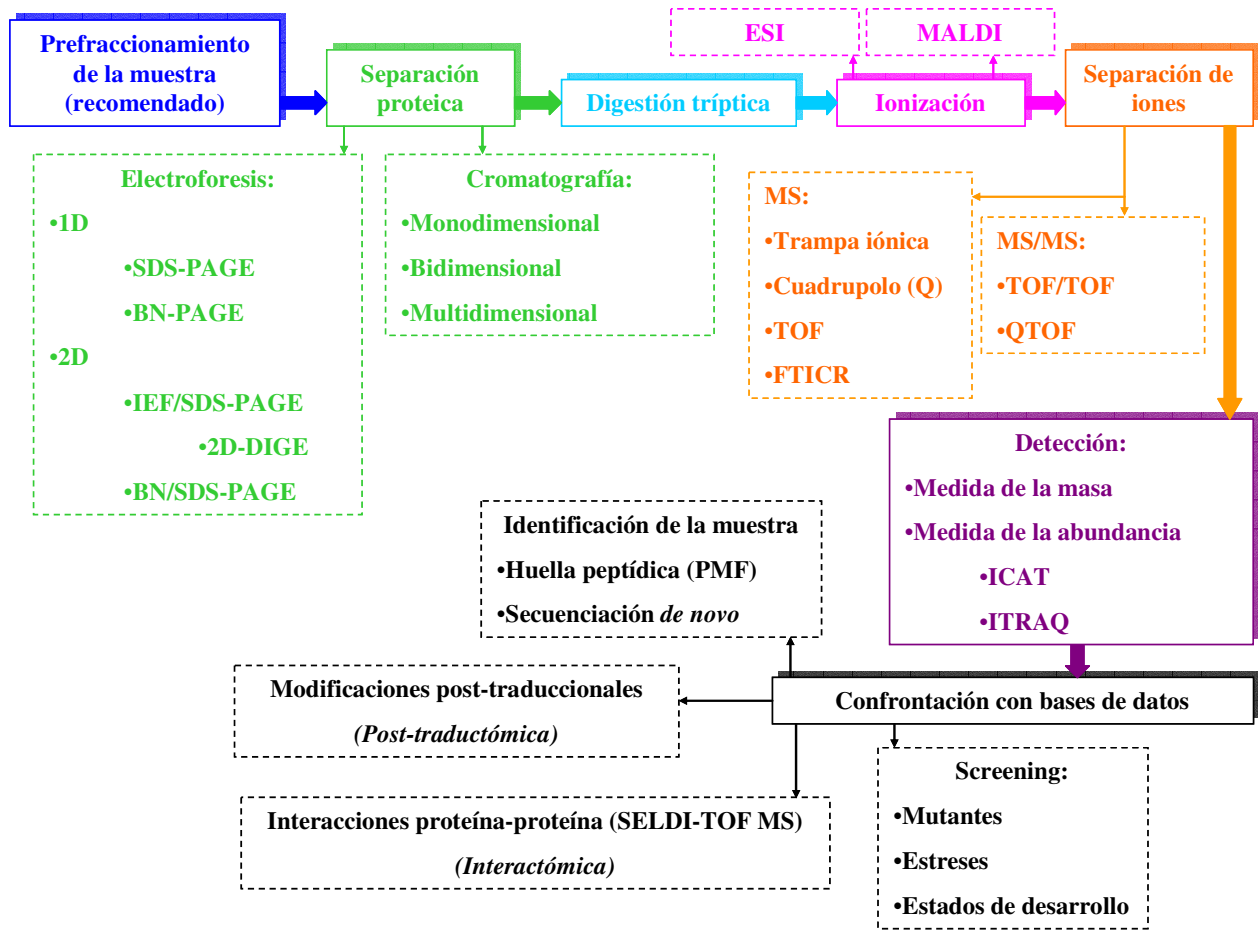
Fig. 24: Detección presintomática de la infección por *Penicillium digitatum* en limones (tomado de Nedbal et al. 2000b).

A.2.3.6.6. Teledetección. Nilsson (1995a) revisó las aplicaciones de diferentes técnicas de imagen con fines de teledetección, entre las que se encontraba la Chl-FI. Desde entonces, las mejoras en la modulación de la luz en los sistemas de medición y la más elevada sensibilidad de los detectores de imágenes permiten mejores medidas de cultivos en el campo y a plena luz solar (Nedbal y Whitmarsh 2004). En tanto que la fluorescencia inducida por luz UV también provoca la emisión de Chl-F, todo lo descrito en el apartado A.2.2.4.9. puede aplicarse a la Chl-FI como medio de teledetección.

A.3. PROTEÓMICA DE PLANTAS

El término proteoma fue acuñado por vez primera en el congreso de Electroforesis Bidimensional de Siena (1994) y hace referencia al conjunto de **proteínas** expresadas por un **genoma** (William y Hochstrasser 1997). En el caso de las plantas, el proteoma se correspondería con la expresión de proteínas de una planta, órgano, tejido, tipo celular u orgánulo en un estado de desarrollo determinado (Hochholdinger et al. 2006) y la proteómica se definiría, por tanto, como el análisis sistemático de la población proteica de dichos compartimentos (van Wijk 2001). El proteoma de cada célula viviente, a diferencia del genoma, es dinámico, alterable en respuesta al estado metabólico de la célula y a la recepción de moléculas señal intra y extracelulares; además muchas de las proteínas que se expresan son susceptibles de modificaciones post-traduccionales (PTM, *post-translational modifications*) (Newton et al. 2004). Por todo ello, surgió la necesidad de redefinir el término proteómica, en la que se ha denominado era de la postgenómica, sugiriéndose que la proteómica representa el esfuerzo para establecer las identidades, cantidades, estructuras y funciones bioquímicas y celulares de todas las proteínas pertenecientes a un organismo, órgano u orgánulo; también estudiaría esta disciplina cómo estas propiedades varían en el espacio, el tiempo y bajo distintas condiciones fisiológicas (Kenyon et al. 2002).

Fig. 25 : Esquema del sistema experimental y de las técnicas más empleadas en proteómica.



La proteómica se está convirtiendo en una herramienta poderosa en la caracterización funcional de plantas modelo y cultivables, debido fundamentalmente a dos motivos: la cada vez más amplia información de secuencias de nucleótidos (Whitelegge 2004), y la alta sensibilidad y rapidez en la identificación de proteínas por espectrometría de masas (MS) conseguidos en los últimos años (Fig. 25, Jonsson 2001, Cánovas et al. 2004, Newton et al. 2004). La velocidad, exactitud y sensibilidad de la MS supera a otras técnicas anteriores como la secuenciación mediante el método de Edman (1970). Debido a que los avances tecnológicos en proteómica son cada vez más accesibles, los esfuerzos por catalogar y cuantificar proteomas completos son paralelos a otras aproximaciones genómicas, transcriptómicas o metabolómicas. La aplicación de los datos obtenidos mediante proteómica para catalogar genes, mostrar información sobre PTMs de los genes identificados y su localización subcelular es particularmente interesante (Baginsky y Gruissem 2006), reconociéndose que la proteómica es el nexo de unión entre genómica, genética y fisiología (Zivy y de Vienne 2000).

A.3.1. Espectrometría de masas

El método de identificación de proteínas mediante MS se resume en la Fig. 25.

A.3.1.1. Preparación de la muestra

Una buena preparación de la muestra, consiguiendo extraer el máximo número de proteínas de una célula, tejido, órgano u organismo dados, es el paso más importante para lograr este objetivo (Agrawal et al. 2005a). Se recomienda el prefraccionamiento, ya que puede reducir mucho la complejidad del extracto proteico, mientras que se enriquece de proteínas poco abundantes. Otro beneficio añadido es la información funcional que se obtiene determinando el compartimento subcelular donde las proteínas están individualmente localizadas (Bertone y Snyder 2005). Las proteínas se aíslan del resto de los componentes vegetales mediante

diversos métodos, entre los que destaca el empleo de fenol o de acetona-tricloroacético (Hurkman y Tanaka 1986, Shaw et al. 2003). La meta final es la solubilización de las proteínas en un tampón que se adecue al sistema de separación que se vaya a emplear.

A.3.1.2. Separación proteica

Las proteínas pueden separarse mediante técnicas electroforéticas o cromatográficas. La electroforesis monodimensional (1D) en geles de poliacrilamida es el método más sencillo de separación electroforética de proteínas en función de la masa molecular de las proteínas desnaturalizadas (SDS-PAGE, *sodium dodecil sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*, Laemli 1970) o del tamaño y la forma de complejos proteicos en condiciones nativas (BN-PAGE, *blue native polyacrylamide gel electrophoresis*, Schagger y Jagow 1991, Eubel et al. 2005). Sin embargo, debido al gran número de proteínas que se encuentran en las muestras biológicas, es necesario un sistema de separación que aumente el nivel de resolución añadiendo un criterio de separación previo. Así nació la electroforesis bidimensional (2D) con técnicas como BN/SDS-PAGE (Fig. 26) y el IEF/SDS-PAGE (O'Farrell et al. 1977). El isoelectroenfoque (IEF) es una técnica de separación de proteínas en función a su punto isoelectrico (pI) empleando soportes en los que se ha establecido un gradiente de pH.

Los geles 1D o 2D, una vez teñidos (azul Coomassie, tinción de plata o tinción fluorescente con SYPRO[®] Ruby) y escaneados pueden ser analizados y comparados con programas de imagen comerciales, especialmente diseñados a tal fin. Dichos programas han sido objeto de continuas mejoras durante los últimos años, pero todavía hay un largo camino hasta conseguir la completa automatización del análisis de la imagen sin requerir la intervención del usuario (Görg et al. 2004). La comparación de muestras con el método convencional de IEF/SDS-PAGE requiere el estudio de varios geles a la vez en los que la migración de cada proteína y su intensidad pueden diferir de un gel a otro, aumentando la variabilidad experi-

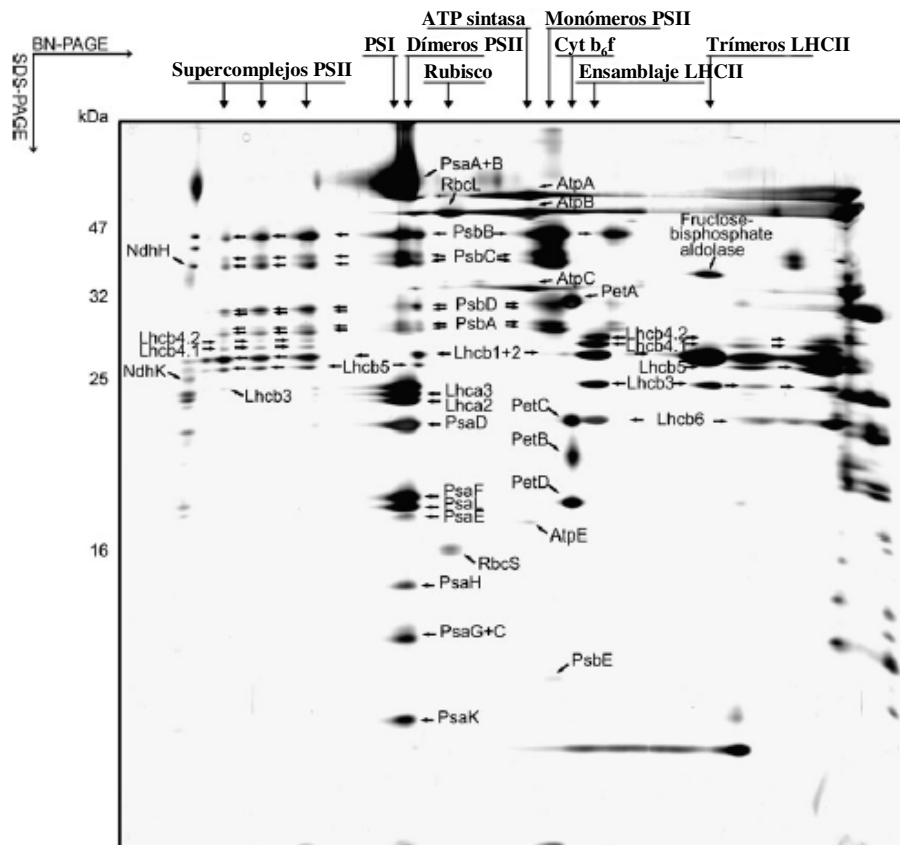


Fig. 26: Separación proteica mediante 2D electroforesis: **BN/SDS-PAGE**. Complejos proteicos cloroplásticos y su composición en subunidades en *Arabidopsis thaliana* (tomado de Aro et al. 2005).

mental. Este problema ha sido subsanado por la técnica 2D-DIGE (*2D difference gel electrophoresis*, Ünlü et al. 1997, Tonge et al. 2001, Alban et al. 2003), que permite el análisis de varias muestras en un solo gel gracias al empleo de fluoróforos (Görg et al. 2004); así se reducen las variaciones metodológicas en las posiciones y abundancia de las proteínas. Este método permite economizar tiempo y esfuerzo, ya que conlleva el uso de un menor número de geles. Las aplicaciones de la 2D-DIGE incluyen el estudio de la expresión diferencial bajo varias

condiciones de crecimiento o estrés, comparación de extractos y el análisis de la variabilidad biológica (Görg et al. 2004). Diversos estudios usando 2D-DIGE en proteómica comparativa han demostrado la gran sensibilidad y reproducibilidad del sistema (Alban et al. 2003, Amme et al. 2006, Lilley y Dupree 2006).

La cromatografía 1D, 2D o multidimensional permite una mayor automatización del proceso cuando se quieren catalogar las proteínas de extractos celulares complejos a gran escala (Bertone y Snyder 2005).

A.3.1.3. Digestión e ionización de la muestra

La digestión trípica de las proteínas separadas por los métodos anteriores proporciona una huella peptídica (PMF, *peptide mass fingerprinting*) característica de cada proteína, lo que permite en la mayoría de los casos su identificación sin ambigüedades (Cottrell 1994). Los péptidos generados son identificados mediante MS, lo que requiere una ionización previa de la muestra. En la década de los 80, la introducción de dos métodos de ionización “suaves” cimentó las bases de la identificación rápida y altamente sensible de las proteínas mediante MS (Gevaert et al. 2001). Dichos métodos, cuya fundamental aportación a la ciencia ha sido reconocida en 2002 con el Premio Nóbel de Química, son la desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI, *matriz-assisted laser desorption/ionization*) (Karas et al. 1988, Tanaka et al. 1988) y la ionización mediante electroespray (ESI, *electrospray ionization*) (Fenn et al. 1989).

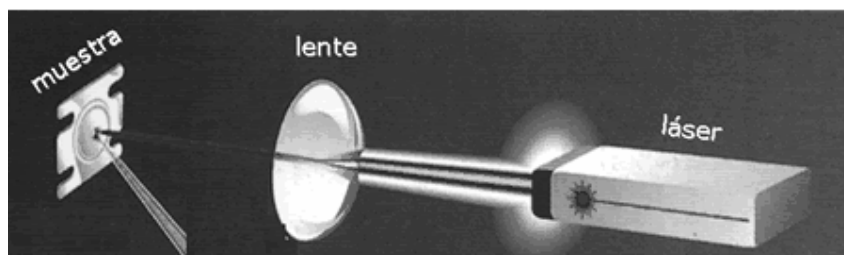


Fig. 27: Esquema de la ionización de péptidos mediante MALDI. El láser provoca la desorción e ionización de la muestra (tomado de www.cnic.es/proteomica).

En la ionización MALDI los analitos co-cristalizados en una matriz apropiada son convertidos en iones mediante la acción de un láser pulsado (Fig. 27). La matriz actúa como intermediaria en el proceso de transferencia de energía entre el láser y los péptidos, absorbiendo energía del primero y transfiriéndola a los segundos, los cuales se desorben e ionizan a la par que adquieren carga (generalmente positiva) procedente también de la matriz. El proceso de ionización por MALDI genera principalmente iones con una sola carga (Karas et al. 1988, Tanaka et al. 1988, Jonson 2001, www.cnic.es/proteomica).

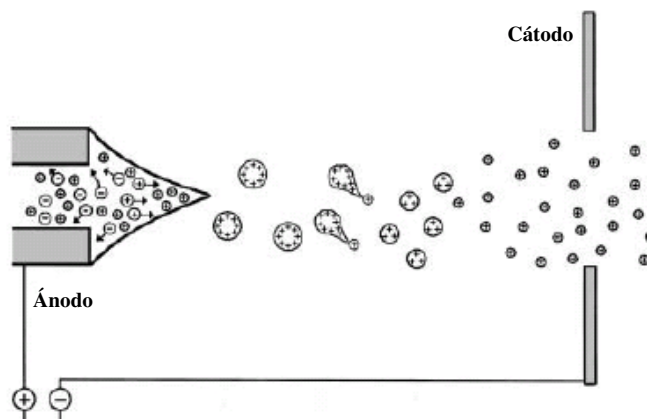


Fig. 28: Representación esquemática del proceso de ESI (tomado de Jonson 2001).

El ESI y sus variantes de bajo flujo (ESI nano-flujo o nanospray) es un método de ionización a presión atmosférica que produce, a partir de un medio líquido y bajo la influencia de un campo eléctrico, pequeñas gotas con una o varias cargas. El flujo líquido pasa a través de una aguja a alto voltaje, creándose una acumulación de cargas en el extremo de la aguja. Bajo el campo eléctrico, la repulsión entre cargas del mismo signo es tan grande que provoca la ruptura de la superficie del líquido, rompiéndose en pequeñas gotas altamente cargadas que se mueven hacia el electrodo (Fig. 28). Los iones en la fase gaseosa se forman mediante una serie de evaporaciones cíclicas del disolvente mientras son aceleradas

hacia la entrada del espectrómetro de masas (cátodo). El método del nanoespray consigue flujos menores de muestra, lo que reduce la cantidad de muestra consumida y aumenta la sensibilidad del método (Fenn et al. 1989, Wilm y Mann 1996, Jonson 2001, Newton et al. 2004).

A.3.1.4. Separación e identificación de los iones

Los iones en fase gaseosa son separados de acuerdo a su cociente masa/carga (m/z). Hay cuatro tipos de espectrómetros de masas compatibles con las técnicas proteómicas: el cuadrupolo (Q), la trampa iónica (IT, *ion trap*), el “tiempo de vuelo” (TOF, *time-of flight*) y el *Fourier-transform ion cyclotron resonance* (FTICR). Las cualidades de cada uno de ellos están recogidas en la tabla 1, y su rango de sensibilidad se encuentra en el rango de los pmol o fmol. Los más usados son el Q y el TOF (Jonsson 2001, Aebersold y Mann, 2003, Newton et al. 2004).

En el TOF lineal los iones son acelerados de tal forma que los iones con bajo cociente m/z viajan a mayor velocidad a lo largo de la zona de deriva y llegan antes al detector que registra los “tiempos de vuelo”. A partir de éstos pueden calcularse las relaciones m/z de los iones. El analizador TOF tiene una naturaleza pulsada (discontinua) y ha sido ampliamente usado junto con una fuente pulsada de iones como es el MALDI (Jonsson 2001, Chernushevich et al. 2001, www.cnic.es/proteomica).

Tabla 1: Principales analizadores de masas usados en espectrometría y sus características principales (modificado a partir de Newton et al. 2004).

| Analizador | Fiabilidad | Coste | Complejidad | Velocidad |
|-------------------|-------------------|--------------|--------------------|------------------|
| Q | Alta | Bajo | Baja | Rápida |
| IT | Alta | Medio | Baja-Media | Rápida |
| TOF | Moderada | Medio-Alto | Baja-Media | Muy rápida |
| FTICR | Moderada | Alto | Alta | Moderada |

El Q está compuesto por cuatro cilindros conductores y funciona aplicando la combinación de una corriente directa y una radiofrecuencia, actuando como un filtro de iones, de tal manera que se pueden seleccionar iones según su masa. El Q es un analizador en continuo, lo que le hace altamente compatible con fuentes de infusión continua como el electrospray o técnicas cromatográficas en líquido (LC) (Jonsson 2001, Chernushevich et al. 2001).

La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) añade otra dimensión a la identificación proteica, puesto que aumenta la eficacia del método mediante su duplicación. La posibilidad de emplear MS o MS/MS permite multitud de combinaciones, aunque se prefieren las de MALDI-TOF/TOF y LC-ESI-Q/TOF (Newton et al. 2004). La mayor ventaja que presenta este último método con respecto al MALDI-TOF/TOF es que se pueden analizar muestras muy complejas de proteínas (Link et al. 1999, Aebersold y Mann 2003, Beranova-Giorgiani 2003, Newton et al. 2004, Zolla et al. 2004).

La identificación de las proteínas mediante PMF es posible gracias a la existencia de bases de datos generadas a partir de secuencias tanto proteicas como génicas, estas últimas proporcionadas por los múltiples proyectos genómicos que se han desarrollado en los últimos años y que continuamente se actualizan con información de los muchos genes ya clonados. Para ello, se han elaborado programas informáticos como MASCOT, SEQUEST o Pro-Found que, mediante sofisticados algoritmos, adjudican una puntuación a cada proteína según el grado de solapamiento con proteínas existentes. Cuando la proteína de interés no está presente en las bases de datos, a veces es posible identificarla mediante homología con otras proteínas (Cottrell 1994) o bien, mediante secuenciación *de novo*. Esto último es posible gracias a las técnicas de MS/MS y consiste en la generación de una secuencia parcial que puede ser usada en combinación con la masa del ión parental intacto, para proporcionar información adicional a la búsqueda por homología (Hunt et al. 1986, van Wijk 2001, Liska y Shevchenko 2003, Görg et al. 2004, Granvogl et al. 2006). Existen múltiples bases de datos generales con las que

confrontar los espectros generados por MS y MS/MS: NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), EBI (*European Bioinformatics Institute*, <http://www.ebi.ac.uk/Databases/proeomic.html>), Swiss-Prot y TrEMBL (<http://www.expasy.org/sprot>). Bases de datos específicas para plantas son: TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*, <http://www.arabidopsis.org>, Huala et al. 2001), TIGR (*genome rice annotation*, <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/index.shtml>, Goff et al. 2002, Yu et al. 2002), una base de datos específica para plantas arbóreas, con *Populus trichocarpa* como planta modelo (<http://genome.jgi-psf.org/Poptr1/Poptr1.home.html>), PPdb (*Plastid Proteome database*, <http://ppdb.tc.cornell.edu/>, Sahnoun et al. 2000), Plastid Protein DB (PL_prot, <http://www.pb.ipw.bio.ethz.ch/>), PROTICdb (<http://moulon.inra.fr/~bioinfo/PROTICdb>, Ferry-Dumazet et al. 2005), AMPDB (*Arabidopsis Mitochondrial Protein Database*, <http://www.ampdb.bcs.uwa.edu.au/>, Heazlewood y Millar 2005), <http://www.gramene.org/> y <http://www.plantgdb.org/>.

La modificación en la expresión proteica provocada por el estrés en las plantas puede ser cuantificada gracias a métodos como el ICAT o el ITRAQ, que añaden distintas modificaciones químicas a los péptidos provenientes de muestras diferentes que pueden ser detectadas mediante MS/MS (Gygi et al. 1999, 2000, Dunklye et al. 2004, Newton et al. 2004, Whitelegge 2004, Jones et al. 2006a, Lilley y Dupree 2006)

Dado que la secuencia de muchas de las proteínas maduras de los organismos eucariotas no coincide con la secuencia aparente deducida a partir del DNA, la proteómica abre paso a la llamada *post-traductómica*, ya que permite la deducción de sitios de *splicing*, PTMs y proteólisis de péptidos señal (Aebersold y Mann 2003, Hirano et al. 2004, Seo y Lee 2004, Kwon et al. 2006, Whitelegge et al. 2006). La proteómica también abre las puertas a la llamada *interactómica* (Hirano et al. 2004), que estudia las interacciones proteína-proteína o proteína-ligando. Una de las técnicas que permite dicho estudio es el empleo de *chips* de proteínas (SELDI-TOF MS, Issaq et al. 2002).

A.3.2. Proteómica de plantas empleando geles bidimensionales: estudio de proteínas con punto isoeléctrico en el rango básico (pH>7)

En el presente trabajo de Tesis Doctoral nos hemos centrado en la resolución del patrón proteico cloroplastídico de *Nicotiana benthamiana* en el rango básico, prestando especial atención a proteínas con alto pI, como complemento a estudios previos del grupo sobre proteínas cloroplastídicas en el rango de pH 4-7 (Pérez Bueno et al. 2004; Sajnani, 2005). En ambos casos, se ha abordado también el efecto de la infección con PMMoV en el proteoma de la planta huésped.

Clásicamente, el IEF (O'Farrell et al. 1977) presentaba toda una serie de problemas que hacían difícil la reproducibilidad del método. El más conflictivo era el establecimiento de un gradiente de pH en los geles de disco empleados, para el cuál era necesario el uso de anfolitos. Esta dificultad, añadida a la imposibilidad de generar gradientes de pH elevados y a otras relativas al manejo, se ha salvado con el empleo de geles de poliacrilamida en los que el gradiente de pH está inmovilizado (en inglés, *immobilized pH gradients* o IPGs). Este método permite una gran resolución y reproducibilidad en los resultados, así como la separación de proteínas de alto punto isoeléctrico (Corbett et al. 1994; Blomberg et al. 1995; Görg et al. 2000, 2004).

Son raras las ocasiones en las que los geles de disco se siguen empleando (Komatsu et al. 2006). Estos autores han conseguido establecer un gradiente de pH entre 4,5 y 8,5 y mediante 2D-DIGE han logrado encontrar proteínas reguladas por giberelinas en arroz. Además de los IPGs, existen otros métodos que mejoran el IEF de proteínas con elevados pI. El empleo de tampones específicos para solubilizar la muestra para IEF/SDS-PAGE es uno de ellos (Chinnasamy y Rampitsch 2006). También contribuye a la mejora del IEF el método llamado *cup-loading*, o carga de las proteínas en el IPG una vez éste se ha rehidratado, en lugar de hacer una rehidratación con muestra, que es el método convencional por ser el más sencillo; la carga anódica ha demostrado que mejora el enfoque de proteínas con elevado pI o muy hidrofóbicas (Görg et al. 2000, 2004). Curiosamente, gran

parte de estas últimas han demostrado ser proteínas de naturaleza básica (Seigneurin-Berny et al. 1999, Rossignol 2001, Ephritikhine et al. 2004). Por último, el IEF de proteínas básicas puede ser mejorado substancialmente utilizando voltajes muy bajos al principio del proceso, que se van incrementando muy lentamente en sucesivos pasos, lo que alarga el tiempo de IEF pero arroja excelentes resultados (Görg et al. 2000, 2004).

En los últimos años, la proteómica ha generado gran número de revisiones bibliográficas, pero tan sólo un 5% corresponden a proteómica vegetal (Schröder y Kieselbach 2003). Agrawal et al. (2005b) hacen una revisión de la proteómica de los órganos de plantas dicotiledóneas, Ephritikhine et al. (2004) y Whitelegge (2003) de las membranas vegetales, Cánovas et al. (2004) sobre la interacción planta-patógeno y planta-organismo simbiote, y también se han publicado recientemente revisiones completas sobre proteómica de los orgánulos vegetales en general (Cánovas et al. 2004, Newton et al. 2004, Rossignol et al. 2006) y de los plástidos en particular (van Wijk 2004). En nuestro grupo, Sajnani (2005) elaboró, en su Tesis Doctoral, una completa revisión de la proteómica del cloroplasto. Sin embargo, y debido a la complejidad que conlleva el estudio y caracterización de proteínas de elevado pI, son muy pocos los artículos sobre proteómica de plantas que lo abordan.

Porubleva et al. (2001) consiguieron resolver, a partir de extractos crudos de hojas completas de maíz, 200 manchas en un rango de pH 6-11 en geles 2D. Rolland et al. (2003) en una revisión sobre proteómica de la cubierta cloroplastídica (*envelope*) establecieron que una gran parte de estas proteínas tienen un alto pI. El análisis del lumen tilacooidal de plantas de *Arabidopsis* en el rango de pH 7-11, demuestra que se resuelven un menor número de proteínas que en el rango ácido (4-7), 12 frente a 69. De las proteínas básicas, destacan PsbQ del OEC y una PsbQ-like (Peltier et al. 2002; Schubert et al. 2002). El estudio de proteínas periféricas y del lumen de guisante en el rango de pH 7-11, llevó a la identificación de 6 proteínas con pI>7; tan sólo una de ellas se correspondió con

PsbQ (Peltier et al. 2000). El análisis de las preparaciones de cloroplastos íntegros de *Arabidopsis* en el rango de pH 7-10 permitió la resolución de 11 proteínas; de las cuales, 3 fueron identificadas mediante MALDI-TOF/MS como la proteína PsbQ del OEC, cuya expresión disminuye tras la exposición de la planta a altas intensidades de luz (Phee et al. 2004).

A.3.3. Proteómica de las interacciones planta-patógeno

Aunque existe abundante literatura sobre los genes que están implicados en la patogénesis, pocos esfuerzos se han dedicado a identificar las modificaciones en el proteoma vegetal asociadas a la interacción planta-patógeno (Cánovas et al. 2004). Sin embargo, en los últimos años, han aparecido algunos trabajos que abordan este objetivo.

La detección de patógenos en las plantas, vectores o reservorios naturales es esencial para asegurar su salud y una agricultura sostenible. La proteómica, junto con los avances en la secuenciación de los genomas de muchos patógenos vegetales, abriría múltiples posibilidades en el desarrollo de técnicas rápidas, sensibles y específicas con este fin (López et al. 2003). La MS, con su capacidad de discriminar proteínas y péptidos exclusivos de patógenos sin la necesidad de reactivos específicos para ellos, podría rivalizar con las aproximaciones genómicas (Padliya y Cooper 2006). Cooper et al. (2003) fueron capaces de identificar en dos plantas del género *Nicotiana* proteínas del Virus X de la patata, mediante cromatografía acoplada a MS/MS. Casado-Vela et al. (2006) consiguieron incluso diferenciar entre especies y cepas de tobamovirus en frutos de tomate, mediante 2D y MALDI-TOF MS. Muy recientemente, Padliya y Cooper (2006) realizaron una completa revisión sobre MS aplicada a la detección de patógenos vegetales y sostienen que esta técnica identifica mejor un virus vegetal que cualquier otra.

Otro enfoque es la detección de proteínas cuya expresión es inducida o se ve afectada, al alta o a la baja, por la acción de factores de estrés biótico. El análisis proteómico de cultivos celulares de *Arabidopsis* reveló aquellas proteínas que

respondían al tratamiento con elicitores fúngicos, entre las que se encuentran proteínas de defensa frente a estrés oxidativo, mitocondriales y de la pared celular, así como chaperonas moleculares, una kinasa y otras participantes en diversas rutas metabólicas (Ndimba et al. 2003, Chivasa et al. 2006). La infección por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en estas mismas plantas induce la expresión de dos grupos de enzimas antioxidantes: glutatión S-transferasas y peroxiredoxinas (Jones et al. 2004), así como cambios en la expresión de enzimas del metabolismo del carbono y proteínas del PSII (Jones et al. 2006b). Los miembros de estas familias proteicas pueden ser modificados post-transduccionalmente según la virulencia de la cepa de *P. syringae* pv. *tomato* y el resultado de la infección (Jones et al. 2004), según demuestran los múltiples *spots* presentes en los geles (Jones et al. 2004, 2006b). El mismo sistema huésped-patógeno fue usado para probar por primera vez la técnica de ITRAQ en plantas. El sistema tuvo éxito detectando 5 proteínas que podrían fosforilarse como parte de la respuesta defensiva basal (reconocimiento del patógeno) de la planta a la infección (Jones et al. 2006a).

La infección fúngica ha sido la más estudiada, usando gran variedad de sistemas huésped-patógeno. Las proteínas vegetales cuya expresión se ve afectada y/o inducida pertenecen a: rutas fotosintéticas, siendo el cloroplasto el principal orgánulo afectado (Zhou et al. 2006); metabolismo del carbono y producción de energía; transducción de señales (Curto et al. 2006); síntesis de aminoácidos; metabolismo del nitrógeno (Zhou et al. 2006); proteínas de la pared celular (Colditz et al. 2004, Kim et al. 2004); rutas antioxidantes (Campo et al. 2004, Kim et al. 2004, Zhou et al. 2006); síntesis, degradación, plegamiento y estabilización proteicas (Campo et al. 2004, Colditz et al. 2004, Curto et al. 2006); y proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Konishi et al. 2001, Rep et al. 2002, Campo et al. 2004, Colditz et al. 2004, Kim et al. 2004, Curto et al. 2006, Smith et al. 2006, Zhou et al. 2006).

El efecto de la planta parásita *Orobancha crenata* en *Pisum sativum* ha sido estudiado mediante aproximaciones proteómicas por Castillejo et al. (2004),

encontrándose que en plantas de guisante susceptibles disminuyen los niveles de algunas proteínas del metabolismo de los carbohidratos y del nitrógeno, así como enzimas del transporte electrónico mitocondrial, mientras que en plantas resistentes aumentaron las proteínas relacionadas con la ruta de asimilación del nitrógeno y las proteínas PR.

En cuanto a los cambios detectados en plantas infectadas con virus, se han encontrado mediante BN/SDS-PAGE varias proteínas PR, de las cuales 10 tienen naturaleza básica (Roggero y Pennazio 2005). En nuestro grupo, se han encontrado varias isoformas de la proteína PsbP del OEC, cuyo nivel de expresión varía con la infección por PMMoV (Pérez-Bueno et al. 2004, Sajnani 2005), indicando una regulación diferencial del mismo para hacer frente al estrés ocasionado por el virus. Además, una aproximación al proteoma cloroplastídico de *N. benthamiana* mediante IEF/SDS-PAGE en el rango de pH 4-7 nos ha permitido resolver unos 150 polipéptidos, de los cuales se han identificado 55 que pertenecen a 29 proteínas distintas. La infección indujo un descenso en al menos 26 de ellas, pertenecientes a 13 proteínas diferentes, la mayoría pertenecientes al ciclo de Benson-Calvin y a la cadena de transporte electrónico fotosintético (Sajnani 2005).

B. OBJETIVOS

1. Seguimiento de la infección viral en el sistema huésped-patógeno *Nicotiana benthamiana*-PMMoV mediante técnicas de imagen para comprobar su utilidad en el diagnóstico y detección temprana del estrés biótico.

1.1. Investigación del efecto de la infección viral sobre la transpiración foliar mediante termografía de imagen.

1.2. Estudio de los cambios en los patrones espaciales de emisión de fluorescencia de plantas infectadas, usando técnicas de imagen de detección de fluorescencia multiespectral inducida por UV. Análisis de compuestos emisores.

1.3. Análisis del impacto de PMMoV sobre el aparato fotosintético de la planta huésped mediante la captación de imágenes de fluorescencia roja.

2. Estudio del proteoma del cloroplasto de *Nicotiana benthamiana* en el rango de pH 6-11, así como de los cambios inducidos en éste por la infección con PMMoV.

OBJECTIVES

1. Study of the viral infection in the host-pathogen system *Nicotiana benthamiana*-PMMoV by means of imaging techniques, to test their applications in the diagnosis and early detection of biotic stress.

1.1. Analysis of the viral-induced changes on leaf transpiration by means of imaging thermography.

1.2. Study of changes on the fluorescence leaf spatial pattern in infected plants by UV-induced multicolour fluorescence imaging. Analysis of emitting compounds.

1.3. Study of changes caused by PMMoV infection on the photosynthetic apparatus of infected plants by means of red fluorescence imaging.

2. Proteomic approach to the *Nicotiana benthamiana* chloroplast proteome in the pH range 6-11. Analysis of the changes induced by the PMMoV infection.

C.1. Robotized thermal and chlorophyll-fluorescence imaging of pepper mild mottle virus infection in *Nicotiana benthamiana*

Laury Chaerle^{1,4}, Mónica Pineda^{2,4}, Remedios Romero-Aranda³, Dominique Van Der Straeten^{1,*}, Matilde Barón^{2,*}

1. Unit Plant Hormone Signalling and Bioimaging, Ghent University, K. L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent (Belgium).

2. Department of Biochemistry, Cell and Molecular Biology of Plants, Estación Experimental del Zaidín. C/ Profesor Albareda, nº 1. C.P. 18008. Granada (Spain).

3. Department of Plant Breeding, Estación Experimental La Mayora. 29750 Algarrobo-Costa, Málaga (Spain).

4. These authors have equally contributed to this work and are placed in alphabetical order

*For correspondence,

mbaron@eez.csic.es; fax: +34958129600; dominique.vanderstraeten@ugent.be; fax : +3292645333

Abstract: After infecting a susceptible host, pathogens spread throughout the plant. Depending on pathogen type and strain, the severity of symptoms greatly varies. In the case of pepper mild mottle virus (PMMoV) infection in *Nicotiana benthamiana*, newly developing leaves display visual symptoms (symptomatic leaves). In this study two PMMoV strains were used, the Spanish strain (PMMoV-S) being more virulent than the Italian one (PMMoV-I). Plants infected with PMMoV-I could recover from the virus-induced symptoms. Leaves that were fully developed at the start of PMMoV infection remained symptomless. In these asymptomatic leaves, an increase in temperature, initiating from the tissue adjacent to the main veins, was observed 7 days before the chlorophyll fluorescence pattern changed. Virus immunolocalization on tissue prints matched well with the concomitant pattern of chlorophyll fluorescence increase. The temperature increase, associated with the veins, was shown to be related to stomatal closure. Upon PMMoV-I infection, appearance of thermal and chlorophyll fluorescence

symptoms as well as virus accumulation were delayed by 3 days compared to PMMoV-S induced symptoms. Temperature increase of whole symptomatic leaves was also correlated to a decrease in stomatal aperture. In contrast to the persistent increase in symptomatic leaf temperature observed during PMMoV-S infection, the temperature of symptomatic leaves of PMMoV-I infected plants decreased gradually during recovery.

We propose that the earliest temperature increase is caused by a systemic plant response to the virus infection, involving the control of water loss. In conclusion, thermography has a potential as an early reporter of an ongoing compatible infection process.

Keywords: Biotic stress - Infrared gas analysis - *Nicotiana benthamiana* – Pepper mild mottle virus – Stomatal conductance – Thermography.

Abbreviations: AS, asymptomatic; Chl-F, Chlorophyll fluorescence; Chl-FI, Chlorophyll fluorescence imaging; dpi, days post infection; F_L , chlorophyll fluorescence image captured after low intensity excitation; F_H , chlorophyll fluorescence image captured after high intensity excitation; g_s , stomatal conductance; HR, hypersensitive response; IRGA, infrared gas analyser; PMMoV-S and -I, Spanish and Italian strains of the pepper mild mottle virus; S, symptomatic; TMV, tobacco mosaic virus.

Introduction

Thermal and chlorophyll-fluorescence imaging (Chl-FI) have proved to be valuable non-destructive tools to study the spatial and temporal heterogeneity of leaf transpiration and photosynthesis under biotic stress. Thermography visualises leaf surface temperature and thus reveals the pattern of transpiration over a leaf. This technique is well-suited to monitor pest and pathogen infections, which often lead to changes in plant water status (Chaerle and Van Der Straeten 2000, 2001). Presymptomatic increases in temperature were visualised at tobacco mosaic virus (TMV) infection sites in resistant tobacco during the hypersensitive reaction (HR) (Chaerle et al. 1999). A bacterial-toxin induced HR was also successfully revealed

by thermography (Boccaro et al. 2001). Still at the lab scale, downy mildew infection in cucumber was visualised at an early stage by thermal imaging (Lindenthal et al. 2005, Oerke et al. 2006). By remote airborne thermal imaging, Schmitz et al. (2004) could distinguish low and high nematode infestation in sugar beet fields, due to the effect of infestation on plant water relations.

Each representative of the wide range of plant-pathogen interactions likely affects different plant physiological processes to a varying extent. Using several imaging techniques in parallel increases the chance of highlighting these pleiotropic effects. Using thermography, Chaerle et al. (2004) observed opposite effects on leaf temperature in a necrotrophic fungal infection versus a viral-induced HR. Chl-FI carried out in parallel on the same plants revealed an increase in chlorophyll fluorescence (Chl-F) in both infection types, albeit with different kinetics. Chl-FI was also used to reveal *disease signatures*, which could allow diagnosis in the absence of symptoms in the visible spectrum (Chaerle and Van Der Straeten 2001, Nedbal and Whitmarsh 2004). Chl-FI of fungi-infected oat and *Arabidopsis* plants (Rolfe and Scholes 1995, Scholes and Rolfe 1996, Chou et al. 2000), as well of fungi and bacterial-infected tomato (Berger et al. 2004), correlated changes in Chl-F emission with alterations of carbohydrate metabolism and photosynthetic gene expression. In addition, changes in source-sink relationships during fungal infection were highlighted by Chl-FI (Esfeld et al. 1995, Weiss et al. 1998). The same technique visualised the inhibition of photosynthetic electron transport during infection of tobacco with *Phytophthora nicotianae* (Scharte et al. 2005). Studies on the early responses in Chl-F emission to viral infection demonstrated photoinhibitory damage in the infected plants (Balachandran and Osmond 1994, Balachandran et al. 1994, Balachandran et al. 1997, Osmond et al. 1998, Lohaus et al. 2000).

In the plant-pathogen system *Nicotiana benthamiana* infected with either the Italian or the Spanish strain of pepper mild mottle virus (PMMoV-I, PMMoV-S), the oxygen evolving complex (OEC) of the photosynthetic electron transport chain

was identified as the main target of this tobamovirus (Barón et al. 1995, Rahoutei et al. 1998, 1999, 2000, Pérez-Bueno et al. 2004). In the present work we have simultaneously monitored changes in photosynthesis and transpiration in *N. benthamiana* leaves infected with PMMoV-S or PMMoV-I by Chl-FI and thermography, respectively. To support thermal image data, stomatal conductance (g_s) measurements were carried out with an infrared gas analyser (IRGA); in addition, stomatal imprints were used to investigate both stomatal density and aperture. Immunolocalization of viral spreading was followed by tissue printing to reveal a possible correlation with the fluorescence and thermographic patterns of infected plant leaves.

Material and methods

Plant growth and virus infection

The imaging experiments were carried out in triplicates, using 3 subsequently grown batches of plants. *N. benthamiana* Gray plants were cultivated in a growth chamber at 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR (photosynthetically-active radiation), generated by cool white fluorescent lamps, with a 16/8h light/dark photoperiod, a temperature of 23°C and a relative humidity of 60-70%. Plants with 6-7 fully-expanded leaves were inoculated in the three lower leaves (inoculated leaves), using 25 μl of inoculum per leaf (50 μg of PMMoV per ml of 20 mM sodium phosphate/biphosphate buffer pH 7.0). Mock-inoculated plants were treated with buffer only. The Italian and Spanish strains of PMMoV (genus Tobamovirus) were isolated in Sicily (Italy) and Almería (Spain), respectively (Wetter et al. 1984, Alonso et al. 1989).

Visual symptoms became visible at 5 (PMMoV-S infection) -7 (PMMoV-I) days post-inoculation (dpi). New leaves developed after inoculation (S leaves) showed severe wrinkling and curling; in contrast, no symptoms were observed in those leaves that were fully expanded at infection time (AS leaves). Inoculated leaves did not show any symptoms. Summarizing, we can distinguish in the

infected plants three kinds of leaves: inoculated, asymptomatic and symptomatic leaves; inoculated leaves were not used in this study. After 14 dpi, stunting of the plant was clearly evident. Plants infected with the Italian strain of the virus were able to recover: after 21 dpi, PMMoV-I infected plants developed new non-curly leaves and plant height increased again. No new leaves appeared in PMMoV-S infected plants after 14 dpi.

IRGA measurements could not be carried out in parallel with thermal and fluorescence experiments. In the case of IRGA measurements, the symptomatology of the corresponding infections was delayed by 2 days: PMMoV-S infected plants showed symptoms at 7 dpi, while PMMoV-I infected ones displayed symptoms at 8-9 dpi.

Starting with the lowest inoculated leaf and numbering leaves in ascending order, we have analysed leaf number 5 as the AS leaf and the second youngest leaf as the S one.

Imaging

Imaging was carried out in a custom-made walk-in chamber with built-in gantry robot monitoring a 2×1m area. Twenty-four plants representing the three different treatments were imaged within one experiment. Each treatment group was split in 2 for respectively AS and S leaf imaging. Illumination and temperature was set equal to the conditions in which the plants were grown before imaging: A FLIR/Agema (FLIR Systems, West Malling, Kent, UK) THV900LW camera (pixel resolution 272×136) was used to capture the thermal images of the PMMoV infection process. Thermographic measurements on AS and S leaves were reproducible for the three independent experiments. The fluorescence and colour images had a size of 300×300 pixels. The Chl-FI system consists of a miniature black and white CCD camera with <0.1 Lux sensitivity, fitted with a cut-off high pass red filter (B+W 092) to detect light above 650 nm. The camera is surrounded by a ring of six small halogen lamps, shielded by a blue cut-off low-pass filter

(Schott BG-39) to provide excitation light below 650 nm, with an excitation maximum at 500 nm (Chaerle et al. 2004). Fluorescence images were grabbed after respectively 1 second of 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR (F_L) and immediately after an additional second of 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR (F_H). Colour reflectance images were captured under chamber illumination.

The ImageJ software package (rsb.info.nih.gov/ij, Thévenaz et al. 1998) was used to register (i.e. adjust for the difference in field of view and magnification between the three imaging sensors) and process the captured images. The 8-bit fluorescence images were normalized for optimal visualization, using the same scaling factor based on the maximum pixel intensity over all selected images across all time points. This allows a relative comparison of fluorescence intensity for the AS leaves of control, PMMoV-I, and PMMoV-S infected plants per panel, as well as between the different time points.

Leaf temperature data were obtained with AGEMA Research software. Leaf temperature was measured by drawing a region of interest (roi) corresponding to the leaf outline. Temperature profiles across the leaves were obtained by drawing a line perpendicular to the main vein, covering 60 (80) pixels for small (large) leaves. The main vein was located in the middle of the line (approx. 30 or 40 pixels to the leaf edge).

Stomatal conductance measurements

Stomatal conductance (g_s) to water vapour was determined on a 100 mm^2 leaf area at the leaf apex by IRGA in an open system at ambient partial pressures of carbon dioxide and water vapour, using a portable photosynthesis system (LI-6400, Li-Cor Inc., Lincon NE, USA). Within the measurement cuvette, average leaf temperature was $29 \pm 1^\circ\text{C}$. During gas exchange measurements, radiation was supplied by Qbeam solid state LED lighting system attached to the leaf cuvette (6400-02B LED, Li-Cor Inc., Lincon NE, USA). Six different leaves were

considered for data calculation. AS leaves were measured at 4, 7, 10, 14, 17, 19, 22, 26 and 28 dpi, whereas S leaves were measured at 7, 10, 19, 24 and 28 dpi.

Stomatal imprints

Leaf impressions were obtained from both surfaces of the leaves at 16 dpi according to Romero-Aranda et al. (2001), on the same leaves used for IRGA measurements. Imprints were examined by a light microscope (Leica DMRB, Leica Microsystems, Switzerland) at 200 x magnification, and stomata were counted on forty fields selected at both sides of the mid-rib. To determine stomatal aperture of adaxial leaf surface, impressions were analysed by a light microscope (Nikon Eclipse E200, Nikon Inc. Instruments, Groups USA), and photographed by a Nikon Coolpix 4500. Thirty stomata (fifteen at every side of the mid-rib) were measured.

Chlorophyll content measurements

Chl content was measured (10 repeats per leaf) using the CL-01 Chlorophyll Content Meter, which determines relative Chl content using dual wavelength optical absorbance (620 and 940nm) measurements from leaf samples (Hansatech Instruments, Norfolk, England; <http://www.hansatech-instruments.com/cl01.htm>).

Statistics

Statistical analysis was carried out with SigmaPlot 8.0 software. Student t-test was used to compare control with infected plants, and PMMoV-I infected with PMMoV-S infected plants. Significance level was set to 0.005. Graphs show mean values and their corresponding standard errors. Significant differences between treatments (according to Student t-tests) are indicated on bar-graphs with different small letters.

Tissue prints

Localization of PMMoV coat protein (CP) in both AS and S leaves was performed by tissue print analysis using specific antiserum against viral CP (Alonso et al. 1989). Non-specific binding was reduced by preabsorbing the immune antiserum with acetone powder obtained from stems and leaves of young healthy *N. benthamiana* plants, as described by Ruiz del Pino et al. (2003). Whole leaves from healthy and infected plants were imprinted on polyvinylidene fluoride (PVDF) sheets and assayed as described by Maliga et al. (1995). Membranes were first incubated with the PMMoV-CP specific antiserum at the appropriate dilutions and subsequently with goat anti-rabbit alkaline phosphatase-IgG (Sigma Aldrich). Bound antibodies were detected using nitro-blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP, Roche).

Results

Visual symptoms

During the imaging experiments, plants infected with PMMoV-S at the 6th or 7th leaf stage developed new curly young leaves (symptomatic [S] leaves) at 5 dpi, while in plants infected with PMMoV-I these symptoms appeared between 5 and 7 dpi. Growth was obviously inhibited in plants infected with either one of the virus strains, stunting was evident at 14 dpi. Plants infected with PMMoV-S were totally senescent at 22 dpi, whereas PMMoV-I infected plants started to recover from the symptoms (as evaluated by emergence of new unaffected leaves) at 21 dpi. Recovery occurred irrespective of the time of appearance of the first symptoms. Asymptomatic (AS) leaves were totally developed at the infection time and did not show any symptoms along the infection process. In the batch of plants on which gas exchange was measured, infection was delayed by 2 days: plants infected with PMMoV-S and PMMoV-I showed symptoms at 7 and 8-9 dpi, respectively.

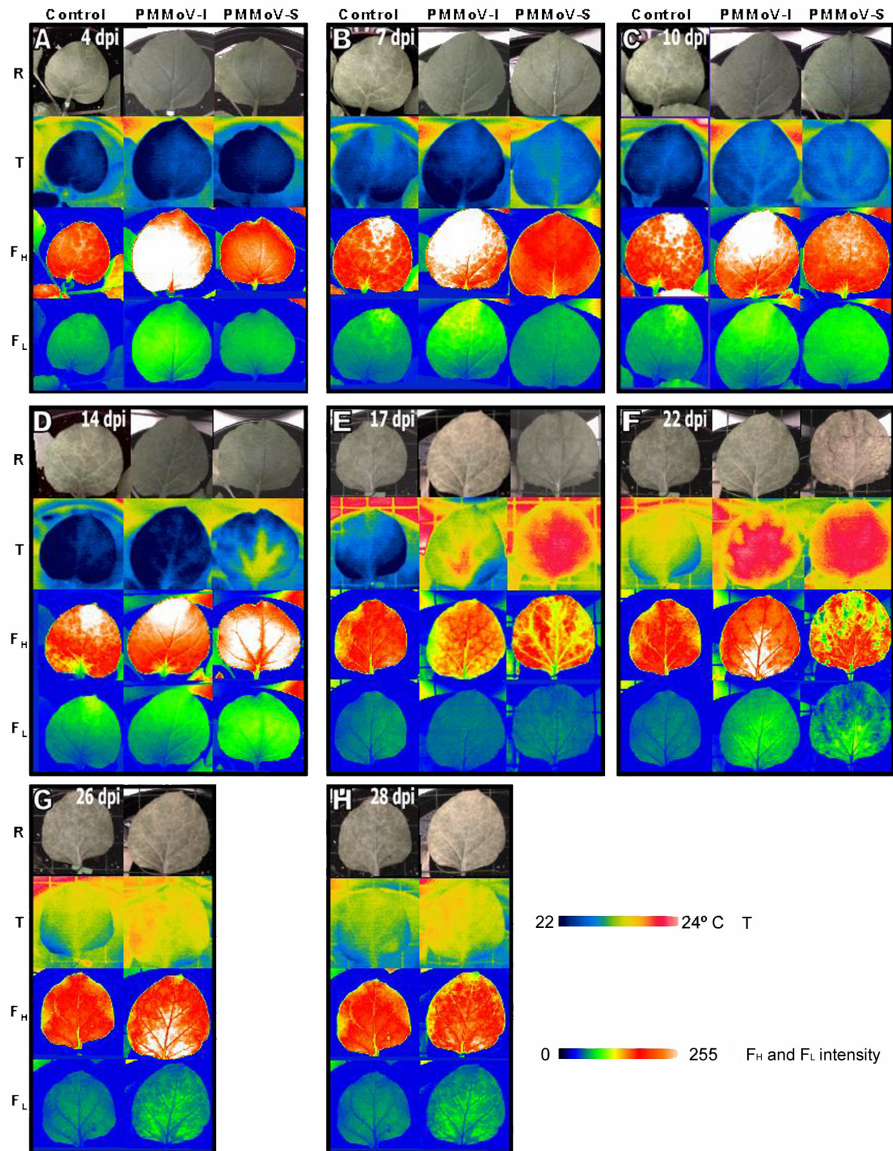


Fig. 1: Colour reflectance (R), thermal (T) and Chl-F (FH, under high excitation light; FL, under low excitation light) imaging of AS leaves of *N. benthamiana*, at 4 dpi (A), 7 dpi (B), 10 dpi (C), 14 dpi (D), 17 dpi (E), 22 dpi (F), 26 dpi (G) and 28 dpi (H). Image width is 60 mm for all panels.

Temperature patterns of asymptomatic leaves

Control plants did not show any discernable surface temperature pattern, apart from a slightly higher leaf vein temperature (Fig. 1, panels A-E, 4-17 dpi). Old AS leaves displayed an overall higher leaf temperature (Fig. 1, panels F-H, 22-28 dpi), including both veinal and interveinal regions.

At 4 dpi, PMMoV-S infected plants were not discernable from controls (Fig. 1A). Starting at 7 dpi, AS leaves of PMMoV-S infected plants showed a higher temperature immediately adjacent to the major veins, when compared to control plants (Fig. 1B). This zone of higher temperature expanded, and affected tissues surrounding main veins in the subsequent days (Fig. 1, panels C, D: 10-14 dpi). In the middle stage of the infection, (17 dpi) the whole leaf surface displayed a higher temperature than the control leaves (Fig. 1, panel E). This temperature increase occurred before the visible decline in Chl content (Fig. 1, panel F, 22 dpi).

AS leaves of PMMoV-I infected plants displayed the same patterns as plants infected with PMMoV-S, but their response was delayed. This is consistent with the lower virulence of the PMMoV-I strain. The temperature increase initiated at the veins in PMMoV-I infected plants at 9-10 dpi (Fig. 1, panel C). For all 3 repeats, the entire leaf surface had a higher temperature as compared to controls from 22 dpi onwards (Fig. 1, panel F).

Temperature profiles across asymptomatic leaves

Temperature profiles across the AS leaf surface were plotted to visualise the evolution of the temperature difference between veins and surrounding tissue. Control plants displayed a higher temperature in veins in comparison with surrounding tissue but this difference did not increase with plant age (Fig. 2, left panel). AS leaves of PMMoV-I-infected plants started to show a slight increase in temperature centred on the main vein at 10 dpi, and this pattern was more evident at 17 dpi (Fig. 2, middle panel). At 22 dpi the whole leaf surface had a high temperature. This response appeared earlier in AS leaves of PMMoV-S infected

plants. The latter presented a higher temperature associated with the vicinity of the veins from 7 dpi on (Fig. 2, right panel). Subsequently, the region of higher temperature expanded to the surrounding tissues, finally affecting the whole leaf.

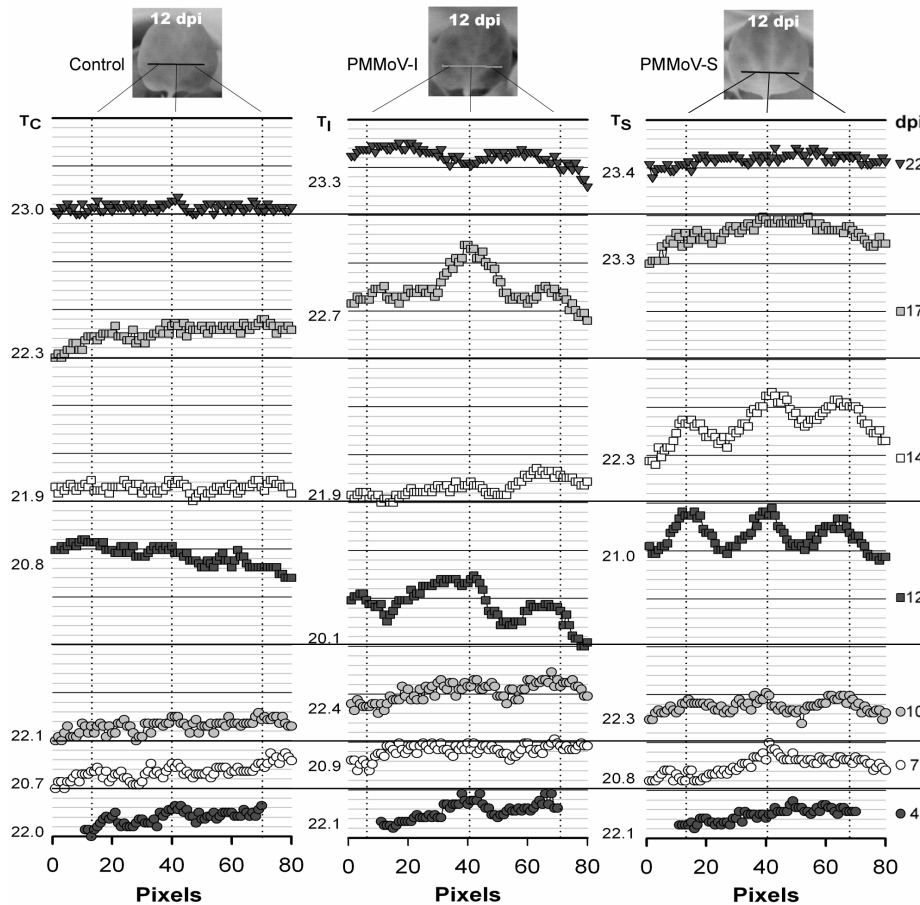


Fig. 2: Infection-induced local increases in leaf temperature in AS leaf tissues adjacent to major veins. Temperature profiles are shown along a 60 to 80 pixel line drawn in the middle of an AS leaf, and centred on the midrib (vein type I; for *N. benthamiana* vein classification, see Roberts et al. 1997). The thermal images shown were captured at 12 dpi. Every vertical dotted line represents the position of veins type I and II. Temperature difference between horizontal solid lines is 0.1°C. The T-values indicate the lowest pixel value for every temperature trace. From bottom to top: 4, 7, 10, 12, 14, 17 and 22 dpi.

At 17 dpi, temperature differences among the line profile nearly levelled out. The overall temperature of the leaf was nearly a degree higher in PMMoV-S infected plants as compared to the corresponding control plants. At this time point, the AS leaf of the PMMoV-I infected plant still showed a marked contrast between the main vein and the adjacent tissue. At 22 dpi AS leaves from both PMMoV-S and PMMoV-I infected plants, exhibited a higher average temperature than those of control plants.

Whole leaf temperature measurements in symptomatic leaves

In spite of the spatial and temporal differences in the thermographic pattern, no significant differences in average whole leaf temperature were measured at any time points, between the AS leaves of control, PMMoV-I, and PMMoV-S infected plants (Fig. 3A). In contrast, S leaves from plants infected with either one of the PMMoV strains showed a significant higher temperature than the control leaves at 14, 17 and 19 dpi (Fig. 3B). Subsequently, the temperature of S leaves from PMMoV-S infected plants stayed high, while S leaf temperature of PMMoV-I infected plants decreased at 21 dpi to reach control values. This corresponds with the initiation of the symptom recovery phase. At 7 dpi (Fig. 4A) the S leaf of the depicted PMMoV-S infected plant appeared marginally warmer. However, statistical analysis did not support a significant difference in leaf temperature between the control and PMMoV-S infected plants (Fig. 3B). At 14 dpi, both Italian and Spanish strains induced a higher temperature in the S leaf (Fig. 4B). The S leaf temperature of the PMMoV-I infected plant decreased from 21 dpi on (Fig. 4C), coinciding with the onset of the recovery phase and the appearance of new young leaves, as can be seen in the reflectance image. This is in accordance with the significantly lower average whole leaf temperature at this time point in PMMoV-I versus PMMoV-S (Fig. 3B). In contrast with PMMoV-I infected plants, temperature of S leaves of PMMoV-S infected plants remained high and no new leaves appeared. Finally, S leaf temperature of PMMoV-I infected plants appeared

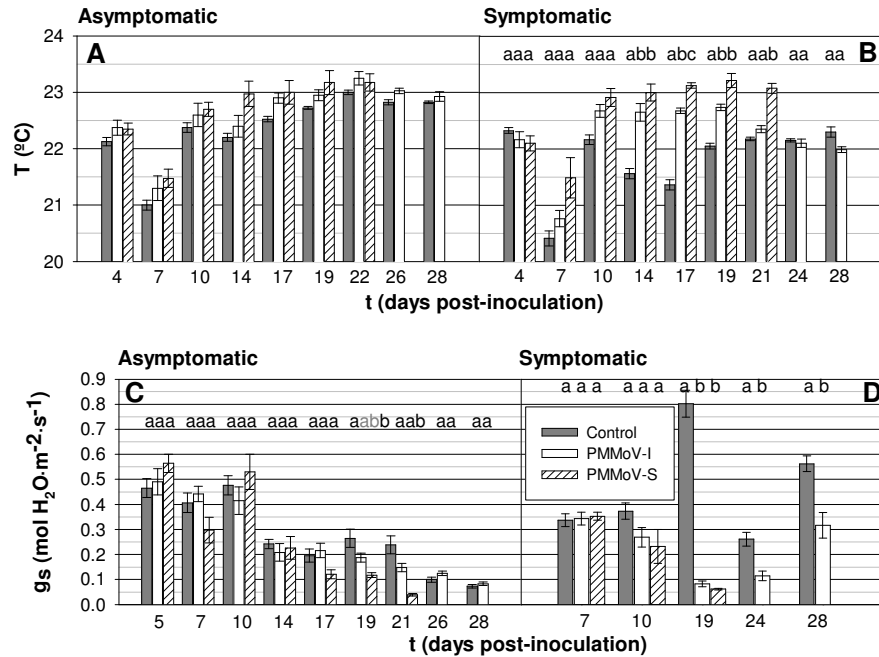


Fig. 3: Virus-induced temperature changes in *N. benthamiana* leaves (A and B). Data are mean values from four different plants, error bars represent standard error. Virus-induced stomatal conductance changes in *N. benthamiana* leaves (C and D). Data are mean values from at least six different plants, error bars represent standard error. Letters show the significant differences, according to statistical analysis ($p < 0.005$). No significant differences were found in panel A.

equal to the control value, which is in agreement with the complete recovery of these plants (Fig. 3B, 4D).

Stomatal conductance measurements

No significant differences in this parameter were found between AS control leaves and PMMoV-I infected ones (Fig. 3C), whereas AS leaves of PMMoV-S infected plants showed a significant decrease of stomatal conductance from 19 to 21 dpi,

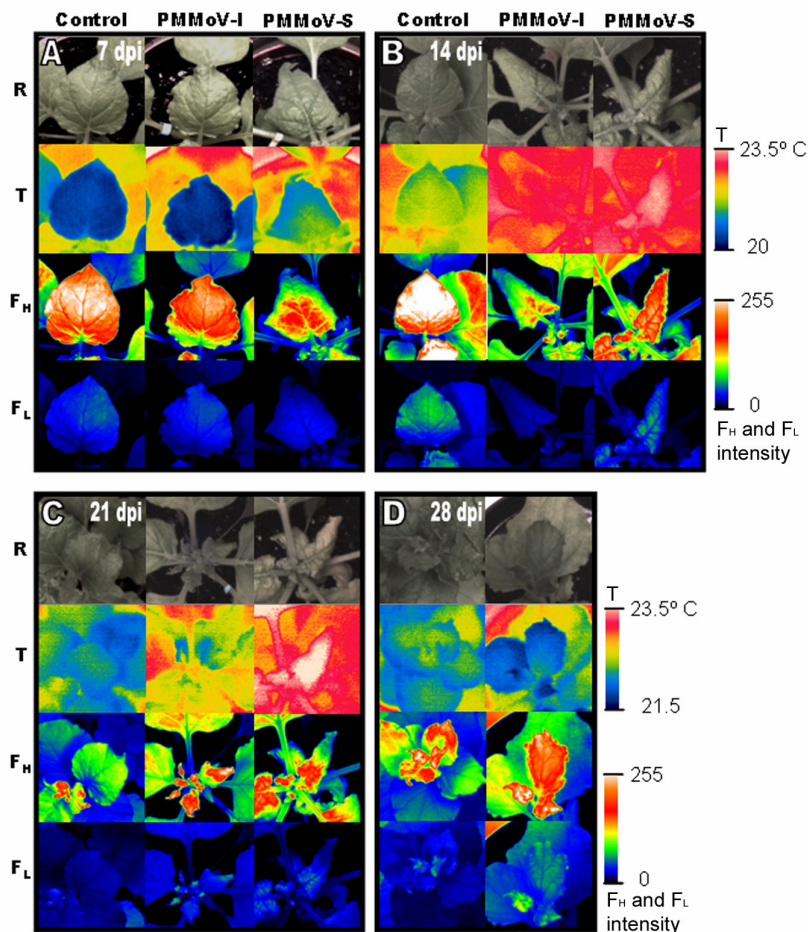


Fig. 4: Colour reflectance (R), thermal (T) and Chl-F (F_H , under high excitation light; F_L , under low excitation light) imaging of S leaves of *N. benthamiana*, at 7 dpi (A), 14 dpi (B), 21 dpi (C) and 28 dpi (D). At each time-point newly-emerged leaves are shown. PMMoV-S infected plants did not produce new leaves after 14 dpi and died at 22 dpi. Image width represents 60 mm for all panels.

compared with the controls. In contrast, S leaves from both infected plants displayed a decrease in stomatal conductance compared with the control, which was significant at 19 dpi (Fig. 3D). Indicative of the recovery phase, g_s values of S leaves from PMMoV-I infected plants increased at both 24 and 28 dpi, compared

with g_s values at 19 dpi, but remained significantly different from control g_s values. However, for these S leaves, the ratio of g_s values from control plants over g_s values from PMMoV-I infected plants decreased markedly from 9.68 (19 dpi) over 2.27 (24 dpi) to 1.77 (28 dpi).

Stomatal density and stomatal aperture

Stomatal imprints made at 16 dpi of both abaxial and adaxial side from AS and S leaves, allowed us to determine both stomatal density and aperture. No significant differences in stomatal density was found between infected and control plants (Fig. 5), indicating that PMMoV does not modify the normal development of stomata in *Nicotiana benthamiana* plants. On the other hand, stomatal aperture at the adaxial leaf surface and close to the midrib, was significantly reduced in both AS and S leaves of infected plants (Fig. 5), suggesting that stomatal closure is involved in the thermal increase. PMMoV-S, the most virulent strain, induced the strongest effect.

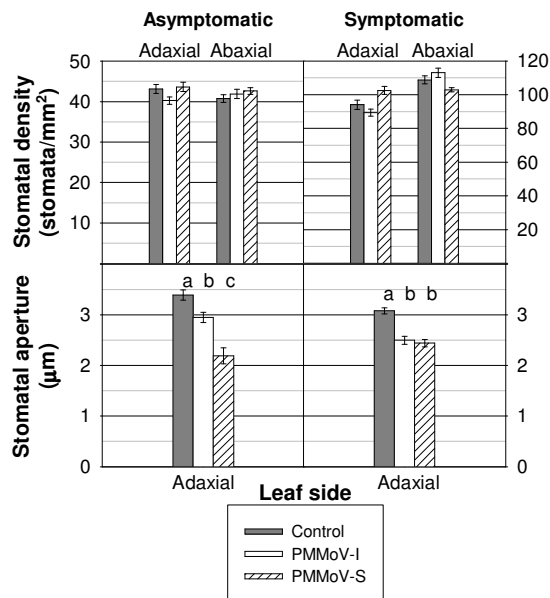


Fig. 5: Stomatal density and aperture measurements after imprinting. Both stomatal density and aperture of AS (left) and S (right) leaves of *Nicotiana benthamiana* are shown at 16 dpi. Data are mean values, error bars represent standard error. Letters indicate the significant differences, according to statistical analysis ($p < 0.005$).

Fluorescence imaging of asymptomatic and symptomatic leaves

Changes in fluorescence emission from AS leaves due to the viral infection became evident (Fig. 1D: 14 dpi PMMoV-S; Fig. 1E: 17dpi PMMoV- I) after appearance of thermal symptoms (7 dpi PMMoV- S, 10 dpi PMMoV- I). Control plants did not show changes in fluorescence emission over time.

During the first days of infection, AS leaves of PMMoV-S infected plants appeared similar in F_H fluorescence (Chl-F image captured under high excitation light) to controls; however, at 14 dpi Chl-F of interveinal tissue increased compared to control plants, the veins having lower fluorescence values. At 17 dpi, the fluorescence pattern was similar to the previous time point, albeit with slightly lower fluorescence values. At 22 dpi (Fig. 1F) fluorescence was high in the areas surrounding the main veins and lower in the rest of the interveinal regions, displaying a heterogeneous pattern.

AS leaves of PMMoV-I infected plants displayed a F_H intensity gradient and a heterogeneous leaf blade response, albeit less prominent than in the PMMoV-S infected plants, and starting later (from 17 dpi on). At 22 dpi (Fig. 1F), fluorescence intensity increased in tissues surrounding veins and remained high, showing a characteristic pattern until the end of the infection (Fig. 1H). In the experiment where PMMoV-I infected plants showed earlier symptoms (5 dpi), AS leaves displayed localised fluorescence decreases in the interveinal regions, similar to the appearance of low-Chl-F areas in PMMoV-S infected leaves at the end of the infection.

The fluorescence images captured at low excitation light (F_L) did not reveal any specific pattern different from the images captured at high light levels (F_H), although the characteristic fluorescence signals appeared even later (17 dpi for PMMoV-S infected plants and 22 dpi for PMMoV-I infected ones). No clear trend emerged from the Chl-F measurements (F_H or F_L) on the S leaves (Fig. 4).

Chlorophyll content

To investigate a possible correlation between changes in leaf temperature or in Chl-F with those in Chl content, this parameter was also measured. In AS leaves from PMMoV-I and PMMoV-S infected plants Chl content was not significantly different from control, and moreover remained higher at later time points as compared to control (Fig. 6A).

In S leaves, Chl content was the highest in infected plants at 7 dpi (Fig. 6B). Chl content decreased significantly at 14 and 21 dpi for PMMoV-S infected plants, and for PMMoV-I only at 21 dpi. PMMoV-S infection thus showed a more severe response as expected. At 28 dpi, Chl content for the PMMoV-I infected plants reached control values, corresponding to total recovery.

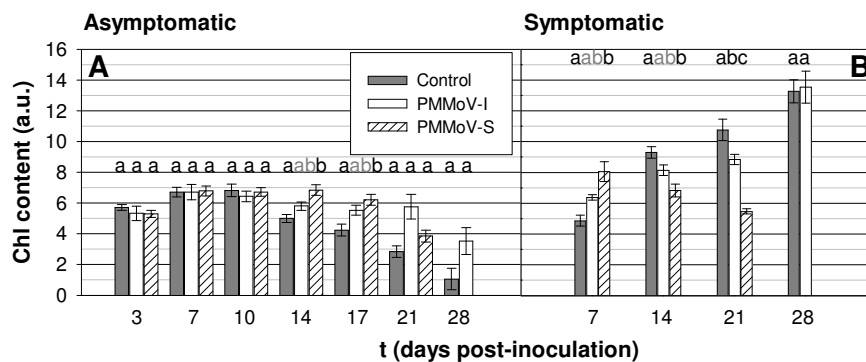


Fig. 6: Chl content of AS (A) and S (B) *N. benthamiana* leaves. Data are mean values from six different plants, error bars represent standard error. Letters show the significant differences between infected and control plants, according to statistical analysis ($p < 0.005$).

Viral immunolocalization

To establish a possible correlation between both thermal and fluorescence patterns in infected plant leaves, and PMMoV localisation, tissue prints were carried out using an antibody against the viral coat protein. In AS leaves of plants

infected with PMMoV-S, virus was detected at 14 dpi, mainly in the leaf base along the major veins (Fig. 7A). At 21 dpi the virus was present in most of the main veins. In plants infected with PMMoV-I, the virus localisation pattern was similar, but delayed in time; the first detection occurred at 17 dpi, and the virus had spread through the whole main vein system at 24-28 dpi. Non-specific binding could be seen at 10 dpi in both AS leaf and in its corresponding control (Fig. 7A). Both viral infections were detectable on S leaves at every dpi assayed, and even in the recovery phase of plants infected with PMMoV-I (Fig. 7B).

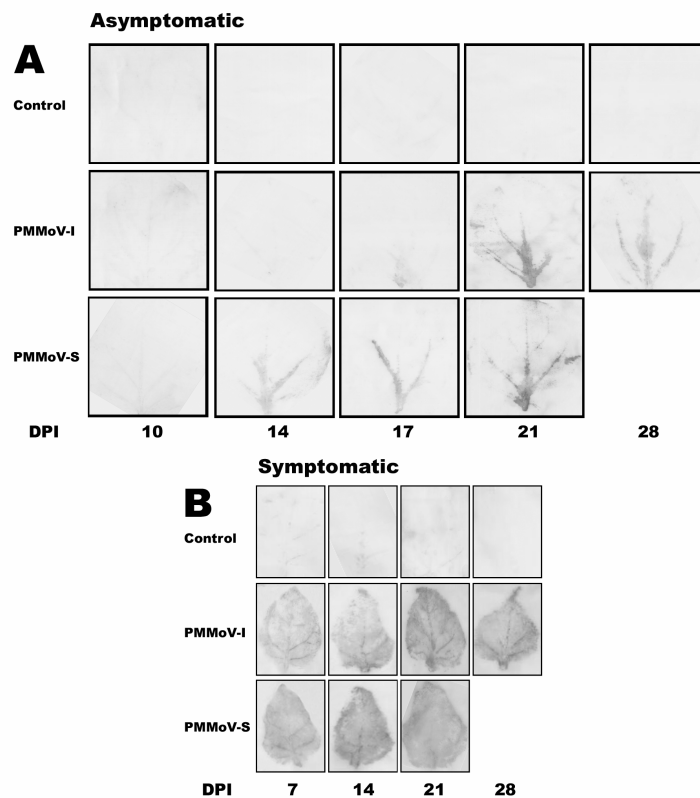


Fig. 7: Tissue prints carried out using a specific antibody against the viral CP at different post-infection times (dpi) from AS (A) and S leaves (B).

Table 1: Timing of symptoms induced by PMMoV (time in dpi).

| | Asymptomatic leaves | | | Symptomatic leaves | | |
|--------------------------|---------------------|---------|---------|--------------------|----------|----------|
| | Control | PMMoV-I | PMMoV-S | Control | PMMoV-I | PMMoV-S |
| <i>Visible</i> | - | - | - | - | 5-7 | 5 |
| <i>Thermography</i> | - | 10 | 7 | - | 14 | 14 |
| <i>g_s</i> | - | - | 19 | - | 19 | 19 |
| <i>Stomatal aperture</i> | - | 16 | 16 | - | 16 | 16 |
| <i>Chl-F</i> | - | 17 | 14 | - | No trend | No trend |
| <i>Tissue Printing</i> | Not detected | 17 | 14 | Not detected | 5-7 | 5 |

The same asymptomatic leaf was measured from 4 to 28 dpi. Newly emerging symptomatic leaves were measured when 2 days old, from 4 until 28 dpi.

Discussion

Early detection by thermography of a viral infection was previously reported (Chaerle et al. 1999, 2004). This response was however specific for the local hypersensitive response (HR) induced at the TMV infection site in resistant tobacco plants, since parallel imaging of a TMV-infected leaf of a susceptible tobacco plant did not reveal changes in temperature (within 7 dpi, the timeframe of the thermal effect of the HR; Chaerle et al. 1999). To our knowledge, the present work on PMMoV infection in *N. benthamiana* is the first to demonstrate thermographic visualisation of a systemic viral infection in asymptomatic leaves. Importantly, thermography revealed symptoms prior to detection of the virus by tissue print or Northern blot (Pérez-Bueno 2003) (Table 1).

Asymptomatic leaves from plants infected with either one of the PMMoV viral strains displayed an expanding temperature increase initiating adjacent to the major veins, and starting at respectively 7 (PMMoV-S) and 10 dpi (PMMoV-I) (Table 1). This difference correlates with the lower virulence of PMMoV-I. Control leaves only display a higher leaf vein temperature, due to the lack of stomata in the epidermis covering leaf veins; transpiration is thus low, resulting in less cooling (Chaerle et al. 2003). The tissue next to the major veins has a similar

stomatal density to the tissue further towards the leaf border (data not shown), hence transpiration and leaf temperature are equal under control conditions.

A linear correlation between Chl content and temperature of AS leaves could not be established (Fig. 6). Thus, factors other than premature leaf aging (of which a decrease in Chl content is indicative) were responsible for the observed early temperature increase in virus-infected plants. In control AS leaves, a late, gradual increase in leaf temperature (Fig. 1; on average starting at 21-23 dpi) paralleled a decrease in Chl content (Fig. 6). This correlates with a reduction in stomatal conductance (see Fig. 3C), which is related to leaf age and thus to aging of the stomatal apparatus (Wardle and Short 1983, Willmer et al. 1988).

The observed temperature increase is most likely due to stomatal closure and the consequent reduction of transpiration. Temperature is known to vary with leaf transpiration and therefore is a function of stomatal conductance (Fuchs and Tanner 1966, Jones et al 1998). A number of reports show that transpiration, as determined by either gas exchange or porometry measurements, is reduced in several plant-viral interactions (Keller et al. 1989, Linsey and Gudauskas 1975, Sridhar et al. 1994, Clover et al. 2001, Ryšlavá et al. 2003, Zhou et al. 2004, Rowland et al. 2005). However, these methods lack the spatial information provided by thermography, which has enough spatial resolution to monitor the variability of stomatal conductance across the leaf surface (Jones, 1999; Jones et al. 2002).

Both average stomatal aperture and number of stomata per unit leaf surface influence transpiration (Jones 1998). Studies on different host-virus systems show either a reduction of leaf stomatal conductance (Levy and Marco 1991, Sampol et al. 2003, Bertamini et al. 2004, Zhou et al. 2004, Guo et al. 2005a, b) or no effect (Alleyne et al. 1989). To our knowledge no information is available showing an effect of viral infection on stomatal density. Upon PMMoV-infection of *Nicotiana benthamiana* plants, stomatal density of abaxial and adaxial leaf surfaces did not change.

PMMoV-I and PMMoV-S infections induced a characteristic spatially and temporally heterogeneous temperature pattern in AS leaves. However, the average whole temperature of these leaves was not significantly different from control leaves at any time point. IRGA analysis could not show a decrease in stomatal conductance at the AS leaf tip of PMMoV-I infected plants. In AS leaves of PMMoV-S infected plants, significant differences were only monitored for 19 and 21 dpi (17dpi shows the same trend but is not significant). However, thermal imaging reveals vein-associated temperature increases due to PMMoV-S infection from 7dpi on (Table 1). In addition, for both viral strains a significant decrease in stomatal aperture and consequently in stomatal conductance was observed on imprints made at 16 dpi, in regions close to the midrib (Fig. 5). The apparent lack of sensitivity of IRGA can be attributed to two factors. IRGA cannot reveal spatial patterns of transpiration, which will go undetected if only a minor part of the measured area is affected. In addition, the measured 100 mm² area of the leaf apex remains colder than the rest of the leaf (see Fig. 1E, 17 dpi). This locally lower temperature explains the delay in detection of a decrease in stomatal conductance, expanding from the major veins towards the leaf border. These observations indicate that only thermal imaging discriminates healthy from infected AS leaves at early time points (Table 1), and allows following viral invasion in a simple, fast way.

In contrast with the AS leaves, S leaves did not reveal a characteristic thermographic pattern. However, they already displayed significant differences in whole leaf temperature at 14 dpi (Fig. 3B, Fig. 4). Stomatal aperture was also clearly reduced at 16 dpi. Stomatal conductance was greatly diminished from 19 dpi onwards. This directly proves that stomatal closure caused by PMMoV infection leads to an increase in leaf temperature. During the recovery phase, newly emerging (S) leaves from PMMoV-I infected plants showed a temperature similar to the control leaves. G_s values of S leaves of PMMoV-I infected plants did not reach control levels, but in support of a recovery response, the ratio of control g_s

values over values of PMMoV-I-infected plants clearly decreased from 19 dpi to 28 dpi.

Stomatal conductance is mainly influenced by abiotic factors including high radiation, high and low temperatures, salinity, deficit of irrigation, but is also affected by foliar pathogens (Chaerle et al. 2004, Lindenthal et al. 2005, Scharte et al. 2005, Oerke et al. 2006). Several compounds known to reduce stomatal aperture accumulate during host pathogen interactions, such as salicylic acid (SA; Malamy et al. 1990, Van Der Straeten et al. 1995, Chaerle et al. 1999), nitric oxide (Del Rio et al. 2004, Mur et al. 2005), the plant hormones ABA and auxin (Whenham and Fraser 1981, Whenham et al. 1986, Grabov and Blatt 1998). In addition, phenolic compounds accumulating during plant diseases, due to the activation of the phenylpropanoid pathway (Nicholson and Hammerschmidt 1992, Kofalvi and Nassuth 1995), were also reported to alter stomatal function (Bhatia et al. 1986, Plumbe and Willmer 1986, Chaerle et al. 2001). Recently, Sajnani (2005) detected an increase of phenolic compounds by blue-green fluorescence (BGF) in *Nicotiana benthamiana* plants infected with PMMoV, which could possibly underlie the observed stomatal closure and associated temperature increase.

The appearance of a heterogeneous fluorescence pattern in AS leaves (visible in F_H images) is delayed with respect to the thermographic pattern (Table 1). At 14 and 17 dpi the F_H images of the AS leaves from plants infected with PMMoV-S and PMMoV-I, respectively, showed a high contrast between main veins and interveinal tissues. At 22 dpi the F_H pattern induced by both viral strains was quite similar, displaying very high fluorescence in areas surrounding the main veins. Only in the final infection steps the areas surrounding the main veins where the virus is spreading were lightly saturated (Fig. 1G, H). At these time points, the PMMoV infection induced a degradation of the thylakoid membrane by lipid peroxidation (Rahoutei et al. 1999), and dramatic changes in PSII function (Rahoutei et al. 2000, Pérez-Bueno et al. 2004). Any of these phenomena could account for the observed fluorescence increase.

However, the fluorescence increase can not be attributed to a local Chl decrease and the consequently diminished fluorescence reabsorption (Gitelson et al. 1998, Buschmann et al. 2000), because these viruses do not induce a vein clearing symptom (see colour reflectance images, Fig. 1). This observation was supported by measurements of Chl content in AS leaves, showing either no differences between control and infected plants or a higher Chl content in the latter (14-17 dpi for PMMoV-S infected plants) (Fig. 6A). The most plausible explanation for the fluorescence increase is an inhibition of PSII electron transport. This hypothesis is supported by previous work showing PMMoV mediated inhibition of PSII function through an influence on the transcription rates of genes encoding oxygen-evolving-complex proteins (Rahoutei et al. 1999, 2000, Pérez-Bueno et al. 2004). Fluorescence point measurements with the PAM fluorometer (Rahoutei et al. 2000) indicated that the number of open reaction centres decreased during pathogenesis. A higher number of closed reaction centres could be responsible for the higher fluorescence emission. More generally, lower values of PSII electron transport efficiency were also documented during infection with other tobamoviruses (van Kooten et al. 1990, Balachandran and Osmond 1994, Balachandran et al. 1994); in addition, viruses belonging to other families, such as the grapevine leafroll virus, can induce similar effects (Bertamini et al. 2004).

The vein-associated patterns revealed by both thermography and fluorescence in AS leaves present similarities with those induced by the well known PSII inhibiting methylurea herbicides. However, after methylurea herbicide treatment of common bean and *Xanthium strumarium*, Chl-F and leaf temperature of the tissue adjacent to the veins increased concomitantly (Chaerle et al. 2003, Messinger et al. 2006). Chl-F kinetics could also be delayed (as compared to the temperature response) due to the different site of action of methylurea herbicides (inhibiting the acceptor site of PSII) and PMMoV (inhibiting the donor site) (Rahoutei et al. 2000). Likely, the systemic effect causing the earlier thermal response after PMMoV infection is not directly affecting Chl-F. Either a

systemically transported signal (possibly phenolics; Sajnani 2005) or a direct effect on water availability could explain the early thermal effect. ABA and nitric oxide - signals known to influence transpiration - were shown to accumulate in compatible and incompatible interactions (Whenham and Fraser 1981; Mur et al. 2005), possibly supporting the above-mentioned hypothesis.

The localisation of the viruses in tissue prints taken at different time-points matched well with the concomitant pattern of Chl-F increase in AS leaves. Importantly, the first thermal symptoms around the main veins preceded the tissue print pattern by 7 days. In contrast to the observations for AS leaves, no clear trend emerged from the Chl-F measurements (F_H or F_L) on the S leaves (Fig. 6B). Tissue prints of these leaves showed a quick viral accumulation in the whole leaf during the early infection steps. This could explain the absence of a dynamic fluorescence pattern in S leaves.

The results presented in this paper indicate that thermography can visualise effects of compatible virus infections well before the appearance of symptoms in the visible spectrum and before the causal agent was present. This widens the range of host- pathogen systems that was successfully visualised by non-contact imaging methods, certainly broadening the applicability thereof.

Acknowledgements

M.P. was recipient of a MEC fellowship, which included financial support for a short-term research stay at Ghent University. L.C. is a post-doctoral fellow of the Research Foundation - Flanders.

This research was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Education (MEC, grants BIO2001-1937-C02-02 and BIO2004-04968-C02-02, to M.B.) and by a grant (G.0015.01) from the Research Foundation - Flanders to D.V.D.S. The authors are very grateful to Drs. Isabel García Luque and Maite Serra (Centro Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid) for providing all PMMoV solutions and antibodies against the viral coat protein.

References

- Alleyne, V., Larsen, F.E. and Stewardt, S.H. (1989). Water relations of container-grown virus-tested and common apple (*Malus domestica* Borkh.) rootstocks. *Scientia Horticulturae* 38: 117-129.
- Alonso, E., García-Luque, I., Avila-Rincón, M.J., Wicke, B., Serra, M.T. and Díaz-Ruiz, J.R. (1989) A tobamovirus causing heavy losses in protected pepper crops in Spain. *J. Phytopathol.* 125: 67-76.
- Balachandran, S. and Osmond B.C. (1994) Susceptibility of tobacco leaves to photoinhibition following infection with two strains of tobacco mosaic virus under different light and nitrogen nutrition regimes. *Plant Physiol.* 104: 1051-1057.
- Balachandran, S., Osmond, B.C. and Daley, F.P. (1994) Diagnosis of the earliest strain-specific interactions between tobacco mosaic virus and chloroplasts of tobacco leaves *in vivo* by means of chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiol.* 104: 1059-1065.
- Balachandran, S., Hurry, V.M., Kelley, S.E., Osmond, C.B., Robinson, S.A., Rohozinski, J., Seaton, G.G.R. and Sims, D.A. (1997) Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis. *Physiol. Plant.* 100: 203-213.
- Barón, M., Rahoutei, J., Lázaro, J.J. and García-Luque, I. (1995) PSII response to biotic and abiotic stress. In *Photosynthesis: From Light to Biosphere*. Edited by Mathis, P. Vol. IV: 897-900. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Berger, S., Papadopoulos, M., Schreiber, U., Kaiser, W. and Roitsch, T. (2004) Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiol. Plant.* 122: 419-428.
- Bertamini, M., Muthuchelian, K. and Nedunchezian, N. (2004) Effect of grapevine leafroll on the photosynthesis of field grown grapevine plants (*Vitis vinifera* L. cv. Lagrein). *Journal of Phytopathology* 152: 145-152.
- Bhatia, D.S., Jindal, V. and Malik, C.P. (1986) Effect of salicylic acid and tannic acid on stomatal aperture and some enzyme changes in isolated epidermal peelings of *Euphorbia hirta* L. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen.* 181: 261-264.
- Boccarda, M., Boue, C., Garmier, M., De Paepe, R. and Boccarda, A.C. (2001) Infra-red thermography revealed a role for mitochondria in pre-symptomatic cooling during harpin-induced hypersensitive response. *Plant Journal* 28: 663-670.
- Buschmann, C., Langsdorf, G. and Lichtenthaler, H.K. (2000) Imaging of the blue, green, and red fluorescence emission of plants: An overview. *Photosynthetica* 38: 483-491.
- Chaerle, L., Van Caeneghem, W., Messens, E., Lambers, H., Van Montagu, M. and Van Der Straeten, D. (1999) Presymptomatic visualization of plant-virus interactions by thermography. *Nature Biotechnology* 17: 813-816.

- Chaerle, L. and Van Der Straeten, D. (2000) Imaging techniques and the early detection of plant stress. *Trends Plant Sci.* 5: 495-501.
- Chaerle, L. and Van Der Straeten, D. (2001) Seeing is believing: imaging techniques to monitor plant health. *Biochim. Biophys. Acta.* 1519: 153-166.
- Chaerle, L., Hulsens, K., Strasser, R.J., Valcke, R., Höfte, M. and Van Der Straeten, D. (2003) Robotized time-lapse imaging to assess in-planta uptake of phenylurea herbicides and their microbial degradation. *Physiol. Plant.* 118: 613-619.
- Chaerle, L., Hagenbeek, D., De Bruyne, E., Valke, R. and Van Der Straeten, D. (2004) Thermal and chlorophyll-fluorescence imaging distinguish plant pathogen interaction at an early stage. *Plant Cell Physiol.* 45: 887-896.
- Chaerle, L., Saibo, N. and Van Der Straeten, D. (2005) Tuning the pores: towards engineering plants for improved water use efficiency. *Trends Biotechnol.* 23: 308-315.
- Chou, H.M., Bundock, N., Rolfe, A.S. and Scholes, J.D. (2000) Infection of *Arabidopsis thaliana* leaves with *Albugo candida* (white blister rust) causes a reprogramming of host metabolism. *Mol. Plant Pathol.* 2: 99-113.
- Clover, G.R.G., Jaggard, K.W., Smith, H.G. and Azam-Ali, S.N. (2001) The use of radiation interception and transpiration to predict the yield of healthy, droughted and virus-infected sugar beet. *Journal of Agricultural Science* 136: 169-178.
- Del Río, L.A., Corpas, F.J. and Barroso, J.B. (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* 65: 783-792.
- Esfeld, P., Siebke, K. and Weis, E. (1995) Local defence-related shift in the carbon metabolism in chickpea leaves induced by a fungal pathogen. In *Photosynthesis: from light to biosphere.* 5:663-666. P Mathis, ed., Kluwer Academic Publisher. Dordrecht.
- Fuchs, M. and Tanner, C.B. (1966) Infrared thermometry of vegetation. *Agronomy Journal* 58: 597-601.
- Gitelson, A.A., Buschmann, C. and Lichtenthaler, H.K. (1998) Leaf chlorophyll fluorescence corrected for re-absorption by means of absorption and reflectance measurements. *J. Plant Physiol.* 152: 283-296.
- Grabov, A. and Blatt, M.R. (1998) Co-ordination of signalling elements in guard cell ion channel control. *J. Exp. Bot.* 49:399-406.
- Guo, Y.-P., Guo, D.-P., Peng, Y. and Chen, J.-S. (2005a) Photosynthetic responses of radish (*Paphanus sativus* var. *longipinnatus*) plants to infection by turnip mosaic virus. *Photosynthetica* 43: 457-462.
- Guo, Y.-P., Guo, Y.-P., Zhao, J.-P., Liu, H., Peng, Y., Wang, Q.-M., Chen, J.-S. and Rao, G.-Z. (2005b) Photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in leaves of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*) after turnip mosaic virus infection. *Plant Sci.* 168: 57-63.

- Jones, H.G. (1998). Stomatal control of photosynthesis and transpiration. *J. Exp. Bot.* 49: 387-398.
- Jones, H.G. (1999) Use of thermography for quantitative studies of spatial and temporal variation of stomatal conductance over leaf surfaces. *Plant, Cell and Environment* 22: 1043-1055.
- Jones, H.G., Stoll, M., Santos, T, de Sousa, C. Chaves, M. and Grant, M. (2002) Use of infrared thermography for monitoring stomatal closure in the field: application to grapevine. *J. Exp. Bot.* 53, 2249- 2260.
- Keller, P., Lüttge, U., Xue-Chen W. and Büttner, F. (1989) Influence of rhizomania disease on gas exchange and water relations of a susceptible and a tolerant sugar beet variety. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.* 34: 379-392.
- Kofalvi, S.A. and Nassuth, A. (1995) Influence of wheat streak mosaic virus infection on phenylpropanoid metabolism and the accumulation of phenolics and lignin in wheat. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.* 47: 365-377.
- Levy, D. and Marco, S. (1991). Indices of water deficit in susceptible and resistant cucumber in response to infection by cucumber mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* 119: 381-386.
- Lindenthal, M., Steiner, U., Dehne, H.-W. and Oerke, E.-C. (2005) Effect of downy mildew development on transpiration of cucumber leaves visualized by digital infrared thermography. *Phytopathology* 95: 233-240.
- Linsey, D.W. and Gudauskas, R. T. (1975). Effects of maize dwarf mosaic virus on water relations of corn. *Phytopathology* 65: 434-440.
- Lohaus, G., Heldt, H.W. and Osmond, C.B. (2000) Infection with phloem limited Abutilon mosaic virus causes localized carbohydrate accumulation in leaves of *Abutilon striatum*: relationships to symptom development and effects on chlorophyll fluorescence quenching during photosynthetic induction. *Plant Biol.* 2: 161-167.
- Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F. and Raskin, I. (1990) Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science.* 250: 1002-1004.
- Maliga, P., Klessig, D.F., Cashmore, A.R., Grisse, W. and Varner, J.E. (1995) *Methods in Plant Molecular Biology: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Messinger, S.M., Buckley, T.N. and Mott, K.A. (2006) Evidence for involvement of photosynthetic processes in the stomatal response to CO₂. *Plant Physiol.* 140: 771-778.
- Mur, L.A.J., Edi Santosa, I., Laarhoven, L.J.J., Holton, N.J., Harren F.J.M. and Smith, A.R. (2005) Laser photoacoustic detection allows in planta detection of nitric oxide in tobacco following challenge with avirulent and virulent *Pseudomonas syringae* pathovars. *Plant Physiol.* 138: 1247-1258.

- Nedbal, L. and Whitmarsh, J. (2004) Chlorophyll fluorescence imaging of leaves and fruits. In *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Papageorgiou, C.G., Govindjee, eds. 14: 389-407. Springer. Dordrecht.
- Nicholson, R.L. and Hammerschmidt, R. (1992) Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30: 369-389.
- Oerke, E.-C., Steiner, U., Dehne, H.-W. and Lindenthal, M. (2006). Thermal imaging of cucumber leaves affected by downy mildew and environmental conditions. *J. Exp. Bot.* 57: 2121-2132.
- Osmond, C.B., Daley, P.F., Badger, M.R. and Lüttge, U. (1998) Chlorophyll fluorescence quenching during photosynthetic induction in leaves of *Abutilon striatum* Dicks infected with Abutilon mosaic virus observed with a field-portable system. *Bot. Acta.* 111: 390-397.
- Pérez-Bueno, M.L. (2003) Photosystem II and viral infection: Analysis of fluorescence imaging and regulation of the synthesis of the oxygen-evolving-complex proteins during pathogenesis. *PhD Thesis*. University of Granada, Granada, Spain.
- Pérez-Bueno, M.L., Rahoutei, J., Sajjani, C., García-Luque, I. and Barón, M. (2004) Proteomic analysis of the oxygen-evolving complex of photosystem II under biotic stress. Studies on *Nicotiana benthamiana* infected with tobamoviruses. *Proteomics* 4: 418-425.
- Plumbe, A.M. and Willmer, C.M. (1986) Phytoalexins, water-stress and stomata. III. The effects of some phenolics, fatty acids and some other compounds on stomatal responses. *New phytol.* 103: 17-22.
- Rahoutei, J., García-Luque, I., Cremona, V. and Barón, M. (1998) Effect of tobamovirus infection on PSII complex of infected plants. In *Photosynthesis: from light to biosphere*. 4: 2761-2764. G Garab, ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Rahoutei, J., Barón, M., García-Luque, I., Droppa, M., Neményi, A. and Horvath, G. (1999) Effect of tobamovirus infection on the thermoluminescence characteristics of chloroplast from infected plants. *Z. Naturforsch.* 54c: 634-639.
- Rahoutei, J., García-Luque, I. and Barón, M. (2000) Inhibition of photosynthesis by viral infection: Effect on PSII structure and function. *Physiol. Plant.* 110: 286-292.
- Roberts, A.G., Santa Cruz, S., Roberts, I.M., Prior, D.A.M., Turgeon, R. and Oparka, K.J. (1997) Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana* comparison of a fluorescent solute with fluorescent virus. *Plant Cell.* 9: 1381-1396.
- Rolfe, A.S. and Scholes, J.D. (1995) Quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *New Phytol.* 131: 69-79.
- Romero-Aranda, R., Soria, T. and Cuartero, J. (2001). Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Science* 160: 265-272.

- Rowland, D., Dorner, J., Sorensen, R., Beasley, J.P. Jr. and Todd, J. (2005) Tomato spotted wilt virus in peanut tissue types and physiological effects related to disease incidence and severity. *Plant Pathology* 54: 431-440.
- Ruiz del Pino, M., Moreno, A., García de Lacoba, M., Castillo-Lluva, S., Gilardi, P., Serra, M.T. and García-Luque, I. (2003) Biological and molecular characterization of P101 isolate, a tobamoviral pepper strain from Bulgaria. *Arch. Virol.* 148: 2115-2135.
- Ryšlavá, H., Müller, K., Semorádová, Š., Synková, H. and Čerovská, N. (2003) Photosynthesis and activity of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Nicotiana tabacum* L. leaves infected by *Potato virus A* and *Potato virus Y*. *Photosynthetica* 41: 357-363.
- Sajnani, C. (2005) Viral infections as stress factor in photosynthesis. *PhD Thesis*, University of Granada, Granada, Spain.
- Sampol, B., Bota, J., Riera, D., Medrano, H. and Flexas, J. (2003). Analysis of the virus-induced inhibition of photosynthesis in malmsey grapevines. *New Phytologist* 160: 403-412.
- Scharte, J., Schon, H. and Weiss, E. (2005) Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. *Plant Cell Environ.* 28: 1421-1435.
- Schmitz, A., Kiewnick, S., Schlang, J. and Sikora, R.A. (2004) Use of high resolution digital thermography to detect *Heterodera schachtii* infestation in sugar beets. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 69: 359-363.
- Scholes, J.D. and Rolfe, S.A. (1996) Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *Planta* 199: 573-582.
- Sridhar, R., Mohanty, S.K. and Ramakrishanayya, G. (1994). Physiology of rice tungro virus disease: water relations of diseased plants. *Acta Phytopatologica et Entomologica Hungarica* 29: 137-145.
- Thévenaz, P., Ruttimann, U.E. and Unser, M. (1998) A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Trans. Image Process.* 7: 27-41.
- Van Der Straeten, D., Chaerle, L., Sharkov, G., Lambers, H. and Van Montagu, M. (1995) Salicylic acid enhances the activity of the alternative pathway of respiration in tobacco leaves and induces thermogenicity. *Planta* 196: 412-419.
- van Kooten, O., Meurs, C. and van Loon, L.C. (1990) Photosynthetic electron transport in tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol. Plant.* 80: 446-452.
- Wardle, K. and Short, K.C. (1983) Stomatal response of *in vitro* cultured plantlets. I. Responses in epidermal strips of *Chrysanthemum* to environmental factors and growth regulators. *Biochem Physiol Pflanzen* 178, 619-624.

- Weis, E., Meng, Q., Siebke, K., Lippert, K. and Esfeld, P. (1998) Topography of leaf carbon metabolism as analyzed by chlorophyll a-fluorescence. In *Photosynthesis: mechanisms and effects Vol5*. Edited by G. Garab pp. 4259-4264. Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht.
- Wetter, C., Conti, M., Alschuh, D., Tabillion, R. and van Regemortel, M.H.V. (1984) Pepper mild mottle virus, a tobamovirus infecting pepper cultivars in Sicily. *Phytopathology*. 74: 405-410.
- Whenham, R.J. and Fraser, R.S.S. (1981) Effect of systemic and local-lesion-forming strains of tobacco mosaic virus on abscisic acid concentration in tobacco leaves: consequences for the control of leaf growth. *Physiol. Plant Pathol.* 18: 267-278.
- Whenham, R.J., Fraser, R.S.S., Brown, L.P. and Payne, J.A. (1986) Tobacco-mosaic-virus-induced increase in abscisic-acid concentration in tobacco leaves: Intracellular location in light and dark-green areas, and relationship to symptom development. *Planta* 168: 592-598.
- Willmer, C.M., Wilson, A.B. and Jones, H.G. (1988) Changing responses of stomata to abscisic acid and carbon dioxide as leaves and plants age. *J. Exp. Bot.* 39: 401-410.
- Zhou, Y.H., Peng, Y.H., Lei, J.L., Zou, L.Y., Zheng, J.H. and Yu, J.Q. (2004) Effects of potato virus Y^{NTN} infection on gas exchange and photosystem 2 function in leaves of *Solanum tuberosum* L. *Photosynthetica* 42: 417-423.

C.2. Multicolour fluorescence imaging: an useful tool to visualise systemic viral infection in plants

Mónica Pineda¹, László Gáspár², Fermín Morales³, Zoltán Szigeti², Matilde Barón^{1,*}.

1. Department of Biochemistry, Cell and Molecular Biology of Plants. Estación Experimental del Zaidín, Spanish Council for Scientific Research (CSIC). C/ Profesor Albareda, nº 1. C.P. 18008. Granada (Spain).

2. Department of Plant Physiology and Molecular Plant Biology, Eötvös Loránd University, Pázmány Péter sétány 1/c, 1117 Budapest, Hungary.

3. Department of Plant Nutrition, Aula Dei Experimental Station, Spanish Council for Scientific Research (CSIC), Apdo. 202, E-50080 Zaragoza, Spain.

* Corresponding author: mbaron@eez.csic.es; Telephone number: 0034 958 18 16 00 Extension 213; Fax number: 0034 958 12 96 00

Abstract: Multicolour fluorescence induced by UV light is a sensitive and specific tool to provide information about the primary and secondary metabolism of the plants by obtaining signals of the chlorophyll fluorescence and blue-green fluorescence (BGF), respectively. We have followed the systemic infection on leaves of *Nicotiana benthamiana* plants with the Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV) by means of a multicolour fluorescence imaging set up. This technique could detect differences during the infection process between two strains of PMMoV and establish a correlation between the virulence and the changes induced on the plant. BGF increase mainly in the abaxial leaf side during pathogenesis and the corresponding images showed a clear vein-associated pattern in both old and young leaves of the infected plants. Chlorogenic acid was demonstrated to be the main contributor to the BGF emission in *N. benthamiana* plants, being also correlated with the levels of this hydroxycinnamic acid in the young symptomatic leaves with the fluorescence signal and the virulence of the viral strain infecting the

plant. BGF imaging could detect viral-induced metabolic changes in asymptomatic leaves before the viral immunodetection by tissue printing. The situation in symptomatic leaves is more complex, due to the quick invasion by the pathogen. Red and far red fluorescence images confirmed our previous results about alterations in the photosynthetic apparatus of old leaves from infected plants detected with other imaging techniques. Fluorescence ratios F440/F690 and F440/F740, which increase in both symptomatic and asymptomatic leaves during the viral infection, were excellent indicators of biotic stress.

Keywords: blue-green fluorescence - chlorophyll fluorescence - UV-induced fluorescence imaging - *Nicotiana benthamiana* - pepper mild mottle virus - tobamovirus.

Abbreviations: AB, abaxial; AD, adaxial; AS, asymptomatic; BGF, blue-green fluorescence; Chl, chlorophyll; Chl-F, chlorophyll fluorescence; Chl-FI, chlorophyll fluorescence imaging; CP, viral coat protein; dpi, days post-inoculation; F440, blue fluorescence (fluorescence intensity at 440 nm); F520, green fluorescence (fluorescence intensity at 520 nm); F690, red chlorophyll fluorescence (fluorescence intensity at 690 nm); F740, far-red chlorophyll fluorescence (fluorescence intensity at 740 nm); HCA, hydroxycinnamic acid; HPLC, high performance liquid chromatography; HR, hypersensitive response; MCF, multicolour fluorescence; NPQ, non-photochemical quenching; PMMoV-S and -I, Spanish and Italian strains of the pepper mild mottle virus; PVDF: polyvinylidene fluoride; S, symptomatic; UV, ultraviolet.

Introduction

In the last decade, ultraviolet (UV)-excited fluorescence signals have emerged as a sensitive and specific tool to evaluate the physiological state of plants

before the impact of different environmental stress factors is evident (Lichtenthaler and Miehé 1997; Buschmann and Lichtenthaler 1998; Cerovic et al. 1999).

Excitation of leaves with long-wavelength UV radiation results in a total of four characteristic fluorescence bands with maximal or shoulders near to 440 nm (blue; F440), 520 nm (green; F520), 690 nm (red; F690) and 740 nm (far-red; F740) fluorescence (Lichtenthaler and Miehé 1997; Buschmann and Lichtenthaler 1998; Buschmann et al. 2000). F690 and F740 taken together are also called chlorophyll fluorescence (Chl-F) since this fluorescence signals are emitted by chlorophyll a (Chl). F440 and F520 are often treated as blue-green fluorescence (BGF), since F520 is rarely present as a distinct peak (Cerovic et al. 1999).

During the monitoring of multicolour-fluorescence (MCF) signals by point measurements of randomly selected leaf areas, the information about fluorescence gradients over the whole leaf surface is missed. In contrast, the UV-excited fluorescence imaging systems offer high spatial resolution from the leaf pattern to the remote sensing applications (Nilsson 1995; Lang et al. 1996; Lichtenthaler and Miehé 1997; Buschmann and Lichtenthaler 1998; Apostol et al. 2003).

BGF is primarily emitted from the epidermis and from both mesophyll cell walls and the leaf veins by several phenolic compounds covalently bound to the cell wall carbohydrates. In contrast, Chl-F emanates principally from mesophyll cells. For some author (Harrys and Hartley 1976; Morales et al. 1996; Lichtenthaler and Schweiger 1998) ferulic acid appears as the main BGF emitter in leaves, showing that soluble plant phenolic compounds being present in the vacuole of plant cells contribute very little to the overall BGF emission. More recently, Morales et al. (2005) indicate that chlorogenic acid is one of the main BGF fluorophores in artichoke leaves. This hydroxycinnamic acid (HCA) is predominant in tobacco plants, increasing its levels with the leaf age (Ounis et al. 2001; Cerovic et al. 2002).

The use of the fluorescence ratios F440/F520, F440/F690, F440/F740 and F690/F740 is widespread since BGF and Chl-F have distinct origins and can

change independently in response to stress factors. F440/F690 and F440/F740 are very early stress indicators and F440/F520 could change after long stress exposure (Buschmann and Lichtenthaler 1998; Lichtenthaler and Schweiger 1998; Buschmann et al. 2000). The F690/F740 ratio presents an inverse relationship with the leaf Chl content (Lang et al. 1996; Gitelson et al. 1998, 1999; Cerovic et al. 1999; Buschmann et al. 2000).

Several limiting agricultural factors have been monitored by MCF, using in most of the cases imaging systems: mineral deficiencies (Morales et al. 1994; Heisel et al. 1996; Buschmann and Lichtenthaler 1998; Langsdorf et al. 2000; Cartelat et al. 2005; Lichtenthaler et al. 2005), water stress (Lang et al. 1996; Schweiger et al. 1996; Buschmann and Lichtenthaler 1998; Hideg et al. 2002), and high temperature stress (Morales et al. 1998). Imaging is especially valuable for the visualization of the plant-pathogen interactions where, according to the symptomatology, no uniform alteration of the foliar metabolism is expected (Chaerle and Van Der Straeten 2001; Nedbal and Whitmarsh 2004). Chl-F imaging (Chl-FI) has revealed the spatial-temporal changes on the photosynthetic efficiency pattern during pathogenesis in plants infected with fungi (Rolfe and Scholes 1995; Scholes and Rolfe 1996; Chou et al. 2000; Scharfe et al. 2005), bacteria (Berger et al. 2004, 2007) and virus (Balachandran and Osmond 1994; Balachandran et al. 1994, 1997; Osmond et al. 1998; Lohaus et al. 2000; Chaerle et al. 2006; Pérez-Bueno et al. 2006). However there is a lack of MCF studies which include the analysis for the BGF signals in pathogen-infected plants. Fungal infection was reported to increase F440 either by the fungus autofluorescence (Lüdeker et al. 1996) or by the production of plant phytoalexins (Niemann et al. 1991). Szigeti et al. (2002) showed changes in the fluorescence ratios in Chinese cabbage infected with turnip yellow mosaic virus. By means of MCF imaging, Buschmann and Lichtenthaler (1998) reported an early visualization of small punctures made by tobacco flies on leaves and mite attack on bean; more recently, Chaerle et al.

(2007) monitored the hypersensitive response (HR) to tobacco mosaic virus (TMV) infection by a BGF increase linked to scopoletin accumulation.

In the present work we follow, a systemic viral infection by an MCF imaging setup in *Nicotiana benthamiana* plants infected with either the Spanish or the Italian strain of Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV-S, PMMoV-I; the origin of these strains was previously reported in Alonso et al. 1989 and Wetter et al. 1984, respectively). In previous studies we have showed that the oxygen-evolving complex (OEC) of photosystem II (PSII) is the main target of this tobamovirus in the chloroplast (Barón et al. 1995; Rahoutei et al. 1998, 1999, 2000; Pérez-Bueno et al. 2004). Kinetic Chl-FI studies showed a correlation between NPQ (non-photochemical quenching) and the PMMoV spreading in leaves without showing any symptoms (Pérez-Bueno et al. 2006). Imaging thermography could detect the infection earlier than the former technique in the form of an increase in leaf temperature caused by stomatal closure (Chaerle et al. 2006). In order to give a more complete picture of the host plant response to PMMoV infection, information is lacking about secondary metabolites implicated in signalling processes and response to pathogens in *N. benthamiana*. Hence, we have monitored changes in both BGF and Chl-F in *N. benthamiana* leaves infected with either PMMoV-S or PMMoV-I by a compact flash-lamp MCF setup. Fluorescence values (F440, F520, F690 and F740) and fluorescence ratios (F440/F520, F440/F690, F440/F740 and F690/F740), as well as their corresponding images, of whole leaves from control and infected plants were monitored along the infection. In an attempt to identify the compounds involved in the BGF emission, imaging was complemented by high performance liquid chromatography (HPLC) analysis of leaf extracts. To correlate changes in fluorescence parameters with the virus entrance in the symptomatic young leaves, immunolocalization of viral coat protein (CP) by tissue printing was carried out.

Material and methods

Plant growth and PMMoV infection

Nicotiana benthamiana cv. Gray plants were cultivated in a growth chamber at $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR (photosynthetically-active radiation), generated by white fluorescent lamps (HPI-T 250 W, Phillips, Eindhoven, Netherlands), with a 15/9h (26/20°C) light/dark photoperiod and a relative humidity of 60%. The three lowest leaves of plants with 6-7 fully-expanded leaves were carborundum-dusted and mechanically inoculated with the Spanish or the Italian strains of PMMoV (PMMoV-S and PMMoV-I) using 50 μl of inoculum per leaf (50 μg of virus per ml of 20 mM sodium phosphate/biphosphate buffer pH 7.0). Mock-inoculated plants were treated with buffer only.

At 5 (PMMoV-S infected plants) and 7 (PMMoV-I infected plants) days post-inoculation (dpi), visual symptoms became visible: new leaves developed after the inoculation showed severe curling and wrinkling (symptomatic leaves, S). In contrast, no symptoms were observed in the three inoculated leaves and neither in those upper fully expanded leaves that were inoculated. These non-inoculated leaves will be referred as asymptomatic leaves (AS, Rahoutei et al. 2000). Stunting of the plants was clearly evident at 14 dpi. PMMoV-I infected plants were able to recover from 21 dpi onwards: plant height increased again and plants developed new non-curly leaves. In contrast, no new leaves appeared in PMMoV-S infected plants after 14 dpi and plants died at 21 dpi, except for the batch of the plants whose fluorophore content was determined which died at 23 dpi.

Starting with the lowest leaf and numbering leaves in ascending order, we have analysed the 5th leaf as the AS one. The second youngest leaf at every dpi was tested as the S one.

Fluorescence Imaging

Fluorescence imaging measurements were carried out in control and virus infected plants at different post-infection times: 3, 5, 7, 10, 12, 14, 17 (for plant

infected with both viral strains), 21, 24 and 28 dpi (for controls and plants infected with PMMoV-I).

Fluorescence excitation and detection was essentially the same as described earlier (Lenk and Buschmann 2006).

Fluorescence emission images of the abaxial (AB) and adaxial (AD) surfaces of leaves were carried out with a compact flash-lamp fluorescence imaging system (FL-FIS, Buschmann and Lichtenthaler 1998; Lichtenthaler and Babani 2000). Excitation light was provided by a pulsed xenon lamp with a UV-transmitting filter (transmission maximum at 355 nm). Fluorescence images were acquired with a CCD-camera gated synchronously with the flash lamp. Leaves were placed at 390 mm from the camera, obtaining images with 60 mm width. The multispectral fluorescence imaging for the blue (F440), green (F520), red (F690) and far-red (F740) fluorescence was acquired sequentially for the identical field of view, each with the appropriate filter that were built into a filter wheel in front of the CCD-camera. The acquisition of the fluorescence emission images required the accumulation of 800 images.

Images were processed by specific software (Camille 1.05 software, Photonetics, Kehl, Germany). The raw image was corrected for non-uniform excitation with the pixels of an image showing uniform fluorescence (blue fluorescence image of a white paper). Black and white images of both measured fluorescence intensity and fluorescence ratios (F440/F520, F440/F690, F440/F740 and F690/F740, acquired by a division of fluorescence intensities pixel by pixel) were set at the appropriate intensity and either false colour or black and white scale were applied by ImageJ software package (rsb.info.nih.gov/ij).

Numerical data were obtained by Camille 1.05 software, in a region of interest corresponding to the leaf outline. Fluorescence profiles across the leaves (carried out by ImageJ, <http://rsb.info.nih.gov/ij>) were obtained by drawing a line perpendicular to the main vein, covering 266 pixels of AS leaves. The main vein was located in the middle of the line (133 pixels to the leaf edge).

Fluorophore determination

Phenolic compounds were extracted in warm (at 70 °C) from 20 mm² leaf disks with methanol for 30 min. The extract solution was brought to a volume of 5 or 10 ml (depending on type of sample) with methanol, and then frozen at -80 °C until analysis.

Leaf extracts were analyzed by an HPLC method described previously (Morales et al. 2005). This method revealed the presence of one (majority) phenolic acid, identified as chlorogenic acid by comparison of its retention time and UV absorption spectrum with that of chlorogenic acid (pure standard) in methanol. Prior to analysis, the sample extracts were thawed and filtered through a 0.45 µm polyvinylidene fluoride (PVDF) filter. High-performance liquid chromatography was performed with a HPLC system (Waters Alliance 2795 HPLC system, Waters Corp., Mildford MA, USA) equipped with on-line degasser, autosampler module (4 °C) and column oven (40 °C). A diode array detector (Waters 2996 UV-visible) was used for analyte detection. The column used was an analytical HPLC column (Waters Symmetry C18, 250 mm x 4.6 mm i.d., dp = 5 µm) with a 20-mm guard column of the same material. The mobile phase consisted of a gradient system of solution A, MilliQ water-acetic acid (97.5:2.5; v/v) and solution B, HPLC gradient grade methanol-acetic acid (97.5:2.5; v/v) at a flow rate of 1.0 ml min⁻¹. The gradient program was as follows: linear gradient from solution A-B (70:30) to solution A-B (51:49) in 15 min, isocratic at solution A-B (51:49) for 10 min, followed linear gradient to solution A-B (70:30) in 5 min, finally isocratic at solution A-B (70:30) for 5 min. Injection volume was 15 µl. Automated instrumentation was realized with an HPLC data system (HyStar, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). The data were analyzed by a data processing software package (HyStar PostProcessing, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). Quantification was based on peak area measurements at 325 nm. Standard solutions were prepared with chlorogenic acid, and were examined by HPLC in order to determine its retention time (4.1 min). A multipoint calibration was

performed in the range of 1.25-40 μ M. Linear relationship was as follows: $Y = 9.28 X + 1.14$ ($R^2 = 0.9999$). α -Naphthol ($\geq 99\%$ GC; Riedel-de Haën, Seelze, Germany) was used as internal standard (retention time, t_R , 23.0 min).

Statistics

Statistical analysis was carried out with specific software (SigmaPlot 8.0 software, Systat Software Inc., San Jose, California, USA). Student t-test was used to compare control with infected plants, and PMMoV-I infected with PMMoV-S infected plants. Graphs show mean values (obtained from at least 4 samples per leaf type) and their corresponding standard errors. Tables 1 and 2 indicate significant differences between treatments, according to Student's t-tests and the three significance levels tested: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***)

Tissue prints

Localization of PMMoV CP in S leaves was performed by tissue print analysis using specific antiserum against viral CP (Alonso et al. 1989). As described by Ruíz del Pino et al. (2003), non-specific binding was reduced by preabsorbing the immune antiserum with acetone powder obtained from stems and leaves of young healthy *N. benthamiana* plants. Whole S leaves from infected and their respective equivalent leaves in control plants were imprinted on PVDF sheets and assayed as described by Maliga et al. (1995). Membranes were first incubated with the PMMoV-CP specific antiserum at the appropriate dilutions and subsequently with goat anti-rabbit alkaline phosphatase-IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Bound antibodies were detected using nitro-blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP, Roche, Basel, Switzerland).

Results

Here we present the images corresponding to fluorescence emission at the different wavelengths analysed and to ratios between them. In addition, values of

these parameters averaged in the whole leaf surface are showed. In order to avoid the tedious enumeration of dpi in which significant differences according to the statistic (see Material and Methods) are found between PMMoV infected plants and controls, this information is displayed in tables 1 and 2.

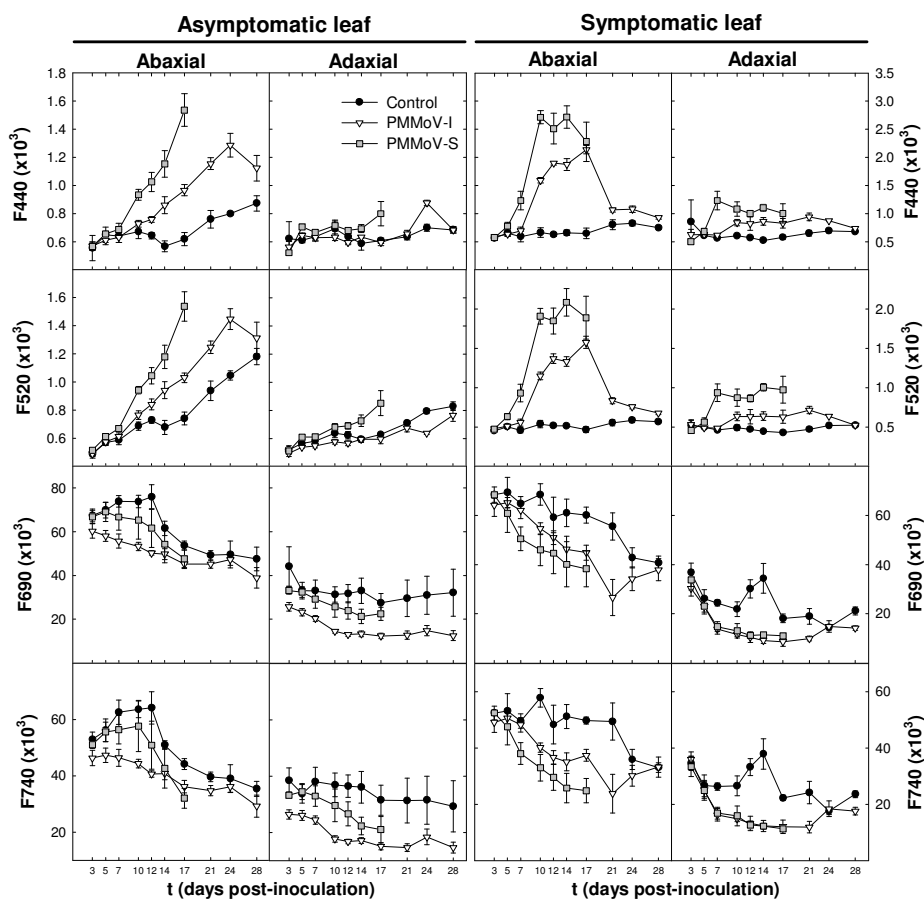


Fig. 1. Time-course of blue (F440), green (F520), red (F690) and far red (F740) fluorescence emission of asymptomatic (left) and symptomatic (right) leaves of *Nicotiana benthamiana* control and PMMoV-infected plants. Averages of the whole leaf at every dpi assayed are displayed, error bars indicate standard error. AB and AD surfaces of the leaves are shown. Fluorescence intensity is given in arbitrary units.

Fluorescence emission of asymptomatic leaves

The most evident changes in fluorescence emission of AS leaves occurred in the AB surface of the leaves.

BGF. Values of total (averaged in the whole leaf) blue fluorescence (F440) emitted by old AS leaves from control and infected plants increased with leaf age only in the AB surface (Fig. 1). The highest F440 values correspond to PMMoV-S infected plants, according to the highest virulence of this strain.

Comparing with control values, F440 of the AB surface of AS leaves of PMMoV-infected plants increased from 10 and 12 dpi onwards (PMMoV-S and -I, respectively; Fig. 1, Table 1). In the last PMMoV-I-infection steps, corresponding to the recovery phase of the symptoms occurred in these plants, F440 values decreased until values similar to the controls (Fig. 1, Table 1).

Table 1. Summary of the statistical analysis of the intensity of the fluorescence emitted in the blue, green, red and far-red region by intact leaves of control and PMMoV infected *N. benthamiana* plants. Table displays days post-inoculation where significant differences were found at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***). Asymptomatic leaves: old leaves which remain symptomless during all the infection process; F440, blue fluorescence; F520, green fluorescence; F690, red fluorescence; F740, far red fluorescence; PMMoV-I and -S, Italian and Spanish strains of the Pepper Mild Mottle Virus; n.s. no significant differences were found at any dpi assayed; symptomatic leaves, young leaves displaying curling from the first week of the infection time.

| | PMMoV Strain | Asymptomatic leaf | | Symptomatic leaf | |
|-------------|--------------|-----------------------------|---------------------|------------------------|---------------------------------|
| | | AB surface | AD surface | AB surface | AD surface |
| F440 | -I | 12-24** | n.s. | 10-17***, 21-24*, 28** | 10**, 14**, 17-21*, 24** |
| | -S | 10-14**, 17*** | 5** | 7*, 10-14***, 17** | 7**, 10*, 12-14***, 17* |
| F520 | -I | 12-14*, 17**, 21*, 24*** | n.s. | 10-17***, 21-28** | 14*, 21-24** |
| | -S | 10***, 12-14**, 17*** | 5-7*; 14-17* | 5*, 7-14***, 17** | 7**, 10*, 12-14***, 17* |
| F690 | -I | 5*, 7**, 10***, 12** 14-17* | 7*, 10-12**, 14-17* | 10*, 17-21* | 7**, 10*, 12-14**, 17-21*, 28** |
| | -S | n.s. | n.s. | 5**, 7-10*, 17* | 7**, 12-14**, 17* |
| F740 | -I | 7*, 10-14**, 17* | 7*, 10-12**, 14-17* | 10**, 14*, 17**, 21* | 7**, 10*, 12-17**, 21*, 28* |
| | -S | 17* | n.s. | 7*, 10**, 14-17** | 7**, 12***, 14**, 17*** |

Total green fluorescence emission (F520) from AS leaves of healthy and infected plants displayed a very similar trend to F440 (Fig. 1); however, increase of this parameter with leaf ageing is more noticeable than with F440, affecting also the AD side. The most virulent strain, PMMoV-S, caused the highest F520 increment (Table 1), which could also be detected in PMMoV-I infected plants, albeit with some delay. As in the case of F440, F520 values decreased until values similar to the controls during the symptom recovery phase (Fig. 1, Table 1).

To analyse the viral-induced spatiotemporal changes of emitted fluorescence at the different wavelengths, we have compared the images obtained before (5 dpi) and after (17 dpi) the fluorescence changes (Fig. 2). The F440 patterns from control leaves did not exhibit great changes along the experimental time (Fig. 2a).

The areas showing the highest fluorescence emission corresponded with the vascular tissues of the AB leaf surface. At 5 dpi, leaves from infected plants were very similar to the controls. However, a F440 increase could be detected at 17 dpi in both veinal and interveinal tissues of AS leaves of infected plants, being more apparent in the AB surface and in the case of PMMoV-S infected plants. The F520 pattern was very similar to those of F440, except for the increase of F520 emission at 17 dpi in control plants.

Chl-F. Values of total red fluorescence emitted by Chl of AS leaves were stronger in the AB leaf side in all cases (Fig. 1). F690 diminished with leaf aging in old AS leaves from both control and infected plants. No significant differences could be established between PMMoV-S-infected and control plants on either of the leaf sides (Table 1); while PMMoV-I infected ones showed a significant fluorescence decrease in the AB surface at 5-17 dpi, as well as in the AD surface at 7-17 dpi. Coinciding with the recovery phase (21-28 dpi) F690 of AS leaves of PMMoV-I infected plants were similar to the respective controls on both leaf surfaces.

During the first infection days, F690 pattern (Fig. 2a) of AS leaves from infected plants appeared similar to control ones; however, at 17 dpi, F690

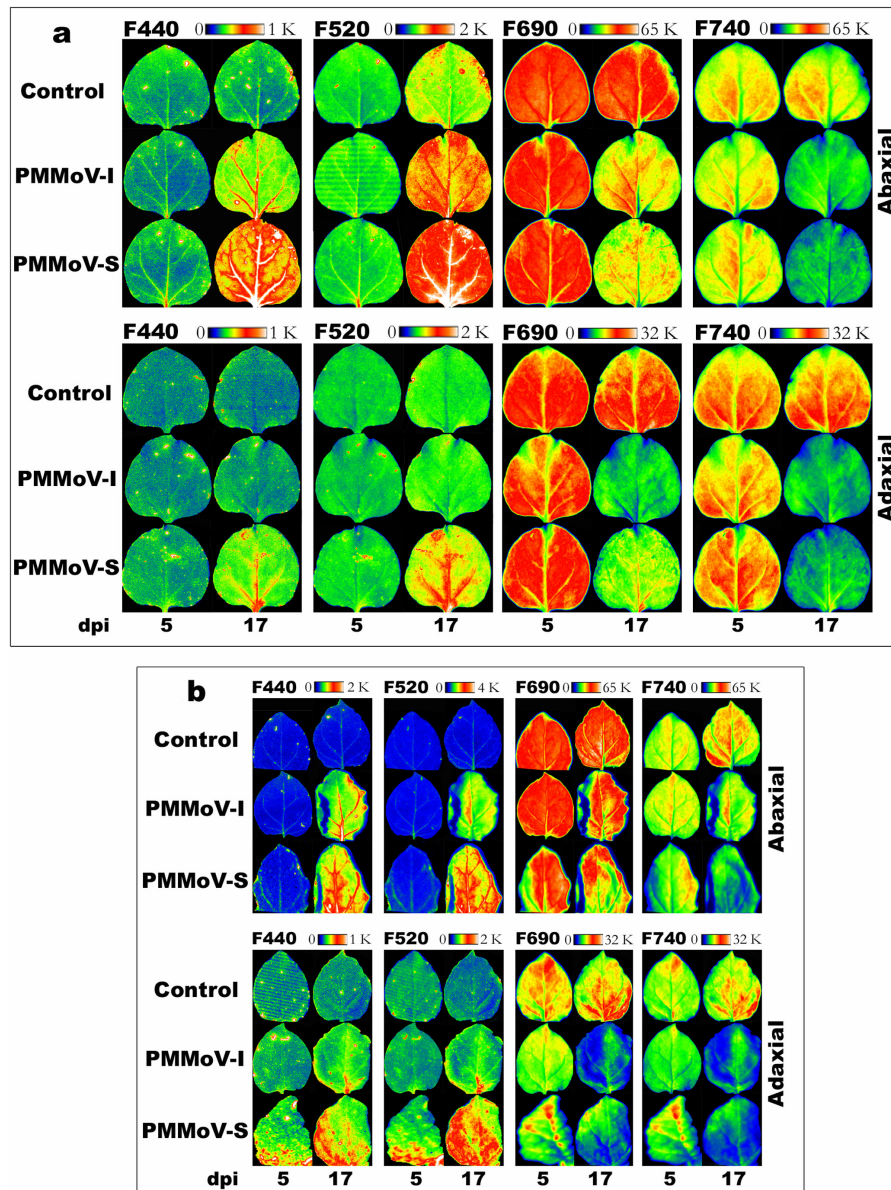


Fig. 2. Images of blue (F440), green (F520), red (F690) and far red (F740) fluorescence emission of AS (a) and S (b) leaves of *Nicotiana benthamiana* control and PMMoV-infected plants. AB and AD surfaces of the leaves are shown. Images obtained before (5 dpi) and after (17 dpi) fluorescence changes occurred are displayed. The applied colour scale is shown for every panel. Different asymptomatic (old) and symptomatic (young) leaves sizes are due to leaf age.

decreased in the whole leaf compared to that of control plants. A fluorescence gradient pattern appeared, where the highest values in AS leaves were found in leaf areas surrounding the main veins (for *N. benthamiana* vein classification, see Roberts et al. 1997).

The behaviour of F740 pattern (Fig. 2a) and whole leaf F740 (Fig. 1) was similar in healthy and infected plants to that exhibited by F690, with some differences listed in Table 1.

Asymptomatic leaves fluorescence profiles at 17 dpi

Fluorescence profiles of AS leaf surface at 17 dpi were plotted to visualise the distribution of the different fluorescence signals registered across these leaves (Fig. 3). The AB leaf surface was chosen because of the more prominent fluorescence signal.

BGF emission of control leaves showed the lowest values. Three small peaks could be distinguished, corresponding to veins type I and II. BGF levels of AS leaves from PMMoV-infected plants were higher along the whole profile, being more evident in the vein area, and in the case of PMMoV-S infected plants. Thus, profiles confirmed the enhancement of BGF in the vascular regions.

On the other hand, control AS leaves exhibited the highest Chl-F values. The main veins displayed the lowest values in AS leaves from both control and PMMoV-infected plants (Fig. 3).

Fluorescence emission of symptomatic leaves

In S leaves, similarly to AS leaves, the main changes in fluorescence pattern and total fluorescence values occurred in the AB surface of the leaves.

BGF. Emission of blue fluorescence from young control leaves did not manifest great differences along the experimental time on either leaf surface (Fig. 1, Table 1). PMMoV-S produced the highest F440 and F520 increment in both leaf surfaces compared to the controls. Once again this phenomenon was delayed in the

case of PMMoV-I infection and during the recovery phase, F440 values of these leaves decreased reaching control values.

Both surfaces of control young leaves displayed a very homogeneous F440 and F520 pattern during the period analysed (Fig. 2b). S leaf of PMMoV-infected plants did no differ from controls at 5 dpi (increased values registered in the AD surface were not significant); however, a BGF increment in the whole leaf (both surfaces) was evident at 17 dpi, the vein areas showing the highest values, more apparent in the AB surface of the S leaves and in PMMoV-S infected plants, as in the case of AS leaf patterns of infected plants.

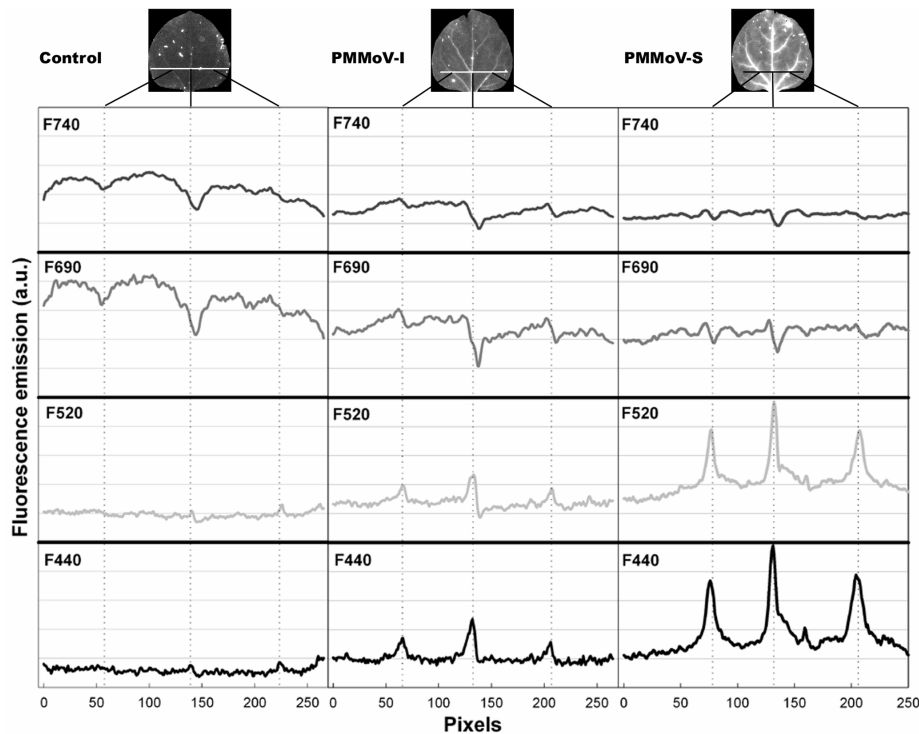


Fig. 3. Infection-induced changes in leaf fluorescence emission in the AB surface of AS leaves at 17 dpi. Fluorescence profiles are shown along a 266 pixel line drawn in the middle of an AS leaf, and centred on the midrib (vein type I; for *N. benthamiana* vein classification, see Roberts et al. 1997). Vertical dotted lines represent the positions of veins type I and II. Fluorescence emission was normalised to maximum values. Fluorescence difference between solid lines is 0.2 relative units.

Chl-F. Control plants emitted the strongest F690 (Fig. 1), as in AS leaves. The AB side of S leaves from PMMoV-S infected plants exhibited the first significant changes (5-10 and 17 dpi; Table 1). The AD surface only showed significant differences as early as 7 dpi and from 12 to 17 dpi. PMMoV-I infected plants showed decreased F690 values in the AD surface at 7-21 dpi, and 28 dpi. The AB surface displayed lower F690 emission than control plants at 10 and 17-21 dpi. Only this leaf surface showed the effects of recovery phase.

F740 emission followed a very similar kinetics to F690 (check Table 1 for significant time points).

In contrast to the defined red Chl fluorescence pattern from AS leaves of infected plants, no clear pattern emerged from F690 images of S leaves (Fig. 2b). The only remarkable fact is the lower fluorescence intensity of S leaves from infected plants at 5 and 17 dpi in both surfaces of the leaves, which is significant at 5 dpi in the case of AB side of S leaves of PMMoV-S infected plants, and at 17 dpi in all cases. Also imaging of F740 was comparable to that of F690 (Fig. 2b).

Fluorescence ratios of asymptomatic leaves

The fluorescence ratios that were early indicators of stress caused by PMMoV infection in *Nicotiana benthamiana* plants were F440/F690 and F440/F740, in both AB and AD surfaces of the AS leaves.

F440/F520. The values of this fluorescence ratio were decreasing with leaf aging in all treatments, being more evident in the case of AS control leaves and in the AB side of the leaves (Fig. 4). Table 2 shows the earliest difference between the AS leaves from PMMoV-S and -I infected plants and their corresponding controls at 12 and 14 dpi, respectively, in the AB side.

Figure 5a displays the fluorescence ratios of AS leaves before (5 dpi) and after (17 dpi) the biggest changes in fluorescence ratios occur. In the case of control leaves, decreasing of F440/F520 due to leaf aging was patent on the images. Comparing the images from control and infected plants at 17 dpi, an

increase of this ratio was evident in the AB side of plants infected with both viral strains, exhibiting the vein areas the highest values.

F440/F690. As Figure 4 shows, AS leaves of infected plants displayed higher values of F440/F690 than control leaves early in the time-course, being more evident in the AD side of the leaves. The earliest change was registered in the AD side of the AS leaves of PMMoV-I infected plants (Table 2). These results were confirmed by imaging (Fig. 5a). Even being an increase of F440/F690 clear at 17 dpi in the AB surface of the AS leaves of infected plants, the AD ones evidenced the highest values of the ratio at this post-infection time. It was possible to observe a decreasing gradient in this parameter from the vein (showing the highest values of the ratio) to the mesophyll. Control AS leaves did not show clear changes along the experimental time.

F440/F740. The kinetics of this parameter was very similar to that of F440/F690 (Fig. 4). F440/F740 detected significant differences later than F440/F690 in both virus infections (Table 2). However, recovery phase of PMMoV-I infected plants could be detected at 28 dpi in both surfaces of the AS leaf, if we consider that any significant difference between the values of the ratio between control and infected plants are evident at this post-infection time (Table 2).

Images of F440/F740 displayed a very similar situation to F440/F690, albeit with higher values than the former (Fig. 5a).

F690/F740. In general, F690/F740 values, inversely correlated with the Chl content in leaf, were higher in the AB surface than in the AD one. In both leaf surfaces and for the 3 samples analysed, F690/F740 slightly diminished until 10-12 dpi, from this point the ratio raised, being more evident this phenomenon on the AD side.

AS leaves of PMMoV-S infected plants displayed the highest ratio and consequently the lowest Chl content at 17 dpi, only significant in the AB leaf surface (Table 2, Fig. 5). However, the AB surface of AS leaves from PMMoV-I

infected plants did not differ significantly along the experiment, when compared with the controls. In this kind of leaves, the AD leaf surface displayed a higher Chl content than controls at various time-points (12, 14, 28 dpi, Table 2).

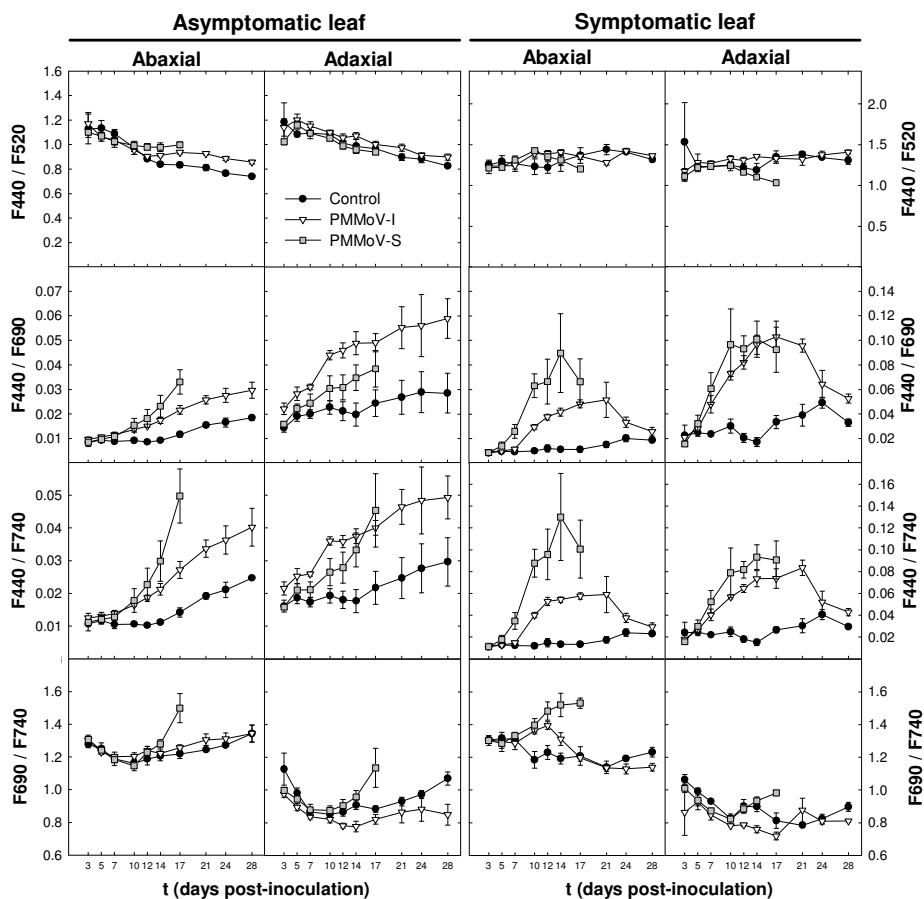


Fig. 4. Time-course of F440/F520, F440/F690, F440/F740 and F690/F740 fluorescence ratios of asymptomatic (left) and symptomatic (right) leaves of *Nicotiana benthamiana* control and PMMoV-infected plants. Averages of the whole leaf at every dpi assayed are displayed, error bars indicate standard error. AB and AD surfaces of the leaves are shown. Fluorescence intensity is given in arbitrary units.

Table 2. Summary of the statistical analysis of the different fluorescence ratios of control and PMMoV infected *N. benthamiana* plants. Table displays days post-inoculation where significant differences were found at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***). Asymptomatic leaves: old leaves which remain symptomless during all the infection process; F440, blue fluorescence; F520, green fluorescence; F690, red fluorescence; F740, far red fluorescence; PMMoV-I and -S, Italian and Spanish strains of the Pepper Mild Mottle Virus; n.s. no significant differences were found at any dpi assayed; symptomatic leaves, young leaves displaying curling from the first week of the infection time.

| | PMMoV Strain | Asymptomatic leaf | | Symptomatic leaf | |
|------------------|--------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------|-----------------------------|
| | | AB surface | AD surface | AB surface | AD surface |
| F440/F520 | -I | 14-28** | 17**, 28* | n.s. | n.s. |
| | -S | 12-14*, 17** | 17** | n.s. | 17* |
| F440/F690 | -I | 7*, 10**, 12-14***, 17-21**, 24* | 5*, 7**, 10***, 12-17**, 21*, 28* | 10-17***, 21-24* | 7*, 10-14***, 17-21**, 28** |
| | -S | 12-14*, 17** | n.s. | 7*, 10**, 12-17* | 7-10*, 12***, 14**, 17* |
| F440/F740 | -I | 10-12***, 14-21**, 24* | 7**, 10***, 12-14**, 17-21* | 10-17***, 21-24* | 7*, 10-14***, 17-21**, 28* |
| | -S | 14*, 17** | 14* | 7*, 10**, 12-17* | 7-10*, 12-14**, 17** |
| F690/F740 | -I | n.s. | 12-14*, 28* | 10-12* | 12*, 14**, 28* |
| | -S | 17* | n.s. | 10-12*, 14-17** | 7*, 17* |

Fluorescence ratios of symptomatic leaves

In the case of S leaves, every fluorescence ratio assayed was a good indicator of the stress induced by PMMoV infection in *Nicotiana benthamiana* plants, except for F440/F520. However, any of the ratios could establish significant differences between S leaves of infected and control plants before the symptoms appeared.

F440/F520. This fluorescence ratio was very regular along the experiment and between treatments (Fig. 4, Table 2). The only significant difference was found in the last assay point for PMMoV-S infected plants: at 17 dpi in the AD surface of the S leaves, as shown in Figure 5b. No clear trend emerged from the F440/F520 images.

F440/F690 and F440/F740. Young control leaves displayed a slight increase of these parameters along the experiment, being more prominent in the AD surface of these leaves. In contrast to F440/F520, alterations in both F440/F690 and F440/F750 ratios due to the viral infection could be found as early as 7 dpi (Fig. 4,

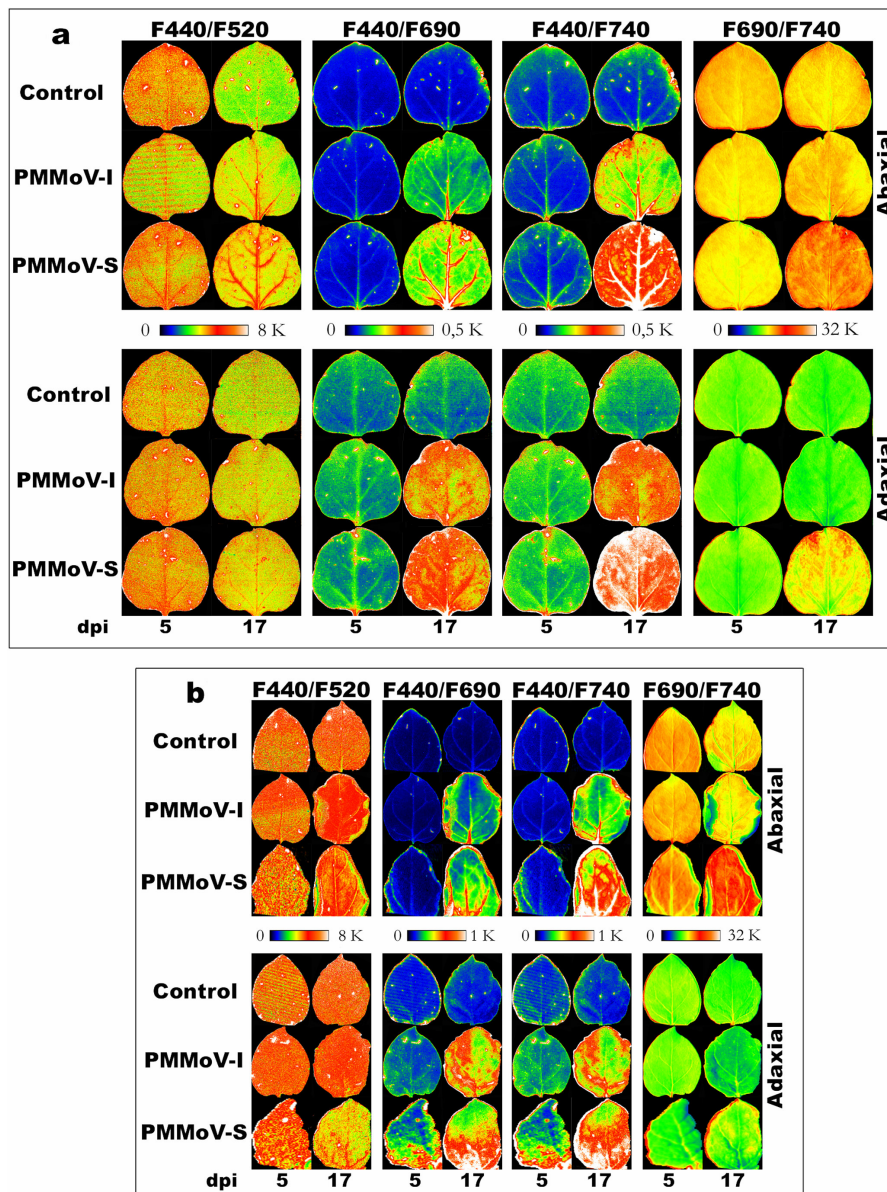


Fig. 5. Images of F440/F520, F440/F690, F440/F740 and F690/F740 fluorescence ratios of AS (a) and S (b) leaves of *Nicotiana benthamiana* control and PMMoV-infected plants. AB and AD surfaces of the leaves are shown. Images obtained before (5 dpi) and after (17 dpi) fluorescence changes occurred are displayed. The applied colour scale is shown for every panel. Different asymptomatic (old) and symptomatic (young) leaves sizes are due to leaf age.

Table 2). Recovery phase of the symptoms on PMMoV-I infected plants was registered as a decrease in this ratios, more evident in the AB surface where no significant differences with control values could be detected at the end of the infection process.

At 5 dpi, both surfaces of control S leaves showed a very uniform F440/F690 and F440/F740 pattern, with slightly increased values of these ratios on the main veins (Fig. 5b). At 17 dpi, this situation continued without great changes. PMMoV infected plants showed similar F440/F690 and F440/F740 values at 5 dpi compared to the controls. Increased values registered in the AD surface were not significant (Table 2). Nevertheless, an increment of the ratios was clear in S leaves of infected plants at 17 dpi. The whole leaf exhibited increased F440/F690 values, emitting the vascular tissues the highest amount of fluorescence. This vein-associated pattern, very similar to that found in AS leaves of infected plants, was more apparent in the AB surface of the S leaves.

F690/F740. AD surface of the 3 treatments displayed lower values of F690/F740 than the AB one (Fig. 4). Changes in the ratios related to a decrease in Chl content of S leaves from PMMoV-S-infected plants were only visible at 17 dpi in the AD surface (Table 2), whereas AB one displayed less Chl content from 10 to 17 dpi (Fig. 4). On the other hand, the two surfaces of the S leaf of PMMoV-I infected plants exhibited a different behaviour depending on the considered leaf surface (Fig. 5b, Table 2.)

Fluorophores determination

HPLC analyses of methanolic extracts from S leaves of *Nicotiana benthamiana* plants revealed the presence of chlorogenic acid (Fig. 6), whose concentration increase during the viral infection. Significant differences with respect to the controls appeared from 7 to 21 dpi for PMMoV-S plants, whereas PMMoV-I infected plants displayed differences only at 14 dpi. The delay is in agreement with the lower virulence of this strain; at the beginning of the recovery

phase (21 dpi), no significant differences could be detected between control and PMMoV-I- infected plants.

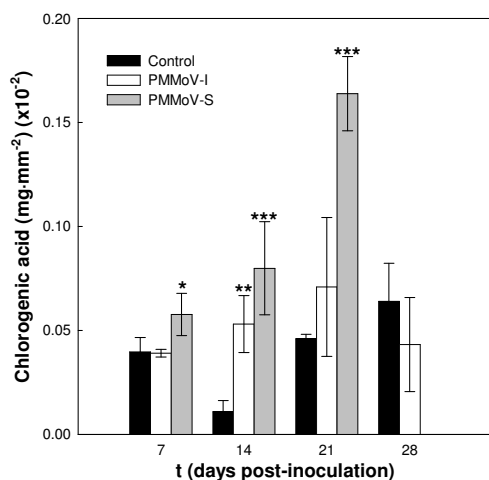


Fig. 6. Time-course of chlorogenic acid concentrations (mg mm⁻²) (x10⁻²) of symptomatic leaves of *Nicotiana benthamiana* control and PMMoV-infected plants.

Viral immunolocalization in symptomatic leaves

To establish a correlation between fluorescence patterns and PMMoV localisation in S plant leaves, tissue prints were carried out using an antibody against the viral coat protein (CP). In S leaves of plants infected with PMMoV-S, the virus was detected at 4 dpi, only in the leaf base (Fig. 7). At 5 dpi the virus was present in almost the whole leaf, while at 6 dpi the leaf appears to be completely invaded. In plants infected with PMMoV-I, the virus localisation pattern was similar, but delayed in time; the first detection occurred at 6 dpi, when the virus had spread through the whole leaf. PMMoV-I was detected even during the symptoms recovery phase (data not shown). The apparent signal detected in control leaves corresponded to rests of Chl due to the imprint technique.

Discussion

Albeit in the last years UV-excited MCF imaging has emerged as a sensitive and specific tool for presymptomatic and non-destructive monitoring of changes in

the physiological state of plants, the application of this technique has not gained ground in the investigation of pathogen attacks, especially viral infections. Nevertheless, Chl-FI has been broadly employed to study such interactions (van Kooten et al. 1990; Balachandran and Osmond 1994; Balachandran et al. 1994; Técsi et al. 1994; Osmond et al. 1998; Lohaus et al. 2000; Chaerle et al. 2004, 2006; Pérez-Bueno et al. 2006). Information about BGF imaging and the corresponding accumulation of secondary metabolites in virus-infected plants is only available for the HR induced by TMV (Chaerle et al. 2007); the present contribution is the first in elucidating such changes during a systemic infection.

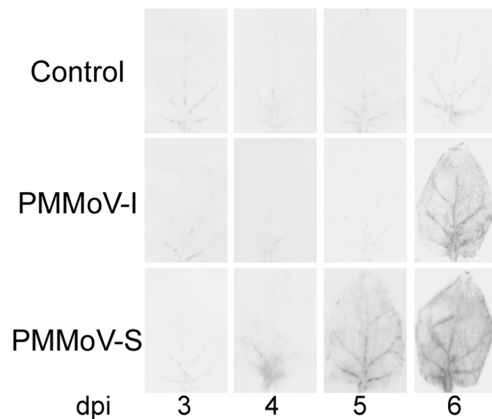


Fig. 7. Tissue prints using a specific antibody against the viral CP at different post-infection times (dpi) from symptomatic leaves.

PMMoV infection in *Nicotiana benthamiana* plants produced an increment in BGF that was higher in the AB side of AS leaves and in the case of PMMoV-S infection; the response of the plant to PMMoV-I is delayed, according to the symptomatology (Rahoutei et al. 2000) and the lower virulence of this strain demonstrated in our previous studies (Chaerle et al. 2006). Areas surrounding the veins showed the highest BGF values; viral-induced BGF increase in the interveinal tissue, is stronger for F520, probably due to the higher accumulation of green fluorophores under long-term stress (Buschmann and Lichtenthaler 1998) and the fact that F520 is less efficiently absorbed by the Chl than F440

(Lichtenthaler et al. 1996). This is supported by the decrease of the F440/F520 ratio during the experiment (Fig. 4). F520 and F440 increase detected in control old leaves (corresponding to the AS in infected plants, Figs. 1 and 2) along the experiment is probably due to accumulation of phenolic compounds and changes in leaf optical properties associated to leaf ageing (Chappelle et al. 1984; Heisel et al. 1996; Cerovic et al. 1999).

BGF measurements in the AB leaf side seem more adequate for following up the viral infection. It is well documented that UV-induced fluorescence signals sensed from the upper and lower leaf side differ considerably in dicotyledonous plants. High amounts of Chl from packed palisade cells of the AD leaf side reabsorb F440 and F690 more efficiently than in the spongy parenchyma of the AB side (Buschmann and Lichtenthaler 1998; Cerovic et al. 1999) and can account for this observation.

Imaging of red fluorescence (F690) in PMMoV-infected plants is well in accordance with our previous data using different Chl-FI setups (Chaerle et al. 2006; Pérez-Bueno et al. 2006). From 14 (PMMoV-S, data not shown) and 17 dpi onwards (PMMoV-I), Chl-F showed a heterogeneous leaf pattern in the AD side, with increased values in the tissue surrounding the main veins. It was demonstrated that this pattern is directly related to the spread of the virus in AS leaves (Chaerle et al. 2006; Pérez-Bueno et al. 2006). Fluorescence changes during pathogenesis in this kind of leaves could not be attributed to alterations in Chl content, because it did not change significantly along the analysed period (Chaerle et al. 2006). The present work also supports this fact, since F690/F740 ratio is similar (PMMoV-S) or even lower (PMMoV-I) than the control values (Figs. 4 and 5). F690/F740 of the AB surface of AS leaves of PMMoV-S infected plants display higher values than the control only very late in the infection process (17 dpi, the last day assayed), but the changes on Chl-F pattern start earlier (14 dpi).

BGF changes preceded (10 dpi PMMoV-S; 12 dpi PMMoV-I) the viral detection by tissue print (14 and 17 dpi, respectively for the two viral strains;

Chaerle et al. 2006) or Northern Blot (Pérez-Bueno 2003) in AS leaves, suggesting an earlier activation of the secondary plant metabolism and the subsequent fluorophore accumulation.

Increases in BGF emission of PMMoV-infected plants are also reflected in the higher F440/F690 and F440/F740 ratios, even on the AD leaf side (Table 2, Fig. 4). Similar increases were reported in Chinese cabbage infected with turnip yellow mosaic virus (Szigeti et al. 2002). These ratios have demonstrated to be the best-suited stress indicators (Schweiger et al. 1996). With the F440/F690 ratio it was possible to detect virus-induced stress earlier (5 dpi AD side and 7 dpi AB side) than with other fluorescence parameters analysed in the case of PMMoV-I infection. F440/F520 was not as efficient as BGF/Chl-F to follow the PMMoV infection.

The recovery phase of PMMoV-I infected plants (21-28 dpi) seem to be also evident in the old leaves, since no significant differences could be found in fluorescence values of either AD or AB surfaces of AS leaves of these plants with respect to the control ones (Fig. 1, Table 1). In addition, the fluorescence ratios decreased to reach values close to the control ones (Table 2, Fig. 4).

A profile analysis of the fluorescence yield along a broader line across the leaf area is possible (Moon et al. 2001; Hideg et al. 2002). Lichtenthaler et al. (2005) used horizontal transects to demonstrate that BGF and Chl-F show a negative contrast in variegated leaves. In the case of *Nicotiana benthamiana* (Fig. 3), this relationship is evident in the vein area of AS leaves. Profiles display the heterogeneous accumulation of blue-green fluorophores, but the Chl-F heterogeneity is poorly represented by these transects, establishing once again that images offer more information about changes originated by PMMoV infection (Chaerle et al. 2006; Pérez-Bueno et al. 2006).

Focusing now on S leaves, first we have to summarize some data about viral movement in the host plant. It is well known that tobamoviruses, such as PMMoV, move rapidly from the inoculated basal leaves to the plant apex (Samuel 1934) *via*

phloem (Roberts et al. 1997; Cheng et al. 2000; Oparka and Santa Cruz 2000). Tissue prints taken from 7-28 dpi of the young leaves showed a quick viral accumulation in the whole leaf during the early infection steps (Chaerle et al 2006). In the present work, we could detect the PMMoV-S entrance in the leaf at 4 dpi and later (5-6 dpi) for the less virulent strain (PMMoV-I), the first visual symptoms appearing one day later. This confirms the rapid viral movement to S leaves in contrast to AS leaves (Chaerle et al. 2006), and could explain the absence of a dynamic imaging Chl-F pattern in S leaves (Fig. 2b). However, averaged whole leaf Chl-F values could distinguish infected leaves from controls, but never in a presymptomatic way (Fig. 1, Table 1). These changes in Chl-F emission preceded the decrease of the Chl content (Chaerle et al. 2006), as F690/F740 ratio showed (Fig. 4, Table 2).

PMMoV detection in the S leaf (Table 1) either preceded alterations in BGF emission or the two processes took place concomitantly (F520 of AB surface of S leaves of PMMoV-S infected plants). As in the case of AS leaves, and due to the same reasons described above, the changes in fluorescence emission on the AB surface of S leaves were more significant. The accumulation of phenolic compounds in S leaves induced by PMMoV, contrary to AS ones, did not precede virus detection. The decrease of BGF values in the S leaves of infected plants between 21-28 dpi, compared with previous points of measurement, was indicative of the symptom recovery phase affecting the young leaves in PMMoV-I infected plants.

To identify the major compounds responsible for the emission of BGF in *N. benthamiana* plants, HPLC analyses of leaves were carried out. Wolfbeis et al. (1985) reviewed a series of natural compounds known to be present in leaves, that emit BGF upon UV excitation. The two main classes of BGF emitters are HCAs and nicotinamide and flavine nucleotides (Lang et al. 1991; Morales et al. 1994; Cerovic et al. 1999). In the methanolic extracts of S leaves from control and PMMoV-infected *N. benthamiana* plants, among the HCAs, chlorogenic acid was

the only HCA detected at high concentrations. Increase in chlorogenic acid concentration in these leaves correlates with the virulence of the viral strain analysed, inducing PMMoV-S the most dramatic changes and reaching this HCA in PMMoV-I infected plants values close to the controls during the recovery phase. In addition, the chlorogenic acid concentrations in S leaves are well in accordance with the BGF values (F440, F520), increasing both of them during the infection with both viral strains. The characteristics of the UV-induced absorption and excitation spectra that we have recorded previously (Sajnani 2005) in leaf pieces from PMMoV-infected plants match those of the chlorogenic acid. This HCA was found to be the most abundant in tobacco plants (Cerovic et al. 2002), being also present in these plants under different environmental conditions (Ounis et al. 2001).

It is well known that biotic and abiotic stress factors induce the phenylpropanoid metabolism (Nicholson and Hammerschmidt 1992; Dixon and Paiva 1995). Increase in the content of phenolic compounds has been demonstrated in plants infected with wheat streak mosaic virus (Kofalvi and Nassuth 1995), as well as during a combined infection with TMV and the potato virus X (PVX) (Balogun and Teraoka 2004). However, little information is available about leaf distribution of phenolic compounds produced during pathogenesis, the existing data only concerning the HR (Chaerle et al. 2007).

Interestingly, in AS leaves of PMMoV-infected plants with a defined spatial pattern of BGF emission at 10-12 dpi (data not shown), we could find similarities between these images and those of the leaf thermal pattern (Chaerle et al. 2006) at 7-10 dpi (viral strain dependent) as well as with the NPQ at 17 dpi (PMMoV-I) (Pérez Bueno et al. 2006) from our previous studies. In addition, those images matched well with the later viral immunolocalization on tissue print at 14-17 dpi. Being the thermal changes (temperature increase due to stomatal closure) the earliest ones during pathogenesis and previous to the viral detection, some systemic plant factors would be involved in them; in our system increase in BGF emission

corresponding to activation of the secondary metabolism occurred 3 days later than thermal changes for every viral strain analysed. Changes in the photosynthetic apparatus, reflected in alteration of the Chl-F pattern, were evident when the virus was already present in the leaf. Some of these changes have to play a role in the defence against the pathogen, because photoinhibition indicating PSII damage was only evident in PMMoV-infected plants at the final infection steps (Rahoutei et al. 2000; Pérez Bueno et al. 2006).

In conclusion, the BGF imaging measured in the AB leaf side could distinguish between the two viral strains, the magnitude of the changes correlating with their virulence. The timing of the response was also delayed in the less virulent one. A symptoms recovery phase in PMMoV-I-infected plants, affecting only the young S leaves, was also demonstrated with these measurements in the last infection steps. BGF emission differs also in S and AS leaves. BGF imaging could detect viral-induced metabolic changes in the absence of symptoms in AS leaves preceding even the viral detection. The situation in S leaves, to which the virus arrives earliest, is more complex, due to the quick invasion by the pathogen; viral spread and changes in BGF emission take place concomitantly. Chlorogenic acid was demonstrated to be the main contributor to the BGF emission in *N. benthamiana* plants. In addition there was a correlation between its levels in developing leaves and the virulence of the tobamovirus.

Taking together, these results indicate that UV-induced fluorescence is a promising tool to visualize a systemic infection before the appearance of visible symptoms and before the pathogen is present.

Acknowledgements

This research and MP's contract was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Education (MEC-FEDER, grant BIO2004-04968-C02-02 to M.B.A.) The authors are very grateful to Drs. Isabel García Luque and Maite

Serra (Centro Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid) for providing all PMMoV solutions and antibodies against the viral coat protein, and to Ruth Sagardoy for her assistance with the HPLC analyses which were supported by an University of Valencia/EEAD-CSIC contract – within the ESA ESRIN contract 19187/05/I-EC – to F.M.. The travel associated with this work was supported by the Spanish-Hungarian Intergovernmental Scientific and Technological Fund (Project number: E-19/04 in Hungary) and *Acciones Integradas* Programme (HH2004-0032 in Spain).

References

- Alonso, E., García-Luque, I., Avila-Rincón, M.J., Wicke, B., Serra, M.T. and Díaz-Ruiz, J.R. (1989) A tobamovirus causing heavy losses in protected pepper crops in Spain. *J. Phytopathol.* 125: 67-76.
- Apostol, S., Viau, A.A., Tremblay, N., Briantais, J.M., Prasher, S., Parent, L.E. and Moya I. (2003) Laser-induced fluorescence signatures as a tool for remote monitoring of water and nitrogen stresses in plants. *Can. J. Remote Sens.* 29: 57-65.
- Balachandran, S. and Osmond, B.C. (1994) Susceptibility of tobacco leaves to photoinhibition following infection with two strains of tobacco mosaic virus under different light and nitrogen nutrition regimes. *Plant Physiol.* 104: 1051-1057.
- Balachandran, S., Osmond, B.C. and Daley, F.P. (1994) Diagnosis of the earliest strain-specific interactions between tobacco mosaic virus and chloroplasts of tobacco leaves in vivo by means of chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiol.* 104: 1059-1065.
- Balachandran, S., Hurry, V.M., Kelley, S.E., Osmond, C.B., Robinson, S.A., Rohozinski, J., Seaton, G.G.R. and Sims, D.A. (1997) Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis. *Physiol. Plant.* 100: 203-213.
- Balogun, O.S. and Teraoka, T. (2004) Time-course analysis of the accumulation of phenols in tomato seedlings infected with *Potato Virus X* and *Tobacco mosaic virus*. *Biokemistri* 16: 112-120.
- Barón, M., Rahoutei, J., Lázaro, J.J. and García-Luque, I. (1995) PSII response to biotic and abiotic

- stress. Mathis P (ed) *Photosynthesis: From Light to Biosphere*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 4: 897-900.
- Berger, S., Papadopoulos, M., Schreiber, U., Kaiser, W. and Roitsch, T. (2004) Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiol. Plant.* 122: 419-428.
- Berger, S., Benediktyová, Z., Matouš, K., Bonfig, K., Mueller, M.J., Nedbal, L. and Roitsch, T. (2007) Visualization of dynamics of plant-pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: Differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*. *J. Exp. Bot.* 58: 797-806.
- Buschmann, C. and Lichtenthaler, H.K. (1998) Principles and characteristics of multi-colour fluorescence imaging of plants. *J. Plant Physiol.* 152: 297-314.
- Buschmann, C., Langsdorf, G. and Lichtenthaler, H.K. (2000) Imaging of the blue, green, and red fluorescence emission of plants: An overview. *Photosynthetica* 38: 483-491.
- Cartelat, A., Cerovic, Z.G., Goulas, Y., Meyer, S., Lelarge, C., Prioul, J.-L., Barbottin, A., Jeuffroy, M.-H., Gate, P., Agati, G. and Moya, I. (2005) Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field. Crop. Res.* 91: 35-49.
- Cerovic, Z.G., Samson, G., Morales, F., Tremblay, N. and Moya, I. (1999) Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. *Agronomie* 19: 543-578.
- Cerovic, Z.G., Ounis, A., Cartelat, A., Latouche, G., Goulas, Y., Meyer, S. and Moya, I. (2002) The use of chlorophyll fluorescence excitation spectra for the non-destructive *in situ* assessment of UV-absorbing compounds in leaves. *Plant Cell. Environ.* 25: 1663-1676.
- Chaerle, L. and Van Der Straeten, D. (2001) Seeing is believing: imaging techniques to monitor plant health. *Biochim. Biophys. Acta* 1519: 153-166.
- Chaerle, L., Hagenbeek, D., De Bruyne, E., Valcke, R. and Van Der Straeten, D. (2004) Thermal and chlorophyll-fluorescence imaging distinguish plant-pathogen interactions at an early stage. *Plant Cell Physiol.* 45: 887-896.
- Chaerle, L., Pineda, M., Romero-Aranda, R., Van Der Straeten, D. and Barón, M. (2006) Robotized thermal and chlorophyll fluorescence imaging of pepper mild mottle virus infection in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Physiol.* 47: 1323-1336.
- Chaerle, L., Lenk, S., Buschmann, C. and Van Der Straeten, D. (2007) Multicolor fluorescence imaging for early detection of the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *J. Plant Physiol.* 164: 253-262.
- Chappelle, E.W., Wood, F.M., McMurtrey, J.E. and Newcomb, W.W. (1984) Laser-induced fluorescence of green plants. 1: A technique for the remote detection of plant stress and

- species differentiation. *Appl. Opt.* 23: 134-138.
- Cheng, N.-H., Su, C.-L., Carter, S.A. and Nelson, R.S. (2000) Vascular invasion routes and systemic accumulation patterns of tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* 23: 349-362.
- Chou, H.M., Bundock, N., Rolfe, A.S. and Scholes, J.D. (2000) Infection of *Arabidopsis thaliana* leaves with *Albugo candida* (white blister rust) causes a reprogramming of host metabolism. *Mol. Plant Pathol.* 2: 99-113.
- Dixon, R.A. and Paiva, N.L. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7 :1085-1097.
- Gitelson, A.A., Buschmann, C. and Lichtenthaler, H.K. (1998) Leaf chlorophyll corrected for reabsorption by means of absorption and reflectance measurements. *J. Plant Physiol.* 152: 283-296.
- Gitelson, A.A., Buschmann, C. and Lichtenthaler, H.K. (1999) The chlorophyll fluorescence ratio F735/F700 as an accurate measure of the chlorophyll content in plants. *Remote Sens. Environ.* 69: 296-302.
- Harris, P.J. and Hartley, R.D. (1976) Detection of bound ferulic acid in cell walls of the Gramineae by ultraviolet fluorescence microscopy. *Nature* 259: 508-510.
- Heisel, F., Sowinska, M., Miehé, J.A., Lang, M. and Lichtenthaler, H.K. (1996) Detection of nutrient deficiencies of maize by laser induced fluorescence imaging. *J. Plant Physiol.* 148: 622-631.
- Hideg, É., Juhász, M., Bornmann, J.F. and Asada, K. (2002) The distribution and possible origin of blue-green fluorescence in control and stressed barley leaves. *Photochem. Photobiol. Sci.* 1: 934-941.
- Kofalvi, S.A. and Nassuth, A. (1995) Influence of wheat streak mosaic virus infection on phenylpropanoid metabolism and the accumulation of phenolics and lignin in wheat. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 47: 365-377.
- Lang, M., Stober, F. and Lichtenthaler, H.K. (1991) Fluorescence emission spectra of plant leaves and plant constituents. *Radiat. Environ. Biophys.* 30: 333-347.
- Lang, M., Lichtenthaler, H.K., Sowinska, M., Heisel, F. and Miehé, J.A. (1996) Fluorescence imaging of water and temperature stress in plant leaves. *J. Plant Physiol.* 148: 613-621.

- Langsdorf, G., Buschmann, C., Sowinska, M., Babani, F., Mokry, M., Timmermann, F. and Lichtenthaler, H.K. (2000) Multicolour fluorescence imaging of sugar beet leaves with different nitrogen status by flash lamp UV-excitation. *Photosynthetica* 38: 539-551.
- Lenk, S. and Buschmann, C. (2006) Distribution of UV-shielding of the epidermis of sun and shade leaves of the beech (*Fagus sylvatica* L.) as monitored by multi-colour fluorescence imaging. *J. Plant Physiol.* 163: 1273-1283.
- Lichtenthaler, H.K., Lang, M., Sowinska, M., Heisel, F. and Miehé, J.A. (1996) Detection of vegetation stress via a new high resolution fluorescence imaging system. *J. Plant Physiol.* 148: 599-612.
- Lichtenthaler, H.K. and Miehé, J.A. (1997) Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends Plant Sci.* 2: 316-320.
- Lichtenthaler, H.K. and Schweiger, J. (1998) Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plants. *J. Plant Physiol.* 152: 272-282.
- Lichtenthaler, H.K. and Babany, F. (2000) Detection of photosynthetic activity and water stress by imaging the red chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 889-895.
- Lichtenthaler, H.K., Langsdorf, G., Lenk, S. and Buschmann, C. (2005) Chlorophyll fluorescence imaging of photosynthetic activity with the flash-lamp fluorescence imaging system. *Photosynthetica* 43: 355-369.
- Lohaus, G., Heldt, H.W. and Osmond, C.B. (2000) Infection with phloem limited Abutilon mosaic virus causes localized carbohydrate accumulation in leaves of *Abutilon striatum*: relationships to symptom development and effects on chlorophyll fluorescence quenching during photosynthetic induction. *Plant Biol.* 2: 161-167.
- Lüdeker, W., Dahn, H.-G. and Günther, K.P. (1996) Detection of fungal infection of plants by laser-induced fluorescence: An attempt to use remote sensing. *J. Plant Physiol.* 148: 579-585.
- Maliga, P., Klessig, D.F., Cashmore, A.R., Grisse, W. and Varner, J.E. (1995) *Methods in Plant Molecular Biology: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor New York.
- Moon, S.K., McMurtrey, J.E., Mulchi, C.L., Daughtry, C.S.T., Chappelle, E.W. and Chen, Y.-R. (2001) Steady-state multispectral fluorescence imaging system for plant leaves. *Appl. Opt.* 40: 157-166.
- Morales, F., Cerovic, Z.G. and Moya, I. (1994) Characterization of blue-green fluorescence in the mesophyll of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves affected by iron deficiency. *Plant Physiol.* 106: 127-133.
- Morales, F., Cerovic, Z.G. and Moya, I. (1996) Time resolved blue-green fluorescence of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. Spectroscopic evidence for the presence of ferulic acid as the main fluorophore of the epidermis. *Biochim. Biophys. Acta* 1273: 251-262.

- Morales, F., Cerovic, Z.G. and Moya, I. (1998) Time-resolved blue-green fluorescence of sugar beet leaves. Temperature-induced changes and consequences for the potential use of blue-green fluorescence as a signature for remote sensing of plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 25: 325-334.
- Morales, F., Cartelat, A., Álvarez-Fernández, A., Moya, I. and Cerovic, Z.G. (2005) Time-resolved spectral studies of blue-green fluorescence of artichoke (*Cynara cardunculus* L. Var. Scolymus) leaves: Identification of chlorogenic acid as one of the major fluorophores and age-mediated changes. *J. Agric. Food Chem.* 53: 9668-9678.
- Nedbal, L. and Whitmarsh, J. (2004) Chlorophyll fluorescence imaging of leaves and fruits. Papageorgiou CG, Govindjee (eds) *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature Photosynthesis*. Springer, Dordrecht. 389-407.
- Nicholson, R.L. and Hammerschmidt, R. (1992) Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 369-389.
- Niemann, G.J., van der Kerk, A., Niessen, W.M.A. and Versluis, K. (1991) Free and cell wall-bound phenolics and other constituents from healthy and fungus-infected carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) stems. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 38: 417-432.
- Nilsson, H.-E. (1995) Remote sensing and image analysis in plant pathology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 15: 489-527.
- Oparka, K.J. and Santa Cruz, S. (2000) The great escape: phloem transport and unloading of macromolecules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 323-347.
- Osmond, C.B., Daley, P.F., Badger, M.R. and Lüttge, U. (1998) Chlorophyll fluorescence quenching during photosynthetic induction in leaves of *Abutilon striatum* Dicks. infected with Abutilon mosaic virus observed with a field-portable system. *Bot. Acta* 111: 390-397.
- Ounis, A., Cerovic, Z.G., Briantais, J.M. and Moya, I. (2001) Dual excitation FLIDAR for the estimation of epidermal UV absorption in leaves and canopies. *Rem. Sens. Environ.* 76: 33-48.
- Pérez-Bueno M (2003) Photosystem II and viral infection. Chlorophyll fluorescence imaging analysis and biosynthesis regulation of the oxygen-evolving-complex proteins during pathogenesis. *PhD Thesis*, University of Granada, Granada, Spain.
- Pérez-Bueno, M.L., Rahoutei, J., Sajjani, C., García-Luque, I. and Barón, M. (2004) Proteomic analysis of the oxygen-evolving complex of photosystem II under biotic stress. Studies on *Nicotiana benthamiana* infected with tobamoviruses. *Proteomics* 4: 418-425.
- Pérez-Bueno, M.L., Ciscato, M., vandeVen, M., García-Luque, I., Valcke, R. and Barón, M. (2006) Imaging viral infection. Studies on *Nicotiana benthamiana* plants infected with the pepper mild mottle tobamovirus. *Photosynth. Res.* 90: 111-123.

- Plumbe, A.M. and Willmer, C.M. (1986) Phytoalexins, water-stress and stomata. III. The effects of some phenolics, fatty acids and some other compounds on stomatal responses. *New Phytol.* 103: 17-22.
- Rahoutei, J., García-Luque, I., Cremona, V. and Barón, M. (1998) Effect of tobamovirus infection on PSII complex of infected plants. Garab G (ed) *Photosynthesis: from light to biosphere*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 4: 2761-2764.
- Rahoutei, J., Barón, M., García-Luque, I., Droppa, M., Neményi, A. and Horváth, G. (1999) Effect of tobamovirus infection on the thermoluminescence characteristics of chloroplast from infected plants. *Z Naturforsch.* 54c: 634-639.
- Rahoutei, J., García-Luque, I. and Barón, M. (2000) Inhibition of photosynthesis by viral infection: Effect on PSII structure and function. *Physiol. Plant* 110: 286-292.
- Roberts, A.G., Santa Cruz, S., Roberts, I.M., Prior, D.A.M., Turgeon, R. and Oparka, K.J. (1997) Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana* comparison of a fluorescent solute with fluorescent virus. *Plant Cell* 9: 1381-1396.
- Rolfe, A.S. and Scholes, J.D. (1995) Quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *New Phytol.* 131: 69-79.
- Ruíz del Pino, M., Moreno, A., García de Lacoba, M., Castillo-Lluva, S., Gilardi, P., Serra, M.T. and García-Luque, I. (2003) Biological and molecular characterization of P101 isolate, a tobamoviral pepper strain from Bulgaria. *Arch Virol.* 148: 2115-2135.
- Sajnani, C. (2005) Viral infections as stress factor in photosynthesis. *PhD Thesis*, University of Granada, Granada, Spain.
- Samuel, G. (1934). The movement of tobacco mosaic virus within the plant. *Ann. Appl. Biol.* 21: 90-111.
- Scharte, J., Schon, H. and Weiss, E. (2005) Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. *Plant Cell Environ.* 28: 1421-1435.
- Scholes, J.D. and Rolfe, S.A. (1996) Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *Planta* 199: 573-582.

- Schweiger, J., Lang, M. and Lichtenthaler, H.K. (1996) Differences in fluorescence excitation spectra of leaves between stressed and non-stressed plants. *J. Plant Physiol.* 148: 536-547.
- Szigeti, Z., Almási, A. and Sárvári, É. (2002) Changes in the photosynthetic functions in leaves of Chinese cabbage infected with turnip yellow mosaic virus. *Acta Biologica Szegediensis* 46: 137-138.
- Técsi, L.I., Maule, A.J., Smith, A.M. and Leegood, R.C. (1994) Complex, localized changes in CO₂ assimilation and starch content associated with the susceptible interaction between cucumber mosaic virus and a cucurbit host. *Plant J.* 5: 837-847.
- van Kooten, O., Meurs, C. and Van Loon, L.C. (1990) Photosynthetic electron transport in tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol. Plant* 80: 446-452.
- Wetter, C., Conti, M., Alschuh, D., Tabillion, R. and van Regemortel, M.H.V. (1984) Pepper mild mottle virus, a tobamovirus infecting pepper cultivars in Sicily. *Phytopathology* 74: 405-410.
- Wolfbeis, O.S. (1985) Fluorescence of organic natural products. In: Schulman SG (ed) *Molecular luminescence spectroscopy: Methods and application*. Part I. John Wiley & Sons, New York, 167.

C.3. Conventional and combinatorial chlorophyll fluorescence imaging of tobamovirus--infected plants

Pineda, M.¹, Soukupová, J.², Matouš, K.², Barón, M^{1,*}. and Nedbal, L^{2,*}.

1. Department of Biochemistry, Molecular and Cell Biology of Plants. Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. C/ Profesor Albareda, nº 1. C.P. 18008. Granada, Spain

2. Institute of Systems Biology and Ecology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Zámek 136, Nové Hradky 37333, Czech Republic / Institute of Physical Biology, University of S. Bohemia, Zámek 136, Nové Hradky 37333, Czech Republic.

Corresponding authors: nedbal@greentech.cz, Phone: +420 386361231 Fax: +420 386361231; mbaron@eez.csic.es, Phone +34958181600 Fax +34958129600.

Abstract: Chlorophyll fluorescence imaging (Chl-F) has proved to be an useful tool to study the spatial and temporal heterogeneity of leaf photosynthesis under biotic stress. In the present work we have compared the effect of two strains of the same virus (Italian and Spanish strains of the pepper mild mottle virus, PMMoV-I and -S, respectively) in the host plant *Nicotiana benthamiana* by means of kinetic Chl fluorescence imaging. We have followed the viral infections using conventional quenching protocols to obtain images of Chl-F parameters that are related to well-established photosynthetic processes or pathways; in addition, we have carried out advanced statistical approach in order to obtain a combinatorial set of images showing differences between control and PMMoV-infected plants earlier in the infection process. From our results, NPQ consolidates as a good PMMoV infection reporter in symptomless leaves of *Nicotiana benthamiana* in the intermediate infection steps. However, the newly found fluorescence signals obtained by combinatorial imaging (including *feature selection*) revealed the

infection earlier than the standard Chl-F parameters (4 and 6 dpi: PMMoV-S and –I, respectively).

Abbreviations: A, photosynthesis rate; AS, asymptomatic; Chl, chlorophyll; Chl-F, chlorophyll fluorescence; Chl-FI, chlorophyll fluorescence imaging; dpi, days post-inoculation, dpi, days post-inoculation; F_0 , minimum chlorophyll fluorescence in the dark adapted state; F_5/F_0 , chlorophyll fluorescence value at 5 s of the induction curve normalized to the minimum fluorescence in the dark-adapted state (protocol 3); F_M , maximum chlorophyll fluorescence in the dark adapted state; F_M' , maximum chlorophyll fluorescence in the light adapted state; $F_{M(1)'}'$, maximum chlorophyll fluorescence at 2 s of the induction kinetic (protocol 2); $F_{M(2)'}'$, maximum chlorophyll fluorescence at 90 s of the induction kinetic (protocol 2); $F_{M(1)''}$, maximum chlorophyll fluorescence after 5 s of switching off the actinic light (protocol 2); $F_{M(2)''}$, maximum chlorophyll fluorescence after 16 s of switching off the actinic light (protocol 2); F_P , maximum chlorophyll fluorescence reached at the induction curve without saturating flashes; F_t , chlorophyll fluorescence value prior to the saturating pulse; F_v/F_M , maximum PSII quantum yield in the dark-adapted state; HL, high light ($200 \mu\text{mol (photons)}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$); LL, low light ($50 \mu\text{mol (photons)}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$); IRGA, infrared gas analyzer; Φ_{PSII} , PSII quantum yield; Φ_{PSII} , PSII quantum yield at referred kinetics time; NPQ, non photochemical quenching; NPQ_{20} , non photochemical quenching at 20 s of the induction kinetic; PMMoV-S and –I, Spanish and Italian strains of the pepper mild mottle virus; PSII, photosystem II;

Introduction

Chlorophyll fluorescence imaging (Chl-FI) is an useful tool to study the spatial and temporal heterogeneity of leaf photosynthesis under biotic stress (Nedbal and Whitmarsh 2004), allowing the diagnosis and quantification of different stress responses on the basis of their characteristic *disease-specific*

signatures (Chaerle et al. 2004, 2007). Chl-FI, combined with other imaging techniques, allowed distinguishing between infections with different pathogens (Chaerle et al. 2004). Changes in red fluorescence emission (Chl-F) could be related with physiological alterations on infected plants (Scholes and Rolfe 1996, Chou et al. 2000, Berger et al. 2004, 2007, Bonfig et al. 2006, Swarbrick et al. 2006). Photoinhibitory damage in infected plants (Balachandran and Osmond 1994, Balachandran et al. 1994) has been also detected by the measurement of changes on fluorescence parameters.

Recent Chl-FI instruments allow application of complex measuring protocols with different dark adaptation-times of the plant and periods of constant actinic light, both supplemented by saturating bright flashes. Thus, different types of light protocols have been used to reveal differences between healthy and stressed plants: obtaining fluorescence values after just one saturating flash (Chaerle et al. 2004, 2006), Kautsky kinetics (Kautsky and Hirsch 1931), harmonic oscillations (Nedbal and Brezina 2002, Nedbal et al. 2003, Matouš et al. 2007), quenching analysis with different number of saturating flashes (Pérez-Bueno et al. 2006) and combined with various actinic light intensities (Berger et al. 2007, Matouš et al. 2007).

During the quenching analysis, huge information is provided because of the great number of fluorescence parameters obtained associated to the photosynthetic function. Some coefficients are related with photochemical processes, as F_V/F_M and Φ_{PSII} , which indicate the maximum and effective quantum yield of photosystem (PSII) (Genty et al. 1989); or with the non photochemical processes, the most straightforward is NPQ (non photochemical quenching, Bilger and Björkman 1990). A coefficient giving information about the vitality of the plants (R_{FD} , Lichtenthaler and Rinderle 1988) has also been broadly used, and can be calculated from Kautsky kinetics and quenching analysis. Lists of Chl-F parameters related to different physiological functions have been reviewed by several authors (e.g., Schreiber et al. 1986, Roháček and Barták 1999, Maxwell and Johnson 2000).

Images of them obtained in every kinetic point could provide a good/early stress indicator to follow pathogenesis (Pérez-Bueno et al. 2006).

However, standard Chl-F parameters not always reveal the maximal differences between healthy and infected tissues along the infection, when complex spatial and temporal changes are occurring. In this context, Soukupová et al. (2003) proposed a simple experimental algorithm to assess the impact of the treatment by fungal phytotoxins in canola and white mustard. More recently, Berger et al. (2007) and Matouš et al. (2007) described combinatorial imaging methods to map bacterial infection in *Arabidopsis*. This method searches small sets of images, obtained during Chl-F transient, giving the highest contrast between the stressed and control leaf tissue and can be used to image the pathogen action during the early infection phase.

The experimental host-pathogen system studied was *Nicotiana benthamiana* plants infected with the Italian and Spanish strains of the pepper mild mottle virus (PMMoV-I and -S, respectively). In previous studies (Barón et al. 1995, Rahoutei et al. 1998, 1999, 2000, Pérez-Bueno et al. 2004), we have analysed the effect of both PMMoV-I and -S infection upon photosynthesis in these plants, and propose the oxygen-evolving complex (OEC) as main target of tobamovirus on the electron transport chain. Chl-FI studies of *Nicotiana benthamiana* plants infected with PMMoV-I revealed that NPQ was a good reporter of the infection process as early as 17 days post-inoculation (dpi). In leaves, which remain asymptomatic (AS) during the infection process, NPQ changes were parallel to the virus spreading in these leaves (Pérez-Bueno et al. 2006). Chaerle et al. (2006) studied thermal and fluorescence responses in *Nicotiana benthamiana* plants infected with either PMMoV-S or -I. They found that infection with PMMoV-S induced earlier alterations than PMMoV-I (14 dpi vs. 17 dpi) in the fluorescence pattern of AS leaves from infected plants. However, as the first reporter of viral infection was observed the temperature increment registered near the main veins (7 dpi in the

case of PMMoV-S infection, 10 dpi in the case of PMMoV-I one), which expanded to the rest of the leaf tissues in successive days.

The aim of the present study was to identify differences between the infection processes induced by distinct strains of the same virus (PMMoV), using conventional Chl-F parameters that are related to well-established photosynthetic processes or pathways. In addition, we investigated PMMoV infection in *Nicotiana benthamiana* plants using novel protocols and statistical approaches that were earlier shown to reveal very early phases of infection with pathogenic bacteria (Berger et al. 2007, Matouš et al. 2007).

Material and methods

Plant and virus

Four experiments were carried out in quadruplicates. *N. benthamiana* Gray plants were cultivated in a growth chamber at $100 \mu\text{mol (photons)}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR (photosynthetically-active radiation), generated by cool white fluorescent lamps, with a 16/8 h light/dark photoperiod, a temperature regime of 24/18°C (day/night) and a relative humidity of 65%.

At the 6-7 fully-expanded leaves stage, plants were inoculated with PMMoV in the three lower leaves, using 25 μl of inocula per leaf (50 μg of tobamovirus per ml of 20 mM sodium phosphate/biphosphate buffer pH 7.0). Two strains of PMMoV were used in the experiment: Italian (PMMoV-I) and Spanish strain (PMMoV-S). Mock-inoculated plants were treated with buffer only. The origin of the Italian and Spanish strain of PMMoV has been previously reported (Alonso et al. 1989, Wetter et al. 1984, respectively).

Starting with the lowest inoculated leaf and numbering leaves in ascending order, we have analysed leaf number 5 as the AS one.

Chlorophyll fluorescence measurements

Chl-F measurements were performed by a commercial kinetic chlorophyll fluorescence instrument FluorCam (PSI, Ltd. Czech Republic; www.psi.cz), described by Nedbal et al. (2000). Chl-F emission from a leaf is emitted by two panels of light emitting diodes (LEDs) ($\lambda_{\max} \approx 635$ nm) that generate measuring light flashes and actinic light. Brief intense saturating light pulses were generated by a 250 W halogen lamp. The Chl-F emission transients are captured by a CCD (charged coupled device) camera in series of images with a resolution of 512x512 pixels. The scattered excitation light is blocked by RG697 filter.

N. benthamiana plants were dark-adapted for 40 min prior each measurement. The kinetic of pathogenesis of both PMMoV-S and PMMoV-I in *Nicotiana benthamiana* plants was followed by capturing images of fluorescence kinetic from AS leaves of infected plants and their respective controls under three measuring protocols:

- 1) Protocol 1. This quenching analysis was previously described by Pérez-Bueno et al. (2006). Here, F_0 and F_M measurement on dark-adapted leaves was followed by 16 s of dark. Then, the leaves were illuminated with continuous actinic light ($100 \mu\text{mol (photons)} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) for 302 s supplemented with 11 saturating pulses to measure F_M' ($1500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 1s; at 2, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240 and 300 s of actinic irradiance).
- 2) Protocol 2. This quenching analysis was carried out using two actinic light irradiance levels and four saturating light pulses. After measurements of F_0 and F_M levels, a short dark relaxation (16 s) followed. Then, the leaf was exposed to a low actinic light (LL, $50 \mu\text{mol (photons)} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) for 100 s and the corresponding Chl-F induction was recorded. Two saturation pulses ($1500 \mu\text{mol (photons)} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, at 2 and 90 s after switching on the actinic light) were applied to measure $F_{M(1)}'$ and $F_{M(2)}'$ (respectively), to probe the light-induced quenching. A short

dark adaptation (16 s) followed by two other saturating pulses (5 s - $F_{M(1)}$ ' and 16 s - $F_{M(2)}$ ' - after switching off the actinic light) allows the measurement of NPQ recovery. These measurements followed by 600 s of dark-adaptation and then by an identical sequence of measurements under higher actinic light intensity (HL, 200 $\mu\text{mol (photons)}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

- 3) Protocol 3. The Chl-F induction curve (Kautsky effect) was measured under continuous actinic irradiance at both LL and HL. Previously, F_0 was recorded. A dark period (600 s) was established between LL and HL measurements.

Image selection and data analysis

A large amount of information was obtained as a function of the post-infection time, virus strain and selected fluorescence parameter. Images of the fluorescence parameters showing the highest contrast between leaves from control and infected plants were selected.

When using protocols 1 and 2, Chl-F signal was integrated over the entire leaf area and standard Chl-F parameters were calculated, according to Maxwell and Johnson (2000). Among them, NPQ and Φ_{PSII} were the best indicators of the PMMoV infection, as we describe in Results.

$$\text{NPQ} = (F_M - F_M') / F_M'$$

$$\Phi_{\text{PSII}} = (F_M' - F_0) / F_M'$$

Differences between the Chl-F transients under actinic light (protocols 2 and 3) from infected leaves and their corresponding controls were displayed in % and calculated according to following equation:

$$\text{Differences} = 100 \cdot [(F_I - F_C) / F_C]$$

where: F_I – Chl-F yield of infected leaf; F_C – Chl-F yield of control leaf.

Images of both standard and novel Chl-F parameters showing high difference between control and infected leaves were displayed in false-scale color scale,

where the blue color represents the lowest value and the red color represents the highest one.

Combinatorial imaging

For selection of the relevant images during tobamoviral infection on *Nicotiana benthamiana*, we used the method of Sequential Forward Floating Search (Pudil et al. 1994). As a separability criterion we used error rate of k -NN classifier ($k=3$), which is a method classifying unknown objects (in our case Chl-F kinetics) on the base of their Euclidian distance to the training samples.

Here, we use measurements of Chl-F transient under protocol 2 as a dataset for the combinatorial imaging. Measurements (4 repetitions) carried out in AS leaves of every plant group –control, PMMoV-I and PMMoV-S-infected- were analyzed. The Chl-F transients of control leaves were used as the first (control) class and those of plants infected with PMMoV-S as the second (infected) class. PMMoV-S infected plants were chosen because of the higher virulence of this virus strain (Rahoutei et al. 2000). The classifier was trained to find the differences between controls and PMMoV-S infected leaves at 16 dpi, the middle phase of the infection, and to resolve these two classes. When the set of the 3 most contrasting features (images) with the lowest error rate was found, it was used to evaluate the difference among control and PMMoV-S as well as PMMoV-I infected plants during the whole infection.

LDA (Linear Discriminant Analysis) algorithm (Fukunaga 1990) was used to find the linear combination of the 3 most contrasting images into one. This resultant image was shown in false colour scale. The method is described in detail by Matouš et al. (2007).

IRGA measurements

Photosynthesis rate (A) was determined on a 100 mm² leaf area at the leaf apex by IRGA (infrared gas analyzer) in an open system at ambient partial

pressures of carbon dioxide and water vapor, using a portable photosynthesis system (LI-6400, Li-Cor Inc., Lincoln NE, USA, www.licor.com). Within the cuvette, average leaf temperature was $29 \pm 1^\circ\text{C}$. During gas exchange measurements, constant irradiance ($300 \mu\text{mol (photons)}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) was supplied by Qbeam solid state LED lighting system attached to the leaf cuvette (6400-02B LED, Li-Cor Inc., Lincoln NE, USA). Flow rate through the assimilation chamber was maintained at $800 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$. Six different leaves were considered for data calculation.

Results

Study of standard Chl-F parameters during quenching analysis (protocol 1)

We have analysed different conventional Chl-F parameters after measurements using protocol 1, in order to find those that can discriminate the infection with two similar strains of the PMMoV in the early infection steps and in absence of symptoms. NPQ and Φ_{PSII} were found to be the best reporters of PMMoV infection in *N. benthamiana* plants among the standard parameters.

The earliest changes on NPQ pattern were detected at 17 dpi, as Fig. 1a shows. NPQ images of AS leaves of plants infected with the two virus strains (PMMoV-I and PMMoV-S) were compared with the corresponding leaves from control plants. A heterogeneous pattern of energy dissipation in the AS leaves of infected plants, consisting in different NPQ values in leaf tissue surrounding main veins and in the interveinal tissue. The NPQ pattern started to be visible in NPQ images taken 20 s after switching on the actinic light (NPQ₂₀), the highest contrast was achieved at 60 s and became less patent from 90-120 s.

Figure 1b displays dynamics of NPQ₂₀ distribution over the leaves during the first 28 dpi. NPQ₂₀ was the kinetic point showing the biggest differences between control and PMMoV-infected plants along the whole infection. Prior to 17 dpi, we could not find any significant response in NPQ₂₀ pattern, except in the case of AS

leaf from PMMoV-S infected plant, which displayed certain higher NPQ₂₀ beside the petiole at 14 dpi, depending on the sample assayed.

Considering the signal over the whole leaf, NPQ was higher in the infected plants compared to control at 17 dpi (Fig.1a) and the relationship became inverse between 19 and 28 dpi (Fig. 1b).

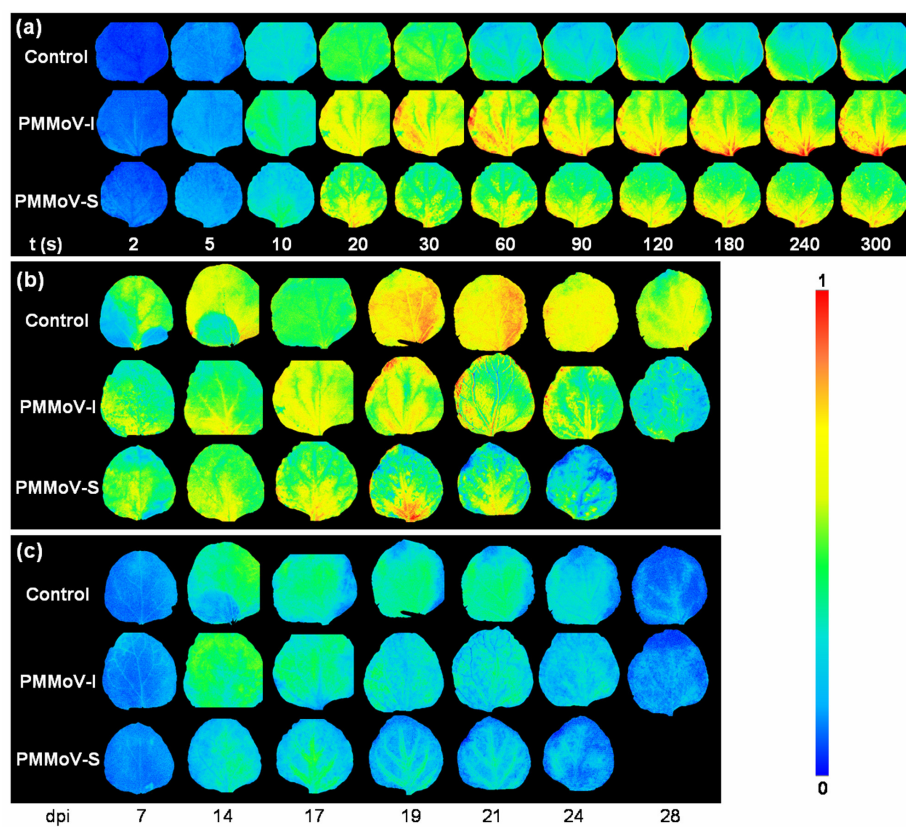


Fig. 1: Images of classical Chl-F parameters obtained by measurements using protocol 1 in AS leaves from control and both PMMoV-I and PMMoV-S infected plants. (a) NPQ kinetic at 17 dpi. (b) NPQ₂₀ pattern at different dpi (displayed at the bottom of the figure). (c) Φ_{PSII2} pattern at different dpi. The colour scale indicates the intensity of the signal.

The analysis of the spatial pattern of Φ_{PSII} , other frequently used conventional Chl-F reporter parameter, displayed differences between PMMoV-S infected and control plants, first at 17 dpi. The Φ_{PSII} pattern was obvious only at 2 s after switching on the actinic light (Φ_{PSII_2}). We have followed the Φ_{PSII_2} pattern along the infection (Fig. 1c). AS leaves of PMMoV-S-infected plants displayed a characteristic spatial pattern between 17-24 dpi, with higher Φ_{PSII_2} in the tissues surrounding the main veins than in interveinal tissues. The Φ_{PSII_2} pattern was more homogeneous over the whole leaf in case of PMMoV-I and control plants. This parameter allows a good differentiation between the infections with either viral strain.

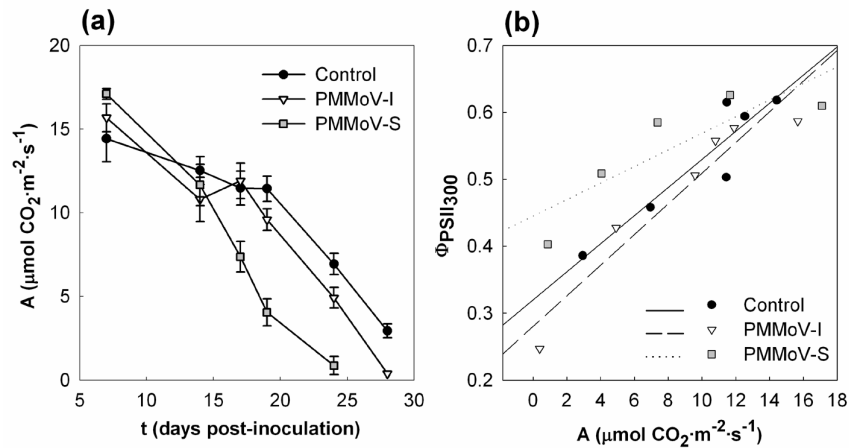


Fig. 2: Analysis of data obtained under fluorescence measuring protocol 1 or by means of IRGA in AS leaves from control and infected plants. (a) Net photosynthesis rates (A) measured at different dpi by the IRGA; (b) Linear correlation between A and $\Phi_{\text{PSII}_{300}}$. Correlation factor (r) were 0.927 (control), 0.956 (PMMoV-I infected plants) and 0.859 (PMMoV-S infected plants).

To link changes on fluorescence parameters with alteration in the photosynthetic process, infrared gas analysis (IRGA) measurements were carried out in AS leaves from infected plants and their corresponding controls (Fig. 2a). The rate of net photosynthesis (A) decreased both in controls and infected plants

from 14 dpi onwards. A significant decrease of this rate compared with the control values was observed in infected plants at 17 dpi (PMMoV-S) and 19 dpi (PMMoV-I). This delay agrees with the less virulence of the last viral strain. In addition, we have made a correlation analysis between $\Phi_{\text{PSII}_{300}}$ (PSII quantum yield at the steady state, i.e. at 300 s of the induction kinetic) averaged in the whole leaf and the rate of net photosynthesis (Fig. 2b). A positive correlation was established in the case of control and infected plants, with $r = 0.927$ (control plants), $r = 0.956$ (PMMoV-I-infected plants) and $r = 0.859$ (PMMoV-S-infected plants).

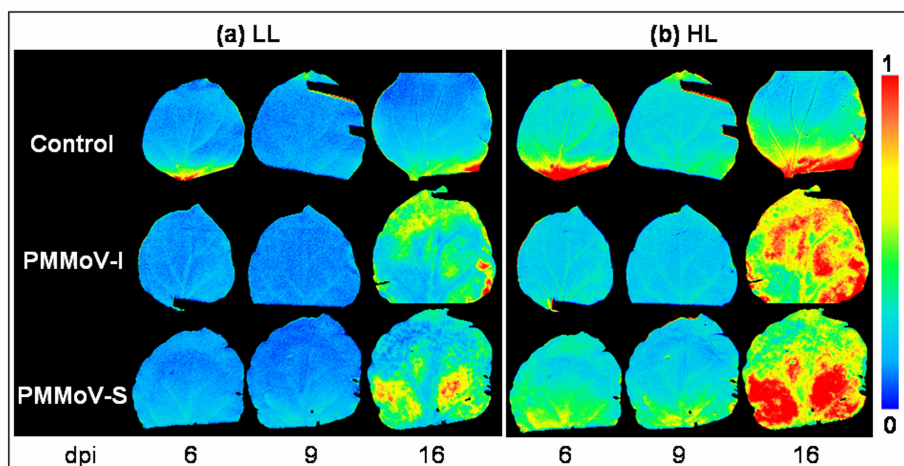


Fig. 3: Images obtained under measuring protocol 2 at different dpi (indicated at the bottom of the figure). NPQ at 5 s after switching off the actinic light at low light (a) and high light (b).

Analysis of Chl-F parameters and Chl-F kinetics (protocol 2)

To test whether we can detect viral-induced changes in the host plant earlier than 17 dpi in AS leaves, we applied measuring light protocols with two intensities of actinic irradiances (measuring protocol 2), more suitable for early pathogen detection (see Discussion).

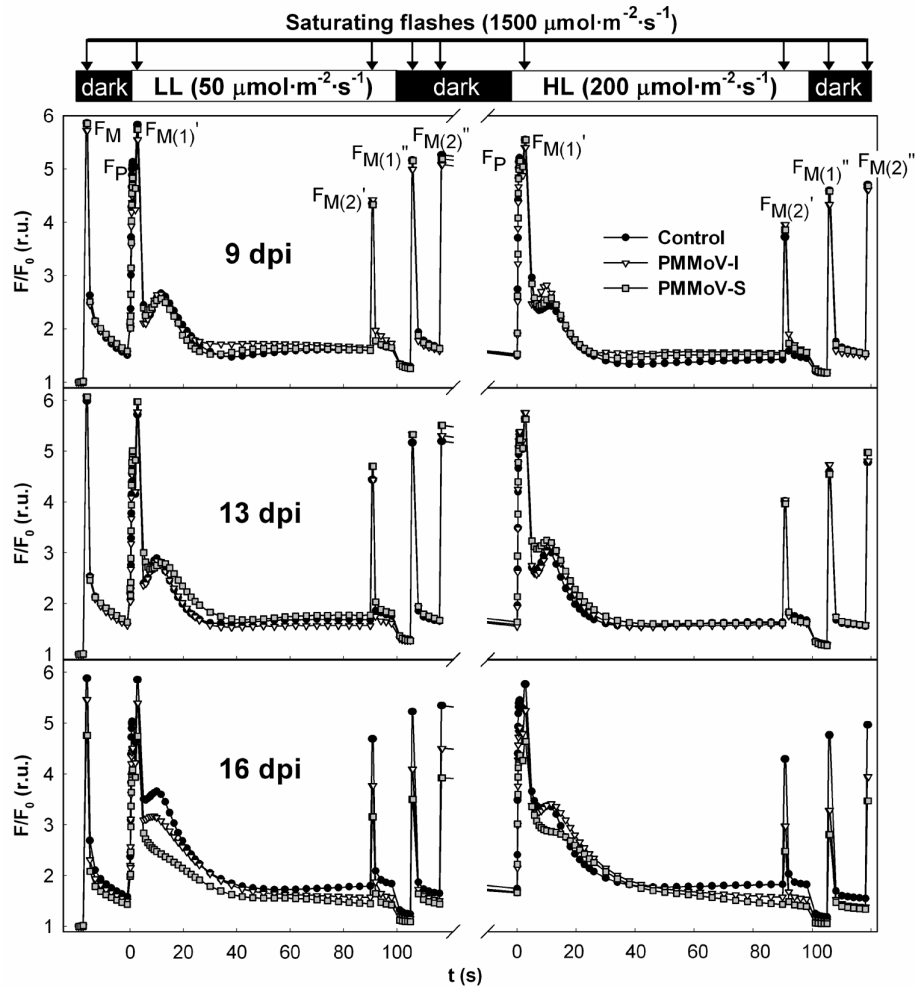


Fig. 4: Chl fluorescence transients of AS leaves measured with protocol 2 at different dpi. A brief picture of the protocol is at the top of the figure, and the distinct peaks (F_M , F_P , $F_{M(1)'}$, $F_{M(2)'}$, $F_{M(1)''}$ and $F_{M(2)''}$) are depicted in the 9 dpi transient Chl-F kinetic.

Here, we also calculated several standard Chl-F parameters. As we expected, the first differences between control and PMMoV-infected plants were detected at 16 dpi in the NPQ under LL and HL; at the second saturation pulse in light ($F_{M(2)'}$, 90 s), and at the both saturating pulses during the short dark period at the end of the measurement ($F_{M(1)''}$ and $F_{M(2)''}$, i. e., 5 and 16 s after switching off the actinic

light). Fig. 3 shows the NPQ images of the AS leaves obtained at the first saturating pulse in the dark under both LL and HL, where the contrast between control and infected leaves was the highest.

Since the analysis of standard Chl-F parameters was not successful in revealing differences between controls and infected plants prior to 16 - 17 dpi, we evaluated difference between the Chl-F transients of control and infected plants under measuring protocol 2 (Fig. 4). The integrative Chl-F signal over the AS leaves of infected plants started to differ from control at 13 dpi under LL; and became more evident at 16 dpi under both light intensities. The differences between the Chl-F transients of control and infected plants were observed during the Chl-F decline from the local transient maximum level (F_p).

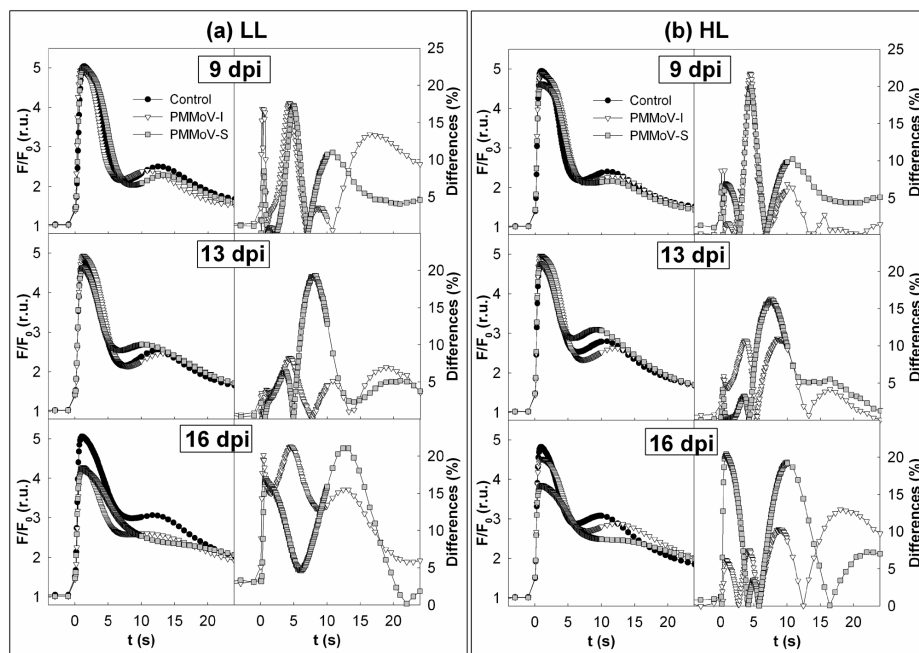


Fig. 5: Kautsky kinetics registered under protocol 3 at low (LL, a) and high light (HL, b) in AS leaves from control and infected plants (left panels). Differences (%) between control and infected plants (right panels) at different dpi.

Analysis of Kautsky kinetic (protocol 3)

Since the main changes between control and infected plants were found during the Chl-F decline from F_p , we applied only actinic irradiance without saturating flashes and measured the Kautsky curve of AS leaves under LL and HL (Fig. 5a and b, left panels). The remarkable differences (%) between Chl-F transients of control and infected plants were found in the first part of the curve, during the Chl-F increase and decline from F_p (Fig. 5a and b, right panels). At 9 dpi, transients of AS leaves from PMMoV-infected plants differed from that of control at 1 s (F_1/F_0) and 5 s (F_5/F_0) after switching on the incident irradiance. The feature for F_5/F_0 was observed both under LL and HL, being the difference slightly higher in HL. Although at 13 dpi this feature persisted even at lower values, another peak appeared at 7 s, which was associated with the PMMoV-S infection; and the difference between the transient of PMMoV-I infected leaf and control was lowered ($\leq 10\%$). At 16 dpi the transients differed in various time points.

Images of Chl-F distribution over the leaves confirmed these results. Fig. 6 displays dynamics of F_5/F_0 distribution over leaves during infection, since it was the parameter in which both PMMoV-S and PMMoV-I infected leaves differed from controls at 9 dpi. AS leaves of both infected plants showed a spatial pattern of F_5/F_0 at 9 dpi under HL, with a lower intensity of the Chl-F signal surrounding main veins, whereas control leaf exhibited homogeneous distribution of the Chl-F emission. Along the infection progress, the infected leaves showed a higher value of this parameter in the interveinal parts, started from the edges. Chl-F signal of control leaf remained low and homogeneous until 16 dpi.

Combinatorial imaging (protocol 2)

We applied the advanced statistical method (see Material and Methods, Matouš et al. 2007) to find the most contrasting images between control and infected plants captured during the Chl-F transients under measuring protocol 2.

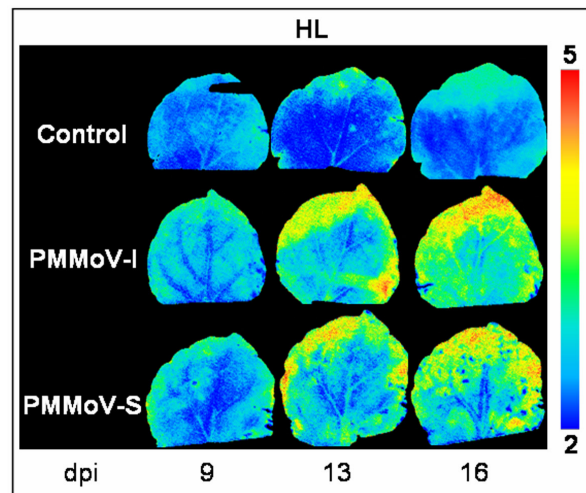


Fig. 6: Images of F_5/F_0 parameter under high light (HL) at different dpi captured using measuring protocol 3.

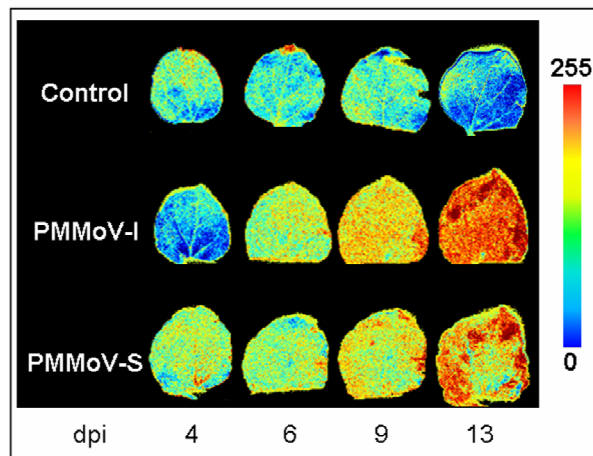


Fig. 7: *Feature selection* analysis of AS leaves measured by protocol 2. The colour scale indicates the intensity of the signal.

We found the biggest difference during the transient decrease from F_p , in the images $[I(t)]$ taken at $t_1 = 5$ s, $t_2 = 21$ s, and $t_3 = 736$ s (i.e., at 5 and 21 s of LL, and

16 s of HL). Once applied the LDA algorithm, we found a linear combination of the 3 most contrasting images into one resultant image, which displayed the best contrast between the control and infected plants. The resultant image (R) was calculated pixel-by-pixel according to this equation:

$$R = -0.155 \cdot I(5 \text{ s}) - 0.574 \cdot I(21 \text{ s}) + 0.804 \cdot I(736 \text{ s})$$

Fig. 7 shows the resultant images of AS leaves from controls as well as PMMoV-I and PMMoV-S infected plants at different dpi. Using this combinatorial imaging was the PMMoV infection detected already at 4 and 6 dpi (for PMMoV-S and -I, respectively).

Discussion

Chl-FI has been broadly applied to study biotic stress on plants (Nedbal and Whitmarsh 2004), since it makes possible to follow the physiological alterations that stress factors induce in leaves from infected plants (Lichtenthaler and Miehe 1997). This technique was successful to follow the effect of folivory damage (Zangerl et al. 2002, Aldea et al. 2006, Tang et al. 2006), as well as fungal (Scholes and Rolfe 1996, Chou et al. 2000, Swarbrick et al. 2006), bacterial (Berger et al. 2004, 2007, Bonfig et al. 2006) and viral infections (Balachandran and Osmond 1994, Balachandran et al. 1994, Osmond et al. 1998, Lohaus et al. 2000, Chaerle et al. 2004). Our previous works with PMMoV-infected plants showed that images of both Chl-F under one saturating flash (Chaerle et al. 2006) and NPQ (Pérez-Bueno et al. 2006) could reflect the viral distribution on leaves which remain asymptomatic during the viral infection. Some authors (Osmond et al. 1998, Lohaus et al. 2000) have proposed that NPQ images reproduce the state of symptom development

In this study, conventional and combinatorial Chl-F imaging of leaf was used to detect the early phase of infection and to differentiate the infection with two viral strains of PMMoV on *Nicotiana benthamiana* plants. .

According to Pérez-Bueno et al. (2006), in the present study PMMoV-I

infection induced in the AS leaf from the host plant a complex and characteristic NPQ pattern from 16-17 dpi onwards (Fig. 1a, 1b, 3). This pattern is better defined in PMMoV-S infected plants. NPQ pattern at 17 dpi corresponds with the viral location in these leaves at the same infection points, tested by tissue print in our previous work (Chaerle et al. 2006, Pérez-Bueno et al. 2006). Changes on NPQ pattern could not be attributed to a viral-induced decrease of the leaf Chl content; only at the last infection steps Chl amount decreased even in the case of control plants (Rahoutei et al 2000, Chaerle et al. 2006). At this time, senescence processes are predominant in the old leaves, since non-photochemical as well as photochemical processes are totally down-regulated, as the lowest NPQ and Φ_{PSII} values reflect (Fig. 1). According to our results and those by other authors (Chou et al. 2000, Berger et al. 2004), changes in NPQ values in the regions colonized by the pathogen are a relevant phenomenon in plant pathogenesis. NPQ increase may have different origins. It is well established that virus induce disturbances in the donor site of PSII due to a decrease in the amount of the extrinsic protein levels (Rahoutei et al. 2000, Pérez-Bueno et al. 2004) that may lead to the appearance of *dissipative* PSII centres (van Wijk et al. 1993, Critchley and Russell 1994). Viruses also induce disturbances in the Benson-Calvin cycle that can increase the intrathylakoidal pH gradient, which modulates the NPQ process (Ruban and Horton 1995). Other process regulating the intrathylakoidal pH gradient is the cyclic electron transport around PSI (photosystem I) (Horton et al. 2005), which is stimulated during viral infection (Sajani et al. 2007). The higher NPQ values during the viral infection could be a host defence response delaying photoinhibition until the final infection steps (Balachandran et al. 1997), as revealed as a late (19-21 dpi onwards for PMMoV-S and -I, respectively) decrease in F_v/F_M (images not shown; point measurements by Rahoutei et al. 2000).

Analysis of the Φ_{PSII} kinetic at different infection points revealed that, only at 2 s after switching on the actinic light (Φ_{PSII2}), AS leaves from PMMoV-S-infected plants displayed a differential pattern from control plants from 17 to 21 dpi,

undetectable in the case of PMMoV-I infection (Fig. 1b). This allows the differentiation between the infections with every viral strain. The Φ_{PSII2} pattern, as the NPQ one, also correlates with the viral presence (Chaerle et al. 2006, Pérez-Bueno et al. 2006) in the infected leaf.

Changes on both standard Chl-F parameters correlated with a decrease on the net photosynthesis rate from 17-19 dpi (PMMoV-S and PMMoV-I, respectively) in infected plants (Fig. 2a). Chl-F imaging demonstrates to be more powerful than IRGA points measurements to detect the PMMoV-I infection, showing earlier changes (17 dpi) in the spatial pattern of the fluorescence parameters.

The standard Chl-F parameters measured under protocol 1 and 2 detected the PMMoV-infection as early as 16 – 17 dpi (Fig. 1,3). However if the combinatorial imaging was applied (Matouš et al. 2007), the first significant changes between control and infected plants were visible at 4 and 6 dpi (for PMMoV-S and -I, respectively; Fig. 7). This is in accordance with previous results, demonstrating that such method could identify the infection process earlier than classical Chl-F parameters (Berger et al. 2007, Matouš et al. 2007).

When we analysed the Chl-F transients under two levels of actinic irradiances (Kautsky effect, measuring protocol 3), the first differences between PMMoV-infected and control plants were displayed at 9 dpi during the Chl-F increase and decline from the F_p (Fig. 5). This result is in well accordance with the data obtained from statistical analysis of Chl transient under light protocol 2, which indicated Chl-F images at 5 s of the kinetics as one of the most contrasting. These changes were reflected in the F_5/F_0 images of the leaves (Fig. 6), displaying a heterogeneous Chl-F pattern in infected plants. Regions emitting less Chl-F yield corresponded with zones of higher NPQ (Fig 1a, 1b) and viral presence (Chaerle et al. 2006, Pérez Bueno et al. 2006). In the later post-infection days, there was an increment of kinetic time points displaying differences between infected and control plants (Fig. 5), that could be associated to the last infection steps connected with the senescence process. Changes on the parameter F_5/F_0 may reflect PMMoV-

induced alterations on the Benson-Calvin cycle, since this time point is very near to the kinetic peak corresponding to the activation of the cycle (Ireland et al. 1984); the fact that the differences between AS leaves from infected plants and control are emphasized by HL is an additional evidence for it.

Images obtained by the combinatorial imaging and those of F_5/F_0 identified the viral infection before the virus is detected in AS leaves by tissue printing (Chaerle et al. 2006, Pérez-Bueno et al. 2006).

Summarizing, Chl-F was a very useful tool to follow the PMMoV infection on AS leaves of *N. benthamiana* plants. The technique provided *specific signatures* (Chaerle et al. 2004, 2007) of the pathogenesis induced by two different strains of the same virus, allowing us to distinguish between PMMoV-I and PMMoV-S infection. Classical Chl-F parameters gave us information about the physiological processes taking place in the AS leaves (decrease in photosynthesis and increase in the energy dissipated as heat), correlated with the viral movement on these leaves. Analysis of Chl-F transients by advanced statistical approach and F_5/F_0 let us to detect the infection earlier than classical parameters. The use of complementary imaging biophysical techniques, as thermography or multicolour fluorescence induced by ultraviolet light, would provide a *signature* of the complete PMMoV infection process, allowing us to elaborate *stress-catalogues* that might be used for diagnostic and quantification of the stress responses (Chaerle et al. 2007).

References

- Aldea, M., Hamilton, J.G., Resti, J.P., Zangerl, A.R., Berenbaum, M.R., Frank, T.D. and de Lucia, E.H. (2006) Comparison of photosynthetic damage from arthropod herbivory and pathogen infection in understory hardwood saplings. *Oecologia*. 149: 221-232.
- Alonso, E., García-Luque, I., Avila-Rincón, M.J., Wicke, B., Serra, M.T. and Díaz-Ruiz, J.R. (1989) A tobamovirus causing heavy losses in protected pepper crops in Spain. *J. Phytopathol.* 125: 67-76.
- Balachandran, S. and Osmond, B.C. (1994) Susceptibility of tobacco leaves to photoinhibition following infection with two strains of tobacco mosaic virus under different light and nitrogen nutrition regimes. *Plant Physiol.* 104: 1051-1057.

- Balachandran S., Osmond B.C. and Daley, F.P. (1994) Diagnosis of the earliest strain-specific interactions between tobacco mosaic virus and chloroplasts of tobacco leaves in vivo by means of chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiol.* 104: 1059-1065.
- Balachandran S., Hurry, V.M., Kelley, S.E., Osmond, C.B., Robinson, S.A., Rohozinski, J., Seaton, G.G.R. and Sims, D.A. (1997) Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis. *Physiol. Plant.* 100: 203-213.
- Barón, M., Rahoutei, J., Lázaro, J.J. and García-Luque, I. (1995) PSII response to biotic and abiotic stress. In *Photosynthesis: from light to biosphere*, 4: 897-900. P Mathis, ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Berger, S., Papadopoulos, M., Schreiber, U., Kaiser, W. and Roitsch, T. (2004) Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiol. Plant.* 122: 419-428.
- Berger, S., Benediktyová, Z., Matouš, K., Bonfig, K., Mueller, M.J., Nedbal, L. and Roitsch, T. (2007) Visualization of dynamics of plant-pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: Differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*. 58: 797-806.
- Bilger, W. and Björkman, O. (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.* 25: 173-185.
- Bonfig, K.B., Schreiber, U., Gabler, A., Roitsch, T. and Berger, S. (2006) Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Planta. Planta* 225: 1-12.
- Chaerle, L., Hagenbeek, D., De Bruyne, E., Valke, R. and Van Der Straeten, D. (2004) Thermal and chlorophyll-fluorescence imaging distinguish plant pathogen interaction at an early stage. *Plant Cell Physiol.* 45: 887-896.
- Chaerle, L., Pineda, M., Romero-Aranda, R., Van Der Straeten, D. and Barón, M (2006) Robotized thermal and chlorophyll-fluorescence imaging of pepper mild mottle virus infection in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Physiol.* 47: 1323-1336.
- Chaerle, L., Leinonen, I., Jones, H.G. y Van Der Straeten, D. (2007) Monitoring and screening plant populations with combined thermal and chlorophyll fluorescence imaging. 58: 773-784.
- Chou, H.M., Bundock, N., Rolfe, A.S. and Scholes DJ (2000) Infection of *Arabidopsis thaliana* leaves with *Albugo candida* (white blister rust) causes a reprogramming of host metabolism. *Mol. Plant Pathol.* 2: 99-113.

- Critchley, C. and Russell, A.W. (1994) Photoinhibition of photosynthesis *in vivo*: The role of protein turnover in photosystem II. *Physiol. Plantarum* 92: 188-196.
- Fukunaga, K. (1990) Introduction to statistical pattern recognition. 2nd Ed. *Academic Press, New York*.
- Genty, B., Briantais, J.-M. and Baker, N.R. (1989) The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990: 87-92.
- Horton, P., Wentworth, M. and Ruban, A.V. (2005) Control of the light harvesting function of chloroplast membranes: The LHCII-aggregation model for non-photochemical quenching. *FEBS Lett.* 579: 4201-4206.
- Ireland, C.R.; Long, N.R. and Baker, N.R. (1984) The relationship between carbon dioxide fixation and chlorophyll a fluorescence during induction of photosynthesis in maize leaves at different temperatures and carbon dioxide concentrations. *Planta* 160: 550-558.
- Kautsky, H. and Hirsch, A. (1931) Neue versuche zur kohlenassimilation. *Naturwissenschaften* 48: 964-964.
- Lichtenthaler, H.K. and Rinderle, U. (1988) The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* 19: 29-85.
- Lichtenthaler, H.K. and Miehe, J.A. (1997) Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends Plant Sci.* 2: 316-320.
- Lohaus, G., Heldt, H.W. and Osmond, C.B. (2000) Infection with phloem limited Abutilon mosaic virus causes localized carbohydrate accumulation in leaves of *Abutilon striatum*: relationships to symptom development and effects on chlorophyll fluorescence quenching during photosynthetic induction. *Plant Biol.* 2:161-167.
- Matouš, K., Benediktyová, Z., Berger, S., Roitsch, T. and Nedbal, L. (2007) Case study of combinatorial imaging: What protocol and what chlorophyll fluorescence image to use when visualizing infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae*? *Photosynth. Res.* doi: 10.1007/s11120-006-9120-6.
- Maxwell, K and Johnson, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51: 659–668.
- Nedbal, L., Soukupová, J., Kaftan, D., Whitmarsh, J. and Trtílek, M. (2000) Kinetic imaging of chlorophyll fluorescence using modulated light. *Photosynth Res.* 66: 3-12.
- Nedbal, L. and Březina, V. (2002) Complex metabolic oscillations in plants forced by harmonic irradiance. *Biophys.J.* 83: 2180-2189.
- Nedbal, L., Březina, V., Adamec, F., Štys, D., Oja, V., Laisk, A. and Govindjee (2003) Negative feedback regulation is responsible for the non-linear modulation of photosynthetic activity in

- plants and cyanobacteria exposed to a dynamic light environment *Biochim. Biophys. Acta* 1607: 5-17.
- Nedbal, L. and Whitmarsh, J. (2004) Chlorophyll fluorescence imaging of leaves and fruits. En *Chlorophyll a fluorescence: A signature photosynthesis*. Papageorgiou, C.G., Govindjee, eds. 14: 389-407. Springer. Dordrecht.
- Osmond, C.B., Daley, P.F., Badger, M.R. and Lüttge, U. (1998) Chlorophyll fluorescence quenching during photosynthetic induction in leaves of *Abutilon striatum* Dicks infected with Abutilon mosaic virus observed with a field-portable system. *Bot. Acta* 111: 390-397.
- Pérez-Bueno, M.L., Rahoutei, J., Sajnani, C., García-Luque, I. and Barón, M. (2004) Proteomic analysis of the oxygen-evolving complex of photosystem II under biotic stress. Studies on *Nicotiana benthamiana* infected with tobamoviruses. *Proteomics* 4: 418-425.
- Pérez-Bueno, M.L., Ciscato, M., van de Ven, M., García-Luque, I., Valcke, R. and Barón, M. (2006) Imaging viral infection. Studies on *Nicotiana benthamiana* plants infected with the pepper mild mottle tobamovirus. *Photosynthesis Res.* 90: 111-123.
- Pudil, P., Novovicova, J. and Kittler, J. (1994) Floating search methods in feature selection. *Pattern Recognition Letters* 15: 1119-1125.
- Rahoutei, J., García-Luque, I., Cremona, V. and Barón, M. (1998) Effect of tobamovirus infection on PSII complex of infected plants. In *Photosynthesis: from light to biosphere*, G Garab, ed, Vol 4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 2761-2764.
- Rahoutei, J., Barón, M., García-Luque, I., Droppa, M., Neményi, A. and Horvath, G. (1999) Effect of tobamovirus infection on the thermoluminescence characteristics of chloroplast from infected plants. *Z. Naturforsch* 54c: 634-639.
- Rahoutei, J., García-Luque, I. and Barón, M. (2000) Inhibition of photosynthesis by viral infection: Effect on PSII structure and function. *Physiol. Plant.* 110: 286-292.
- Roháček, K. and Barták, M. (1999) Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica* 37: 339-363, 1999.
- Ruban, A.V. and Horton, P. (1995) Regulation of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 221-230.
- Sajnani, C., Zurita, J.L., Doncel, M., Ortega, J.M., Barón, M. and Ducruet, J.-M. (2007) Changes in photosynthetic metabolism induced by tobamovirus infection in *Nicotiana benthamiana* studied in vivo by chlorophyll thermoluminescence. *New Phytol.* In press.
- Scholes, J.D. and Rolfe, S.A. (1996) Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *Planta* 199: 573-582.

- Schreiber, U., Schliwa, U. and Bilger, W. (1986) Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Res.* 10: 51-62.
- Soukupová, J., Smatanová, S., Nedbal, L. and Jegorov, A. (2003) Plant response to destruxins visualized by imaging of chlorophyll fluorescence. *Physiol Plantarum* 118: 399-405.
- Swarbrick, P.J., Schulze-Lefert, P. and Scholes, J.D. (2006) Metabolic consequences of susceptibility and resistance (race-specific and broad-spectrum) in barley leaves challenged with powdery mildew. *Plant Cell Environ.* 29: 1061-1076.
- Tang, J.Y., Zielinski, R.E., Zangerl, A.R., Crofts, A.R., Berenbaum, M.R. and de Lucia, E.H. (2006) The differential effects of herbivory by first and fourth instars of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) on photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 57: 527-536.
- van Wijk, K.J., Schnettger, B., Graf, H. and Krause, G.H. (1993) Photoinhibition and recovery in relation to heterogeneity of photosystem II. *Biochim. Biophys Acta* 1142: 59-68.
- Wetter, C., Conti, M., Alschuh, D., Tabillion, R. and van Regemortel, M.H.V. (1984) Pepper mild mottle virus, a tobamovirus infecting pepper cultivars in Sicily. *Phytopathology* 74: 405-410.
- Zangerl, A.R., Hamilton, J.G., Miller, T.J., Crofts, A.R., Oxborough, K., Berenbaum, M.R. and de Lucia, E.H. (2002) Impact of folivory on photosynthesis is greater than the sum of its holes. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 22: 1088-1091.

C.4. Changes induced by the pepper mild mottle tobamovirus on the chloroplast proteome of *Nicotiana benthamiana*

The analysis of chloroplast proteome of *Nicotiana benthamiana* in the pH range 4-7 has been carried out by Carlota Sajnani, and was described in her PhD Thesis work (Sajnani 2005).

The analysis of chloroplast proteome of *Nicotiana benthamiana* in the pH range 6-11 has been carried out by Mónica Pineda for the present PhD Thesis work.

C.4. Changes induced by the pepper mild mottle tobamovirus on the chloroplast proteome of *Nicotiana benthamiana*

Pineda, M^{*,1}, Sajnani, C^{*,1}., and Barón, M.^{1,2}.

1: Department of Biochemistry, Molecular and Cellular Biology, Estación Experimental del Zaidín. CSIC, Granada, Spain.

2: Corresponding author: mbaron@eez.csic.es

*: These authors have contributed equally to this work and are placed in alphabetical order.

Abstract: In this work, we have analysed the chloroplast proteome of *Nicotiana benthamiana* by using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry followed by database searching. To improve the resolution of the 2D gels, we have made separate maps for the low and the high pH range. At least 200 spots were detected and 72 identified, being some of them isoforms of different multiprotein families. In addition, changes in this chloroplast proteome induced by the infection with the Spanish strain of the pepper mild mottle virus (PMMoV-S) were investigated after 14 days post-inoculation. Viral infection induced the down-regulation of several photosynthetic proteins and surprisingly, the expression level of two PsbQ proteins from the oxygen-evolving-complex was enhanced during the viral infection.

Keywords: Bidimensional electrophoresis – Biotic stress – Chloroplast proteome – *Nicotiana benthamiana* – Pepper Mild Mottle Virus – Oxigen evolving complex

Abbreviations: 1D, one-dimensional; 2D, two-dimensional; IEF, isoelectrofocusing; 2-DE, two dimensional gel electrophoresis; CF₁, ATP synthase catalytic portion; CP, coat protein; Cyt. f, cytochrome f; FNR, ferredoxina-NADP⁺ reductase; GS, glutamine synthetase; Hsp70, heat shock protein 70 kDa; Lhca: photosystem I chlorophyll a/b binding proteins; Lhcb: photosystem II chlorophyll

a/b binding proteins; MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionization; MS, mass spectrometry; M_r , relative molecular mass; OEC, oxygen-evolving complex; PGK, phosphoglycerate kinase; pI, isoelectrical point; PMMoV-S, Spanish strain of pepper mild mottle virus; PRK, phosphoribulo-kinase; PsaC, PsaD and PsaE, C, D and E proteins, respectively, of the photosystem I core complex; PsbO, PsbP and PsbQ, 33, 24 and 16 extrinsic proteins of the photosystem II oxygen-evolving complex; PSI, photosystem I; PSII, photosystem II; RbcL and RbcS, ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase oxygenase large and small subunits; RuBisCO, ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase oxygenase; Rca, ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase oxygenase activase; SBPase, sedoheptulose-1,7-bisphosphatase; TOF/TOF, time of flight tandem mass spectrometry.

Introduction

Proteomics is nowadays an irreplaceable tool to study the response of living organisms to their environment. However, less attention has been applied to plant proteome, although some revisions about this topic were published in last years (Rossignol 2001, Bagginisky and Gruissem 2004, Cánovas et al. 2004, Newton et al. 2004, Rose et al. 2004, van Wijk 2004, Rossignol et al. 2006). In order to improve the understanding of plant proteome expression, a number of studies are focused in organelles subproteomes, as those of chloroplast and mitochondria responsible of the plant energy metabolism. 2-DE (two dimensional gel electrophoresis), consisting in isoelectrofocusing (IEF) followed by SDS-PAGE electrophoresis (IEF/SDS-PAGE), was one of the first techniques applied to study the chloroplast proteome. This approach has demonstrated to be successful for the analysis of both luminal and peripheral thylakoid proteins from *Pisum sativum* (Peltier et al. 2000) and *Arabidopsis* (Kieselbach et al. 2000, Peltier et al. 2002, Schubert et al. 2002). 2D-BN/SDS-PAGE (Blue-native polyacrylamide gel electrophoresis followed by SDS-PAGE), commonly used to characterize chloroplast protein complexes in plants and algae (Schägger et al. 1994), has also

provided an excellent two dimensional (2D) alternative for the IEF/SDS-PAGE of the most hydrophobic thylakoid proteins. This technique has provided an insight in the chloroplast proteome of *Hordeum vulgare* (Ciambella et al. 2005) and *Cucurbita pepo* (Aro et al. 2005). Several strategies (fractionation followed by multidimensional protein separation steps) have been also used for identification of the hydrophobic thylakoid integral membrane proteome (Friso et al. 2004, Peltier et al. 2004) as well as the chloroplast *envelope* proteomes (Ferro et al. 2002) of *Arabidopsis*. In addition, novel non-gel proteomic techniques have revealed the pathway abundance and novel protein functions in the photosynthetic membranes (Huber et al. 2004, Kleffman et al. 2004).

Fewer efforts have been done to identify the changes on the proteomic profile of chloroplast from plants suffering under different biotic and abiotic stress factors. Phee et al. (2004) and Giacomelli et al. (2006) analysed in *Arabidopsis thaliana* the response to high light of the chloroplast proteome, Andaluz et al. (2006) studied the proteomic changes induced by iron deficiency in the thylakoid membranes from *Beta vulgaris* and Cui et al. (2005) investigated in *Oryza sativa* the chloroplast proteome as main target of cold stress. Jones et al. (2006) using 2-DE detected significant changes in the chloroplast proteome of *Arabidopsis* plants infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, affecting mainly photosystem II (PSII) and components of the Benson-Calvin cycle. Zhou et al. (2006) carried out a proteomic analysis of the compatible interaction *Fusarium graminearum* and *Triticum aestivum* and concluded that the chloroplast is the organelle mostly affected by the infection. A leaf proteomic approach was also carried out to study pea responses to powdery mildew, and showed changes in proteins involved in photosynthesis and carbon metabolism in the host plant (Curto et al. 2006).

We had investigated by 2-DE the changes on the protein pattern of the oxygen-evolving complex (OEC) of PSII during the infection of *Nicotiana benthamiana* plants with the Spanish strain of the pepper mild mottle tobamovirus (PMMoV-S) (Pérez-Bueno et al. 2004). Previously, we had demonstrated that the

OEC is one of the main targets of the viral infection in the chloroplast (Rahoutei et al. 2000). The proteomic analysis of the OEC from the infected plants showed that the PsbO and PsbP proteins correspond to protein families in *Nicotiana benthamiana*, and the content of the PsbP polypeptides decreased dramatically with respect to PsbO during the progress of the infection. Interestingly, there was a differential decrease of the different PsbP proteins, indicative of a distinct regulation of their expression during pathogenesis (Pérez-Bueno et al. 2004).

In the present work we go further insight in the analysis of the chloroplast proteome of *Nicotiana benthamiana* by 2-DE and mass spectrometry (MS) followed by database searching. In addition, changes in this chloroplast proteome induced by the infection with PMMoV-S were studied after 14 days post-inoculation (dpi). Viral infection induced the down-regulation of several photosynthetic proteins, while expression of other chloroplast proteins was enhanced by the virus.

N. benthamiana is one of the most common experimental hosts and it is used in many studies about compatible interaction plant-virus, because of its ability to be infected by many different viral families. Progress in the knowledge of the *N. benthamiana* chloroplast proteome would be of high interest in the field of the impact of biotic stress on photosynthesis.

Material and methods

Plant and virus material

Nicotiana benthamiana Gray plants were cultivated in a growth chamber at 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR (photosynthetically active radiation), provided by cool white fluorescent lamps, with a 16/8 h light/dark photoperiod, a temperature regime of 23/18°C (day/night) and a relative humidity of 65%. Plants at the 6–7 fully-expanded leaves stage were inoculated in the three lower leaves with 25 μl of inocula per leaf at 50 μg of purified PMMoV/ml of 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.0. Mock-inoculated plants were treated with buffer only. The Spanish

strain of PMMoV (genus Tobamovirus) was isolated in Almería (Spain) (Alonso et al. 1989).

Sample isolation

Chloroplast-enriched preparations from virus-infected plants and their corresponding controls were isolated according to Reche et al. (1997) at 14 dpi.

Sample solubilisation for protein electrophoresis

Sample solubilisation was carried out according to Schuster and Davies (1983) with minor modifications. 200 µl from a chloroplast preparation containing 1 µg Chl/µl was incubated with 200 µl extraction buffer [0.7 M sucrose, 0.5 M Tris, 30 mM HCl, 50 mM EDTA, 0.1 M KCl, 2% (v/v) 2-mercaptoethanol and 2 mM PSMF] for 20 min at 4°C, vortexing several times. Then, 400 µl of 0.1 M Tris-HCl-saturated phenol (Amresco, Ohio, USA) were added. After shaking for 15 min at 4°C, the phases were separated by 10 min centrifugation at 16000 g and 4°C. The phenolic phase was recovered and re-extracted three times with an equal volume of extraction buffer, as above. Proteins were precipitated from the phenol phase by adding 6 volumes of 0.1 M ammonium acetate in methanol (HPLC grade) and incubated at -20°C overnight. The pellet obtained after a centrifugation during 10 min at 16000 g and 4°C was washed three times with the ammonium acetate-methanol solution and then 8 volumes of 100% HPLC acetone was added. Proteins were kept at -20°C at least 4 h and then precipitated by the same centrifugation conditions. The pellet was dried and solubilised in ReadyPrep Sequential Extraction Reagent 3 (BioRad, Hercules, CA, USA), containing 5 M urea, 2 M thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 2% (w/v) SB 3-10, 40 mM Tris, 0.2% Bio-Lyte 3/10 and 2 mM TBP. The sample was incubated for 2 h at room temperature and gentle shaking. Insoluble material was removed by centrifugation during 10 min at 16000 g and 25°C. Protein content of the sample was measured using the 2-D Quant Kit (GE Health Care, St. Giles Chalfont, United Kingdom). In the case of the samples

used for alkaline pH range gels, pI (isoelectrical point) standards (2-D SDS-PAGE Standards, BioRad) were added to them after the quantification.

First dimension electrophoresis: isoelectrofocusing (IEF)

IEF was carried out on 11 cm ReadyStrip IPG Strip gels (BioRad) as well as on Immobiline DryStrip gels (GE Health Care) for the 4-7 and 6-11 pH ranges, respectively. The strips were allowed to rehydrate in a PROTEAN IEF Cell (BioRad) for 14-16 h at 50 V and 20°C with 200 µl of chloroplast preparation, containing 75 µg of proteins and a trace of bromophenol blue. Proteins were separated in the pH range 4-7 by IEF using a three step procedure: 15 min at 250 V, followed by 2 h at 8000 V and a final step of 8000 Vh to complete 35000 V. In the case of the 6-11 pH range, some intermediate steps were required according to Görg et al. (2000): 1 h at 150 V, 1 h at 300 V, 1 h at 1000 V, 1 h at 3000 V, 1 h at 6000 V and 6000 Vh to complete 25000 V. After focusing, the strips were immediately run or frozen at -80°C.

SDS-PAGE

Focused IEF strips were incubated at room temperature for 20 min with two changes of equilibration buffer Tris-HCl 50 mM pH 8.8 containing 6 M urea, 2% (w/v) SDS, 0.02% (w/v) bromophenol blue, 30% glycerol, and 0.5% (w/v) DTT. Strips were then layered on the top of a SDS 12% polyacrylamide gel and sealed with melted 0.8% agarose in running buffer. 2 gels were run simultaneously, one for each treatment, in order to reduce variations. Running conditions were 17 mA for 30 min and 48 mA for 5-6 h. After electrophoresis, gels were silver stained (pH 6-11 map; Yan et al. 2000) or Sypro Ruby stained (pH 4-7 map; Bio-Rad, Steinberg et al. 1996). To ensure the reproducibility of the results, triplicate 2D gels were made from 3 independent chloroplast preparations, each from a different batch of plants. Figures show the most representative gels.

Mass spectrometry and protein identification

Spots from silver- or Sypro Ruby-stained gels were manually excised and stored in milli-Q water at 4°C until MALDI-TOF/TOF analysis. Protein spots were digested automatically using a Proteineer DP protein digestion station (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany). The digestion protocol used was that of Schevchenko et al. (1996) with minor variations. For peptide mass fingerprinting and TOF/TOF spectra acquisition an aliquot of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 33% aqueous acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid was mixed with an aliquot of the above digestion solution and the mixture was deposited onto an AnchorChip MALDI probe (Bruker-Daltonics). Peptide mass fingerprint spectra were measured on a Bruker Ultraflex MALDI TOF/TOF mass spectrometer (Bruker-Daltonics) (Suckau et al. 2003) in positive ion reflector mode. When possible, mass measurements were performed automatically through fuzzy logic based software. Each spectrum was internally calibrated with mass signals of trypsin autolysis ions to reach a typical mass measurement accuracy of ± 25 ppm. The measured tryptic peptide masses were transferred through MS BioTools program (Bruker-Daltonics) as inputs to search the NCBI nr database using Mascot software (Matrix Science, London, UK). When available, MS/MS data from LIFT TOF/TOF spectra were combined with MS peptide mass fingerprint data for database searching. Positively identified proteins are listed in Tables 1 and 2.

Results

Chloroplastidic proteins from both control and PMMoV-S infected *Nicotiana benthamiana* plants were separated by 2-DE and the gels were analysed to study the changes induced by the viral infection. To improve the gel resolution and avoid troubles due to the difficult focusing of proteins with alkaline pI, we made separate 2D maps for the low (4-7) and high (6-11) pH range.

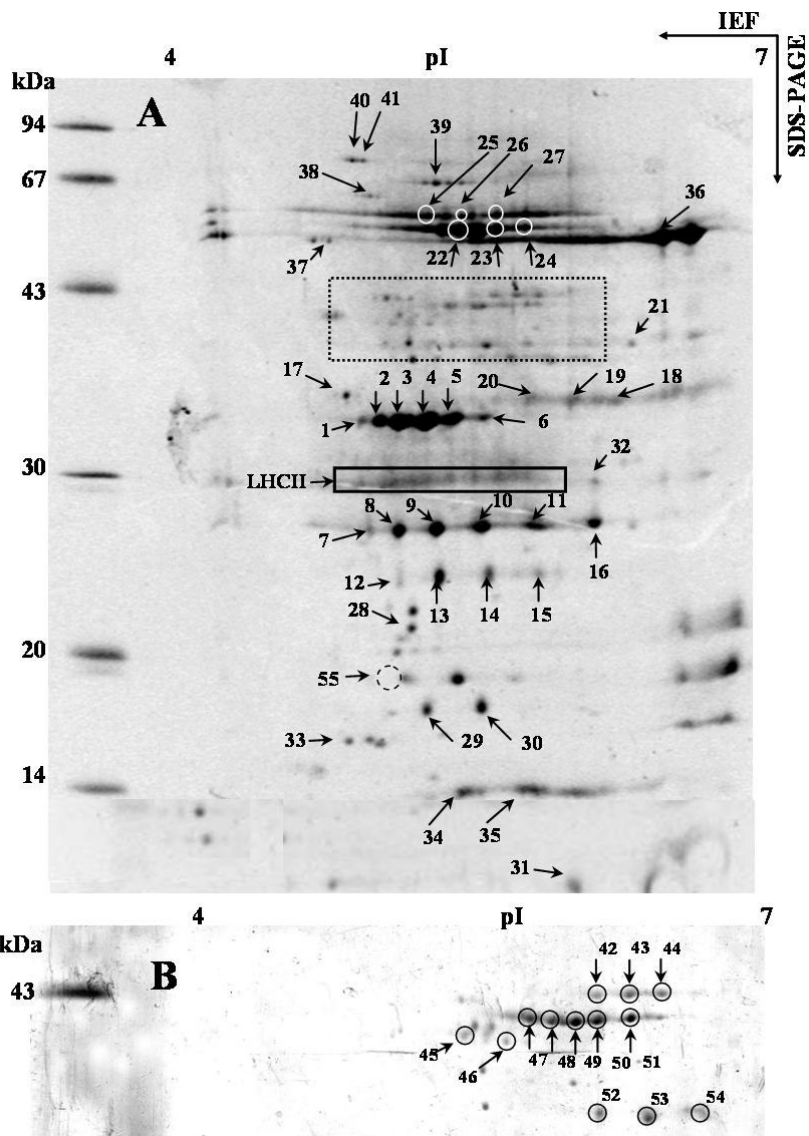


Fig. 1. A) Sypro-stained 2D maps of chloroplast preparations from control *Nicotiana benthamiana* plants. Proteins were separated in the first dimension in a linear pH (4-7) IPG gel strips and in the second dimension in 12% polyacrylamide vertical gels. Identified spots by means of MALDI/TOF-TOF are listed in Table 1. LHCII proteins were detected by Western Blot analysis. The region enclosed by a dotted box is shown in detail in B. B) Detail of the map in the pH 4-7 range, where proteins from # 42 to # 54 are better resolved.

Chloroplast proteome of Nicotiana benthamiana in the pH range 4-7

Most of the chloroplastidic proteins were found in this pH range. At least 150 spots could be distinguished in the 2D-gels (Fig. 1A, B). Based on the reproducibility of the spot pattern and relative amount of the proteins, 78 spots were selected for the MALDI-TOF/TOF analysis. A number of 55 proteins could be identified, corresponding to 29 different proteins (Table 1, spots # 1-55). Most of the identified proteins (31) were members of the different photosynthetic complexes of the thylakoid membrane: 16 polypeptides from PSII, 3 proteins from photosystem I (PSI), 2 cytochrome f (Cyt. f) polypeptides from the cytochrome complex and 10 spots corresponding to the ATP synthase. PSII proteins belonging to the OEC were one of the most abundant proteins in the gels. Six spots corresponding to the PsbO multiprotein family were found (# 1-6), showing the same M_r and different pI. The PsbP multiprotein family contributed with 10 spots (# 7-16), 6 of them (# 7-11, 16) with similar M_r and differing in pI and 4 spots (# 12-15) of lower M_r . From PSI, we detected the ferredoxin-NADP⁺-reductase (# 19), PsaC (# 31) and a *cab* protein from the light harvesting complex (Lhca; # 32). In addition, we identified 2 Cyt. f polypeptides (# 18 and 20) from the cytochrome complex. The ATP synthase macrocomplex was represented by 10 proteins (# 21-30), corresponding to the five subunits of the CF₁ catalytic portion: α (# 25-27), β (# 22-24), γ (# 21), δ (# 28) and ϵ (# 29 and 30). Spots corresponding to the same subunit showed the same M_r , but different pI.

From the proteins involved in the reactions of the Benson-Calvin cycle, the RuBisCO (ribulose 1,5 biphosphate carboxilase oxygenase) protein was the most prominent one in the 2D-gels. RcbL (RuBisCO large subunit; # 36) was present in the high M_r range of the gels with a pI of 6.9, and RcbS (RuBisCO small subunit) in the low M_r range with 2 spots, showing the same M_r , but different pIs (# 34 and 35). We could also detect in the 2D-gels other proteins from the same metabolic pathway: sedoheptulose-1,7-biphosphatase (SBPase, # 45), phosphoribulokinase (PRK, # 46), RuBisCo activase (Rca, # 47-50), phosphoglycerate kinase (PGK, #

Table 1. Proteins identified by MALDI/TOF-TOF from the 2D gels showed in Figs. 1 and 3 and marked by the same number. Each polypeptide is annotated with the homology found, including protein name, plant species and the corresponding protein accession number. Asterisks indicate *Nicotiana tabacum*. Theoretical and experimental pIs and M_r are also provided. Homologies include the % coverage reached, the number of matched and unmatched peptides, and the MASCOT score details. Scores >76 are significant ($p < 0.05$). CF₁: ATP synthase catalytic portion; CP: viral coat protein; Cyt. f: cytochrome f; FNR: ferredoxin-NADP⁺ reductase; GS: glutamine synthetase; Hsp70, heat shock protein 70 kDa; Lhca: PSI chlorophyll a/b binding proteins ; Lhcb: PSII chlorophyll a/b binding proteins; PGK: phosphoglycerate kinase; PRK: phosphoribulo-kinase; Psa proteins: PSI proteins codified by *psa* genes; Psb proteins: PSII proteins codified by *psb* genes; RbcL: RuBisCO large subunit; RbcS: RuBisCO small subunit; Rca: RuBisCO activase; SBPase: sedoheptulose-1,7-bisphosphatase; SFBA: sedoheptulose/fructose-bisphosphate aldolase.

| Spot | Homology | Species | Accession # | Theoretical mass | Theoretical pI | Experimental mass | Experimental pI | Mascot score | Matched peptides | Unmatched peptides | % Coverage |
|------|----------|---------|-------------|------------------|----------------|-------------------|-----------------|--------------|------------------|--------------------|------------|
| 1 | PsbO | * | gi30013657 | 35 | 5.3 | 35.4 | 5.1 | 152 | 10 | 3 | 26 |
| 2 | PsbO | * | gi30013657 | 35 | 5.3 | 35.4 | 5.2 | 85 | 5 | 1 | 20 |
| 3 | PsbO | * | gi30013657 | 35 | 5.3 | 35.4 | 5.3 | 124 | 7 | 1 | 27 |
| 4 | PsbO | * | gi30013657 | 35 | 5.3 | 35.4 | 5.5 | 96 | 6 | 3 | 33 |
| 5 | PsbO | * | gi30013657 | 35 | 5.3 | 35.4 | 5.7 | 182 | 11 | 2 | 42 |
| 6 | PsbO | * | gi30013657 | 35 | 5.3 | 35.4 | 5.8 | 189 | 10 | 0 | 37 |
| 7 | PsbP | * | gil19911 | 29 | 7.5 | 26.2 | 5.1 | 125 | 6 | 1 | 33 |
| 8 | PsbP | * | gil19911 | 29 | 7.5 | 26.2 | 5.3 | 108 | 7 | 6 | 39 |
| 9 | PsbP | * | gi49259455 | 19 | 5.1 | 26.2 | 5.5 | 105 | 5 | 2 | 37 |
| 10 | PsbP | * | gi49259455 | 19 | 5.1 | 26.2 | 5.8 | 105 | 5 | 2 | 37 |
| 11 | PsbP | * | gi49259455 | 19 | 5.1 | 26.2 | 6.1 | 106 | 5 | 2 | 37 |
| 12 | PsbP | * | gil1345550 | 29 | 7.5 | 23.2 | 5.3 | 96 | 5 | 1 | 26 |
| 13 | PsbP | * | gil1345550 | 29 | 7.5 | 23.2 | 5.5 | 121 | 6 | 1 | 29 |
| 14 | PsbP | * | gil1345550 | 29 | 7.5 | 23.2 | 5.8 | 113 | 6 | 2 | 33 |
| 15 | PsbP | * | gil1345550 | 29 | 7.5 | 23.2 | 6.1 | 80 | 4 | 1 | 25 |
| 16 | PsbP | * | gi49259455 | 19 | 5.1 | 26.2 | 6.4 | 82 | 4 | 2 | 37 |

| Spot | Homology | Species | Accession # | Theoretical mass | Theoretical pI | Experimental mass | Experimental pI | Mascot score | Matched peptides | Unmatched peptides | % Coverage |
|------|----------------------------------|----------------------------------|-------------|------------------|----------------|-------------------|-----------------|--------------|------------------|--------------------|------------|
| 17 | Plastid lipid associated protein | * | gil2632088 | 29 | 4.6 | 37.9 | 5.0 | 122 | 7 | 4 | 25 |
| 18 | Cyt. f | * | gil65614 | 35 | 8.2 | 37.9 | 6.5 | 163 | 9 | - | 42 |
| 19 | FNR, chain b | <i>Capsicum annuum</i> | gil47169164 | 34 | - | 37.9 | 6.3 | 171 | 7 | 16 | - |
| 20 | Cyt. f | * | gil11465970 | 35 | 8.2 | 37.9 | 6.1 | 92 | 6 | 4 | 18 |
| 21 | CF ₁ γ | * | gil19785 | 42 | 7.6 | 43.8 | 6.6 | 109 | 7 | 2 | 17 |
| 22 | CF ₁ β | <i>Nicotiana glumbaginifolia</i> | gil114556 | 54 | 4.9 | 59.0 | 5.7 | 196 | 13 | 7 | 37 |
| 23 | CF ₁ β | <i>Nicotiana glumbaginifolia</i> | gil114556 | 54 | 4.9 | 59.0 | 5.9 | 230 | 16 | 10 | 42 |
| 24 | CF ₁ β | <i>Nuphar variegata</i> | gil14718153 | 51 | 4.7 | 59.0 | 6.1 | 108 | 6 | 0 | 16 |
| 25 | CF ₁ α | * | gil55977763 | 55 | 4.9 | 59.0 | 5.5 | 240 | 15 | 2 | 31 |
| 26 | CF ₁ α | * | gil55977763 | 55 | 4.9 | 59.0 | 5.7 | 269 | 16 | 1 | 35 |
| 27 | CF ₁ α | <i>Atropa belladonna</i> | gil28261702 | 55 | 5 | 59.0 | 5.9 | 183 | 11 | 1 | 23 |
| 28 | CF ₁ δ | * | gil19787 | 27 | 8.1 | 20.1 | 5.3 | 85 | 6 | 5 | 24 |
| 29 | CF ₁ ε | <i>Atropa belladonna</i> | gil28261723 | 15 | 5 | 16.1 | 5.4 | 114 | 5 | 1 | 43 |
| 30 | CF ₁ ε | * | gil11465963 | 15 | 5 | 16.2 | 5.7 | 117 | 6 | 4 | 51 |

Table 1 (continued). Proteins identified by MALDI/TOF-TOF from the 2D gels showed in Figs. 1 and 3 and marked by the same number. Each polypeptide is annotated with the homology found, including protein name, plant species and the corresponding protein accession number. Asterisks indicate *Nicotiana tabacum*. Theoretical and experimental pIs and M_r are also provided. Homologies include the % coverage reached, the number of matched and unmatched peptides, and the MASCOT score details. Scores >76 are significant ($p < 0.05$). CF₁: ATP synthase catalytic portion; CP: viral coat protein; Cyt. f: cytochrome f; FNR: ferredoxin-NADP⁺ reductase; GS: glutamine synthetase; Hsp70, heat shock protein 70 kDa; Lhca: PSI chlorophyll a/b binding proteins ; Lhcb: PSII chlorophyll a/b binding proteins; PGK: phosphoglycerate kinase; PRK: phosphoribulo-kinase; Psa proteins: PSI proteins codified by *psa* genes; Psb proteins: PSII proteins codified by *psb* genes; RbcL: RuBisCO large subunit; RbcS: RuBisCO small subunit; Rca: RuBisCO activase; SBPase: sedoheptulose-1,7-bisphosphatase; SFBA: sedoheptulose/fructose-bisphosphate aldolase.

| Spot | Homology | Species | Accession # | Theoretical mass | Theoretical pI | Experimental mass | Experimental pI | Mascot score | Matched peptides | Unmatched peptides | % Coverage |
|------|---|-----------------------------------|-------------|------------------|----------------|-------------------|-----------------|--------------|------------------|--------------------|------------|
| 31 | Putative PsaC | <i>Solanum tuberosum</i> | gil34787119 | 9 | 6.9 | 11.1 | 6.3 | 145 | 6 | 1 | 71 |
| 32 | Lhca Type III | <i>Lycopersicon esculentum</i> | gil19182 | 29 | - | 30.1 | 6.4 | 67 | - | - | - |
| 33 | Thylakoid lumenal 16.5 kDa protein | <i>Arabidopsis thaliana</i> | gil7388292 | 26 | - | 14.8 | 5.0 | 80 | - | - | - |
| 34 | RbcS | <i>Flaveria ramosissima</i> | gil13241101 | 16 | - | 12.9 | 5.7 | 98 | 4 | 8 | - |
| 35 | RbcS | <i>Chrysanthemum x morifolium</i> | gil28139169 | 21 | - | 12.9 | 6.0 | 116 | 5 | 7 | - |
| 36 | RbcL | <i>Nolana albescens</i> | gil11182397 | 6,5 / 52 | 6.5 | 58.5 | 6.9 | 87 | 6 | 3 | 16 |
| 37 | Hypothetical protein | <i>Arabidopsis thaliana</i> | gil7267602 | 49 | - | 57.7 | 4.7 | 62 | - | - | - |
| 38 | 60 kDa chaperonin α subunit, RuBisCo binding-protein | <i>Brassica napus</i> | gil1351030 | 58 | 4.6 | 66.7 | 5.2 | 123 | 7 | 0 | 18 |
| 39 | FtsH like | * | gil4325041 | 75 | 6 | 69.3 | 5.6 | 101 | 6 | 0 | 12 |
| 40 | Hsp70 | <i>Pisum sativum</i> | gil445605 | 76 | - | 73.1 | 5.1 | 108 | 5 | 1 | - |
| 41 | Hsp70 | <i>Pisum sativum</i> | gil445605 | 76 | - | 72.5 | 5.1 | 106 | 4 | 0 | - |

| Spot | Homology | Species | Accession # | Theoretical mass | Theoretical pI | Experimental mass | Experimental pI | Mascot score | Matched peptides | Unmatched peptides | % Coverage |
|------|----------|-----------------------------|-------------|------------------|----------------|-------------------|-----------------|--------------|------------------|--------------------|------------|
| 42 | GS | <i>Nicotiana attenuata</i> | gil40457328 | 48 | 6,8 | 49.9 | 5.9 | 94 | 6 | 3 | 16 |
| 43 | GS | <i>Nicotiana attenuata</i> | gil40457328 | 48 | 6,8 | 49.9 | 6.0 | 92 | 6 | 2 | 12 |
| 44 | GS | <i>Nicotiana attenuata</i> | gil40457328 | 48 | 6,8 | 49.9 | 6.1 | 125 | 8 | 3 | 22 |
| 45 | SBPase | <i>Spinacia oleracea</i> | gil3914940 | 43 | - | 47.3 | 5.3 | 80 | - | - | - |
| 46 | PRK | <i>Spinacia oleracea</i> | gil21279 | 45 | 5,8 | 45.5 | 5.5 | 89 | 6 | 4 | 15 |
| 47 | Rca | * | gil19990 | 49 | 7,6 | 48.7 | 5.6 | 176 | 13 | 9 | 29 |
| 48 | Rca | * | gil19990 | 49 | 7,6 | 48.7 | 5.7 | 119 | 10 | 12 | 25 |
| 49 | PGK | * | gil1161600 | 50 | 8.5 | 48.7 | 5.8 | 206 | 8 | - | 20 |
| | Rca | * | gil445628 | 43 | 5.5 | 48.7 | 5.8 | - | 8 | 7 | 22 |
| 50 | PGK | * | gil1161600 | 50 | 8.5 | 48.7 | 5.9 | 205 | 8 | - | - |
| | Rca | * | gil445628 | 43 | 5.5 | 48.7 | 5.9 | - | 7 | 3 | - |
| 51 | PGK | * | gil1161600 | 50 | 7.8 | 48.7 | 6.0 | 104 | 7 | 4 | 21 |
| 52 | SFBA | <i>Nicotiana paniculata</i> | gil4827251 | 43 | 7 | 41.2 | 5.8 | 94 | 6 | 3 | 16 |

Table 1 (continued). Proteins identified by MALDI/TOF-TOF from the 2D gels showed in Figs. 1 and 3 and marked by the same number. Each polypeptide is annotated with the homology found, including protein name, plant species and the corresponding protein accession number. Asterisks indicate *Nicotiana tabacum*. Theoretical and experimental pIs and *M_r*, are also provided. Homologies include the % coverage reached, the number of matched and unmatched peptides, and the MASCOT score details. Scores>76 are significant (p<0.05). CF₁: ATP synthase catalytic portion; CP: viral coat protein; Cyt. f: cytochrome f; FNR: ferredoxin-NADP⁺ reductase; GS: glutamine synthetase; Hsp70, heat shock protein 70 kDa; Lhca: PSI chlorophyll a/b binding proteins ; Lhcb: PSII chlorophyll a/b binding proteins; PGK: phosphoglycerate kinase; PRK: phosphoribulo-kinase; Psa proteins: PSI proteins codified by *psa* genes; Psb proteins: PSII proteins codified by *psb* genes; RbcL: RuBisCO large subunit; RbcS: RuBisCO small subunit; Rca: RuBisCO activase; SBPase: sedoheptulose-1,7-bisphosphatase; SFBA: sedoheptulose/fructose-bisphosphate aldolase.

| Spot | Homology | Species | Accession # | Theoretical mass | Theoretical pI | Experimental mass | Experimental pI | Mascot score | Matched peptides | Unmatched peptides | % Coverage |
|------|----------|------------------------------|-------------|------------------|----------------|-------------------|-----------------|--------------|------------------|--------------------|------------|
| 53 | SFBA | <i>Nicotiana paniculata</i> | gil4827251 | 43 | 7 | 41.2 | 6.1 | 90 | 6 | 4 | 16 |
| 54 | SFBA | <i>Nicotiana paniculata</i> | gil4827251 | 43 | 7 | 41.2 | 6.2 | 99 | 5 | 2 | 15 |
| 55 | CP | <i>ToMV</i> (tobamovirus) | gil10719965 | 17 | - | 17.6 | 5.2 | 159 | 9 | 7 | - |
| 56 | Cyt. f | * | gil11845 | 35 | 8.2 | 40.2 | 7.0 | 145 | 8 | 1 | 23 |
| 57 | PsaD | <i>Nicotiana sylvestris</i> | gil19748 | 22 | 8.8 | 17.9 | 8.7 | 106 | 6 | 2 | 32 |
| 58 | PsaD | <i>Nicotiana sylvestris</i> | gil19748 | 22 | 8.8 | 17.9 | 9.0 | 112 | 6 | 1 | 31 |
| 59 | PsaD | <i>Nicotiana sylvestris</i> | gil19748 | 22 | 8.8 | 17.9 | 9.2 | 113 | 6 | 1 | 28 |
| 60 | PsaD | <i>Nicotiana sylvestris</i> | gil19748 | 22 | 8.8 | 17.9 | 9.3 | 129 | 7 | 3 | 44 |
| 61 | PsaD | <i>Nicotiana sylvestris</i> | gil417544 | 23 | 8.8 | 16.7 | 9.3 | 105 | 6 | 4 | 26 |
| 62 | PsaD | <i>Nicotiana sylvestris</i> | gil19748 | 22 | 8.8 | 16.7 | 9.2 | 133 | 7 | 2 | 43 |
| 63 | PsaD | <i>Nicotiana sylvestris</i> | gil19748 | 22 | 8.8 | 16.7 | 9.0 | 107 | - | - | - |
| 64 | PsaD | <i>Nicotiana sylvestris</i> | gil19748 | 22 | 8.8 | 16.7 | 8.7 | 85 | - | - | - |

| Spot | Homology | Species | Accession # | Theoretical mass | Theoretical pI | Experimental mass | Experimental pI | Mascot score | Matched peptides | Unmatched peptides | % Coverage |
|------|-----------------------|------------------------------|-------------|------------------|----------------|-------------------|-----------------|--------------|------------------|--------------------|------------|
| 65 | PsbQ | <i>Nicotiana benthamiana</i> | gil58700507 | 24 | 8.7 | 10.9 | 9.4 | 163 | 8 | 0 | 32 |
| 66 | PsbQ | <i>Nicotiana benthamiana</i> | gil58700507 | 24 | 8.7 | 10.9 | 9.5 | 123 | 6 | 0 | 24 |
| 67 | PsaE | <i>Nicotiana sylvestris</i> | gil632722 | 15 | 8.6 | 13.9 | 8.2 | 133 | 7 | 6 | 43 |
| 68 | PsaE | <i>Nicotiana sylvestris</i> | gil632724 | 15 | 8.7 | 13.9 | 8.8 | 130 | 7 | 7 | 54 |
| 69 | Ribosomal protein L14 | <i>Nicotiana sylvestris</i> | gil78102574 | 14 | - | 7.3 | 9.2 | 220 | 6 | 0 | - |
| 70 | CF ₁ α | * | gil76559637 | 55 | 4.9 | 77.3 | 6.4 | 117 | 7 | 1 | 18 |
| 71 | Lhcb | <i>Nicotiana sylvestris</i> | gil3036944 | 28 | - | 34.8 | 6.7 | 96 | 4 | 6 | - |

49-51) and chloroplastidic sedoheptulose/fructose biphosphate aldolase (SFBA, # 52-54). Spots 49 and 50 contained a combination of two proteins: Rca and PGK. Other stromal proteins identified corresponded to enzymes of the nitrogen metabolism (glutamine synthetase, GS, # 42-44).

Some proteins related with stress processes were found in the gels: a RuBisCO-binding chaperonin (# 38), heat shock 70 kDa protein (Hsp70, # 40-41) and the FtsH-like protein (# 39), related to the D1 turnover and to the hypersensitive response in incompatible host-pathogen interactions. Finally, three proteins with unknown function were present in the 2D gels: hypothetic protein (# 37), thylakoid lumenal 16.5 kDa protein (# 33) and a plastid lipid associated protein (# 17).

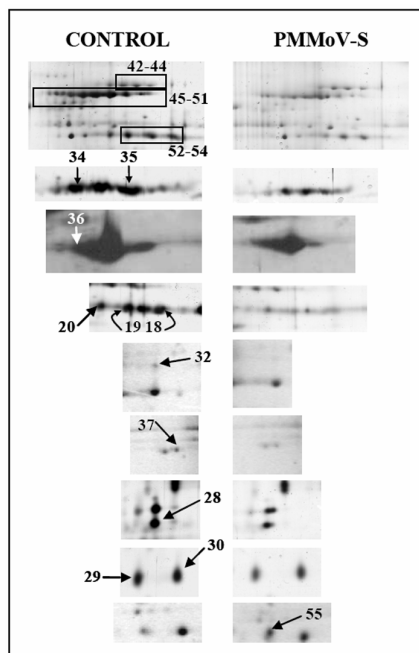


Fig. 2. Changes in the expression levels of different chloroplastidic proteins (pH 4-7 range) detected by 2-DE. Left panels correspond to control plants and right panels to PMMoV-S infected plants. All the proteins (excepting # 55, the coat protein of PMMoV-S) present lower expression levels in infected plants. Numbers correspond with those of Table 1.

Comparative analysis of 2D-gels (Fig. 2) in the acid pH range of chloroplasts isolated from control and PMMoV-S infected *Nicotiana benthamiana* plants at 14 dpi, let us to identify some proteins down-regulated by the viral infection: Cyt. f (# 18 and 20), FNR (# 19), δ and ϵ subunits of CF₁ (# 28-30), RbcL (# 36), RbcS (# 34 and 35), hypothetical protein (# 37), GS (# 42-44), SBPase (# 45), PRK (# 46), Rca (# 47-50), PGK (# 49-51), Lhca (# 32) and SFBA (# 52-54). They are related with the photosynthetic electronic transport chain and Benson-Calvin cycle. Only one new protein appeared in the chloroplast from infected plants: the viral coat protein (CP; # 55) with a M_r and pI of 17.6 kDa and 5.2, respectively.

Chloroplast proteome of Nicotiana benthamiana in the pH range 6-11

In the 2D map of chloroplastidic proteins separated in the basic range 53 spots appear (Fig 3A, B) and were analysed by MALDI-TOF/TOF. Only 28 spots could be identified (Table 1), 7 spots corresponded to the pI standards (Table 2) and 21 spots are chloroplastidic proteins. Due to the overlapping between acidic (pH 4-7) and basic (pH 6-11) pH ranges, some proteins present in the acid 2D-map appeared again in the basic one: PsbP from the OEC (# 16), the Cyt. f (# 18) the γ subunit of CF₁ (# 21), Lhca (# 32) and RcbL (# 36). In the overlapping range (6-7) also appears a chlorophyll a/b binding protein from PSII (Lhcb; # 71) not identified in the gels of the acidic range. New forms corresponding to proteins already identified in the acidic range appear in the 6-7 pH range: Cyt. f (# 56) and CF₁ α subunit (# 70).

The other proteins identified in the range 6-11 were: 2 spots for the E subunit of PSI (PsaE), with the same M_r and different pI (# 67 and 68); 8 spots corresponding to D subunit of PSI (PsaD) with 4 of them with similar M_r and differing in pI (# 57-60) and another group of 4 PsaD proteins with lower M_r (# 61-64). The PsbQ protein from the OEC was detected in the low M_r region of the gel, matching with two spots (# 65 and 66). The ribosomal protein L14 was the lowest M_r identified protein (# 69).

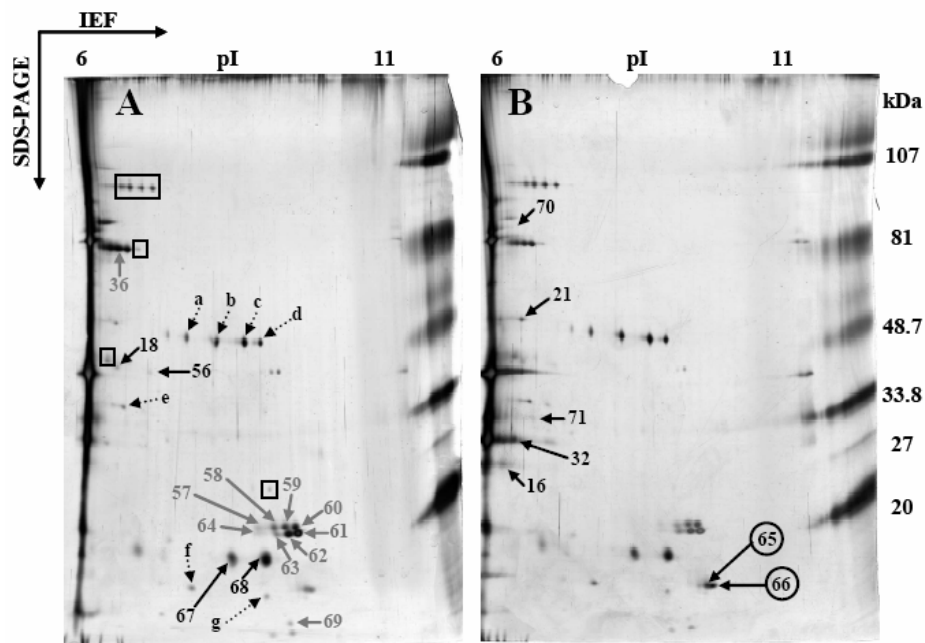


Fig. 3. Silver-stained 2D maps of chloroplast preparations from control (A) and PMMoV-S infected (B) *Nicotiana benthamiana* plants. Proteins were separated in the first dimension in a linear (pH 6-11) IPG gel strips and in the second dimension in 12% polyacrylamide vertical gels. Identified spots by means of MALDI/TOF-TOF are listed in Table 1. Black and gray numbers in (A) represent proteins suffering no changes or down-regulated, respectively, during the PMMoV-S infection. Numbers enclosed in circles in (B) display up-regulated proteins in infected plants. Black boxes frame human keratins. Dotted arrows in (A) represent pI standards, named by letters and listed in Table 2.

Comparative analysis of the basic 2D map from chloroplast isolated from control (Fig 3A) and PMMoV-S infected (Fig. 3B) plants showed that, as in the case of acidic map, the RbcL (# 36) diminished in the infected plants. Other proteins whose expression levels were reduced were all PsaD forms and the ribosomal protein L14 (# 57-64, and 69). In turn, PsbQ augmented due to the viral infection (# 65 and 66).

Table 2. pI standards identified by MALDI/TOF-TOF from gels displayed in Fig. 3. Each polypeptide is annotated with the homology found, including protein name, species and the corresponding protein accession number. Theoretical and experimental pIs and M_r are also provided. Homologies include the % coverage reached, the number of matched and unmatched peptides, and the MASCOT score details. Scores >76 are significant ($p < 0.05$).

| Spot | Homology | Species | Accession # | Theoretical mass | Theoretical pI | Experimental mass | Experimental pI | Mascot score | Matched peptides | Unmatched peptides | % Coverage |
|------|--|-----------------------|-------------|------------------|----------------|-------------------|-----------------|--------------|------------------|--------------------|------------|
| a | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | - | gil2506441 | 36 | 7.9 | 47.6 | 7.5 | 105 | 6 | 1 | 16 |
| b | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | - | gil1169794 | 36 | 7.9 | 46.0 | 8 | 126 | 7 | 1 | 20 |
| c | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | - | gil40889053 | 36 | 7.8 | 46.0 | 8.4 | 188 | 10 | 1 | 28 |
| d | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | - | gil1169794 | 36 | 7.9 | 46.0 | 8.6 | 107 | 6 | 1 | 16 |
| e | Bovine carbonic anhydrase II, chain B | - | gil46016009 | 29 | 6.5 | 35.0 | 6.4 | 202 | 10 | 1 | 33 |
| f | Horse Herat myoglobin | <i>Equus caballus</i> | gil2554649 | 17 | 7.5 | 10.9 | 7.8 | 185 | 9 | 2 | 63 |
| g | Albumin | <i>Bos taurus</i> | gil162648 | 71 | 5.8 | 10.0 | 8.9 | 145 | 11 | 4 | 21 |

Discussion

2-DE has been applied successfully to the analysis of the chloroplast proteome, and especially, to the peripheral and luminal one in plants as *Arabidopsis* and *Pisum sativum* (Kieselbach et al. 2000, Peltier et al. 2000, van Wijk 2001, Whitelegge 2003). Few authors have investigated changes in the chloroplast proteome under abiotic or biotic stress factors, Andaluz et al. (2006) analysed the effect of Fe-deficiency in *Beta vulgaris*, Cui et al. (2005) that of cold stress in *Oryza sativa* and Jones et al. (2006) evaluated changes in the chloroplast proteome of *Arabidopsis* plants infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. We have also carried out a proteomic analysis of the OEC from *N. benthamiana* infected with PMMoV (Pérez-Bueno et al. 2004); the OEC proteins were the most abundant one in the chloroplast proteome and we had previously described them as target of the infection with this tobamovirus (Rahoutei et al. 1998). In the present work we go further insight in the analysis of the chloroplast proteome of *N. benthamiana* by 2-DE and MS followed by database searching.

More than 200 spots could be visualised in the 2D gels from chloroplast preparations isolated from control plants: 150 spots in the pH range 4-7, most of them in the 20-43 kDa M_r region (Fig. 1A, B), and 53 spots in the pH range 6-11 (Fig. 3A, B). From the analysis by MALDI-TOF/TOF MS, 71 proteins were identified (35,5%); in addition, several LHCI proteins were visible in the gels (Fig.1A) and identified by Western Blot (data not shown).

It was very remarkable the high resolution grade reached in the case of PsbO and PsbP proteins, extrinsic proteins of the OEC (Fig. 1A). Our previous works only let us identify 4 isoforms of every protein family (Rahoutei et al. 1998, Pérez-Bueno et al. 2004), both encoded by a multigene family with at least 4 isogenes (Pérez-Bueno 2003). In turn, we have identified in the present work 6 spots corresponding to PsbO and 10 belonging to PsbP (Table 1). Multigene families coding for different isoforms of PsbO have been described in *Pisum sativum* (Wales et al. 1989), *Lycopersicon esculentum* (Görlach et al. 1993) and

Arabidopsis thaliana (Kieselbach 2000, Peltier et al. 2002, Schubert et al. 2002). Gene families for PsbP were found in *Nicotiana tabacum* (Hua et al. 1991a and b, Hua et al. 1993, Takahashi et al. 1991), *Arabidopsis thaliana* (Peltier et al. 2002) and *Sinapis alba* (Merkle et al. 1990). It has been demonstrated in *Nicotiana tabacum* that the 4 PsbP isoforms are functionally equivalents *in vivo*, but it is required the expression of the 4 isogenes for optimal PSII activity (Ishihara et al. 2005). We have also demonstrated that the expression level of the distinct PsbP isoforms is differentially affected by the PMMoV infection in *Nicotiana benthamiana* (Pérez-Bueno et al. 2004). Analysis of the 2 PsbO isogenes from *A. thaliana* revealed that they were not equivalent; the down-regulation of the expression from every isogene induced that of other PSII proteins and a reduced activity of this photosynthetic complex (Murakami et al. 2005).

The higher number of PsbP and PsbO spots found in this work compared with our previous one (Pérez-Bueno et al. 2004), could be explained because in the earlier work we have used self-made disc gels for the IEF; in the present one we carried out the first dimension by ready made IPG Strip gels. This technique allows higher resolution, more reproducible patterns and better focusing of the basic proteins (Corbett et al. 1994; Gorg et al. 2000). From the 6 and 10 spots detected for the PsbO and PsbP proteins, respectively, some of them may be the result of post-transcriptional modifications, because we have found only 4 isogenes codifying every protein family (Pérez-Bueno 2003). Further analysis of these spots carried out by electrospray ionization-MS will clarify this point.

The reported decrease due to the viral infection on the levels of PsbP isoforms (Pérez-Bueno et al. 2004) was not evident in the present acidic 2D maps. Being the OEC proteins the most prominent ones in this pH range, the PsbO and Psb P signals were saturated (Fig. 2), because we have loaded a higher amount of protein in these gels in order to identify minor proteins in the *N. benthamiana* chloroplast proteome.

In the alkaline 2D map (pH 6-11) we detected two spots for the PsbQ protein (pI 9.4 and 9.5; Fig. 3A, B and Table 1), in accordance with the 2 *psbQ* isogenes that we have reported for *N. benthamiana* (Pérez-Bueno 2003). Two PsbQ isoforms were identified by 2-DE on chloroplast preparations (Kieselbach et al. 2000, Schubert et al. 2002). However, Peltier et al. (2000) could only detect one spot in 2D gels from *Pisum sativum* chloroplasts. The 2D gels in the alkaline pH range displayed increased levels of the PsbQ proteins in chloroplast from PMMoV-S infected plants (Fig. 3B). Ifuku et al. (2005a and b) showed that under standard growth conditions, PsbP protein, but not PsbQ, is indispensable for the normal PSII function *in vivo*. In contrast, Yi et al. (2006) found that under stressful low light conditions, the PsbQ suppression led to a loss of different PSII components, decrease in PSII quantum yield and disturbances on electron transfer from Q_A^- to Q_B . Other authors (Ifuku and Sato 2002, Ifuku et al. 2005a) conclude that PsbQ is required for optimum PSII function under conditions in which PsbP is impaired. This could explain why PsbQ are accumulated in PMMoV-S plants, whereas PsbP expression is diminished.

The different subunits of the CF_1 are together with the OEC proteins the most abundant polypeptides in the acidic pH range (Fig. 1A, B). These data are in accordance with the 2D-maps from the thylakoid proteome of *Arabidopsis thaliana* investigated by Friso et al. (2004). We have found in our gels all subunits of the CF_1 fragment from the ATP synthase. Due to the analogy with Friso et al. (2004) gels, we propose that proteins with the same M_r , close to $CF_1 \alpha$ and $CF_1 \beta$ (Fig. 1A) would be protein trains of these subunits.

We have also identified several high M_r chaperons (Fig. 1, Table 1): the 60 kDa chaperonin collaborating in RuBisCo assembly (Buchanan et al. 2000) and Hsp70 involved in PSII stress protection (Schroda et al. 2001). The FtsH-like related to PSII repair (Nixon et al. 2005, Cheregi et al. 2005) and turnover (Zaltsman et al. 2005a and b) was also present in the 2D gels. Two of the identified spots in our 2D maps (hypothetical protein and the thylakoid luminal 16.5 kDa

proteins) have unknown function; the hypothetical protein amount decreased in the PMMoV-S infected plants.

Comparative analysis of the chloroplastidic proteome from control and PMMoV-S infected plants revealed that the expression levels of some proteins implicated in Benson-Calvin cycle, electron transport chain and nitrogen metabolism decreased during the PMMoV-S infection (Fig. 2).

The proteins involved in the Benson-Calvin cycle affected by the PMMoV infection are: RbcL, RbcS, Rca, SFBA, SBPase, and PRK. The decrease on the amounts of both RuBisCO subunits and Rca is in agreement with the diminished transcript levels of these proteins during pathogenesis (Pérez-Bueno, 2003). The degradation of the RbcL subunit under different stress conditions (UV radiation, ozone, osmotic, etc.) is for some authors a consequence of oxidative modifications on this enzyme (Houtz et al. 2003 and references therein). Oxidative stress is usually induced in infected plants (Foyer and Harbinson 1994, Vranová et al. 2002). The Rca has a dual function, activating the RuBisCO complex, and as a chaperonin, protecting protein synthesis under stress conditions (Sánchez de Jiménez et al. 1995, Rokka et al. 2001). SFBA is codified by two genes in *Nicotiana* with differential expression levels under salt stress (Yamada et al. 2000). A similar situation seems to occur in our PMMoV-infected plants. We have identified three proteins spots corresponding to SFBA, being number 52 the most affected by the PMMoV-S infection. Probably, the exceeding spot is due to post-translational modifications. To evaluate the impact of the diminished levels of the SBPase -one of the key regulatory enzymes of the Benson-Calvin cycle- and PRK in infected plants, we take as model transgenic plant showing lower expression levels of both enzymes. Decrease on SBPase amounts induced limitations on CO₂ fixation and leaf carbohydrates content (Harrison et al. 1998); diminished PRK expression could be compensated by the higher activity of the remaining PRK in the plant (Banks et al. 1999). In general it is well documented that the decline on the Benson-Calvin enzymes levels induced adverse effects on CO₂ fixation,

carbohydrates accumulation and plant growth (Haake et al. 1998, Raines 2003). We have also documented (unpublished data, chapter C.3 in this work) a decrease of the net photosynthesis rate during the infection with PMMoV.

The plastid GS, a key protein in the nitrogen metabolism, is also diminished in PMMoV-S infected plants. Senescent plants present also decreased protein and mRNA levels of this enzyme, whereas the cytosolic one is induced (Masclaux-Daubresse et al. 2005, Teixeira et al. 2005). PMMoV-S infection on *Nicotiana benthamiana* shows similarities with senescence processes. In clover (*Trifolium repens* L.) senescence induced diminished levels of PsbO, both RuBisCO subunits and Rca, as well as GS (Wilson et al. 2002). This down-regulation pattern is similar to that found in symptomless leaves of PMMoV-infected *Nicotiana benthamiana* plants for the transcripts of these proteins (Pérez-Bueno 2003), and confirm that viral infection accelerates senescence processes.

In the 2D maps of the alkaline pH range from *Nicotiana benthamiana* chloroplasts appeared some PSI proteins, as the PsaD and PsaE (Fig. 3A, B, Table 1). These highly hydrophilic proteins, together with PsaC, that could be distinguished in the low pH range gels (Fig. 1A, Table 1), are located on the PSI stromal side being involved in the ferredoxin-docking (Sétif et al. 2002). PsaD and PsaE are codified by nuclear genes, existing two isogenes for both of them in *Arabidopsis thaliana* (Naver et al. 1999, Ihnatowicz et al. 2004) and *Nicotiana* spp. (Obokata et al. 1993, 1994, Yamamoto et al. 1993). In the case of *Nicotiana sylvestris*, the two *psaE* isogenes codify for 4 different polypeptides; however, we could detect only 2 PsaE spots in *N. benthamiana*. In *N. sylvestris* PsaD is also a protein family with two isoforms (PsaD1 and PsaD2), functionally redundant, encoded by 2 isogenes. However, we could detect up 8 PsaD spots, whose expression levels diminished due to the viral infection. Because of the high homology between PsaD1 and PsaD2 proteins (96/95% similarity/identity, Ihnatowicz et al. 2004), they could not be distinguished by the MALDI-TOF/TOF analysis. The *psaD* genes are differentially expressed during leaf development in

Nicotiana sylvestris (Yamamoto et al. 1993). *Arabidopsis* PsaD double mutants showed that this protein is essential for photosynthesis (Ihnatowicz et al. 2004). Its down-regulation induces both a high non-photochemical quenching and steady state chlorophyll fluorescence (Haldrup et al. 2003), a similar phenomenon was observed in our PMMoV-infected plants (Chaerle et al. 2006, Pérez-Bueno et al. 2006). Other proteins from the electron transport chain whose levels are diminished due to the PMMoV infection are Cyt. f, FRN and some belonging to the light harvesting complexes from both photosystems. The impact of the PMMoV infection on the photosynthetic electron transport that we have described in our previous works (Rahoutei et al. 2000, Pérez Bueno et al. 2004), could be explained by the down-regulation of proteins involved in this photosynthetic step as well as in light harvesting.

Other chloroplastidic protein present in the alkaline pH range and affected by the PMMoV infection is the ribosomal protein L14, a protein from the chloroplastidic large ribosomal subunit (Tanaka et al. 1986). The significance of its decrease in PMMoV-S infected plants remains unclear.

The presence of multigene families for different chloroplastidic proteins – PsbO, PsbP, PsbQ, PsaD, PsaE, SFBA- in *Nicotiana benthamiana* would allow the host plant to react in a more flexible way to environmental stimuli and different stress factors (Koiwa et al. 2002).

The understanding of the chloroplast proteome of *Nicotiana benthamiana*, a promiscuous host for different viral families, is of high interest for the study of the virus-plant interactions. In spite of the limitations of the 2-DE technique, it was powerful enough to obtain maps with about 200 polypeptides. Taking into account that *Nicotiana benthamiana* genome is not completely sequenced, we could identify a high number of proteins, similar to that reported in other publications here cited. The future application of non-gel-proteomics techniques for the study of the *N. benthamiana* chloroplastidic proteome, together with the progress in sequencing the genome of this host plant, will contribute to enlarge an emergent

investigation field lacking on these types of studies: influence of biotic stress factors in the photosynthetic apparatus proteome.

Acknowledgements

This research and M.P. contract was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Education (BIO2004-04968-C02-02, to M.B.) and FEDER Funds. The authors are very grateful to Drs. Isabel García Luque and Maite Serra (Centro Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid) for providing all PMMoV solutions and antibodies against the viral coat protein. In addition, they thank to J.A. López, E.Camafeita and E. Calvo from the Proteomic Unit of the National Centre for Cardiovascular Research (Madrid, Spain) for the skilful assistance with the MALDI/TOF-TOF analysis and protein identification.

References

- Alonso, E., García-Luque, I., Avila-Rincón, M.J., Wicke, B., Serra, M.T. and Díaz-Ruiz, J.R. (1989) A tobamovirus causing heavy losses in protected pepper crops in Spain. *J. Phytopathol.* 125: 67-76.
- Andaluz, S., López-Millán, A.F., De Las Rivas, J., Aro, E.M., Abadía, J. and Abadía, A. (2006) Proteomic profiles of thylakoid membranes and changes in response to iron deficiency. *Photosynth. Res.* 89: 141-155.
- Aro, E.M., Soursa, M., Rokka, A., Allahverdiyeva, Y., Paakkanen, V., Saleem, A., Battchikova, N. and Rintamaki, E. (2005) Dynamics of photosystem II a proteomic approach to thylakoid protein complexes.
- Bagginsky, S. and Gruissem, W. (2004) Chloroplast proteomics: potentials and challenges. *J. Exp. Bot.* 400: 1213-1220.
- Banks, F.M., Driscoll, S.P., Parry, M.A.J., Lawlor, D.W., Knight, J.S., Gray, J.C. and Paul, M.J. (1999) Decrease in phosphoribulokinase activity by antisense RNA in transgenic tobacco. Relationship between photosynthesis, growth and allocation at different nitrogen levels. *Plant Physiol.* 119: 1125-1136.
- Buchanan, B.B., Wilhelm, G. and Jones, R.L. (2000) Biochemistry and molecular biology of plants. Buchanan, B.B., Gruissem, W. and Jones, R.L. ed., American Society of Plant Biologist, Rockville, USA.

- Cánovas, F.M., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Jorrín, J., Mock, H.-P. and Rossignol, M. (2004) Plant proteome analysis. *Proteomics* 4: 285-298.
- Chaerle, L., Pineda, M., Romero-Aranda, R., Van Der Straeten, D. and Barón, M. (2006) Robotized thermal and chlorophyll fluorescence imaging of pepper mild mottle virus infection in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Physiol.* 47: 1323-1336.
- Cheregi, O., Sicora, C., Kos, P.B., Nixon, P.J. and Vass, I. (2005) The FtsH protease is required for the repair of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803 damaged by UV-B radiation. *BMC Plant Biology* 5: S8. Meeting Abstract.
- Ciambella, C., Roepstorff, P., Aro, E.M. and Zolla, L. (2005) A proteomics approach for investigation of photosynthetic apparatus in plants. *Proteomics* 5: 746-757.
- Corbett, J.M., Dunn, M.J., Posch, A. and Görg, A. (1994). Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilized pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: an interlaboratory comparison. *Electrophoresis* 15: 1205-1211.
- Cui, S., Huang, F., Wang, J., Ma, X., Cheng, Y. and Liu, J. (2005) A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. *Proteomics* 5: 3162-3172.
- Curto, M., Camafeita, E., López, J.A., Maldonado, A.M., Rubiales, D. and Jorrín, J.V. (2006) A proteomic approach to study pea (*Pisum sativum*) responses to powdery mildew (*Erysiphe pisi*). *Proteomics* 6: S163-S174.
- Ferro, M., Salvi, D., Rivière-Rolland, H., Vermat, T., Seigneurin-Berny, D., Grunwald, D., Garin, J., Joyard, J. and Rolland, N. (2002) Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: identification and subcellular localization of new transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 11487-11492.
- Foyer, C.H. and Harbinson, J. (1994) Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In: *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense system in plants*, Foyer, C.H. and Mullineaux, P.M. eds, 1-42. Boca Raton CRC Press.
- Friso, G., Giacomelli, L., Ytterberg, J.A., Peltier, J.B., Rudella, A., Sun, Q. and van Wijk, K.J. (2004) In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. *Plant Cell* 16: 478-499.
- Giacomelli, L., Rudella, A. and van Wijk, K.J. (2006) High light response of the thylakoid proteome in *Arabidopsis* wild type and the ascorbate-deficient mutant *vtc2-2*. A comparative proteomics study. *Plant Physiol.* 141: 685-701.
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R. and Weiss, W. (2000) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21: 1037-1053.

- Görlach, J., Schmid, J. and Amrhein, N. (1993) The 33 kDa protein of the oxygen-evolving complex: a multi-gene family in tomato. *Plant Cell Physiol.* 34: 479-501.
- Haake, V., Zrenner, R., Sonnewald, U. and Stitt, M. (1998) A moderate decrease of plastid aldolase activity inhibits photosynthesis, alters the levels of sugars and starch, and inhibits growth of potato plants. *Plant J.* 14: 147-157.
- Haldrup, A., Lunde, C. and Scheller, H.V. (2003) *Arabidopsis thaliana* plants lacking the PSI-D subunit of photosystem I suffer photoinhibition, have unstable photosystem I complexes, and altered redox homeostasis in the chloroplast stroma. *J. Biol. Chem.* 278: 33276-33283.
- Harrison, E.P., Willingham, N.M., Lloyd, J.C. and Raines, C.A. (1998) Reduced sedoheptulose-1,7-bisphosphatase levels in transgenic tobacco lead to decreased photosynthetic capacity and altered carbohydrate accumulation. *Planta* 204: 27-36.
- Houtz, R.L. and Portis, A.R. Jr. (2003) The life of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase – Posttranslational facts and mysteries. *Arch. Biochem. Biophys.* 414: 150-158.
- Hua, S.B., Dube, S.K., Barnett, N.M. and Kung, S.D. (1991a) Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding 23 kDa polypeptide of the oxygen-evolving complex of photosystem II in tobacco, *Nicotiana tabacum* L. *Plant Mol. Biol.* 16: 749-750.
- Hua, S.B., Dube, S.K., Barnett, N.M. and Kung, S.D. (1991b) Nucleotide sequence of gene *oe2-A* and its cDNA encoding 23 kDa polypeptide of the oxygen-evolving complex of photosystem II in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 17: 551-553.
- Hua, S.B., Dube, S.K. and Kung, S.D. (1997) Molecular evolutionary of the *pspP* gene family of the photosystem II oxygen-evolving complex in *Nicotiana*. *Genome* 36: 483-488.
- Huber, C.G., Walcher, W., Timperio, A., Troiani, S., Porceddu A. and Zolla, L. (2004) Multidimensional proteomic analysis of photosynthetic membrane proteins by liquid extraction-ultracentrifugation-liquid chromatography-mass spectrometry. *Proteomics* 4: 3909-3920.
- Ifuku, K. and Sato, F. (2002) A truncated mutant of the extrinsic 23-kDa protein that absolutely requires the extrinsic 17-kDa protein for Ca²⁺ retention in photosystem II. *Plant Cell Physiol.* 43: 1244-1249.
- Ifuku, K., Yamamoto, Y., Ono, T., Ishihara, S. and Sato, F. (2005a) PsbP protein, but not PsbQ protein, is essential for the regulation and stabilization of photosystem II in higher plants. *Plant Physiol.* 139: 1175-1184.
- Ifuku, K., Yamamoto, Y., Ishihara, S. and Sato, F. (2005b) Down-regulation of *psbO*, *psbP* and *psbQ* genes in *Nicotiana tabacum* by RNA interference technique. *Plant Cell Physiol.* 46: S27-S27.
- Ihnatowicz, A., Pesaresi, P., Varotto, C., Richly, E., Schneider, A., Jahns, P., Salamini, F. and Leister, D. (2004) Mutants for photosystem I subunit D of *Arabidopsis thaliana*: effects on

- photosynthesis, photosystem I stability and expression of nuclear genes for chloroplast functions. *Plant J.* 37: 839-852.
- Ishihara, S., Yamamoto, Y., Ifuku, K. and Sato, F. (2005) Functional analysis of four members of the PsbP family in photosystem II in *Nicotiana tabacum* using differential RNA interference. *Plant Cell Physiol.* 46: 1885-1893.
- Jones, A.M.E., Bennett, M.H., Mansfield, J.W. and Grant, M. (2006) Analysis of the defence phosphoproteome of *Arabidopsis thaliana* using differential mass tagging. *Proteomics* 6: 4155-4165.
- Kieselbach, T., Hagman, a., Andersson, B. and Schröder, P.W. (2000) The thylakoid lumen of chloroplast. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 273: 6710-6716.
- Kleffman, T., Russenberger, D., von Zychlinski, A., Christopher, W., Sjölander, K., Gruissem, W., and Baginsky, S. (2004) The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Curr. Biol.* 14: 354-362.
- Koiwa, H., Barb, A.W., Xiong, L., Li, F., McCully, M.G., Lee, B., Sokolchik, I., Zhu, J., Gong, Z., Reddy, M., Sharkhuu, A., Manabe, Yl., Yokoi, S., Zhu, J.K., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. (2002) C-terminal domain phosphatase-like family members (AtCPLs) differentially regulate *Arabidopsis thaliana* abiotic stress signalling, growth, and development. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99: 10893-10898.
- Masclaux-Daubresse, C., Carrayol, E. and Valadier, M.H. (2005) The two nitrogen mobilisation- and senescence-associated GS1 and GDH genes are controlled by C and N metabolites. *Planta* 221: 580-588.
- Merkle, T.H., Krenz, M., Wennig, A. and Schäfer, E. (1990) Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a gene encoding the 23 kDa polypeptide of the oxygen-evolving complex from mustard (*Sinapis alba* L.). *Plant Mol. Biol.* 14: 889-890.
- Murakami, R., Ifuku, K., Takabayashi, A., Shikanai, T., Endo, T. and Sato, F. (2005) Functional dissection of two *Arabidopsis* PsbO2. *FEBS J.* 272: 2165-2175.
- Naver, H., Haldrup, A. and Scheller, H.V. (1999) Cosuppression of photosystem I subunit PSI-H in *Arabidopsis thaliana*. Efficient electron transfer and stability of photosystem I is dependent upon the PSI-H subunit. *J. Biol. Chem.* 274: 10784-10789.
- Newton, R.P., Brenton, A.G., Smith, C.J. and Dudley, E. (2004) Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. *Phytochemistry* 65: 1449-1485.
- Nixon, P.J., Barker, M., Boehm, M., de Vries, R. and Komenda, J. (2005) FtsH-mediated repair of the photosystem II complex in response to light stress. *J. Exp. Bot.* 56: 357-363.

- Obokata, J., Mikami, K., Hayashida, N., Nakamura, M. and Sugiera, M. (1993) Molecular heterogeneity of photosystem I. *psaD*, *psaE*, *psaF*, *psaH* and *psaL* are all present in isoforms in *Nicotiana* spp. *Plant Physiol.* 102: 1259-1267.
- Obokata, J., Mikami, K., Yamamoto, Y. and Hayashida, N. (1994) Microheterogeneity of PSI-E subunit of photosystem I in *Nicotiana sylvestris*. *Plant Cell Physiol.* 35: 203-209.
- Peltier, J.B., Friso, G., Kalume, E.D., Roepstorff, P., Nilsson, F., Adamska, I. and van Wijk, K.J. (2000) Proteomics of the chloroplasts: systematic identification and targeting analysis of luminal and peripheral thylakoid proteins. *Plant Cell* 12: 319-341.
- Peltier, J.B., Emanuelsson, O., Kalume, D.E., Ytterberg, J., Friso, G., Rudella, A., Liberles, D.A., Söderberg, L., Roepstorff, P., von Heijne, G. and van Wijk, K.J. (2002) Central functions of the luminal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction. *Plant Cell* 14: 211-236.
- Peltier, J.B., Ytterberg, J.A., Sun, Q. and van Wijk, K.J. (2004) New functions of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* revealed by a simple, fast, and versatile fractionation strategy. *J. Biol. Chem.* 279: 49367-49383.
- Pérez-Bueno, M.L. (2003) Photosystem II and viral infection: Analysis of fluorescence imaging and regulation of the synthesis of the oxygen-evolving-complex proteins during pathogenesis. *Ph. D. Thesis, Granada University, Spain.*
- Pérez-Bueno, M.L., Rahoutei, J., Sajjani, C., García-Luque, I. and Barón, M. (2004) Proteomic analysis of the oxygen-evolving complex of photosystem II under biotic stress. Studies on *Nicotiana benthamiana* infected with tobamoviruses. *Proteomics* 4: 418-425.
- Pérez-Bueno, M.L., Ciscato, M., vandeVen, M., García-Luque I., Valcke, R. and Barón, M. (2006) Imaging viral infection. Studies on *Nicotiana benthamiana* plants infected with the pepper mild mottle tobamovirus. *Photosynth. Res.* 90: 111-123.
- Phee, B.-K., Cho, J.-H., Park, S., Jung, J.H., Lee, Y.-H., Jeong, J.-S., Bhoo, S.H. and Hahn, T.-R. (2004) Proteomic analysis of the response of *Arabidopsis* chloroplast proteins to high light stress. *Proteomics* 4: 3560-3568.
- Rahoutei, J., García-Luque, I., Cremona, V. and Barón, M. (1998) Effect of tobamovirus infection on PSII complex of infected plants. In *Photosynthesis: from light to biosphere*. 4: 2761-2764. G Garab, ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Rahoutei, J., García-Luque, I. and Barón, M. (2000) Inhibition of photosynthesis by viral infection: Effect on PSII structure and function. *Physiol. Plant.* 110: 286-292.
- Raines, C.A. (2003) The Calvin cycle revisited. *Photosynth. Res.* 110: 286-292.
- Reche, A., Lázaro, J.J., Hermoso, R., Chueca, A. and López Gorgé, J. (1997) Binding and activation of pea chloroplast fructosa-1,6-biphosphatase by homologous thioredoxins *m* and *f*. *Physiol. Plantarum* 101: 463-470.

- Rokka, A., Zhang, L. and Aro, E.M. (2001) RuBisCo activase: an enzyme with a temperature-dependent dual function? *Plant J.* 25: 463-471.
- Rose, J.K., Bashir, S., Giovannoni, J.J., Jahn, M.M. and Saravanan, R.S. (2004) Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant J.* 39: 715-733.
- Rossignol, M. (2001) Analysis of the plant proteome. *Curr. Opin. Biotech.* 12: 131-134.
- Rossignol, M., Peltier, J.-B., Mock, H.-P., Matros, A., Maldonado, A.M. and Jorrín, J.V. (2006) Plant proteome analysis: A 2004-2006 update. *Proteomics* 6: 5529-5548.
- Sánchez de Jiménez, E., Medrano, L. and Martínez-Barajas, E. (1995) RuBisCo-activase, a possible new member of the molecular chaperone family. *Biochem.* 34: 2826-2831.
- Schägger, H., Cramer, W.A. and von Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217: 220-230.
- Schevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68: 850-858.
- Schroda, M., Kropat, J., Oster, U., Rudiger, W., Vallon, O., Wollman, F.A. and Beck, C.F. (2001) Possible role for molecular chaperones in assembly and repair of photosystem II. *Biochem. Soc. Trans.* 29: 413-418.
- Schubert, M., Petersson, U.A., Haas, B.J., Funk, C., Schöder, w.P. and Kieselbach, T. (2002) Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 277: 8354-8365.
- Schuster, A.M. and Davies, E. (1983) Ribonucleic acid and protein metabolism in pea epicotyls. *Plant Physiol.* 73: 809-816.
- Sétif, P., Fischer, N., Lagoutte, B., Bottin, H. and Rochaix, J.-D. (2002) The ferredoxin docking site of photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* 1555: 204-209.
- Steinberg, T.H., Jones, L.J., Haugland, R.P. and Singer, V.L. (1996) SYPRO Orange and SYPRO Red Protein gel stains: One-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein. *Anal. Biochem.* 239: 223-237.
- Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J. and Holle, A. (2003) A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* 376: 952-965.
- Takahashi, H., Ehara, Y. and Hirano, H. (1991) A protein in the oxygen-evolving complex in the chloroplasts is associated with symptom expression on tobacco leaves infected with cucumber mosaic virus strain Y. *Plant Mol. Biol.* 16: 689-698.
- Tanaka, M., Wakasugi, T., Sugita, M., Shinozaki, K. and Sugiura, M. (1986) Genes for the eight ribosomal proteins are clustered on the chloroplast genome of tobacco (*Nicotiana tabacum*):

- Similarity to the S10 and *spc* operons of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6030-6034.
- Teixeira, J., Pereira, S., Cánovas, F. and Salema, R. (2005) Glutamine synthetase of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Desiree) plants: cell- and organ-specific roles in nitrogen assimilation and mobilization. *J. Exp. Bot.* 56: 663-671.
- van Wijk, K.J. (2001) Challenges and prospects of plant proteomics. *Plant Physiol.* 126: 501-508.
- van Wijk, K.J. (2004) Plastid proteomics. *Plant Physiol. Biochem.* 42: 963-977.
- Vranová, E., Inzé, d. and Van Breusegem, F. (2002) Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 53: 1227-1236.
- Wales, R., Nweman, B.J., Pappin, D. and Gray, J.C. (1989) The extrinsic 33 kDa polypeptide of the oxygen-evolving complex of photosystem II is a putative calcium-binding protein and is encoded by a multi-gene family in pea. *Plant Mol. Biol.* 12: 439-451.
- Whitelegge, J.P. (2003) Thylakoid membrane proteomics. *Photosynth. Res.* 78: 265-277.
- Wilson, K.A., McManus, M.T., Gordon, M.E. and Jordan, T.W. (2002) The proteomics of senescence in leaves of white clover, *Trifolium repens* L. *Proteomics* 2: 1114-1122.
- Yamada, S., Komori, T., Hashimoto, A., Kuwata, S., Imaseki, H. and Kubo, T. (2000) Differential expression of plastidic aldolase genes in *Nicotiana* plants under salt stress. *Plant Sci.* 54: 61-69.
- Yamamoto, Y., Tsuji, H. and Obokata, J. (1993) Structure and expression of a nuclear gene for the PSI-D subunit of photosystem I in *Nicotiana sylvestris*. *Plant. Mol. Biol.* 22: 985-994.
- Yan, J.X., Wait, R., Berkelman, T., Harry, R.A., Westbrook, J.A., Wheeler, C.H. and Dunn, M.J. (2000) A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray-mass spectrometry. *Electrophoresis* 21: 3666-3672.

D. DISCUSIÓN

El uso combinado e incluso simultáneo de varias técnicas de imagen (termografía, Chl-FI, MCFI) para el diagnóstico del estrés vegetal permitiría, en el caso de las interacciones patógeno-planta huésped, la elaboración de *catálogos de estrés* basados en las *marcas* específicas que cada patógeno deja en la planta huésped, modificando su metabolismo y activando sus mecanismos de defensa. Esto constituiría una potente herramienta en la diagnosis y cuantificación de diferentes respuestas a estrés biótico (Chaerle et al. 2004, 2007a). La *marca* de actuación de PMMoV en *N. benthamiana* se encuentra resumida en la tabla 2, que recoge los resultados de la presente Tesis Doctoral y datos previos de nuestro grupo (Pérez Bueno 2003, Pérez Bueno et al. 2004, 2006, Sajnani 2005, Sajnani et al. 2007), obtenidos en colaboración con el de la Dra. García Luque (CIB, CSIC, Madrid) y otros grupos europeos.

Tabla 2: Marca de actuación de PMMoV-I y PMMoV-S en *Nicotiana benthamiana*. Los resultados han sido obtenidos en nuestro laboratorio y en colaboración con el de la Dra. I. García-Luque (CIB, CSIC, Madrid), mediante diversas aproximaciones experimentales durante el desarrollo de este trabajo y de otros anteriores. La tabla muestra las diferencias significativas encontradas entre hojas de las plantas control e infectadas en cada uno de los dpi analizados. En negro, se describe la sintomatología. Los diferentes colores identifican los resultados obtenidos con cada una de las técnicas empleadas en nuestros estudios. **Rojo:** medidas de Chl-FI con el FluorCam; **rosa:** inmunodetección de la CP en impronta de hojas; **azul oscuro:** medidas de MCFI; **púrpura:** detección por Northern Blot de mRNAs de proteínas cloroplastídicas (Pérez-Bueno 2003); **marrón:** análisis de TL en hoja (Sajnani 2005, Sajnani et al. 2007); **amarillo:** detección por HPLC de compuestos fenólicos emisores de BGF; **verde claro:** medidas de concentración de Chl; **verde oscuro:** medidas de Chl-FI y termografía de imagen mediante un sistema de imagen robotizado; **naranja:** determinación del patrón proteico cloroplastídico mediante electroforesis 2D (el rango de pH 4-7 es obra de Pérez-Bueno et al. 2004 y Sajnani 2005); **gris:** estudios de apertura estomática en impresiones epidérmicas; **azul claro:** determinación de parámetros de intercambio gaseoso con IRGA. AS: hojas asintomáticas; S: hojas sintomáticas. * No hay ensayos de Northern Blot entre 14 y 21 dpi. mRNAs: CP, proteína de la cápside viral; gox, glicolato oxidasa; lhcb1, proteína de unión a clorofila a/b tipo I del PSII; psaK, subunidad K del PSI; psbA, proteína D1 del PSII; psbO, psbP, psbQ, proteínas del OEC (33, 24 y 16 kDa, respectivamente); rbcL, subunidad grande de la RuBisCO; rbcS, subunidad pequeña de la RuBisCO rca, RuBisCO activasa. AB: abaxial; AD: adaxial; F440: fluorescencia azul; F520: fluorescencia verde; F690: fluorescencia roja; F740: fluorescencia en el rojo lejano. HL: alta intensidad lumínica ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). AG: banda afterglow; B: banda B; C: banda C; HTL: bandas de termoluminiscencia a altas temperaturas. Chl: clorofila. gs: conductancia estomática.

| dpi | PMMoV-I | | PMMoV-S | |
|-----|---|--|--|--|
| | AS | S | AS | S |
| 4 | | | Infección detectada por "selección de características" | Preseca del virus en la base |
| 5 | ↓F690 cara AB ↑F440/F690 cara AD | | ↑F520 cara AD | Curvamiento Hoja completa con virus ↑F520 cara AB ↓F690 cara AB |
| 6 | Infección detectada por "selección de características" | Curvamiento Hoja completa con virus | | |
| 7 | ↓F690 cara AD ↓F740 ambas caras ↑F440/F690 cara AB ↑F440/F740 cara AD mRNA CP detectado ↓mRNA: psaK, gox | Curvamiento ↓F690 cara AD ↓F740 cara AD ↑F440/F690 cara AD mRNA CP detectado ↓mRNA: lhcb1, rca, rbcS, psaK, gox, rbcL y psbA ↑ Proporción AG/B Desplazamiento banda AG hacia mayores temperaturas | ↑Temperatura en la zona de venas ↓mRNA: psaK, rca, gox Desplazamiento leve banda AG hacia mayores temperaturas Aparición banda HTL2 | ↑ Ácido clorogénico ↑F440 ambas caras ↑F520 cara AD ↓F690 cara AD ↓F740 ambas caras ↑F440/F690 ambas caras ↑F440/F740 ambas caras ↓ F690/F740 cara AD ↑Chl mRNA CP detectado ↓mRNA: lhcb1, rca, rbcS, psaK, gox, rbcL y psbA ↑proporción AG/B Desplazamiento banda AG hacia mayores temperaturas |
| 9 | Alteración patrón F ₃ /F ₀ en régimen de HL | | Alteración patrón F ₃ /F ₀ en régimen de HL | |
| 10 | ↑Temperatura en la zona de venas ↑F440/F740 cara AB | ↑F440 ambas caras ↑F520 cara AB ↓F690 cara AB ↓F740 cara AB ↑F440/F690 cara AB ↑F440/F740 ambas caras ↑F690/F740 cara AB | ↑F440 cara AB ↑F520 cara AB | ↑F690/F740 cara AB |
| 12 | ↑F440 cara AB ↑F520 cara AB ↓F690/F740 cara AD | ↓F690/F740 cara AD | ↑F440/F520 cara AB ↑F440/F690 cara AB | |

| dpi | PMMoV-I | | PMMoV-S | |
|-----|--|---|---|--|
| | AS | S | AS | S |
| 14 | <p>Enanismo planta completa</p> <p>↑ Chl</p> <p>↑F440/F520 cara AB</p> <p>CP no detectada en geles 2D</p> <p>↓proteínas (mezcla hoja ASIN +SIN): 18-20, 29, 30, 32, 34-37, 42-50</p> <p>↓ mRNA: lhcb1, rbcS, rca, psbO, psbP, psbQ</p> <p>Desplazamiento bandas AG y B hacia mayores temperaturas</p> <p>↓ Proporción AG/B</p> <p>↑Banda C</p> | <p>↑Temperatura en hoja completa</p> <p>↑ Ácido clorogénico</p> <p>↑F520 cara AD</p> <p>↓ mRNA: psbO, psbP, psbQ</p> <p>↑Banda C</p> | <p>Enanismo planta completa</p> <p>Patrón Chl-F alterado</p> <p>↑ Chl</p> <p>↑F440/F740 ambas caras</p> <p>Preseca del virus en la base</p> <p>CP detectada en geles 2D</p> <p>↓proteínas: 7-15, 18-20, 28-30, 34-37, 42-54, 57-67, 69</p> <p>↑ o aparecen proteínas (mezcla hoja ASIN +SIN): 16, 21, 32, 65, 66, 70, 71</p> <p>mRNA CP detectado</p> <p>↓mRNA: lhcb1, rbcS, psbO, psbP, psbQ</p> <p>Desplazamiento significativo bandas AG y B hacia mayores temperaturas</p> <p>↓ proporción AG/B</p> <p>↑banda C</p> | <p>↑Temperatura en hoja completa</p> <p>↓Chl</p> <p>↓ mRNA: psbO, psbP, psbQ</p> <p>↑Banda C</p> <p>Banda HTL2</p> |
| 16 | ↓ apertura estomática | ↓ apertura estomática | ↓ apertura estomática | ↓ apertura estomática |
| 17 | <p>Patrón Chl-F alterado</p> <p>Presencia del virus en la base</p> <p>↑Chl</p> <p>↑F440/F520 cara AD</p> <p>Alteración patrón NPQ₂₀</p> | | <p>↑Temperatura en hoja completa</p> <p>↓F740 cara AB</p> <p>↑F440/F520 cara AD</p> <p>↑F690/F740 cara AB</p> <p>↑Chl</p> <p>Alteración patrón NPQ₂₀</p> <p>Alteración patrón Φ_{psm2}</p> <p>↓tasa fotosíntesis</p> | <p>↑F440/F520 cara AD</p> <p>↑F690/F740 cara AD</p> |
| 19 | <p>↓ g_s</p> <p>↓tasa fotosíntesis</p> | | <p>↓ g_s</p> <p>↓ F_v/F_M</p> | <p>↓ g_s</p> |
| 21 | <p>↑Temperatura en hoja completa</p> <p>mRNA CP detectado*</p> <p>↓ mRNA: psbA, rbcL</p> <p>↓ F_v/F_M</p> | <p>Inicio fase recuperación: hojas sin curvar y crecimiento en altura</p> <p>Temperatura de la hoja similar al control</p> <p>↓Chl</p> <p>Niveles de ácido clorogénico similares al control</p> | <p>↓ mRNA: psbA, rbcL</p> | |
| 28 | <p>↑F440/F520 cara AD</p> <p>↓F690/F740 cara AD</p> <p>↓mRNA: rbcL, psbA</p> | <p>Fase de recuperación completa</p> <p>Chl equivalente a la del control</p> <p>↑mRNA: lhcb1, rca, rbcS, psaK, gox, rbcL, psbA, psbO, psbP, psbQ</p> | <p>mRNA: psbO, psbP, psbQ, lhcb1, rbcS, psaK, psbA prácticamente indetectables</p> | <p>mRNA: psbO, psbP, psbQ, lhcb1, rbcS, psaK, psbA prácticamente indetectables</p> |

Las diferentes técnicas de imagen empleadas en este trabajo para el análisis de la interacción compatible *Nicotiana benthamiana*-PMMoV han revestido especial importancia para el seguimiento de las hojas AS (no desarrollan síntomas visibles) a lo largo de la infección. Cambios en parámetros termográficos o de fluorescencia en estas hojas de plantas infectadas anteceden a la detección del virus en las mismas y manifestarían, en ocasiones, posibles respuestas defensivas de la planta. Los patrones espaciales que adoptan estos parámetros en momentos cruciales de la infección podrían asimismo ser reflejo del movimiento viral en la planta huésped.

La situación en las hojas S, que desarrollan los primeros síntomas visibles (curvamiento) a 5-7 dpi, es más compleja ya que los cambios en los parámetros analizados por termografía, Chl-FI o MCFI en las plantas de *N. benthamiana* infectadas con PMMoV ocurren al mismo tiempo o con posterioridad al desarrollo de la sintomatología.

Las primeras diferencias entre plantas de *N. benthamiana* control e infectadas con PMMoV, se han logrado detectar a 4 dpi para la infección con PMMoV-S y a 6 dpi para PMMoV-I (Tabla 2), tras el registro de las cinéticas de Chl-F con el FluorCam y la búsqueda mediante métodos estadísticos avanzados como la “selección de características” (*feature selection*, A.2.3.3) de imágenes que ofrezcan un alto contraste entre las plantas sanas y las infectadas, usando nuevos algoritmos. Dichos cambios se registraron en plantas sin síntomas visibles de la infección y en hojas AS (Fig. 7, sección C.3) en las que aún no se había detectado el virus (Fig. 7, sección C.1). La “selección de características” ya había sido empleada con éxito en el estudio de plantas de *Arabidopsis* infectadas con *Pseudomonas syringae*, siendo capaz de detectar la infección con anterioridad a los parámetros tradicionales de Chl-F (Berger et al. 2007, Matouš et al. 2007). Sin embargo, su principal desventaja respecto a éstos es que las imágenes obtenidas no representan ningún parámetro que refleje cambios fisiológicos en las plantas analizadas.

Ateniéndonos a esta limitación, podríamos decir que la medida de BGF realizada con el equipo de MCFI diseñado en la Universidad ELTE de Budapest ha sido realmente la técnica más precoz a la hora de detectar cambios en las plantas de *N. benthamiana* infectadas con PMMoV. A 5 dpi se registra un aumento de F520 tanto en la hoja AS como en la S en las plantas infectadas con PMMoV-S, ocurriendo de forma más temprana que en las inoculadas con PMMoV-I (7 dpi), como corresponde a la sintomatología y a la menor virulencia de dicha cepa (Rahoutei et al. 2000). El incremento de BGF en las hojas S de las plantas infectadas es mucho más acentuado que en hojas AS. Los cambios en BGF suceden, por regla general, de una forma más acentuada en la cara AB de las hojas analizadas (Fig. 1-5, sección C.2).

La medida de BGF aporta información sobre el metabolismo secundario de las plantas, ya que son los compuestos derivados de la ruta del shikimato los implicados en esta emisión (Buschmann y Lichtenthaler 1998, Cerovic 1999). Si las medidas se realizan, como en nuestro caso, en aparatos de MCFI que permiten detectar también la emisión de Chl-F, analizaríamos en paralelo los procesos fotosintéticos primarios. La capacidad de obtener imágenes de dichas emisiones de fluorescencia y de los diferentes cocientes entre ellas, abre la posibilidad de visualizar espacialmente los efectos causados tanto por factores de estrés abióticos como bióticos en el vegetal (Lang et al. 1996, Lichtenthaler et al. 1996, Lichtenthaler y Miehe 1997). Pese a ello, y a diferencia de las de Chl-FI, las medidas de BGF -puntuales o de imagen- han sido usadas en escasas ocasiones en el seguimiento de la infección por patógenos (Niemann et al. 1991, Buschmann y Lichtenthaler 1998, Szigeti 2002, Sajani 2005, Swarbrick et al. 2006). En el caso de la infección por virus, el único trabajo sobre MCFI publicado hasta la fecha corresponde a Chaerle et al. (2007b), que detectaron un aumento de BGF durante la HR provocada por TMV en tabaco resistente, atribuyéndola a un aumento de escopoletina. La carencia de información sobre la infección sistémica en este

campo, hace aún más valiosos nuestros datos obtenidos durante la infección por PMMoV en *N. benthamiana*.

Los cambios en BGF suceden de forma más acentuada en la cara AB de las hojas (Fig. 1-5, sección C.2), así que en general son recomendables las medidas en el envés de la hoja para la detección del estrés biótico. La diferencia en la emisión de fluorescencia de la cara AD y AB incluso en una hoja sana está relacionada con la diferente anatomía y contenido de Chl de ambas caras de la hoja. Las hojas de plantas dicotiledóneas como *N. benthamiana* son bifaciales (Fig. 8A), lo que supone que la luz de medida puede penetrar mejor en la cara AB debido al menor empaquetamiento del parénquima lagunar y lograr una mayor eficiencia de excitación (A.2.2.1, Sajjani 2005). Asimismo, el contenido de Chl de la cara AD es mayor (Cerovic et al. 2002 y referencias incluidas), como lo demuestran nuestros datos del cociente F690/F740 (Fig. 4 y 5, sección C.2), que es inversamente proporcional al contenido de Chl de las hojas (Lichtenthaler et al. 1986, Stober y Lichtenthaler 1992, Babani y Lichtenthaler 1996, Gitelson et al. 1998, 1999, Buschmann et al. 2000); la mayor cantidad de Chl de la cara AD reabsorbe la BGF emitida por la propia hoja con mayor eficiencia que en la cara AB (Buschmann y Lichtenthaler 1998, Cerovic et al. 1999).

Aunque el incremento en BGF inducido por la infección viral afecta a toda la hoja AS, las imágenes obtenidas en plantas infectadas muestran un característico patrón espacial a 17 dpi, registrando las venas principales de la hoja los mayores niveles de BGF (Fig. 2, 3, sección C.2). El incremento de BGF en el resto de la hoja es mayor en el caso de F520 que en el de F440, probablemente por una acumulación de compuestos que fluorescen en el verde bajo estreses que actúan a largo plazo (Buschmann y Lichtenthaler 1998) y que hasta el momento no hemos identificado debido a la presencia mayoritaria de ácido clorogénico, como veremos más adelante; además F520 es reabsorbida por otros pigmentos fotosintéticos con menor eficacia que F440 (Lichtenthaler et al. 1996). Las hojas S presentan también un patrón similar de BGF aunque peor definido, con altos valores de esta emisión

en la zona de venas. La aparición de este tipo de patrón en ambos tipos de hojas se ve favorecida por el hecho de que, a diferencia de la Chl-F, la BGF es más alta en la zona vascular de la hoja incluso en plantas no estresadas, debido a un menor contenido de Chl de las venas que evita la reabsorción de la fluorescencia emitida (Lichtenthaler et al. 1996). Naturalmente, el contraste entre zona vascular y el resto del limbo foliar respecto a emisión de BGF, es mucho mayor en las hojas de plantas infectadas que en las sanas (Fig. 2, sección C.2).

La tabla 2 nos muestra también que los cocientes entre las distintas emisiones de fluorescencia medidas con el equipo de MCFI son buenos indicadores de la infección viral, a partir de 5 y 7 dpi (PMMoV-I y -S, respectivamente), tanto en hoja AS como S (Fig. 4, 5, sección C.2). De entre todos los cocientes estudiados, F440/F520 fue el más tardío en revelar la infección viral, de acuerdo con datos previos que afirman que es un indicador de estrés a largo plazo (Buschmann y Lichtenthaler 1998). F440/F690 y F440/F740 se consideran indicadores tempranos de estrés (Schweiger et al. 1996, Buschmann y Lichtenthaler 1998), aumentando en hojas de col china infectadas con el virus del mosaico amarillo del nabo (Zsigeti et al. 2002); en nuestro caso, F440/F690 es el más precoz de ambos. Los dos cocientes aumentan durante de la infección viral, y en el caso de las plantas control lo hacen con la edad de la planta, debido al progresivo aumento de la BGF y al descenso de la fluorescencia emitida por la Chl (Fig. 1, sección C.2). El hecho de que este aumento sea también apreciable en la cara AD de las hojas, hace que estos cocientes sean especialmente útiles a la hora de aplicar esta técnica en campo, donde normalmente se mide esta cara de la hoja y no la AB. Esto, junto con la capacidad de distinguir entre dos cepas de un mismo virus, estableciendo que la magnitud de los cambios en los parámetros medidos es acorde con la virulencia de los mismos, incluyendo la fase de recuperación que sólo presentan las plantas infectadas con PMMoV-I, hacen de la MCFI una técnica muy prometedora para caracterizar los cambios que la infección sistémica ocasiona en el metabolismo fotosintético y secundario de las plantas infectadas.

Paralelamente a las medidas de MCFI, hemos registrado mediante HPLC un aumento de los niveles de un ácido hidroxicinámico que podría ser el principal responsable de la emisión de BGF: el ácido clorogénico (Fig. 6, sección C.2). Los niveles de este compuesto, mayoritario en plantas de tabaco (Takahama 1998, Ounis et al. 2001, Cerovic et al. 2002) y alcachofa (Morales et al. 2005), aumentaron en las hojas AS (no se muestra) y S de plantas infectadas comparadas con sus respectivos controles. La concentración de ácido clorogénico aumenta con la edad de la hoja debido a la continua exposición a la luz (Takahama 1998, Cerovic et al. 1999, 2002, Ounis et al. 2001), lo que podría originar el incremento de BGF en las hojas AS de plantas control a partir de 21 dpi (Fig. 1, 2, sección C.2). Los niveles de ácido clorogénico en las hojas S de las plantas infectadas se corresponden con el incremento de BGF registrado en las mismas y con la virulencia de la cepa viral empleada, mostrando un mayor contenido de este compuesto fenólico las plantas infectadas con PMMoV-S. A su vez, las hojas S de las plantas infectadas con PMMoV-I muestran un descenso de ácido clorogénico (y consecuentemente, una tendencia a la baja de BGF) a partir de 21 dpi, lo que corresponde a la fase de recuperación de los síntomas, a pesar de que el virus sigue presente en dichas hojas (Fig. 7, sección C.1). La mayor concentración de ácido clorogénico en las plantas infectadas confirma resultados previos de nuestro grupo (Sajjani 2005), en los que las características de los espectros de excitación por UV de discos de hojas de *N. benthamiana* se corresponden con las del espectro del ácido clorogénico puro. Sin embargo, la detección de este ácido en la hoja no excluye la presencia de otros polifenoles minoritarios que también podrían contribuir a la BGF.

A los cambios durante la infección viral detectados en la emisión de BGF en plantas infectadas, les siguen los que afectan al patrón termal de la hoja, que incrementa su temperatura (Tabla 2). Las primeras hojas afectadas son las AS de las plantas infectadas con PMMoV-S (7 dpi); la respuesta a PMMoV-I es idéntica, pero está retrasada 3 días (10 dpi; Tabla 1, sección C.1). El aumento de

temperatura comenzó en la zona adyacente a las venas principales, para luego expandirse progresivamente, hasta que toda la hoja mostró una mayor temperatura que el control a 17 y 22 dpi (PMMoV-S e -I, respectivamente; Fig. 1 y 2, sección C.1). El control registró un aumento de temperatura a partir de 22 dpi (Fig. 1, sección C.1), que sin embargo fue homogéneo y no progresivo (Fig. 2, sección C.1), probablemente por el comienzo de la fase de senescencia de la hoja equivalente a la AS. A ello apuntan el menor contenido de Chl de las hojas con respecto a días anteriores (Fig. 6A, sección C.1), la disminución de la conductancia estomática de estas hojas (Fig. 3C, sección C.1) que puede ser indicativa de un envejecimiento del aparato estomático (Wardle y Short 1983, Willmer et al. 1988) y la reducción de la tasa de fotosíntesis neta (A) con respecto a días anteriores (Fig. 2, sección C.3). El valor medio de temperatura de la hoja AS completa de las plantas infectadas no mostró diferencias significativas con respecto al control (Fig. 3A, sección C.1), lo que muestra el mayor poder resolutivo de las imágenes y la enorme utilidad de la termografía de imagen en el seguimiento de la infección por PMMoV en *N. benthamiana*.

Al contrario que en las hojas AS, el incremento de temperatura en la hoja S de las plantas infectadas fue homogéneo y tuvo lugar a partir de los 14 dpi (Fig. 3B, 4, sección C.1), detectándose tanto en imágenes como en los valores de temperatura medios de la hoja completa.

La temperatura de las hojas está asociada a la transpiración de las mismas y, por tanto, a la conductancia estomática (Fuchs y Tanner 1966, Jones 1998), lo que ha sido confirmado por diversos autores empleando: porómetros o IRGAs (Cherle et al. 1999, 2001), *peelings* o impresiones epidérmicas (Boccaro et al. 2001), además de una combinación de ambas técnicas (Lindenthal et al. 2005, Oerke et al. 2006), como ha sido nuestro caso. El número de estomas o su grado de apertura pueden también determinar la temperatura de las hojas (Jones 1998). Las impresiones epidérmicas mostraron que el número de estomas de las hojas AS y S de plantas infectadas es el mismo que el de sus respectivos controles (Fig. 5,

sección C.1, anexo 1); sin embargo, el grado de apertura de los estomas a 16 dpi era menor en las plantas infectadas. Por tanto, el cierre estomático estaría provocando el incremento de temperatura, lo que fue confirmado mediante las mediciones realizadas con el IRGA (Fig. 3C, 3D, sección C.1). Otros estudios empleando diferentes sistemas virus-planta huésped ya habían demostrado una reducción de la conductancia estomática del vegetal (Levy y Marco 1991, Sampol et al. 2003, Bertamini et al. 2004, Zhou et al. 2004, Guo et al. 2005a y b). Sin embargo, el IRGA detectó el cierre estomático más tarde que la termografía de imagen, a partir de 19 dpi en hojas S y en la hoja AS de las plantas infectadas con PMMoV-S, o incluso no lo detecta, como es el caso de la hoja AS de las plantas infectadas con PMMoV-I (Fig. 3C, 3D, sección C.1). La aparente falta de sensibilidad del IRGA podría deberse a que, durante la medida, la pinza se situó en el extremo apical de la hoja, donde el incremento de temperatura tiene lugar más tarde que en las zonas centrales (Fig. 1, sección C.1). Ya que este aparato no puede revelar patrones espaciales de transpiración, la termografía de imagen resulta más resolutive que otras técnicas equivalentes, y podemos afirmar con Jones (1999) que posee suficiente resolución espacial como para proporcionar información sobre la variabilidad de la conductancia estomática a lo largo de la superficie de una hoja.

Para tratar de correlacionar el movimiento del virus en las hojas AS con el efecto térmico, se realizaron impresiones de hojas donde la proteína de la cápside viral fue detectada con un anticuerpo específico. Los resultados mostraron que el virus comienza a penetrar en las hojas AS con posterioridad al aumento de temperatura (14 y 17 dpi, en plantas infectadas con PMMoV-S e -I, respectivamente; Fig. 7, Tabla 1, sección C.1), de acuerdo con resultados previos de Northern Blot (Pérez-Bueno 2003).

Respecto al agente directo causante del cierre estomático durante la infección viral, está bien documentada la acumulación de varias sustancias que afectan la apertura estomática durante las interacciones planta-patógeno: ácido salicílico (Malamy et al. 1990, Van Der Straeten et al. 1995, Chaerle et al.1999), óxido

nítrico (Del Río et al. 2004, Mur et al. 2005), las hormonas vegetales ABA y auxina (Whenham y Fraser 1981, Whenham et al. 1986, Grabov y Blatt 1998) y hasta compuestos fenólicos (Bhatia et al. 1986, Nicholson y Hammerschmidt 1992, Kofalvi y Nassuth 1995, Chaerle et al. 2001, Balogun y Teraoka 2004). Al ácido clorogénico se le atribuye la propiedad de inhibir la apertura estomática (Plumbe y Willmer 1986) y la de cerrar los estomas (Einhellig y Kuan 1971). Sin embargo, el aumento de BGF en las hojas AS y S no correlaciona temporalmente con el aumento de temperatura de las mismas (Tabla 1, C.1 y C.2), ni el patrón de BGF (Fig. 2 y 3, sección C.2) con el efecto expansivo del aumento de temperatura en la hoja AS (Fig. 1 y 2, sección C.1). Por tanto, la subida de temperatura no parece ser consecuencia directa de la acumulación de fenoles, si bien éstos, una vez presentes en las hojas, podrían contribuir al descenso de la conductancia estomática. La sustancia causante del cierre estomático y/o de la acumulación de ácido clorogénico está aún por determinar.

Más tardíos que los cambios en el patrón termal de las hojas de plantas infectadas son los que afectan a la emisión de Chl-F, que aparecen a 9 dpi en la hoja AS. Se detectan registrando la curva de Kautsky con el FluorCam a bajas (LL, $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y altas (HL, $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) intensidades de luz actínica. Tras aplicar estudios estadísticos a las cinéticas de inducción de Chl-F (Fig. 5, C.3), se encontró un parámetro que evidenciaba diferencias entre las hojas AS de las plantas infectadas con ambas cepas virales y sus respectivos controles en medidas realizadas a HL, mucho antes que con los protocolos tradicionales (17 dpi; Pérez-Bueno et al. 2006, Fig. 1, sección C.3, Tabla 2). Este parámetro es la emisión de Chl-F a los 5 s de la cinética de inducción de fluorescencia (es decir, tras el encendido de la luz actínica), con respecto a la fluorescencia basal o F_0 (F_5/F_0). Las imágenes del mismo evidencian un patrón asociado a venas característico de plantas infectadas que no se vislumbra en las hojas correspondientes de las plantas control (Fig. 6, sección C.3). El cambio en la emisión de Chl-F a los 5 s de la cinética con respecto a los controles, ocurre en torno al pico de emisión de

fluorescencia que tiene lugar cuando se induce el ciclo de Benson-Calvin (Ireland et al. 1984), lo que reflejaría algún tipo de perturbación en este proceso durante la patogénesis, como discutiremos posteriormente.

Si avanzamos en la infección (14 dpi) los cambios ocurridos a nivel fisiológico son claros tanto en hoja S como AS y se ponen de manifiesto con el amplio rango de técnicas utilizadas por nuestro grupo. En este momento, la inhibición del crecimiento en plantas infectadas es evidente, con un efecto más drástico en las inoculadas con PMMoV-S. En estas últimas se detecta además la llegada del virus en las improntas de hojas (Fig. 7, sección C.1), los geles 2D de preparaciones cloroplastídicas (Fig. 1, 2, sección C.4) y en los ensayos previos de Northern Blot (Pérez-Bueno 2003). A 14 dpi, las imágenes de Chl-FI de hojas AS de plantas infectadas con PMMoV-S captadas con el sistema robotizado del laboratorio de la Dra. Van Der Straeten (Fig. 1, sección C.1), y a 17 dpi con el FluorCam (no se muestran) y el sistema de MCFI (Fig. 2, sección C.2), exhiben un patrón espacial en el que las venas principales presentan una diferente emisión de Chl-F que el resto de la hoja; en etapas más tardías, el patrón en torno a venas se expande a las zonas circundantes, mostrando el tejido intervenal una menor emisión de Chl-F. Este patrón espacial puede correlacionarse con el avance del virus en la hoja (Fig. 1, 7, sección C.1), como también ocurre con el patrón de NPQ estudiado en trabajos anteriores de nuestro grupo (Pérez-Bueno et al. 2006) y en el presente (Fig. 1, sección C.3). En el caso de la hoja AS de las plantas infectadas con PMMoV-I, tiene lugar el mismo fenómeno de alteración del Chl-FI de la hoja asociado al movimiento viral (Fig. 1, sección C.1) a 17 dpi, cuando ya el virus es detectable en esa hoja (Fig. 7, sección C.1). En todos estos ensayos la Chl-FI aparece como una potente herramienta para determinar el avance del virus en tejidos que permanecen asintomáticos.

El incremento en Chl-F en las zonas de avance viral de la hoja AS de las plantas infectadas podría atribuirse a una inhibición del transporte electrónico fotosintético en el PSII, ya que en ensayos anteriores hemos descrito daños en el

OEC por los tobamovirus objeto de este estudio, debidos a perturbaciones en la transcripción de los genes codificadores de las proteínas de este complejo (Rahoutei et al. 1999, 2000, Pérez-Bueno 2003, Pérez-Bueno et al. 2004). Las medidas puntuales realizadas con el PAM sobre el mismo sistema huésped-parásito indicaron que el número de CR abiertos disminuye durante la patogénesis (Rahoutei et al. 2000); un mayor número de CR cerrados podría ser el responsable del incremento de emisión de Chl-F. También se ha detectado una disminución de la eficiencia del transporte electrónico en el PSII durante la infección con otros tobamovirus (van Kooten et al. 1990, Balachandran y Osmond 1994, Balachandran et al. 1994; Balachandran 1997 y referencias incluidas), así como con virus pertenecientes a otras familias (Bertamini et al. 2004).

A 14 dpi, también son patentes cambios en el proteoma cloroplastídico de las plantas de *N. benthamiana* infectadas con PMMoV al compararlo con el de sus controles. Si se analiza el rango de pH 4-7 en geles de electroforesis proteica 2D, es evidente que la infección induce un descenso en al menos 26 polipéptidos pertenecientes a 13 proteínas diferentes; la mayoría de ellas pertenecen al ciclo de Benson-Calvin y a la cadena de transporte electrónico fotosintético (Fig. 1 y 2, sección C.4; Sajnani 2005). Como era de esperar, PMMoV-S induce las mayores alteraciones.

Si nos atenemos al rango de pH 6-11, del que solamente tenemos datos correspondientes a la infección por PMMoV-S, conseguimos visualizar en geles 2D, 53 manchas (Fig. 3A, 3B, sección C.4), de las cuales resultaron proteínas de interés 21 (Tabla 1, sección C.4). Cinco de ellas eran proteínas cloroplastídicas que ya aparecían en los geles de rango ácido realizados por Sajnani (2005), debido al solapamiento de ambos rangos en una unidad de pH (6-7). Nos referimos a PsbP (número 16), citocromo f (número 18), la subunidad γ de la ATP sintasa (número 21), una proteína de unión a clorofila del PSI (Lcha, número 32) y la subunidad grande de la RuBisCO (RbcL, número 36). No hemos analizado en los geles de rango de pH 6-11 el comportamiento durante la infección de estas proteínas, ya que

en esta ocasión no están resueltas de forma óptima (Fig. 1, 3, sección C.4) y además este análisis ya se realizó por Sajjani (2005). Por tanto, los geles del rango 4-7 son más fidedignos resolviendo proteínas en torno a pH 6, por lo que el análisis de la expresión proteica en los geles de rango básico sólo es fiable a partir de pH 7.

De esta manera, el total de nuevas proteínas pertenecientes al proteoma cloroplastídico era de 16 (Tabla 1, sección C.4), 15 de ellas correspondientes a la cadena de transporte electrónico fotosintético, y una proteína ribosomal.

De las proteínas implicadas en el transporte electrónico fotosintético, hemos encontrado polipéptidos que forman parte del PSI (PsaD y PsaE), del OEC (PsbQ), del complejo citocromo b_6/f (citocromo f), de la ATP sintasa (subunidad α de la porción catalítica o CF_1) y de la antena del PSII (Lhcb).

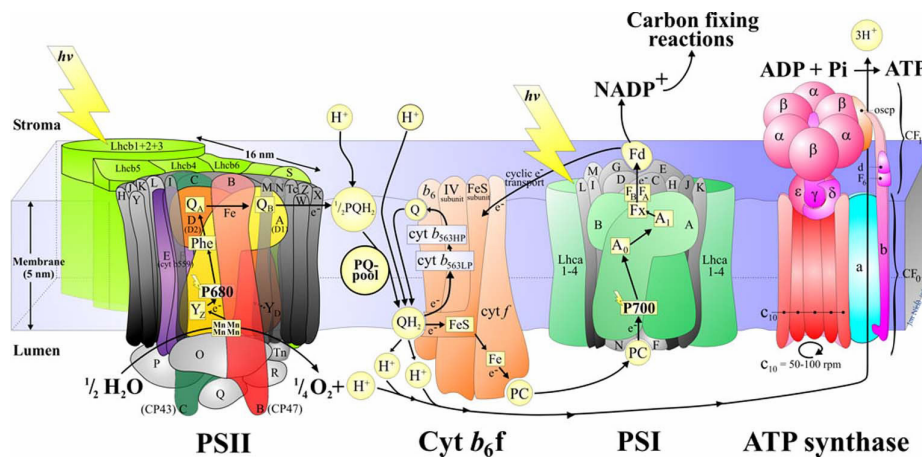


Fig. 29: La **cadena de transporte electrónico fotosintético** formada por los cuatro macrocomplejos proteicos embebidos en la membrana tilacoidal del cloroplasto: PSII, Cyt b_6/f y la ATP sintasa.

Las proteínas del PSI localizadas en los geles de rango básico, PsaD y PsaE (8 y 2 polipéptidos, respectivamente), son altamente hidrofóbicas y localizadas en el lado estromático de este fotosistema junto con PsaC, que aparecía en los geles del rango ácido. Todas ellas forman el complejo encargado del anclaje de la

ferredoxina (Fig. 29), uno de los miembros de la cadena transportadora de electrones fotosintética (Fromme et al. 2001, Scheller et al. 2001, Sétif et al. 2002, Jensen et al. 2003). PsaD y PsaE están codificadas por genes nucleares, existiendo dos isogenes en *Arabidopsis thaliana* (Naver et al. 1999, Ihnatowicz et al. 2004) y *Nicotiana* spp. (Obokata et al. 1993, 1994, Yamamoto et al. 1993) para cada una de ellas. Los 2 isogenes de la proteína PsaE de *N. sylvestris* codifican 4 isoproteínas diferentes, mientras que en nuestros geles tan sólo hemos detectado 2 manchas. Las isoformas de PsaD son dos, una por cada isogen codificante, que se expresan de forma diferencial durante el desarrollo de la hoja de *N. sylvestris* (Yamamoto et al. 1993); ambas isoformas son funcionalmente redundantes, lo que permitiría a la célula vegetal reaccionar más flexiblemente ante los estímulos ambientales, al tener más de una copia disponible del mismo gen. En nuestro caso, pudimos detectar hasta 8 manchas diferentes de esta proteína que, dada la alta homología existente entre estas proteínas (96/95% similitud/identidad, Ihnatowicz et al. 2004), no hemos podido asociar a gen alguno.

Debido a la infección con PMMoV-S, la expresión de las 8 proteínas correspondientes a PsaD disminuye (Fig. 3A y B, sección C.4). Los dobles mutantes de *Arabidopsis* para los genes *psaD*, demuestran que esta proteína es esencial para la fotosíntesis (Ihnatowicz et al. 2004) y además es conocido que los bajos niveles de expresión de la proteína PsaD producen descensos similares en otras subunidades del PSI y dan lugar a un incremento del NPQ y de la emisión de Chl-F en el estado estacionario (Haldrup et al. 2003). Altos niveles de estos parámetros de fluorescencia han sido detectados en este estudio (Fig. 1, sección C.1; Fig. 1, sección C.3) y en otros previos de nuestro grupo (Pérez-Bueno et al. 2006). El descenso en los niveles de PsaD podría así contribuir a la inhibición del transporte electrónico que detectamos en nuestras plantas infectadas.

Pese a la disminución de los niveles de PsaD, el descenso del contenido de la subunidad PsaE en las plantas infectadas, en nuestro caso, es muy pequeño o no tiene lugar, dependiendo de la muestra analizada.

Otra de las proteínas que encontramos en los geles de rango básico es la proteína del OEC PsbQ. Hasta el momento, dos isoformas de esta proteína han sido identificadas mediante electroforesis 2D en preparaciones del lumen tilacoidal de *Arabidopsis thaliana* (Kiesselbach et al. 2000, Schubert et al. 2002). Sin embargo, Peltier et al. (2002) sólo han podido identificar en el correspondiente proteoma de guisante una única forma de PsbQ. En nuestros geles en el rango de pH 6-11 hemos sido capaces de detectar dos isoformas de esta proteína (Fig. 3, sección C.4), de acuerdo con los resultados previos de nuestro grupo, ya que Pérez-Bueno (2003) identificó dos genes codificadores de PsbQ en *N. benthamiana*. La expresión de PsbQ está regulada al alza en plantas de *N. benthamiana* infectadas con PMMoV-S (Fig. 3A, 3B, sección C.4). En nuestros trabajos previos Rahoutei et al. (2000) detectaron un descenso en los niveles de esta proteína en membranas tilacoidales aisladas de plantas infectadas con PMMoV, cuando se comparan con sus respectivos controles. Sui et al. (2006) encontraron en preparaciones similares que la cantidad de proteínas OEC PsbO, PsbP y PsbQ se mantiene en plantas de *N. benthamiana* infectadas con TMV. El diferente procedimiento experimental para obtener cada tipo de muestra, membranas tilacoidales o preparaciones de cloroplastos, podría explicar que las primeras pierdan algunas proteínas periféricas.

Es conocido que, bajo condiciones normales de crecimiento, la proteína PsbP y no PsbQ, es indispensable para el funcionamiento normal del PSII de las plantas superiores *in vivo* (Ifuku et al. 2005a y b). Sin embargo, cuando las plantas crecen a bajas intensidades lumínicas, la supresión de la proteína PsbQ condujo a la pérdida de varios componentes del PSII, un descenso en F_v/F_M y deficiencias en el transporte electrónico desde Q_A^- a Q_B^- (Yi et al. 2006). Además, se ha encontrado que PsbQ es requerida para el funcionamiento óptimo del PSII bajo condiciones en las que la proteína PsbP está deteriorada. En estas ocasiones, PsbQ podría actuar como una subunidad accesoria para apoyar la función de PsbP en plantas superiores, o alternativamente, PsbQ podría ser requerida *in vivo* bajo condiciones estresantes (Ifuku et al. 2005a). Esto podría explicar por qué PsbQ se acumula en

las plantas infectadas con PMMoV-S donde la expresión de PsbP ha disminuido, según resultados previos de nuestro grupo (Pérez-Bueno 2004, Sajani 2005).

La presencia de familias multigénicas para diferentes proteínas cloroplastídicas como son PsaD, PsaE, PsbO, PsbP y PsbQ en *Nicotiana benthamiana*, permitiría a la planta huésped reaccionar de manera flexible a un ambiente cambiante que puede llegar a constituirse en factor de estrés (Koiwa et al. 2002).

La única de las proteínas identificadas en los geles de rango básico que no pertenece a la cadena de transporte de electrones fotosintética es la proteína ribosomal L14, que forma parte de la subunidad 50S del ribosoma cloroplastídico (Tanaka et al. 1986). Esta proteína muestra un descenso en los geles 2D debido a la infección por PMMoV-S, lo que podría tener una influencia negativa en la expresión de polipéptidos codificados en el cloroplasto.

Tras el análisis proteómico pormenorizado del cloroplasto que realizamos a 14 dpi, las técnicas de imagen nos siguieron suministrando información de fases más tardías de la infección.

A 17 dpi es posible detectar mediante el análisis de los coeficientes de quenching con el FluorCam un aumento de NPQ en las hojas AS de las plantas infectadas con ambas cepas virales (Fig. 1A, sección C.3), lo cual amplía nuestros datos previos obtenidos durante la infección con PMMoV-I (Pérez-Bueno et al. 2006).

El trabajo con el FluorCam en nuestro laboratorio ha sido amplio y arduo. Hemos realizado un gran número de medidas a diferentes dpi, registrando en cada uno de ellos la cinética de emisión de la Chl-F, lo que permite la obtención de un elevado número de parámetros de *quenching* (revisados, entre otros, en Schreiber et al. 1986, Roháček y Bartak 1999, Maxwell y Johnson 2000), así como de sus respectivas imágenes. Los valores medios de la mayoría de estos parámetros considerando la hoja entera enmascaraban las diferencias entre las plantas control y aquellas infectadas con PMMoV. Por tanto, y al igual que ocurría con la

termografía, las imágenes han sido mucho más resolutivas a la hora de realizar el seguimiento de la infección viral en la hoja AS.

Con anterioridad a 17 dpi, no hay cambios destacables en las imágenes de los diferentes parámetros analizados: F_0 , F_M , F_V/F_M , Rfd , Φ_{PSII} , Φ_{II} , NPQ, qCN , qTQ . A 17 dpi, el parámetro que maximizó las diferencias entre plantas control e infectadas y mostró un complejo patrón espacio-temporal en estas últimas fue el NPQ, en especial NPQ₂₀ (Fig. 1, sección C.3), de acuerdo con los resultados previos de nuestro grupo durante la infección por PMMoV-I empleando otro sistema de Chl-FI diferente (Pérez-Bueno et al. 2006). En el presente trabajo, los experimentos con el FluorCam mostraron también un patrón heterogéneo de NPQ en las hojas AS de plantas infectadas con PMMoV-S. En las etapas finales de la infección, las hojas AS de las plantas infectadas muestran los valores más bajos de NPQ, demostrando que los procesos de senescencia son predominantes y que los procesos no fotoquímicos están totalmente regulados a la baja. Diferentes trabajos señalan al NPQ como uno de los mejores indicadores de estrés en plantas infectadas, revelando una compleja heterogeneidad metabólica en la zona de infección (Chou et al. 2000, Repka 2002, Berger et al. 2004, Swarbrick et al. 2006). Autores como Osmond et al. (1998) y Lohaus et al. (2000) encuentran que NPQ reflejaba el desarrollo estado de de los síntomas provocados por un geminivirus restringido a floema en plantas de *Abutilon striatum* Dicks. La ventaja de nuestro trabajo con respecto a los anteriormente citados, es que amplía las posibilidades de uso del NPQ al detectar la infección en zonas asintomáticas de la planta (Pérez-Bueno et al. 2006), situación similar a la encontrada en nuestros trabajos de colaboración con el grupo del Dr. C. Ramos en plantas de judía infectadas con distintas cepas de *Pseudomonas* (comunicación personal).

El incremento del NPQ durante la infección viral es una respuesta defensiva de la planta infectada que podría retrasar el proceso de fotoinhibición hasta las fases finales del proceso infectivo (Wright et al. 1995a, b, Balachandran et al. 1997). De hecho, la fotoinhibición sólo es evidente en las plantas infectadas con

PMMoV-S e -I a partir de 19-21 dpi (respectivamente), como demuestra el descenso del parámetro F_v/F_M (datos obtenidos con el FluorCam mostrados en el anexo 2 y medidas puntuales en Rahoutei et al. 2000).

El aumento de NPQ en las zonas de expansión viral en hojas AS podría estar ocasionado por perturbaciones en el ciclo de Benson-Calvin, como apuntábamos anteriormente al hablar del parámetro F_5/F_0 . La disminución en los niveles de proteínas implicadas en la ruta asimilatoria de la fotosíntesis y sus correspondientes transcritos (Fig. 1-3, sección C.4; Pérez-Bueno 2003, Sajnani 2005) durante la infección de *Nicotiana benthamiana* por PMMoV, corroboraría este hecho. Ello conduciría a un aumento del pH intratilacoidal que a su vez induce el incremento de NPQ (Ruban y Horton 1995, Holt et al. 2004, Horton et al. 2005, Szabó et al. 2005, Sajnani et al. 2007). Nuestros estudios anteriores en este sistema empleando TL, muestran también la inducción de un flujo cíclico de electrones en torno al PSI en hojas AS de plantas infectadas (Sajnani 2005) que llevaría a elevados valores de NPQ (Horton et al. 2005), lo que también se vería favorecido por un incremento en el número de CR cerrados (Rahoutei et al. 2000) que podrían actuar como centros *disipativos* en un PSII con el lado donador dañado (Rahoutei et al. 1998, 1999, 2000, Pérez-Bueno et al. 2004). La bajada en los niveles de las distintas subunidades de la ATP sintasa en cloroplastos de plantas infectadas que hemos detectado, podría también influir en el desarrollo de NPQ, ya que se ha descrito que esta enzima puede modular el proceso de disipación energética no fotoquímica (Kanazawa y Kramer 2002, Avenson et al. 2004).

Un fenómeno distintivo de la infección por PMMoV-S en la hoja AS, que no ocurre en el caso de la inoculación con PMMoV-I ni en el de las plantas control, es el aumento de Φ_{PSII} en la zona de venas tras 2 s de iluminación con luz actínica (Φ_{PSII2} , Fig. 1C, sección C.3). A partir de los 2 s, las diferencias entre la zona de venas y la intervenal desaparecen (no se muestra). Sin embargo, el diferente comportamiento de PMMoV-S e -I en cuanto a Φ_{PSII2} hace a este parámetro útil para la diferenciación de dos cepas diferentes del mismo virus.

La tasa de fotosíntesis en el estado estacionario calculada mediante el FluorCam ($\Phi_{PSII300}$) se correlacionó con la tasa de fotosíntesis neta calculada mediante el IRGA (Fig. 2, sección C.3), lo que hace al coeficiente de Chl-F un buen indicador de este parámetro fotosintético (Genty et al. 1989).

Todas las alteraciones detectadas en los patrones de Chl-FI, así como en los diferentes parámetros de *quenching* de las hojas AS infectadas con PMMoV, no se deben a una disminución en el contenido de Chl de las hojas AS, ya que muestran una concentración igual o mayor de este pigmento que los respectivos controles en el momento en que los cambios en Chl-FI son detectados. Esto último fue evidente en las medidas del cociente F690/F740 mediante MCFI (Fig. 4, 5, sección C.2) y en las del contenido de Chl foliar (Fig. 6, sección C.1), así como en resultados previos de nuestro grupo (Rahoutei et al. 2000).

El análisis de las imágenes de Chl-FI y los coeficientes de *quenching* obtenidas con el FluorCam de las hojas S de plantas infectadas no muestra ningún patrón espacial característico que nos permita un seguimiento de la infección (no se muestra); igual ha ocurrido con las medidas de fluorescencia roja realizadas con el equipo robotizado del laboratorio de la Dra. Van Der Straeten (Fig. 4, sección C.1). La veloz invasión de la hoja joven por el virus siguiendo el flujo del fotoasimilado (Samuel 1934, Roberts et al. 1997, Santa Cruz 1999, Cheng et al. 2000) podría ser una limitación para esta técnica, que parece más adecuada para detectar el movimiento tardío y más lento, aunque sea en ausencia de síntomas, caso de la hoja AS. Sin embargo, la termografía de imagen (Fig. 3B, 4, sección C.1) y la BGF (Fig. 1, 2, 4, 5, sección C.2) sí han sido de utilidad para detectar cambios inducidos por la patogénesis en las hojas S.

Reviste especial interés el análisis de la fase de recuperación de los síntomas, sólo registrada en las plantas infectadas con PMMoV-I, que comienza a 21 dpi y se completa a 28 dpi, manifestándose con un incremento del porte de la planta y con la aparición de hojas jóvenes sin curvar. Muchos de los parámetros analizados - termográficos, de intercambio de gases y de fluorescencia- alcanzan en este estado

valores próximos a los de las plantas control (Tabla 2). En este sentido, registramos una disminución de la temperatura de las hojas S (Fig. 3B y 4, sección C.1) y una tendencia al alza de la conductancia estomática (Fig. 3D, sección C.1). Muchos de los parámetros calculados con el equipo de MCFI tienen una clara tendencia a alcanzar los valores de las plantas control, tanto en hoja S como AS (Fig. 1, 4, Tabla 1, 2, sección C.2), lo que sorprende, ya que la fase de recuperación sólo afecta a las hojas jóvenes de la planta huésped. El descenso de BGF en la hoja S se corresponde con una caída en los niveles de ácido clorogénico, como cabía esperar (Fig. 1, 6, sección C.2). Los niveles de Chl se recuperan completamente a 28 dpi (Fig. 6, sección C.1), así como los de la mayor parte de transcritos de proteínas cloroplásticas analizadas (lchb1, rca, rbcS, psaK, gox, rbcL, psbA, psbO, psbP, y psbQ; Pérez Bueno et al. 2003).

La fase de recuperación es un fenómeno del que se conoce muy poco. Es posible que la recuperación de la enfermedad sea consecuencia del silenciamiento de RNA mediado por virus, por el cual se produce de forma específica la destrucción enzimática del RNA viral (Hiriart et al. 2002, Mlotshwa et al. 2002), y por la activación coordinada de mecanismos de defensa generales de la planta durante los procesos de floración y/o senescencia (Somssich y Hahlbrook 1998, Malek y Dietrich 1999, Ji y Ding 2001, Obregón et al. 2001). Sin embargo, durante la fase de recuperación aún es posible detectar el virus mediante Northern Blot (Pérez-Bueno 2003) o impresiones de hojas (Fig. 7B, sección C.1), y por el momento se desconoce si estos focos de acumulación están formados por células que fueron invadidas antes del proceso de recuperación o simplemente éste no es completamente eficaz.

Llegados a este punto, resumiremos el trabajo presentado, considerando también los trabajos previos de nuestro laboratorio y aquellos realizados en colaboración con el grupo de la Dra. I García Luque (CIB. CSIC. Madrid) en el sistema huésped-patógeno *Nicotiana benthamiana*-PMMoV. En esta Tesis se han caracterizado, mediante varios sistemas de captación de imágenes, diversas

respuestas fisiológicas de la planta a la infección viral. Para ello se han empleado técnicas que revelan el nivel de transpiración de las hojas (termografía), la eficiencia fotosintética y los mecanismos disipativos de la energía no fotoquímicos (fluorescencia roja de la clorofila), así como la activación del metabolismo secundario (fluorescencia multiespectral inducida por luz UV) de la planta huésped. También se han utilizado otras aproximaciones experimentales que apoyan los resultados obtenidos mediante las técnicas de imagen, como son las medidas de parámetros de intercambio gaseoso con el IRGA, de compuestos fenólicos emisores de BGF mediante HPLC, la de apertura estomática mediante impresiones epidérmicas y la inmunodetección de la CP viral en improntas de hojas. Asimismo se han investigado los cambios inducidos por PMMoV-S en el proteoma cloroplastídico de *Nicotiana benthamiana*, ampliando además el número de proteínas cloroplastídicas identificadas hasta la fecha en este huésped experimental.

En todo momento, a excepción de los análisis proteómicos, se ha comparado el efecto de dos cepas del virus, PMMoV-S y PMMoV-I, que difieren en su grado de virulencia y en el desarrollo de la sintomatología.

Con nuestro abordaje experimental hemos detectado alteraciones en las hojas AS de plantas infectadas con ambos virus en estadios iniciales de la infección, mediante nuevos métodos estadísticos aplicados al análisis de la emisión de Chl-F. Estos cambios son más tempranos aún en plantas infectadas con PMMoV-S, la cepa más virulenta, como también ocurre con los resultados ofrecidos por las diversas técnicas de imagen empleadas en este trabajo. Los algoritmos matemáticos empleados discriminan en el tiempo la infección con cada uno de los virus y pueden llevar a una detección temprana y presintomática de la infección viral, pero a diferencia de los parámetros de fluorescencia convencionales no se corresponden con cambios fisiológicos en el vegetal.

Pero es en la etapa intermedia del proceso infeccioso, de 7 a 17 dpi, donde se manifiesta más claramente el impacto de PMMoV en *N. benthamiana*. Si

descartamos los síntomas visibles, la primera hoja en manifestar cambios es la AS, así como la hoja S de las plantas infectadas con PMMoV-S, y consisten en un incremento en la emisión de BGF de ambos tipos de hojas. Este hecho es más evidente, en general, en la cara AB de las hojas, debido a que las de plantas dicotiledóneas son bifaciales; si bien, los coeficientes de fluorescencia también muestran diferencias en la cara AD, lo que hace a la MCFI una herramienta muy adecuada para su aplicación como técnica de diagnóstico precoz en campo. La emisión de BGF se correlaciona con el contenido de ácido clorogénico, así como con el grado de virulencia de la cepa viral empleada; la fase de recuperación de las plantas infectadas con PMMoV-I se ve también acompañada de un descenso en la emisión de BGF. Sin embargo, no podemos descartar la contribución a la BGF de otros compuestos fenólicos minoritarios.

Durante este periodo también tienen lugar las alteraciones en el patrón de transpiración foliar, manifestado antes en hojas AS que en S, y en las plantas infectadas con PMMoV-S que en las infectadas con PMMoV-I. En las hojas AS, se experimenta un cierre estomático inducido por la infección viral, que se hace visible mediante un aumento de temperatura en los tejidos próximos a las venas principales y que se extiende en días sucesivos al resto de la hoja. Este fenómeno tiene lugar cuando el virus aún no se halla presente en dichas hojas. La naturaleza del factor que induce el cierre estomático es aún desconocida. En la hoja S, el incremento de temperatura afecta homogéneamente a toda la hoja, y durante la fase de recuperación de las plantas infectadas con PMMoV-I, se reduce la temperatura de las mismas, no ofreciendo diferencias con respecto al control. La termografía de imagen demostró ser más potente que el IRGA, mostrando cambios más tempranos en el intercambio gaseoso y revelando la heterogeneidad en el patrón de transpiración de la hoja AS de las plantas infectadas.

En la etapa intermedia de la infección por PMMoV, también se detectaron cambios en el patrón de Chl-F y de NPQ, que pueden correlacionarse con la distribución viral en la hoja AS, por lo que estos parámetros de fluorescencia

podrían ser buenos indicadores del movimiento viral. El NPQ se postularía como un mecanismo de defensa del cloroplasto para evitar la fotoinhibición. El Φ_{PSII} se ha revelado como un parámetro diferenciador de la infección por PMMoV-S, puesto que muestra un patrón característico que no presentan las hojas AS de las plantas control o infectadas con PMMoV-I. Las alteraciones que tienen lugar en la cinética de emisión de Chl-F de hojas de plantas infectadas aparecen en un punto cercano a F_p , lo que es indicativo de perturbaciones en el ciclo de Benson-Calvin. Esta hipótesis parece confirmarse con nuestros resultados previos y los expuestos en esta Tesis, que muestran descensos en los niveles de transcritos y de proteínas implicadas en esta ruta metabólica.

Considerando los resultados de todas las técnicas utilizadas en esta Tesis Doctoral, es evidente una vez más la enorme complejidad de la interacción compatible planta-virus, que resulta dependiente de otros factores ambientales y del estado de desarrollo del vegetal en el momento de la infección. La respuesta de la planta a la infección viral, que es un factor de estrés biótico, tiene patrones comunes a la que presenta frente a factores adversos de origen abiótico y, en determinados momentos, se asemeja a los procesos de senescencia.

La activación del metabolismo secundario, el equilibrio entre procesos fotoinhibitorios y fotoprotectores así como entre fotoquímica y fase asimilatoria de la fotosíntesis, la inhibición de procesos fotoquímicos y activación de rutas electrónicas alternativas, el descenso en los niveles de proteínas claves en las dos fases del proceso fotosintético y la inhibición progresiva de genes nucleares y cloroplásticos que las codifican, es clave para la respuesta de la planta huésped al patógeno.

Los resultados de este trabajo abren nuevas líneas de investigación que se abordarán próximamente. Por un lado, el estudio del proteoma cloroplástico de *N. benthamiana* utilizando técnicas proteómicas sin geles permitirá aumentar el número de proteínas identificadas y caracterizar las modificaciones post-traduccionales que pueden sufrir, así como sus isoformas. El empleo de la técnica

2D-DIGE llevará, asimismo, a un análisis cuantitativo más minucioso de los cambios inducidos por PMMoV en la expresión proteica del cloroplasto de plantas infectadas. Por otra parte, se hace necesaria la identificación de la/s sustancia/s responsables del aumento de temperatura de las hojas de plantas infectadas, así como de la activación del metabolismo secundario en las mismas. El análisis del sistema antioxidante de la planta huésped también ayudará al entendimiento de su interacción con el virus.

E. CONCLUSIONES

1. El análisis por termografía de imagen de *Nicotiana benthamiana* infectada con PMMoV, reveló un incremento de la temperatura superficial de las hojas ocasionado por un cierre estomático inducido por el virus. El aumento de temperatura en la hoja S fue homogéneo y no presintomático; mientras que en la AS fue progresivo, comenzando en las venas principales para extenderse luego al resto de la hoja, y teniendo lugar antes de la detección del virus en las mismas.
2. Las técnicas de imagen de captación de fluorescencia inducida por luz UV registraron un aumento de la fluorescencia verde y azul durante la infección con PMMoV, que se correspondería con una activación del metabolismo secundario. Los cambios detectados son más drásticos en el envés de las hojas y en hojas S más que en AS. El principal compuesto responsable del aumento de la BGF fue el ácido clorogénico.
3. La fase de recuperación de los síntomas en las plantas infectadas con PMMoV-I se manifestó con un descenso de temperatura de las hojas S, así como con una bajada de la fluorescencia verde y azul acompañada de una caída del contenido de ácido clorogénico en estas hojas.
4. En las medidas de la cinética de inducción de la fluorescencia roja, NPQ y sus correspondientes imágenes se confirmaron como uno de los parámetros que mejor señalan la infección por PMMoV en las hojas AS, revelando un característico patrón que se correlacionó con las áreas de expansión viral.
5. El uso de nuevos parámetros de fluorescencia roja obtenidos mediante la aplicación de nuevos protocolos de medida de la cinética de inducción de la fluorescencia y el uso de métodos estadísticos avanzados, ha permitido

la detección de la infección con PMMoV antes de la aparición de los primeros síntomas visibles.

6. El estudio proteómico del cloroplasto de *N. benthamiana* mediante electroforesis bidimensional en el rango de pH 6-11 nos ha permitido elevar el número de proteínas detectadas en geles 2D para este proteoma hasta 203, con un total de 71 identificadas. De los polipéptidos que muestran un pI básico, sufrieron un descenso en sus niveles durante la infección con PMMoV-S: PsaD, RbcL y la proteína ribosomal L14, mientras que la proteína PsbQ del OEC experimentó un incremento.

E. CONCLUDING REMARKS

1. Analysis of PMMoV-infected *Nicotiana benthamiana* plants by means of imaging thermography revealed an increase of leaf temperature due to a viral-induced stomatal closure. In S leaves, temperature increase was homogeneous and occurred before the symptom appearance, whereas AS leaves showed higher temperatures first in the main veins, expanding to the rest of the leaf in the next days. In AS leaves, the temperature increment precedes the viral detection in these leaves.
2. UV-induced fluorescence imaging showed higher blue-green fluorescence emission levels in PMMoV-infected plants due to an up-regulation of the secondary metabolism in these plants. BGF emission is higher in the AB side, as well as in the S leaves compared with AS ones. Chlorogenic acid was detected as the main hydroxycinnamic acid contributing to BGF.
3. On PMMoV-I infected plants, recovery phase manifested as a decrease in S leaf temperature, as well as a reduced blue-green fluorescence emission, accompanied by a diminished content of chlorogenic acid of these leaves.
4. Red chlorophyll fluorescence measurements confirmed NPQ images as one of the best Chl-FI parameters reporting PMMoV infection on AS leaves, revealing a complex, time-varying spatial pattern correlated with the viral spreading in the leaf.
5. The application of new measuring protocols and combinatorial imaging to the red chlorophyll fluorescence transient kinetics, allowed the detection of PMMoV infection before visible symptoms appeared, reporting also damages on the Benson-Calvin cycle.

6. The study of the chloroplast proteome of *N. benthamiana* plants by means of bidimensional electrophoresis in the 6-11 pH range, let us to increase the number of spots detected in 2D gels up to 203, been 71 proteins identified. Some polypeptides with an alkaline pI were down-regulated in PMMoV-S infected plants (PsaD, RbcL and ribosomal protein L14), while PsbQ protein from the OEC was up-regulated.

F. BIBLIOGRAFÍA

- Abbinck, T.E.M., Peart, J.R., Moss, N.M., Baulcombe, D.C., Bol, J.F. y Linhorst, H.J.M. (2002) Silencing of a gene encoding a protein component of the oxygen-evolving complex of photosystem II enhances virus replication in plants. *Virology* 295: 307-319.
- Aebersold, R. y Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422: 198-207.
- Agati, G., Galardi, C., Gravano, E., Romani, A. y Tattini, M. (2002) Flavonoid distribution in tissues of *Phillyrea latifolia* L. leaves as estimated by microspectrofluorometry and multispectral fluorescence microimaging. *Photochem. Photobiol.* 76: 350-360.
- Agrawal, G.K., Yonekura, M., Iwahashi, Y., Iwahashi, H. y Rakwal, R. (2005a) System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants. Part I: Technologies in proteome establishment. *J. Chromatogr. B* 815: 109-123.
- Agrawal, G.K., Yonekura, M., Iwahashi, Y., Iwahashi, H. y Rakwal, R. (2005b) System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants. Part II: Proteomes of the complex developmental stages. *J. Chromatogr. B* 815: 109-123.
- Alban, A., Davi, S.O., Bjorkesten, L., Andersson, C., Sloge, E., Lewis, S. y Currie, I. (2003) A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* 3: 36-44.
- Aldea, M., Hamilton, J.G., Resti, J.P., Zangerl, A.R., Berenbaum, M.R., Frank, T.D. y de Lucia, E.H. (2006) Comparison of photosynthetic damage from

- arthropod herbivory and pathogen infection in understory hardwood saplings. *Oecologia* 149: 221-232.
- Alfondillo, T., Sigalotti, G.B., Tomasi, M., Semenzato, P. y Valentini, R. (1993) Applications of a thermal imaging technique in the study of the ascent of sap in woody species. *Plant Cell Environ.* 16: 997-1001.
- Alleyne, V., Larsen, F.E. y Stewardt, S.H. (1989) Water relations of container-grown virus-tested and common apple (*Malus domestica* Borkh.) rootstocks. *Scientia Horticulturae* 38: 117-129.
- Alonso, E., García-Luque, I., Avila-Rincón, M.J., Wicke, B., Serra, M.T. y Díaz-Ruiz, J.R. (1989) A tobamovirus causing heavy losses in protected pepper crops in Spain. *J. Phytopathol.* 125: 67-76.
- Amme, S., Matros, A., Schlesier, B. y Mock, H.-P. (2006) Proteome analysis of cold stress response in *Arabidopsis thaliana* using DIGE-technology. *J. Exp. Bot.* 57: 1537-1546.
- Andaluz, S., López-Millán, A.F., De Las Rivas, J., Aro, E.M., Abadía, J. y Abadía, A. (2006) Proteomic profiles of thylakoid membranes and changes in response to iron deficiency. *Photosynth. Res.* 89: 141-155.
- Apostol, S., Viau, A.A., Tremblay, N., Briantais, J.M., Prasher, S., Parent, L.E. y Moya, I. (2003) Laser-induced fluorescence signatures as a tool for remote monitoring of water and nitrogen stresses in plants. *Can. J. Remote Sens.* 29: 57-65.
- Apostol, S. (2006) Leaf fluorescence as diagnostic tool for monitoring vegetation. *From cells to proteins: imaging nature across dimensions* 3: 423-430.
- Argüello-Astorga, G. y Herrera-Estrella, L. (1998) Evolution of light-regulated plant promoters. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 79: 525-555.
- Ariana, D., Guyer, D.E. y Shrestha, B. (2006) Integrating multispectral reflectance and fluorescence imaging for defect detection on apples. *Comput. Electron. Agr.* 50: 148-161.

- Aro, E.-M., Suorsa, M., Rokka, A., Allahverdiyeva, Y., Paakkarinen, V., Saleem, A., Battchikova, N. y Rintamäki, E. (2005) Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. *J. Exp. Bot.* 56: 347-356.
- Avenson, T.J., Cruz, J.A. y Kramer, D.M. (2004) Modulation of energy-dependent quenching of excitons in antennae of higher plants. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 5530-5535.
- Ayres, P.G. (1992) Plants versus pests and pathogens: an old story but the same story? En: *Pests and Pathogenes: Plant responses to foliar attack*, Ayres, P.G. eds. Bios. Scientific Publishers, Oxford.
- Babani, F. y Lichtenthaler, H.K. (1996) Light-induced and age-dependent development of chloroplasts in etiolated barley leaves as visualized by determination of photosynthetic pigments, CO₂ assimilation rates and different kinds of chlorophyll fluorescence ratios. *J. Plant Physiol.* 148: 555-566.
- Babani, F., Lichtenthaler, H.K. y Richter, P. (1996) Changes of chlorophyll fluorescence signatures during greening of etiolated barley seedlings as measured with the CCD-OMA fluorometer. *J. Plant Physiol.* 148: 471-477.
- Babani, F., Langsdorf, G., Knapp, M., Buschmann, C. y Lichtenthaler, H.K. (2005) UV-A induced fluorescence images in sun and shade leaves. *BMC Plant Biology* 5: S3. Meeting abstract.
- Baginsky, S. y Gruissem, W. (2006) *Arabidopsis thaliana* proteomics: from proteome to genome. *J. Exp. Bot.* 57: 1485-1491.
- Baker, N. (1991) A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiol. Plantarum* 81: 563-570.
- Balachandran, S. y Osmond B.C. (1994) Susceptibility of tobacco leaves to photoinhibition following infection with two strains of tobacco mosaic virus under different light and nitrogen nutrition regimes. *Plant Physiol.* 104: 1051-1057.

- Balachandran, S., Osmond, B.C. y Daley, F.P. (1994) Diagnosis of the earliest strain-specific interactions between tobacco mosaic virus and chloroplasts of tobacco leaves *in vivo* by means of chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiol.* 104: 1059-1065.
- Balachandran, S., Hurry, V.M., Kelley, S.E., Osmond, C.B., Robinson, S.A., Rohozinski, J., Seaton, G.G.R. y Sims, D.A. (1997) Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis. *Physiol. Plantarum* 100: 203-213.
- Balogun, O.S. y Teraoka, T. (2004) Time-course analysis of the accumulation of phenols in tomato seedlings infected with Potato Virus X and Tobacco mosaic virus. *Bioquímica* 16: 112-120.
- Banerjee, N., Wang, J.Y. y Zaitlin, M. (1995) A single nucleotide change in the coat protein gene of tobacco mosaic virus is involved in the induction of severe chlorosis. *Virology* 297: 234-239.
- Banks, F.M., Driscoll, S.P., Parry, M.A.J., Lawlor, D.W., Knight, J.S., Gray, J.C. y Paul, M.J. (1999) Decrease in phosphoribulokinase activity by antisense RNA in transgenic tobacco. Relationship between photosynthesis, growth and allocation at different nitrogen levels. *Plant Physiol.* 119: 1125-1136.
- Barber, J. (1995) Molecular basis of the vulnerability of photosystem II to damage by light. *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 201-208.
- Barber, J. (1998) Photosystem two. *Biochim. Biophys. Acta* 1365: 269-277.
- Barón, M., Rahoutei, J., Lázaro, J.J. y García-Luque, I. (1995a) PSII response to biotic and abiotic stress. In *Photosynthesis: From Light to Biosphere*. Mathis, P., ed. Vol. IV: 897-900. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Barón, M., Arellano, J.B. y Gorgé, J.L. (1995b) Copper and photosystem II: a controversial relationship. *Physiol. Plantarum* 94: 174-180.
- Beranová-Giorgianni, S. (2003) Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. *Trends Anal. Chem.* 22: 273-281.

- Berger, S., Papadopoulos, M., Schreiber, U., Kaiser, W. y Roitsch, T. (2004) Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiol. Plantarum* 122: 419-428.
- Berger, S., Benediktyová, Z., Matouš, K., Bonfig, K., Mueller, M.J., Nedbal, L. y Roitsch, T. (2007) Visualization of dynamics of plant-pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: Differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*. *J. Exp. Bot.* 58: 797-806.
- Bertamini, M., Muthuchelian, K. y Nedunchezian, N. (2004) Effect of grapevine leafroll on the photosynthesis of field grown grapevine plants (*Vitis vinifera* L. cv. Lagrein). *J. Phytopathol.* 152: 145-152.
- Bertone, P. y Snyder, M. (2005) Prospects and challenges in proteomics. *Plant Physiol.* 138: 560-562.
- Bhatia, D.S., Jindal, V. y Malik, C.P. (1986) Effect of salicylic acid and tannic acid on stomatal aperture and some enzyme changes in isolated epidermal peelings of *Euphorbia hirta* L. *Biochem. Physiol. PFL.* 181: 261-264.
- Bilger, W. y Björkman, O. (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.* 25: 173-186.
- Björkman, O. y Demming, B. (1987) Photon yield of O₂-evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170: 489-504.
- Björn, L. y Forsberg, A. (1979) Imaging by delayed light emission (phyoluminography) as a method for detecting damage to the photosynthetic system. *Physiol. Plantarum* 47: 215-222.
- Blomberg, A., Blomberg, L., Norbeck, J., Fey, S.J., Larsen, P.M., Larsen, M., Roepstorff, P., Degand, H., Boutry, M. y Posch, A. (1995) Interlaboratory reproducibility of yeast protein patterns analyzed by immobilized pH

- gradient two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 16: 1935-1945.
- Boccarda, M., Boue, C., Garmier, M., De Paepe, R. y Boccarda, A.C. (2001) Infrared thermography revealed a role for mitochondria in pre-symptomatic cooling during harpin-induced hypersensitive response. *Plant J.* 28: 663-670.
- Bonfig, K.B., Schreiber, U., Gabler, A., Roitsch, T. y Berger, S. (2006) Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially effects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Planta* 225: 1-12.
- Bongi, G., Palliotti, A., Rocchi, P., Moya, I. y Goulas, Y. (1994) Blue-green fluorescence excited by UV laser on leaves of different species originates from cutin and is sensitive to leaf temperature. *Plant Cell Environ.* 17: 777-780.
- Buchanan, B.B., Wilhelm, G. y Jones, R.L. (2000) Biochemistry and molecular biology of plants. Buchanan, B.B., Gruissem, W. y Jones, R.L. ed., American Society of Plant Biologist, Rockville, USA.
- Buschmann, C. y Lichtenthaler, H.K. (1998) Principles and characteristics of multi-colour fluorescence imaging of plants. *J. Plant Physiol.* 152: 297-314.
- Buschmann, C. (1999) Photochemical and non-photochemical quenching coefficients of the chlorophyll fluorescence: comparison of variation and limits. *Photosynthetica* 37: 217-224.
- Buschmann, C., Langsdorf, G. y Lichtenthaler, H.K. (2000) Imaging of the blue, green, and red fluorescence emission of plants: An overview. *Photosynthetica* 38: 483-491.
- Butz, P., Hofmann, C. y Tauscher, B. (2005) Recent Developments in non-invasive techniques for fresh fruit and vegetable internal quality analysis. *J. Food Sci.* 70: R131-R141.
- Campo, S., Carrascal, M., Coca, M., Abián, J. y San Segundo, B. (2004) The defense response of germinating maize embryos against fungal infection: a proteomics approach. *Proteomics* 4: 383-396.

- Cánovas, F.M., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Jorrín, J., Mock, H.-P. y Rossignol, M. (2004) Plant proteome analysis. *Proteomics* 4: 285-298.
- Cartelat, A., Cerovic, Z.G., Goulas, Y., Meyer, S., Lelarge, C., Prioul, J.-L., Barbottin, A., Jeuffroy, M.-H., Gate, P., Agati, G. y Moya, I. (2005) Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crop Res.* 91: 35-49.
- Casado-Vela, J., Sellés, S. y Bru-Martínez, R. (2006) Proteomic análisis of tobacco mosaic virus-infected tomato (*Lycopersicon esculentum* M.) fruits and detection of viral coat protein. *Proteomics* 6: S196-S206.
- Castillejo, M.A., Amiour, N., Dumas-Gaudot, E., Rubiales, D. y Jorrín, J.V. (2004) A proteomic approach to studying plant response to crenate broomrape (*Orobanche crenata*) in pea (*Pisum sativum*). *Phytochemistry* 65: 1817-1828.
- Catena, G. (1992) Application of thermography in Phytopathology. Diagnosis of sanitary state of ornamental trees. *Phytoma* 439: 46-48.
- Cerovic, Z.G., Samson, G., Morales, F., Tremblay, N. y Moya, I. (1999) Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. *Agronomie* 19: 543-578.
- Cerovic, Z.G., Ounis, A., Cartelat, A., Latouche, G., Goulas, Y., Meyer, S. y Moya, I. (2002) The use of chlorophyll fluorescence excitation spectra for the non-destructive *in situ* assessment of UV-absorbing compounds in leaves. *Plant Cell Environ.* 25:1663-1676.
- Chaerle, L., Van Caeneghem, W., Messens, E., Lambers, H., Van Montagu, M. y Van der Straeten, D. (1999) Presymptomatic visualization of plant-virus interactions by thermography. *Nat. Biotechnol.* 17: 813-816.
- Chaerle, L. (2000) Thermographically-aided analysis of early plant-pathogen interactions and related cell-death phenomena. *Tesis doctoral*. Universidad de Gante, Bélgica.

- Chaerle, L. y Van der Straeten, D. (2000) Imaging techniques and the early detection of plant stress. *Trends Plant Sci.* 5: 495-501.
- Chaerle, L. y Van der Straeten, D. (2001) Seeing is believing: imaging techniques to monitor plant health. *Biochim. Biophys. Acta* 1519: 153-166.
- Chaerle, L., De Boever, F., Van Montagu, M. y Van Der Straeten (2001) Thermographic visualisation of cell death in tobacco and *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 24: 15-25.
- Chaerle, L., Hulsen, K., Strasser, R.J., Valcke, R., Höfte, M. y Van Der Straeten, D. (2003) Robotized time-lapse imaging to assess in-planta uptake of phenylurea herbicides and their microbial degradation. *Physiol. Plantarum* 118: 613-619.
- Chaerle, L., Hagenbeek, D., De Bruyne, E., Valcke, R. y Van der Straeten, D. (2004) Thermal and chlorophyll-fluorescence imaging distinguish plant-pathogen interactions at an early stage. *Plant Cell Physiol.* 45: 887-896.
- Chaerle, L., Saibo, N. y Van Der Straeten, D. (2005) Tuning the pores: towards engineering plants for improved water use efficiency. *Trends Biotechnol.* 23: 308-315.
- Chaerle, L., Pineda, M., Romero-Aranda, R., Van Der Straeten, D. y Barón, M. (2006) Robotized thermal and chlorophyll fluorescence imaging of pepper mild mottle virus infection in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Physiol.* 47: 1323-1336.
- Chaerle, L., Leinonen, I., Jones, H.G. y Van Der Straeten, D. (2007a) Monitoring and screening plant populations with combined thermal and chlorophyll fluorescence imaging. *J. Exp. Bot.* 58: 773-784.
- Chaerle, L., Lenk, S., Hagenbeek, D., Buschmann, C. y Van Der Straeten, D. (2007b) Multicolour fluorescence imaging for early detection of the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *J. Plant Physiol.* 164: 253-262.

- Chapelle, E.W., Wood, F.M., McMurtrey, J.E y Newcomb, W.W. (1984) Laser-induced fluorescence of green plants. 1: A technique for the remote detection of plant stress and species differentiation. *Appl. Opt.* 23: 134-138.
- Chapelle, E.W., Wood, F.M., Newcomb, W.W. y McMurtrey, J.E (1985) Laser-induced fluorescence of green plants. 3: LIF spectral signatures of five major plant types. *App. Opt.* 24: 74-80.
- Chappelle, E.W. y Lichtenthaler, H.K. (1994) Fluorescence measurements of vegetation - Preface. *Remote Sens. Environ.* 47: 1-1.
- Cheng, N.-H., Su, C.-L., Carter, S.A. y Nelson, R.S. (2000) Vascular invasion routes and systemic accumulation patterns of tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* 23: 349-362.
- Cheregi, O., Sicora, C., Kos, P.B., Nixon, P.J. y Vass, I. (2005) The FtsH protease is required for the repair of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803 damaged by UV-B radiation. *BMC Plant Biology* 5: S8. *Meeting abstract.*
- Chernushevich, I.V., Loboda, A.V. y Thomson, B.A. (2001) An introduction to quadrupole-time-of flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 36: 849-865.
- Chinnasamy, G. y Rampitsch, C. (2006) Efficient solubilization buffers for two-dimensional gel electrophoresis of acidic and basic proteins extracted from wheat seeds. *Biochim. Biophys. Acta* 1764: 641-644.
- Chivasa, S., Hamilton, J.M., Pringle, R.S., Ndimba, B.K., Simon, W.J., Lindsey, K. y Slabas, A.R. (2006) Proteomic analysis of differentially expressed proteins in fungal elicitor-treated *Arabidopsis* cell cultures. *J. Exp. Bot.* 57: 1553-1562.
- Chou, H.M., Bundock, N., Rolfe, A.S. y Scholes, J.D. (2000) Infection of *Arabidopsis thaliana* leaves with *Albugo candida* (white blister rust) causes a reprogramming of host metabolism. *Mol. Plant Pathol.* 2: 99-113.

- Chow, W.S., Lee, H.Y., Park, Y.I., Park, Y.M., Hong, Y.N. y Anderson, J.M. (2002) The role of inactive photosystem II-mediated quenching in a last-ditch community defence against high light stress in vivo. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 357: 1441-1450.
- Ciambella, C., Roepstorff, P., Aro, E.M. y Zolla, L. (2005) A proteomics approach for investigation of photosynthetic apparatus in plants. *Proteomics* 5: 746-757.
- Ciscato, M. (2000) Development of a fluorescence imaging system for the quality assessment of fruits and vegetables. *Tesis doctoral*, Universidad de Limburg, Bélgica.
- Clover, G.R.G., Jaggard, K.W., Smith, H.G. y Azam-Ali, S.N. (2001) The use of radiation interception and transpiration to predict the yield of healthy, droughted and virus-infected sugar beet. *J. Agr. Sci.* 136: 169-178.
- Cohen, Y., Alchanatis, V., Meron, M., Saranga, Y. y Tsipris, J. (2005) Estimation of leaf water potential by thermal imagery and spatial analysis. *J. Exp. Bot.* 56: 1843-1852.
- Colditz, F., Nyamsuren, O., Niehaus, K., Eubel, H., Braun, H.-P. y Krajinski, F. (2004) Proteomic approach: identification of *Medicago truncatula* proteins induced in roots after infection with the pathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Plant Mol. Biol.* 55: 109-120.
- Cooper, B., Ecker, D., Andon, N.L., Yates 3rd, J.R. y Haynes, P.A. (2003) Investigative proteomics: identification of an unknown plant virus from infected plants using mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14: 736-741.
- Corbett, J.M., Dunn, M.J., Posch, A. y Görg, A. (1994) Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilized pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: an interlaboratory comparison. *Electrophoresis* 15: 1205-1211.

- Corp, L.A., McMurtrey, J.E., Middleton, E.M., Mulchi, C.L., Chappelle, E.W. y Daughtry, C.S.T. (2003) Fluorescence sensing systems: In vivo detection of biophysical variations in field corn due to nitrogen supply. *Remote Sens. Environ.* 86: 470-479.
- Cottrell, J.S. (1994) Protein identification by peptide mass fingerprinting. *Pept. Res.* 7: 115-124.
- Critchley, C. y Russell, A.W. (1994) Photoinhibition of photosynthesis *in vivo*: The role of protein turnover in photosystem II. *Physiol. Plantarum* 92: 188-196.
- Crouchman, S., Ruban, A. y Horton, P. (2006) PsbS enhances nonphotochemical fluorescence quenching in the absence of zeaxanthin. *FEBS Lett.* 580: 2053-2058.
- Cui, S., Huang, F., Wang, J., Ma, X., Cheng, Y. y Liu, J. (2005) A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. *Proteomics* 5: 3162-3172.
- Curto, M., Camafeita, E., López, J.A., Maldonado, A.M., Rubiales, D. y Jorrín, J.V. (2006) A proteomic approach to study pea (*Pisum sativum*) responses to powdery mildew (*Erysiphe pisi*). *Proteomics* 6: S163-S174.
- Daley, P.F., Raschke, K., Ball, J.T. y Berry, J.A. (1989) Topography of photosynthetic activity of leaves obtained from video images of chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol.* 90: 1233-1238.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D. y Van Breusegem, F. (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 779-795.
- Dawson, O.W. (1992) Tobamovirus-plant interactions. *Virology* 186: 359-367.
- 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.
- DeRocher, E.J. y Bohnert, H.J. (1993) Development and environmental stress employ different mechanisms in the expression of a plant gene family. *Plant Cell* 5: 1611-1625.

- Demmig-Adams, B. y Adams W.W. 3rd. (2000) Harvesting sunlight safely. *Nature* 403: 371-374.
- Dixon, R.A. y Paiva, N.L. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097.
- Dixon, R.A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C.-J., Srinivasa Reddy, M.S. y Wang, L. (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence – A genomics perspective. *Mol. Plant Pathol.* 3: 371-390.
- Dunkley, T.P., Dupree, P., Watson, R.B. y Lilley, K.S. (2004) The use of isotope-coded affinity tags (ICAT) to study organelle proteomes in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Soc. Trans.* 32: 520-523.
- Edman, P. (1970) Sequence determination. *Mol. Bio. Biochem. Biophys.* 8: 211-255.
- Einhellig, F.A. y Kuan, L.-Y. (1971) Effects of scopoletin and chlorogenic acid on stomatal aperture in tobacco and sunflower. *B. Torrey Bot. Club* 98: 155-162.
- Ephritikhine, G., Ferro, M. y Rolland, N. (2004) Plant membrane proteomics. *Plant Physiol. Biochem.* 42: 943-962.
- Esfeld, P., Siebke, K. y Weis, E. (1995) Local defence-related shift in the carbon metabolism in chickpea leaves induced by a fungal pathogen. In *Photosynthesis: from light to biosphere*. 5:663-666. P Mathis, ed., Kluwer Academic Publisher. Dordrecht.
- Eubel, H., Braun, H.-P. y Millar, H. (2005) Blue-native PAGE in plants: a tool in analysis of protein-protein interactions. *BMC Plant Methods* 1: 11.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F. y Whitehouse, C.M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246: 64-71.
- Ferro, M., Salvi, D., Riviére-Rolland, H., Vermat, T., Seigneurin-Berny, D., Grunwald, D., Garin, J., Joyard, J. y Rolland, N. (2002) Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: identification and subcellular

- localization of new transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 11487-11492.
- Ferry-Dumazet, H., Houel, G., Montalent, P., Moreau, L., Languella, O., Negroni, L., Vincent, D., Lalanne, C., de Daruvar, A., Plomion, C., Zivy, M. y Joets, J. (2005) PROTICdb: A web-based application to store, track, query, and compare plant proteome data. *Proteomics* 5: 2069-2081.
- Finazzi, G., Johnson, G.N., Dalosto, L., Joliot, P., Wollman, F.-A. y Bassi, R. (2004) A zeaxanthin-independent nonphotochemical quenching mechanism localized in the photosystem II core complex. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 101: 12375-12380.
- Fito, P.J., Ortolá, M.D., De los Reyes, R., Fito, P. y De los Reyes, E. (2004) Control of citrus surface drying by image analysis of infrared thermography. *J. Food Eng.* 61: 287-290.
- Foyer, C.H. y Harbinson, J. (1994) Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. En: *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense system in plants*, Foyer, C.H. and Mullineaux, P.M. eds, 1-42. Boca Raton CRC Press.
- Friso, G., Giacomelli, L., Ytterberg, J.A., Peltier, J.B., Rudella, A., Sun, Q. y van Wijk, K.J. (2004) In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. *Plant Cell* 16: 478-499.
- Fromme, P., Jordan, P. y Krauss, N. (2001) Structure of photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* 1507: 5-31.
- Fryer, M.J., Ball, L., Oxborough, K., Karpinski, S., Mullineaux, P.M. y Baker, N.R. (2003) Control of ascorbate peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organisation of *Arabidopsis* leaves. *Plant J.* 33: 691-705.
- Fuchs, M. y Tanner, C.B. (1966) Infrared thermometry of vegetation. *Agronomy J.* 58: 597-601.

- Fukunaga, K. (1990) Introduction to statistical pattern recognition. 2nd Ed. Academic Press, New York.
- Funayama-Noguchi, S. (2001) Ecophysiology of virus-infected plants: A case study of *Eupatorium makinoi* infected by geminivirus. *Plant Biol.* 3: 251-262.
- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J.F. y Dommes, J. (2002) Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regul.* 37: 263-285.
- Genty, B., Briantais, J.M. y Baker, R.N. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990: 87-92.
- Georgieva, K., Szigeti, Z., Sarvari, E., Gaspar, L., Maslenkova, L., Peeva, V., Peli, E. y Tuba, Z. (2006) Photosynthetic activity of homoiochlorophyllous desiccation tolerant plant *Haberlea rhodopensis* during dehydration and rehydration. *Planta*. 10.1007/s00425-006-0396-8.
- Gevaert, K., Demol, H., Martens, L., Hoorelbeke, L., Puype, M., Goethals, M., Van Damme, J., De Boeck, S. y Vandekerckhove, J. (2001) Protein identification based on matrix assisted laser desorption/ionization-post source decay-mass spectrometry. *Proteomics* 22: 1645-1651.
- Giacomelli, L., Rudella, A. y van Wijk, K.J. (2006) High light response of the thylakoid proteome in *Arabidopsis* wild type and the ascorbate-deficient mutant *vtc2-2*. A comparative proteomics study. *Plant Physiol.* 141: 685-701.
- Gitelson, A.A., Buschmann, C. y Lichtenthaler, H.K. (1998) Leaf chlorophyll fluorescence corrected for re-absorption by means of absorption and reflectance measurements. *J. Plant Physiol.* 152: 283-296.
- Gitelson, A.A., Buschmann, C. y Lichtenthaler, H.K. (1999) The chlorophyll fluorescence ratio F735/F700 as an accurate measure of the chlorophyll content in plants. *Remote Sens. Environ.* 69: 296-302.

- Goff, S.A., Ricke, D., Lan, T.H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H., Hadley, D., Hutchinson, D., Martin, C., Katagiri, F., Lange, B.M., Moughamer, T., Xia, Y., Budworth, P., Zhong, J., Miguel, T., Paszkowski, U., Zhang, S., Colbert, M., Sun, W.L., Chen, L., Cooper, B., Park, S., Wood, T.C., Mao, L., Quail, P., Wing, R., Dean, R., Yu, Y., Zharkikh, A., Shen, R., Sahasrabudhe, S., Thomas, A., Cannings, R., Gutin, A., Pruss, D., Reid, J., Tavtigian, S., Mitchell, J., Eldredge, G., Scholl, T., Miller, R.M., Bhatnagar, S., Adey, N., Rubano, T., Tusneem, N., Robinson, R., Feldhaus, J., Macalma, T., Oliphant, A. y Briggs, S. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*). *Science* 296: 92-100.
- Goodman, R.N., Király, Z. y Wood, K.R. (1986) The biochemistry and physiology of plant disease. *University of Missouri Press*, Columbia.
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R. y Weiss, W. (2000) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21: 1037-1053.
- Görg, A., Weiss, W. y Dunn, M.J. (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4: 3665-3685.
- Görlach, J., Schmid, J. y Amrhein, N. (1993) The 33 kDa protein of the oxygen-evolving complex: a multi-gene family in tomato. *Plant Cell Physiol.* 34: 479-501.
- Götz, T., Sandmann, G. y Romer, S. (2002) Expression of a bacterial carotene hydroxylase gene (*crtZ*) enhances UV tolerance in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 50: 129-142.
- Grabov, A. y Blatt, M.R. (1998) Co-ordination of signalling elements in guard cell ion channel control. *J. Exp. Bot.* 49:399-406.
- Granvogl, B., Reisinger, V. y Eichacker, L.A. (2006) Mapping the proteome of thylakoid membranes by *de novo* sequencing of intermembrane peptide domains. *Proteomics* 6: 3681-3695.

- Guo, Y.-P., Guo, D.-P., Peng, Y. y Chen, J.-S. (2005a) Photosynthetic responses of radish (*Paphanus sativus* var. *longipinnatus*) plants to infection by turnip mosaic virus. *Photosynthetica* 43: 457-462.
- Guo, D.-P., Guo, Y.-P., Zhao, J.-P., Liu, H., Peng, Y., Wang, Q.-M., Chen, J.-S. y Rao, G.-Z. (2005b) Photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in leaves of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*) after turnip mosaic virus infection. *Plant Sci.* 168: 57-63.
- Gunasinghe, U.B. y Berger, P.H. (1991) Association of potato virus and gene products with chloroplasts in tobacco. *Mol. Plant Microbe In.* 4: 452-457.
- Gusta, L.V., Wisniewski, M., Nesbitt, N.T. y Gusta, M.L. (2004) The effect of water, sugars, and proteins on the pattern of ice nucleation and propagation in acclimated and nonacclimated canola leaves. *Plant Physiol.* 135: 1642-1653.
- Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H. y Aebersold, R. (1999) Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotech.* 17: 994-999.
- Gygi, S.P., Rist, B. y Aebersold, R. (2000) Measuring gene expression by quantitative proteome analysis. *Curr. Opin. Biotech.* 11: 396-401.
- Haake, V., Zrenner, R., Sonnewald, U. y Stitt, M. (1998) A moderate decrease of plastid aldolase activity inhibits photosynthesis, alters the levels of sugars and starch, and inhibits growth of potato plants. *Plant J.* 14: 147-157.
- Hák, R., Lichtenthaler, H.K. y Rinderle, U. (1990) Decrease of the chlorophyll fluorescence ratio F690/F730 during greening and development of leaves. *Radiat. Environ. Biophys.* 29: 329-336.
- Haldrup, A., Lunde, C. y Scheller, H.V. (2003) *Arabidopsis thaliana* plants lacking the PSI-D subunit of photosystem I suffer photoinhibition, have unstable photosystem I complexes, and altered redox homeostasis in the chloroplast stroma. *J. Biol. Chem.* 278: 33276-33283.

- Haripal, P.K., Raval, H.K., Raval, M.K., Rawal, R.M., Biswal, B. y Biswal, U.C. (2006) Three-dimensional model of zeaxanthin binding PsbS protein associated with nonphotochemical quenching of excess quanta of light energy absorbed by the photosynthetic apparatus. *J. Mol. Model.* 12: 847-853.
- Harris, P.J. y Hartley, R.D. (1976) Detection of bound ferulic acid in cell walls of the Gramineae by ultraviolet fluorescence microscopy. *Nature* 259: 508-510.
- Havaux, M., Triantaphylidès, C. y Genty, B. (2006) Autoluminescence imaging: a non-invasive tool for mapping oxidative stress. *Trends Plant Sci.* 11: 480-484.
- Havelda, Z. y Maule, J.A. (2000) Complex spatial responses to cucumber mosaic virus photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 852: 144-155.
- Heazlewood, J.L. y Millar, A.H. (2005) AMPDB: the *Arabidopsis* mitochondrial protein database. *Nucleic Acids Res.* 33: D605-D610.
- Heisel, F., Sowinska, M., Miehe, J.A., Lang, M. y Lichtenthaler, H.K. (1996) Detection of nutrient deficiencies of maize by laser induced fluorescence imaging. *J. Plant Physiol.* 148: 622-631.
- Herbers, K., Takahata, Y., Melzer, M., Mock, P.H. y Hajirezaei, M. (2000) Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco. *Mol. Plant Pathol.* 1: 51-59.
- Hideg, E., Juhasz, M., Bornman, J.F. y Asada, K. (2002) The distribution and possible origin of blue-green fluorescence in control and stressed barley leaves. *Photochem. Photobiol. Sci.* 1: 934-941.
- Hirano, H., Islam, N. y Kawasaki, H. (2004) Technical aspects of functional proteomics in plants. *Phytochemistry* 1487-1498.
- Hiriart, J.B., Lehto, K., Tyystjärvi, E., Junttila, T. y Aro, E.M. (2002) Suppression of a key gene involved in chlorophyll biosynthesis by means of virus-inducing gene silencing. *Plant Mol. Biol.* 50: 213-224.

- Hochholdinger, F., Sauer, M., Dembinsky, D., Hoecker, N., Muthreich, N., Saleem, M. y Liu, Y. (2006) Proteomic dissection of plant development. *Proteomics* 6: 4076-4083.
- Hodgson, A.J.R., Beachy, N.R. y Pakrasi, B.H. (1989) Selective inhibition of photosystem II spinach by tobacco mosaic virus: an effect of the viral coat protein. *FEBS Lett.* 245: 267-270.
- Holt, N.E., Fleming, G.R. y Niyogi, K.K. (2004) Toward an understanding of the mechanism of nonphotochemical quenching in green plants. *Biochemistry* 43: 8281-8289.
- Horton, P., Ruban, A.V. y Walters, R.G. (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 655-684.
- Horton, P. y Ruban, A.V. (2005) Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. *J. Exp. Bot.* 56: 365-373.
- Horton, P., Wentworth, M. y Ruban, A. (2005) Control of the light harvesting function of chloroplast membranes: The LHCII-aggregation model for non-photochemical quenching. *FEBS Letters* 579: 4201-4206.
- Houtz, R.L. y Portis, A.R. Jr. (2003) The life of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase – Posttranslational facts and mysteries. *Arch. Biochem. Biophys.* 414: 150-158.
- Hua, S.B., Dube, S.K., Barnett, N.M. y Kung, S.D. (1991a) Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding 23 kDa polypeptide of the oxygen-evolving complex of photosystem II in tobacco, *Nicotiana tabacum* L. *Plant Mol. Biol.* 16: 749-750.
- Hua, S.B., Dube, S.K., Barnett, N.M. y Kung, S.D. (1991b) Nucleotide sequence of gene *oe2-A* and its cDNA encoding 23 kDa polypeptide of the oxygen-evolving complex of photosystem II in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 17: 551-553.

- Hua, S.B., Dube, S.K. y Kung, S.D. (1997) Molecular evolutionary of the psbP gene family of the photosystem II oxygen-evolving complex in *Nicotiana*. *Genome* 36: 483-488.
- Huala, E., Dickerman, A.W., García-Hernández, M., Weems, D., Reiser, L., LaFond, F., Hanley, D., Kiphart, D., Zhuang, M., Huang, W., Mueller, L.A., Bhattacharyya, D., Bhaya, D., Sobral, B.W., Beavis, W., Meinke, D.W., Town, C.D., Somerville, D. y Rhee, S.Y. (2001) The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic Acids Res.* 29: 102-105.
- Huber, C.G., Walcher, W., Timperio, A., Troiani, S., Porceddu A. y Zolla, L. (2004) Multidimensional proteomic analysis of photosynthetic membrane proteins by liquid extraction-ultracentrifugation-liquid chromatography-mass spectrometry. *Proteomics* 4: 3909-3920.
- Hull, R. (2002) *Matthew's Plant Virology*. 4th ed. Academic Press.
- Hunt, D.F., Yates 3rd, J.R., Shabanowitz, J., Winston, S. y Hauer, C.R. (1986) Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6233-6237.
- Hurkman, W.J. y Tanaka, C.K. (1986) Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.* 81: 802-806.
- Ifuku, K. y Sato, F. (2002) A truncated mutant of the extrinsic 23-kDa protein that absolutely requires the extrinsic 17-kDa protein for Ca²⁺ retention in photosystem II. *Plant Cell Physiol.* 43: 1244-1249.
- Ifuku, K., Yamamoto, Y., Ono, T., Ishihara, S. y Sato, F. (2005a) PsbP protein, but not PsbQ protein, is essential for the regulation and stabilization of photosystem II in higher plants. *Plant Physiol.* 139: 1175-1184.

- Ifuku, K., Yamamoto, Y., Ishihara, S. y Sato, F. (2005b) Down-regulation of *psbO*, *psbP* and *psbQ* genes in *Nicotiana tabacum* by RNA interference technique. *Plant Cell Physiol.* 46: S27-S27.
- Ihnatowicz, A., Pesaresi, P., Varotto, C., Richly, E., Schneider, A., Jahns, P., Salamini, F. y Leister, D. (2004) Mutants for photosystem I subunit D of *Arabidopsis thaliana*: effects on photosynthesis, photosystem I stability and expression of nuclear genes for chloroplast functions. *Plant J.* 37: 839-852.
- Ireland, C.R.; Long, N.R. y Baker, N.R. (1984) The relationship between carbon dioxide fixation and chlorophyll a fluorescence during induction of photosynthesis in maize leaves at different temperatures and carbon dioxide concentrations. *Planta* 160: 550-558.
- Ishihara, S., Yamamoto, Y., Ifuku, K. y Sato, F. (2005) Functional analysis of four members of the PsbP family in photosystem II in *Nicotiana tabacum* using differential RNA interference. *Plant Cell Physiol.* 46: 1885-1893
- Issaq, H.J., Veenstra, T.D., Conrads, T.P. y Felschow, D. (2002) The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 292: 587-592.
- Jensen, P.E., Haldrup, A., Rosgaard, L. y Scheller, H.V. (2003) Molecular dissection of photosystem I in higher plants: topology, structure and function. *Physiol. Plantarum* 119: 313-321.
- Ji, L.H. y Ding, S.W. (2001) The suppressor of transgene RNA silencing encoded by Cucumber mosaic virus interferes with salicylic acid-mediated virus resistance. *Mol. Plant Microbe In.* 14: 715-724.
- Jones H.G. (1998) Stomatal control of photosynthesis and transpiration. *J. Exp. Bot.* 49: 387-398.
- Jones, H.G. (1999) Use of thermography for quantitative studies of spatial and temporal variation of stomatal conductance over leaf surfaces. *Plant Cell Environ.* 22: 1043-1055.

- Jones, H.G., Stoll, M., Santos, T., de Sousa, C., Chaves, M.M. y Grant, O.M. (2002) Use of infrared thermography for monitoring stomatal closure in the field: application to grapevine. *J. Exp. Bot.* 53: 2249-2260.
- Jones, H.G. (2004a) Application of thermal imaging and infrared sensing in plant physiology and ecophysiology. *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology*, Vol. 41: 107-163.
- Jones, H.G. (2004b) Irrigation scheduling: advantages and pitfalls of plant-based methods. *J. Exp. Bot.* 55: 2427-2436.
- Jones, A.M.E., Thomas, V., Truman, B., Lilley, K., Mansfield, J.W. y Grant, M. (2004) Specific changes in the *Arabidopsis* proteome in response to bacterial challenge: differentiating basal and R-gene mediated resistance. *Phytochemistry* 65: 1805-1816.
- Jones, A.M.E., Bennett, M.H., Mansfield, J.W. y Grant, M. (2006a) Analysis of the defence phosphoproteome of *Arabidopsis thaliana* using differential mass tagging. *Proteomics* 6: 4155-4165.
- Jones, A.M.E., Thomas, V., Bennett, M.H., Mansfield, J. y Grant, M. (2006b) Modifications to the *Arabidopsis* defense proteome occur prior to significant transcriptional change in response to inoculation with *Pseudomonas syringae*^{[W][OA]}. *Plant Physiol.* 142: 1603-1620.
- Jonsson, A.P. (2001) Mass spectrometry for protein and peptide characterisation. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 868-884.
- Karpinski, S., Reynolds, H., Karpinska, B., Wingsle, G., Creissen, G. y Mullineaux, P. (1999) Systemic signalling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* 284: 654-657.
- Kautsky, H. y Hirsch, A. (1931) Neue versuche zur kohlenauerassimilation. *Naturwissenschaften* 48: 964-964.
- Kanazawa, A. y Kramer, D.M. (2002) *In vivo* modulation of nonphotochemical exciton quenching (NPQ) by regulation of the chloroplast ATP synthase. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 12789-12794.

- Karas, M. y Hillenkamp, F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 daltons. *Anal. Chem.* 60: 2299-2301.
- Keller, P., Lüttge, U., Xue-Chen, W. y Büttner, F. (1989) Influence of rhizomania disease on gas exchange and water relations of a susceptible and a tolerant sugar beet variety. *Physiol. Mol. Plant P.* 34: 379-392.
- Kenyon, G.L., DeMarini, D.M., Fuchs, E., Galas, D.J., Kirsch, J.F., Leyh, T.S., Moos, W.H., Petsko, G.A., Ringe, D., Rubin, G.M. y Sheahan, L.C. (2002) Natural Research Council Steering Committee. Defining the mandate of proteomics in the post-genomics era: workshop report. *Mol. Cell Proteomics*: 1: 763-780.
- Kiesselbach, T., Hagman, a., Andersson, B. y Schröder, P.W. (2000) The thylakoid lumen of chloroplast. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 273: 6710-6716.
- Kim, S.T., Kim, S.G., Hwang, D.H., Kang, S.Y., Kim, H.J., Lee, B.H., Lee, J.J. y Kang, K.Y. (2004) Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from rice leaves induced by rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Proteomics* 4: 3569-3578.
- Kitaya, Y., Kawai, M., Tsuruyama, J., Takahashi, H., Tani, A., Goto, E., Saito, T. y Kiyota, M. (2001) The effect of gravity on surface temperature and net photosynthetic rate of plant leaves. *Adv. Space Res.* 28: 659-664.
- Kitaya, Y., Kawai, M., Tsuruyama, J., Takahashi, H., Tani, A., Goto, E., Saito, T. y Kiyota, M. (2003) The effect of gravity on surface temperatures of plant leaves. *Plant Cell Environ.* 26: 497-503.
- Kleffman, T., Russenberger, D., von Zychlinski, A., Christopher, W., Sjölander, K., Gruissem, W., y Baginsky, S. (2004) The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Curr. Biol.* 14: 354-362.

- Kofalvi, S.A. y Nassuth, A. (1995) Influence of wheat streak mosaic virus infection on phenylpropanoid metabolism and the accumulation of phenolics and lignin in wheat. *Physiol. Mol. Plant P.* 47: 365-377.
- Koiwa, H., Barb, A.W., Xiong, L., Li, F., McCully, M.G., Lee, B., Sokolchik, I., Zhu, J., Gong, Z., Reddy, M., Sharkhuu, A., Manabe, Yl., Yokoi, S., Zhu, J.K., Bressan, R.A. y Hasegawa, P.M. (2002) C-terminal domain phosphatase-like family members (AtCPLs) differentially regulate *Arabidopsis thaliana* abiotic stress signalling, growth, and development. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99: 10893-10898.
- Komatusu, S., Zang, X. y Tanaka, N. (2006) Comparison of two proteomics techniques used to identify proteins regulated by gibberellin in rice. *Journal of Proteome Resesearch* 5: 270-276.
- Konishi, H., Ishiguro, K. y Komatsu, S. (2001) A proteomics approach towards understanding blast fungus infection of rice grown under different levels of nitrogen fertilization. *Proteomics* 1: 1162-1171.
- Krapp, A. y Stitt, M. (1995) An evaluation of direct and indirect mechanism for the “sink-regulation” of photosynthesis in spinach: changes in gas exchange, carbohydrates, metabolites, enzymes activities and steady-state transcript levels after cold-girdling source leaves. *Planta* 195: 313-323.
- Krizek, D.T., Middleton, E.M., Sandhu, R.K. y Kim, M.S. (2001) Evaluating UV-B effects and EDU protection in cucumber leaves using fluorescence images and fluorescence emission spectra. *J. Plant Physiol.* 158: 41-53.
- Kwon, S.J., Choi, E.Y., Choi, Y.J., Ahn, J.H. y Park, O.K. (2006) Proteomics studies of post-translational modifications in plants. *J. Exp. Bot.* 57: 1547-1551.
- Kyle, D.J., Staehelin, L.A. y Arntzen, C.J. (1983) Lateral mobility of the light-harvesting complex in chloroplast membranes controls excitation energy distribution in higher plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 222: 527-541.

- Laemli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lang, M., Stober, F. y Lichtenthaler, H.K. (1991) Fluorescence emission spectra of plant leaves and plant constituents. *Radiat Environ Biophys* 30: 333-347.
- Lang, M., Lichtenthaler, H.K., Sowinska, M., Heisel, F. y Miehé, J.A. (1996) Fluorescence imaging of water and temperature stress in plant leaves. *J. Plant Physiol.* 148: 613-621.
- Langsdorf, G., Buschmann, C., Sowinska, M., Babani, F., Mokry, M., Timmermann, F. y Lichtenthaler, H.K. (2000) Multicolour fluorescence imaging of sugar beet leaves with different nitrogen status by flash lamp UV-excitation. *Photosynthetica* 38: 539-551.
- Larcher, W. (1987) Streß bei Pflanzen. *Naturwissenschaften* 74: 158-167.
- Lehto, K., Tikkanen, M., Hiriart, J.-B., Paakkari, V. y Aro, E.M. (2003) Depletion of the photosystem II core complex in mature tobacco leaves infected by the Flavum strain of tobacco mosaic virus. *Mol. Plant Microbe In.* 16: 1135-1144.
- Leigh, A., Close, J.D., Ball, M.C., Siebke, K. y Nicotra, A.B. (2006) Leaf cooling curves: measuring leaf temperature in sunlight. *Functional Plant Biology* 33: 515-519.
- Leinonen, I. y Jones, H.G. (2004) Combining thermal and visible imagery for estimating canopy temperature and identifying plant stress. *J. Exp. Bot.* 55: 1423-1431.
- Lenk, S. y Buschmann, C. (2006) Distribution of UV-shielding of the epidermis of sun and shade leaves of the beech (*Fagus sylvatica* L.) as monitored by multi-colour fluorescence imaging. *J. Plant Physiol.* 163: 1273-1283.
- Levy, D. y Marco, S. (1991) Indices of water deficit in susceptible and resistant cucumber in response to infection by cucumber mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* 119: 381-386.

- Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., Rinderle, U. y Schmuck, G. (1986) Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology. *Radiation Radiat. Environ. Biophys.* 25: 297-308.
- Lichtenthaler, H.K. y Rinderle, U. (1988) The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 19: S29-85.
- Lichtenthaler, H.K. (1996) Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J. Plant Physiol.* 148: 4-14.
- Lichtenthaler, H.K., Lang, M., Sowinska, M., Heisel, F. y Miehé, J.A. (1996) Detection of vegetation stress via a new high resolution fluorescence imaging system. *J. Plant Physiol.* 148: 599-612.
- Lichtenthaler, H.K. y Miehé, J.A. (1997) Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends Plant Sci.* 2: 316-320.
- Lichtenthaler, H.K. (1998) The stress concept in plants: an introduction. *Ann. NY Acad. Sci.* 851: 187-198.
- Lichtenthaler, H.K. y Schweiger, J. (1998) Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plants. *J. Plant Physiol.* 152: 272-282.
- Lichtenthaler, H.K. y Babani, F. (2000) Detection of photosynthetic activity and water stress by imaging the red chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 889-895.
- Lichtenthaler, H.K., Langsdorf, G., Lenk, S. y Buschmann, C. (2005) Chlorophyll fluorescence imaging of photosynthetic activity with the flash-lamp fluorescence imaging system. *Photosynthetica* 43: 355-369.
- Lilley, K.S. y Dupree, P. (2006) Methods of quantitative proteomics and their application to plant organelle characterization. *J. Exp. Bot.* 1493-1499.
- Lindbeck, A.G.C., Dawson, O.W. y Thomson, W.W. (1991) Coat protein-related polypeptides from *in vitro* tobacco mosaic virus coat protein mutants do not

accumulate in the chloroplast of directly inoculated leaves. *Mol. Plant Microbe In.* 4: 89-94.

- Lindenthal, M., Steiner, U., Dehne, H.W. y Oerke, E.C. (2005) Effect of downy mildew development on transpiration of cucumber leaves visualized by digital infrared thermography. *Phytopathology* 95: 233-240.
- Lin, T.B., Schwartz, A. y Saranga, Y. (1999) Photosynthesis and productivity of cotton under silverleaf whitefly stress. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 889-895.
- Link, A.J., Eng, J., Schieltz, D.M., Carmack, D., Mize, G.J. Morris, D.R., Garvik, B.M. y Yates 3rd, J.R. (1999) Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nature Biotech.* 17: 676-682.
- Linsey, D.W. y Gudauskas, R. T. (1975) Effects of maize dwarf mosaic virus on water relations of corn. *Phytopathology* 65: 434-440.
- Liska, A.J. y Shevchenko, A. (2003) Combining mass spectrometry with database interrogation strategies in proteomics. *Trends Anal. Chem.* 22: 291-298.
- Lohaus, G., Heldt, H.W. y Osmond, C.B. (2000) Infection with phloem limited Abutilon mosaic virus causes localized carbohydrate accumulation in leaves of *Abutilon striatum*: relationships to symptom development and effects on chlorophyll fluorescence quenching during photosynthetic induction. *Plant Biol.* 2: 161-167.
- López, M.M., Bertolini, E., Olmos, A., Caruso, P., Gorris, M.T., Llop, P., Penyalver, R. y Cambra, M. (2003) Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. *Int. Microbiol.* 6: 233-243.
- Lucas, J.W., Olesinki, A., Hull, J.R., Haudenshield, S.J., Deom, M.C., Beachy, N.R. y Wolf, S. (1993) Influence of the tobacco mosaic virus 30-kDa movement protein on carbon metabolism and photosynthate partitioning in transgenic tobacco plants. *Planta* 190: 88-96.
- Lüdeker, W., Dahn, H.-G. y Günter, K.P. (1996) Detection of fungal infection of plants by laser-induced fluorescence: An attempt to use remote sensing. *J. Plant Physiol.* 148: 579-585.

- Lüdeker, W., Günter, K.P. y Dahn, H.-G. (1997) Laser induced leaf fluorescence: A tool for vegetation status- and stress-monitoring and optical aided agriculture. En: *Advances in laser remote sensing for terrestrial and oceanographic applications*. 3059: 63-75.
- Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F. y Raskin, I. (1990) Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*. 250: 1002-1004.
- Malek, K. y Dietrich, R.A. (1999) Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends Plant Sci*. 4: 215-219.
- Maliga, P., Klessig, D.F., Cashmore, A.R., Gruissem, W. y Varner, J.E. (1995) *Methods in Plant Molecular Biology: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Mantha, S.V., Johnson, G.A. y Day, T.A. (2001) Evidence from action and fluorescence spectra that UV-induced violet-blue-green fluorescence enhances leaf photosynthesis. *Photochem. Photobiol*. 73: 249-256.
- Masclaux-Daubresse, C., Carrayol, E. y Valadier, M.H. (2005) The two nitrogen mobilisation- and senescence-associated GS1 and GDH genes are controlled by C and N metabolites. *Planta* 221: 580-588.
- Matouš, K., Benediktyová, Z., Berger, S., Roitsch, T. y Nedbal, L. (2007) Case study of combinatorial imaging: What protocol and what chlorophyll fluorescence image to use when visualizing infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae*? *Photosynth. Res.* doi: 10.1007/s11120-006-9120-6.
- Maule, A., Leh, V. y Lederer, C. (2002) The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Curr. Opin. Plant Biol*. 5: 279-284.
- Maxwell, D.P., Laudenbach, D.E. y Huner, N.P.A. (1995) Redox regulation of light-harvesting complex II and cab mRNA abundance in *Dunaliella salina*. *Plant Physiol*. 109: 787-795.

- Maxwell, K. y Johnson, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51: 659–668.
- Mercure, S.A., Daoust, B. y Samson, G. (2004) Causal relationship between growth inhibition, accumulation of phenolic metabolites, and changes of UV-induced fluorescence in nitrogen-deficient barley plants. *Can. J. Botany.* 82: 815-821.
- Merkle, T.H., Krenz, M., Wennig, A. y Schäfer, E. (1990) Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a gene encoding the 23 kDa polypeptide of the oxygen-evolving complex from mustard (*Sinapis alba* L.). *Plant Mol. Biol.* 14: 889-890.
- Merlot, S., Mustilli, A.C., Genty, B., North, B., Lefebvre, V., Sotta, B., Vavasseur, A. y Giraudat, J. (2002) Use of infrared thermal imaging to isolate *Arabidopsis* mutants defective in stomatal regulation. *Plant. J.* 30: 601-609.
- Messinger, S.M., Buckley, T.N. y Mott, K.A. (2006) Evidence for involvement of photosynthetic processes in the stomatal response to CO₂. *Plant Physiol.* 140: 771-778.
- Meyer, S., Saccardy-Adji, K., Rizza, F. y Genty, B. (2001) Inhibition of photosynthesis by *Colletotrichum lindemuthianum* in bean leaves determined by chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Cell Environ.* 24: 947-955.
- Meyer, S., Cartelat, A., Moya, I. y Cerovic, Z.G. (2003) UV-induced blue-green and far-red fluorescence along wheat leaves: a potential signature of leaf ageing. *J. Exp. Bot.* 54: 757-769.
- Mlotshwa, S., Voinnet, O., Mette, M.F., Matzke, M., Vaucheret, H., Ding, S.W., Pruss, G. y Vance, V.B. (2002) RNA silencing and the mobile silencing signal. *Plant Cell* 14: S289-301.
- Moon, S.K., McMurtrey, J.E., Mulchi, C.L., Daughtry, C.S.T., Chappelle, E.W. y Chen, Y.-R. (2001) Steady-state multispectral fluorescence imaging system for plant leaves. *Appl. Opt.* 40: 157-166.

- Morales, F., Cerovic, Z.G. y Moya, I. (1994) Characterization of blue-green fluorescence in the mesophyll of sugar-beet (*Beta vulgaris* L) leaves affected by iron deficiency. *Plant Physiol.* 106: 127-133.
- Morales, F., Cerovic, Z.G. y Moya, I. (1996) Time-resolved blue-green fluorescence of sugar beet (*Beta vulgaris* L) leaves. Spectroscopic evidence for the presence of ferulic acid as the main fluorophore of the epidermis. *Biochim. Biophys. Acta* 1273: 251-262.
- Morales, F., Cerovic, Z.G. y Moya, I. (1998) Time-resolved blue-green fluorescence of sugar beet leaves. Temperature-induced changes and consequences for the potential use of blue-green fluorescence as a signature for remote sensing of plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 25: 325-334.
- Morales, F., Cartelat, A., Álvarez-Fernández, A., Moya, I. y Cerovic, Z.G. (2005) Time-resolved spectral studies of blue-green fluorescence of artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. Scolymus) leaves: Identification of chlorogenic acid as one of the major fluorophores and age-mediated changes. *J. Agric. Food Chem.* 53: 9668-9678.
- Moya, I., Cartelat, A., Cerovic, Z.G., Ducruet, J.M., Evain, S., Flexas, J., Goulas, Y., Louis, J., Meyer, S., Moise, N. y Ounis, A. (2003) Possible approaches to remote sensing of photosynthetic activity. *Learning from Earth's shapes and sizes, Proceedings of IEEE International Geoscience and Remote Sensing symposium.* I-VII: 588-590.
- Mullineaux, P. y Karpinski, S. (2002) Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 43-48.
- Mur, L.A.J., Edi Santosa, I., Laarhoven, L.J.J., Holton, N.J., Harren F.J.M. y Smith, A.R. (2005) Laser photoacoustic detection allows in planta detection of nitric oxide in tobacco following challenge with avirulent and virulent *Pseudomonas syringae* pathovars. *Plant Physiol.* 138: 1247-1258.
- Murakami, R., Ifuku, K., Takabayashi, A., Shikanai, T., Endo, T. y Sato, F. (2005) Functional dissection of two *Arabidopsis* PsbO2. *FEBS J.* 272: 2165-2175.

- Murphy, A.M., Chivasa, S., Singh, D.P. y Carr, J.P. (1999) Salicylic acid induced resistance to viruses and other pathogens: a parting of the ways? *Trends Plant Sci.* 4: 155-159.
- Mustilli, A.C., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F. y Giraudat, J. (2002) *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* 14: 3089-3099.
- Naidu, R.A., Krishnan, M., Ramanajam, P., Gnanan, A. y Nayudu, M.V. (1984a) Studies on peanut green mosaic virus infected peanut (*Arachis hypogaea* L.) leaves. I. Photosynthesis and photochemical reactions. *Physiol. Plant. Pathol.* 25: 181-190.
- Naidu, R.A., Krishnan, M., Nayudu, M.V. y Gnanan, A. (1984b) Studies on peanut green mosaic virus infected peanut (*Arachis hypogaea* L.) leaves. II. Chlorophyll-protein complexes and polypeptide composition of thylakoid membranes. *Physiol. Plant. Pathol.* 25: 191-198.
- Naidu, R.A., Krishnan, M., Nayudu, M.V. y Gnanan, A. (1986) Studies on peanut green mosaic virus infected peanut (*Arachis hypogaea* L.) leaves. III. Changes in the polypeptides of photosystem II particles. *Physiol. Mol. Plant P.* 29: 53-58.
- Naver, H., Haldrup, A. y Scheller, H.V. (1999) Cosuppression of photosystem I subunit PSI-H in *Arabidopsis thaliana*. Efficient electron transfer and stability of photosystem I is dependent upon the PSI-H subunit. *J. Biol. Chem.* 274: 10784-10789.
- Ndimba, B.K., Chivasa, S., Hamilton, J.M., Simon, W.J. y Slabas, A.R. (2003) Proteomic análisis of changes in the extracellular matrix of *Arabidopsis* cell suspension cultures induced by fungal elicitors. *Proteomics* 3: 1047-1059.
- Nedbal, L., Soukupová, J., Kaftan, D., Whitmarsh, J. y Trtílek, M. (2000a) Kinetic imaging of chlorophyll fluorescence using modulated light. *Photosynth. Res.* 66: 3-12.

- Nedbal, L., Soukupová, J., Whitmarsh, J. y Trtílek, M. (2000b) Postharvest imaging of chlorophyll fluorescence from lemons can be used to predict fruit quality. *Photosynthetica* 38: 571-579.
- Nedbal, L. y Březina, V. (2002) Complex metabolic oscillations in plants forced by harmonic irradiance. *Biophys.J.* 83: 2180-2189.
- Nedbal, L., Březina, V., Adamec, F., Štys, D., Oja, V., Laisk, A. y Govindjee (2003) Negative feedback regulation is responsible for the non-linear modulation of photosynthetic activity in plants and cyanobacteria exposed to a dynamic light environment *Biochim. Biophys. Acta* 1607: 5-17.
- Nedbal, L. y Whitmarsh, J. (2004) Chlorophyll fluorescence imaging of leaves and fruits. En *Chlorophyll a fluorescence: A signature photosynthesis*. Papageorgiou, C.G., Govindjee, eds. 14: 389-407. Springer. Dordrecht.
- Newton, R.P., Brenton, A.G., Smith, C.J. y Dudley, E. (2004) Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. *Phytochemistry* 65: 1449-1485.
- Nicholson, R.L. y Hammerschmidt, R. (1992) Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 369-389.
- Niemann, G.J., van der Kerk, A., Niessen, W.M.A. y Versluis, K. (1991) Free and cell wall-bound phenolics and other constituents from healthy and fungus-infected carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) stems. *Physiol. Mol. Plant P.* 38: 417-432.
- Nilsson, H.-E. (1995a) Remote sensing and image analysis in plant pathology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 15: 489-527.
- Nilsson, H.-E. (1995b) Remote sensing and image analysis in plant pathology. *Can. J. Plant Pathol.* 17: 154-166.
- Nixon, P.J., Barker, M., Boehm, M., de Vries, R. y Komenda, J. (2005) FtsH-mediated repair of the photosystem II complex in response to light stress. *J. Exp. Bot.* 56: 357-363.

- Niyogi, K.K., Xiao-Ping, L., Rosenberg, V. y Jung, H.-S. (2005) Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? *J. Exp. Bot.* 56: 375-382.
- Obokata, J., Mikami, K., Hayashida, N., Nakamura, M. y Sugiera, M. (1993) Molecular heterogeneity of photosystem I. psaD, psaE, psaF, psaH and psaL are all present in isoforms in *Nicotiana* spp. *Plant Physiol.* 102: 1259-1267.
- Obokata, J., Mikami, K., Yamamoto, Y. y Hayashida, N. (1994) Microheterogeneity of PSI-E subunit of photosystem I in *Nicotiana sylvestris*. *Plant Cell Physiol.* 35: 203-209.
- Obregón, P., Martín, R., Sanz, A. y Castresana, C. (2001) Activation of defence-related genes during senescence: a correlation between gene expression and cellular damage. *Plant Mol. Biol.* 46: 67-77.
- Oerke, E-C., Steiner, U., Dehne, H-W. y Lindenthal, M. (2006) Thermal imaging of cucumber leaves affected by downy mildew and environmental conditions. *J. Exp. Bot.* 57: 2121-2132.
- O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M. y O'Farrell, P.H. (1977) High resolution two dimensional of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12: 1133-1142.
- Omasa, K. y Takayama, K. (2003) Simultaneous measurement of stomatal conductance, non-photochemical quenching, and photochemical yield of Photosystem II in intact leaves by thermal and chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Cell Physiol.* 44: 1290-1300.
- Oparka, K.J. y Santa Cruz, S. (2000) The great escape: phloem transport and unloading of macromolecules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 323-347.
- Osmond, C.B., Berry, J.A., Balachandran, S., Büchen-Osmond, C., Daley, P.F. y Hodgson, R.A.J. (1990) Potential consequences of virus infection for shade-sun acclimation in leaves. *Bot. Acta* 103: 226-229.
- Osmond, C.B., Daley, P.F., Badger, M.R. y Lüttge, U. (1998) Chlorophyll fluorescence quenching during photosynthetic induction in leaves of

- Abutilon striatum* Dicks. infected with Abutilon mosaic virus observed with a field-portable system. *Bot. Acta* 111: 390-397.
- Oswald, O., Martin, T., Dominy, P.J. y Graham, I.A. (2001) Plastid redox state and sugars: interactive regulators of nuclear-encoded photosynthetic gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2047-2052.
- Ounis, A., Cerovic, Z.G., Briantais, J.M. y Moya, I. (2001) Dual excitation FLIDAR for the estimation of epidermal UV absorption in leaves and canopies. *Rem. Sens. Environ.* 76: 33-48.
- Padliya, N.D. y Cooper, B. (2006) Mass spectrometry-based proteomics for the detection of plant pathogens. *Proteomics* 6: 4069-4075.
- Pearce, R.S. (2001) Plant freezing and damage. *Ann. Bot.* 87: 417-424.
- Pearce, R.S. y Fuller, M.P. (2001) Freezing of barley studied by infrared video thermography. *Plant Physiol.* 125: 227-240.
- Peltier, J.-B., Friso, G., Kalume, D.E., Roepstorff, P., Nilsson, F., Adamska, I. y van Wijk, K.J. (2000) Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of lumenal and peripheral thylakoid proteins. *Plant Cell* 12: 319-341.
- Peltier, J.-B., Emanuelsson, O., Kalume, D.E., Ytterberg, J., Friso, G., Rudella, A., Liberles, D.A., Söderberg, L., Roepstorff, P., von Heijne, G. y van Wijk, K.J. (2002) Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction. *Plant Cell* 14: 211-236.
- Peltier, J.B., Ytterberg, J.A., Sun, Q. y van Wijk, K.J. (2004) New functions of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* revealed by a simple, fast, and versatile fractionation strategy. *J. Biol. Chem.* 279: 49367-49383.
- Pérez-Bueno, M.L. (2003) Photosystem II and viral infection: Analysis of fluorescence imaging and regulation of the synthesis of the oxygen-evolving-complex proteins during pathogenesis. *Tesis Doctoral*, Universidad de Granada, España.

- Pérez-Bueno, M.L., Rahoutei, J., Sajnani, C., García-Luque, I. y Barón, M. (2004) Proteomic analysis of the oxygen-evolving complex of photosystem II under biotic stress. Studies on *Nicotiana benthamiana* infected with tobamoviruses. *Proteomics* 4: 418-425.
- Pérez-Bueno, M.L., Ciscato, M., vandeVen, M., García-Luque I., Valcke, R. y Barón, M. (2006) Imaging viral infection. Studies on *Nicotiana benthamiana* plants infected with the pepper mild mottle tobamovirus. *Photosynth. Res.* 90: 111-123.
- Peterson, R.B. y Aylor, D.E. (1995) Chlorophyll fluorescence induction in leaves of *Phaseolus vulgaris* infected with bean rust (*Uromyces appendiculatus*). *Plant Physiol.* 108: 163-171.
- Pfannschmidt, T. (2003) Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Sci.* 8: 33-41.
- Phee, B.-K., Cho, J.-H., Park, S., Jung, J.H., Lee, Y.-H., Jeon, J.-S., Bhoo, S.H. y Hahn, R.-R. (2004) Proteomic analysis of the response of *Arabidopsis* chloroplast proteins to high light stress. *Proteomics* 4: 3560-3568.
- Plumbe, A.M. y Willmer, C.M. (1986) Phytoalexins, water-stress and stomata. III. The effects of some phenolics, fatty acids and some other compounds on stomatal responses. *New Phytol.* 103: 17-22.
- Porubleva, L., Vander Velden, K., Kothari, S., Oliver, D.J. y Chitnis, P.R. (2001) The proteome of maize leaves: use of gene sequences and expressed sequence tag data for identification of proteins with peptide mass fingerprints. *Electrophoresis* 22: 1724-1738.
- Pudil, P., Novovicova, J. and Kittler, J. (1994) Floating search methods in feature selection. *Pattern Recognition Letters* 15: 1119-1125.
- Rahoutei, J., García-Luque, I., Cremona, V. y Barón, M. (1998) Effect of tobamovirus infection on PSII complex of infected plants. In *Photosynthesis: from light to biosphere.* 4: 2761-2764. G Garab, ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- Rahoutei, J., Barón, M., García-Luque, I., Droppa, M., Neményi, A. y Horvath, G. (1999) Effect of tobamovirus infection on the thermoluminescence characteristics of chloroplast from infected plants. *Z. Naturforsch.* 54c: 634-639.
- Rahoutei, J. (2000) Efecto de la infección en el proceso fotosintético de la planta huésped. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, España.
- Rahoutei, J., García-Luque, I. y Barón, M. (2000) Inhibition of photosynthesis by viral infection: Effect on PSII structure and function. *Physiol. Plantarum* 110: 286-292.
- Raines, C.A. (2003) The Calvin cycle revisited. *Photosynth. Res.* 110: 286-292.
- Raskin, I. y Ladyman, J.A.R. (1988) Isolation and characterization of a barley mutant with abscisic-acid-insensitive stomata. *Planta* 173: 73-78.
- Raskin, I., Ehmann, A., Melander, W.R. y Meeuse, B.J.D. (1987) Salicylic acid: a natural inducer of heat production in *Arum* lilies. *Science* 237: 1601-1602.
- Reche, A., Lázaro, J.J., Hermoso, R., Chueca, A. y López Gorgé, J. (1997) Binding and activation of pea chloroplast fructosa-1,6-biphosphatase by homologous thioredoxins *m* and *f*. *Physiol. Plantarum* 101: 463-470.
- Reinero, A. y Beachy, N.R. (1986) Association of TMV coat protein with chloroplast membranes in virus-infected leaves. *Plant. Mol. Biol.* 6: 291-301.
- Reinero, A. y Beachy, N.R. (1989) Reduced photosystem II activity and accumulation of viral coat protein in chloroplast of leaves infected with tobacco mosaic virus. *Plant Physiol.* 89: 111-116.
- Rep, M., Dekker, H.L., Vossen, J.H., de Boer, A.D., Houterman, P.M., Speijer, D., Back, J.W., de Koster, C.G. y Cornelissen, B.J.C. (2002) Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato. *Plant Physiol.* 130: 904-917.
- Repka, V. (2002) Chlorophyll-deficient mutant in oak (*Quercus petraea* L.) displays an accelerated hypersensitive-like cell death and an enhanced resistance to powdery mildew disease. *Photosynthetica* 40: 183-193.

- Richards, J.T., Schuerger, A.C., Capelle, G. y Guikema, J.A. (2003) Laser-induced fluorescence spectroscopy of dark- and light-adapted bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) plants grown under three irradiance levels and subjected to fluctuating lighting conditions. *Remote Sens. Environ.* 84: 323-341.
- Roberts, A.G., Santa Cruz, S., Roberts, I.M., Prior, D.A.M., Turgeon, R. y Oparka, K.J. (1997) Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana* comparison of a fluorescent solute with fluorescent virus. *Plant Cell* 9: 1381-1396.
- Roggero, P. y Pennazio, S. (2005) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of extracellular soybean pathogenesis-related proteins using PhastSystem. *Electrophoresis* 11: 86-90.
- Roháček, K y Barták, M (1999) Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica* 37: 339-363.
- Rokka, A., Zhang, L. y Aro, E.M. (2001). Rubisco activase: an enzyme with a temperature dependent dual function? *Plant J.* 25: 463-471.
- Rolland, N., Ferro, M., Seigneurin-Berny, D., Garin, J., Douce, R. y Joyard, J. (2003) Proteomics of chloroplast envelope membranes. *Photosynth. Res.* 78: 205-230.
- Rolfe, A.S. y Scholes, J.D. (1995) Quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *New Phytol.* 131: 69-79.
- Romero-Aranda, R., Soria, T. y Cuartero, J. (2001). Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Science* 160: 265-272.
- Rose, J.K., Bashir, S., Giovannoni, J.J., Jahn, M.M. y Saravanan, R.S. (2004) Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant J.* 39: 715-733.

- Rossignol, M. (2001) Analysis of the plant proteome. *Curr. Opin. Biotech.* 12: 131-134.
- Rossignol, M., Peltier, J.-B., Mock, H.-P., Matros, A., Maldonado, A.M. y Jorrín, J.V. (2006) Plant proteome analysis: A 2004-2006 update. *Proteomics* 6: 5529-5548.
- Rowland, D., Dorner, J., Sorensen, R., Beasley, J.P. Jr. y Todd, J. (2005) Tomato spotted wilt virus in peanut tissue types and physiological effects related to disease incidence and severity. *Plant Pathology* 54: 431-440.
- Ruban, A.V. y Horton, P. (1995) Regulation of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 221-230.
- Ruíz del Pino, M., Moreno, A., García de Lacoba, M., Castillo-Lluva, S., Gilardi, P., Serra, M.T. y García-Luque, I. (2003) Biological and molecular characterization of P101 isolate, a tobamoviral pepper strain from Bulgaria. *Arch. Virol.* 148: 2115-2135.
- Ryšlavá, H., Müller, K., Semorádová, Š., Synková, H. y Čerovská, N. (2003) Photosynthesis and activity of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Nicotiana tabacum* L. leaves infected by *Potato virus A* and *Potato virus Y*. *Photosynthetica* 41: 357-363.
- Saito, Y., Kanoh, M., Hatake, K., Kawahara, T.D. y Nomura, A. (1998) Investigation of laser-induced fluorescence of several natural leaves for application to LIDAR vegetation monitoring. *App. Opt.* 37: 431-437.
- Sajnani, C. (2005) Infecciones virales como factor de estrés en fotosíntesis. *Tesis doctoral*, Universidad de Granada, España.
- Sajnani, C., Zurita, J.L., Doncel, M., Ortega, J.M., Barón, M. y Ducruet, J.-M. (2007) Changes in photosynthetic metabolism induced by tobamovirus infection in *Nicotiana benthamiana* studied in vivo by chlorophyll thermoluminescence. *New Phytol.* En prensa.

- Sampol, B., Bota, J., Riera, D., Medrano, H. y Flexas, J. (2003). Analysis of the virus-induced inhibition of photosynthesis in malmsey grapevines. *New Phytologist* 160: 403-412.
- Samuel, G. (1934). The movement of tobacco mosaic virus within the plant. *Ann. App. Biol.* 21: 90-111.
- Sánchez de Jiménez, E., Medrano, L. y Martínez-Barajas, E. (1995). Rubiscoactivase, a possible new member of the molecular chaperone family. *Biochemistry* 34: 2826-2831.
- Santa Cruz, S. (1999) Perspective: phloem transport of viruses and macromolecules – what goes in must come out. *Trends Microbiol.* 7: 237-241.
- Sauer, K. y Debreczeny, M. (1996) Fluorescence. En *Biophysical Techniques in Photosynthesis*. Ames J. y Hoff, J., ed. 3: 41-61. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Sahnoun, I., Déhais, P., Van Montagu, M., Rossignol, M. y Rouzé, P. (2000) PPMdb: a plant plasma membrane database. *J. Biotechnol.* 78: 235-246.
- Schägger, H. y von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199: 223–231.
- Schägger, H., Cramer, W.A. y von Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217: 220-230.
- Schansker, G., Tóth, S.Z. y Strasser, R.J. (2006) Dark recovery of the Chl a fluorescence transient (OJIP) after light adaptation: The qT-component of non-photochemical quenching is related to an activated photosystem I acceptor side. *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 787-797.
- Scharte, J., Schon, H. y Weiss, E. (2005) Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. *Plant Cell Environ.* 28: 1421-1435.

- Scheller, H.V., Jensen, P.E., Haldrup, A., Lunde, C. y Knoetzel, J. (2001) Role of subunits in eukaryotic PSI. *Biochim. Biophys. Acta* 1507: 41-60.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. y Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68: 850-858.
- Schmitz, A., Kiewnick, S., Schlang, J. y Sikora, R.A. (2004) Use of high resolution digital thermography to detect *Heterodera schachtii* infestation in sugar beets. *Comm. Appl. Biol. Sci.* 69: 359-363.
- Scholes, J.D., Lee, P.J., Horton, P. y Lewis, D.H. (1994) Invertase: understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. *New Phytol.* 126: 213-222.
- Scholes, J.D. y Rolfe, S.A. (1996) Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *Planta* 199: 573-582.
- Schreiber, U., Schliwa, U. y Bilger, W. (1986) Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Res.* 10: 51-62.
- Schroda, M., Kropat, J., Oster, U., Rudiger, W., Vallon, O., Wollman, F.A. y Beck, C.F. (2001) Possible role for molecular chaperones in assembly and repair of photosystem II. *Biochem. Soc. Trans.* 29: 413-418.
- Schröder, P.W. y Kieselbach, T. (2003) Update on chloroplast proteomics. *Photosynth. Res.* 78: 181-193.
- Schubert, M., Petersson, U.A., Haas, B.J., Funk, c., Schröder, W.P. y Kieselbach, T. (2002) Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 277: 8354-8365.
- Schuerger, A.C., Capelle, G.A., Di Benedetto, J.A., Mao, C.Y., Thai, C.N., Evans, M.D., Richards, J.T., Blank, T.A. y Stryjewski, E.C. (2003) Comparison of two hyperspectral imaging and two laser-induced fluorescence instruments

- for the detection of zinc stress and chlorophyll concentration in bahia grass (*Paspalum notatum* Flugge.). *Remote Sens. Environ.* 84: 572-588.
- Schurr, U., Schuberth, B., Aloni, R., Pradel, K.S., Schmundt, D., Jahne, B. y Ullrich, C.I. (1996) Structural and functional evidence for xylem-mediated water transport and high transpiration in *Agrobacterium tumefaciens*-induced tumors of *Ricinus communis*. *Bot. Acta* 109: 405-411.
- Schuster, A.M. y Davies, E. (1983) Ribonucleic acid and protein metabolism in pea epicotyls. *Plant Physiol.* 73: 809-816.
- Schweiger, J., Lang, M. y Lichtenthaler, H.K. (1996) Differences in fluorescence excitation spectra of leaves between stressed and non-stressed plants. *J. Plant Physiol.* 148: 536-547.
- Seigneurin-Berny, D., Rolland, N., Garin, J. y Joyard, J. (1999) Differential extraction of hydrophobic proteins from chloroplast envelope membranes: a subcellular-specific proteomic approach to identify rare intrinsic membrane proteins. *Plant J.* 19: 217-228.
- Selye, H. (1936) A syndrome produced by a various nucuous agents. *Nature* 138: 32-34.
- Seo, J. y Lee, K.-J. (2004) Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *J. Biochem. Mol. Biol.* 37: 35-44.
- Sétif, P., Fischer, N., Lagoutte, B., Bottin, H. y Rochaix, J.-D. (2002) The ferredoxin docking site of photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* 1555: 204-209.
- Shalitin, D. y Wolf, S. (2000) Cucumber mosaic virus infection affects sugar transport in melon plants. *Plant Physiol.* 123: 597-604.
- Shaw M.M. y Riederer M.B. 2003. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 3: 1408-17.
- Sheen, J. (1990) Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* 2: 1027-1038.

- Smith, J.A., Blanchette, R.A., Burnes, T.A., Jacobs, J.J., Higgins, L.A., Whitthuhn, B.A., David, A.J. y Gillman, J.H. (2006) Proteomic comparison of needles from blister rust-resistant and susceptible *Pinus strobus* seedlings reveals up regulation of putative disease resistance proteins. *Mol. Plant Microbe In.* 19: 150-160.
- Somssich, I.E. y Hahlbrook, K. (1998) Pathogen defence in plants – a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* 3: 86-90.
- Soukupová, J., Smatanová, S., Nedbal, L. y Jegorov, A. (2003) Plant response to destruxins visualized by imaging of chlorophyll fluorescence. *Physiol. Plantarum* 118: 399-405.
- Sridhar, R., Mohanty, S.K. y Ramarkrishanayya, G. (1994). Physiology of rice tungro virus disease: water relations of diseased plants. *Acta Phytopatologica et Entomologica Hungarica* 29: 137-145.
- Steinberg, T.H., Jones, L.J., Haugland, R.P. y Singer, V.L. (1996) SYPRO Orange and SYPRO Red Protein gel stains: One-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein. *Anal. Biochem.* 239: 223-237.
- Stober, F. y Lichtenthaler, H.K. (1992) Changes of the laser-induced blue, green and red fluorescence signatures during greening of etiolated leaves of wheat. *J. Plant Physiol.* 140: 673-680.
- Stober, F. y Lichtenthaler, H.K. (1993a) Characterization of the laser-induced blue, green and red fluorescence signatures of leaves of wheat and soybean grown under different irradiance. *Physiol. Plantarum* 88: 696-704.
- Stober, F. y Lichtenthaler, H.K. (1993b) Studies on the localization and spectral characteristics of the fluorescence emission of differently pigmented wheat leaves. *Bot. Acta* 106: 365-370.
- Stober, F., Lang, M. y Lichtenthaler, H.K. (1994) Blue, green, and red fluorescence emission signatures of green, etiolated, and white leaves. *Remote Sens. Environ.* 47: 65-71.

- Subhash, N., Mazzinghi, P., Agati, G., Fusi, F. y Lercari, B. (1995) Analysis of laser-induced fluorescence line-shape of intact leaves - Application to UV stress detection. *Photochem. Photobiol.* 62: 711-718.
- Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J. y Holle, A. (2003) A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* 376: 952-965.
- Sui, C., Fan, Z., Wong, S.-M. y Li, H. (2006) Cloning of cDNAs encoding the three subunits of oxygen evolving complex in *Nicotiana benthamiana* and gene expression changes in tobacco leaves infected with *Tobacco mosaic virus*. *Physiol. Mol. Plant P.* 68: 61-68.
- Swarbrick, P.J., Schulze-Lefert, P. y Scholes, J.D. (2006) Metabolic consequences of susceptibility and resistance (race-specific and broad-spectrum) in barley leaves challenged with powdery mildew. *Plant Cell Environ.* 29: 1061-1076.
- Szabó, I., Bergantino, E. y Giacometti, G.M. (2005) Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation. *EMBO reports* 6: 629-634.
- Szigeti, Z., Almási, A. y Sárvári, É. (2002) Changes in the photosynthetic functions in leaves of Chinese cabbage infected with Turnip Yellow Mosaic Virus. *Acta Biologica Szegediensis* 46: 137-138.
- Takács, Z., Lichtenthaler, H.K. y Tuba, Z. (2000) Fluorescence emission spectra of desiccation-tolerant cryptogamic plants during a rehydration - desiccation cycle. *J. Plant Physiol.* 156: 375-379.
- Takahama, U. (1998) Ascorbic acid-dependent regulation of redox levels of chlorogenic acid and its isomers in the apoplast of leaves of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Cell Physiol.* 39: 681-689.
- Takahashi, H., Ehara, Y. y Hirano, H. (1991) A protein in the oxygen-evolving complex in the chloroplasts is associated with symptom expression on tobacco leaves infected with cucumber mosaic virus strain Y. *Plant Mol. Biol.* 16: 689-698.

- Takahashi, H. y Ehara, Y. (1992) Changes in the activity and the polypeptide composition of the oxygen-evolving complex in photosystem II of tobacco leaves infected with cucumber mosaic virus strain Y. *Mol. Plant Microbe In.* 5: 269-272.
- Tanaka, M., Wakasugi, T., Sugita, M., Shinozaki, K. y Sugiura, M. (1986) Genes for the eight ribosomal proteins are clustered on the chloroplast genome of tobacco (*Nicotiana tabacum*): Similarity to the S10 and *spc* operons of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6030-6034.
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., y Yoshida, T. (1988) Protein and polymer análisis up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2: 151-153.
- Tang, J.Y., Zielinski, R.E., Zangerl, A.R., Crofts, A.R., Berenbaum, M.R. y de Lucia, E.H. (2006) The differential effects of herbivory by first and fourth instars of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) on photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 57: 527-536.
- Técsi, L.I., Maule, A.J., Smith, A.M. y Leegood, R.C. (1994) Complex, localized changes in CO₂ assimilation and starch content associated with the susceptible interaction between cucumber mosaic virus and a cucurbit host. *Plant J.* 5: 837-847.
- Teixeira, J., Pereira, S., Cánovas, F. y Salema, R. (2005) Glutamine synthetase of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Desiree) plants: cell- and organ-specific roles in nitrogen assimilation and mobilization. *J. Exp. Bot.* 56: 663-671.
- Thévenaz, P., Ruttimann, U.E. y Unser, M. (1998) A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Trans. Image Process.* 7: 27-41.
- Tollner, E.W., Becht, J.K., Upchurch, B.L., Shewfelt, R.L. y Prussia, S.E. (1993) Nondestructive evaluation: detection of external and internal attributes frequently associated with quality or damage. *Postharvest handling: a systems approach* A volume in the Food Science and Technology Series: 225-255.

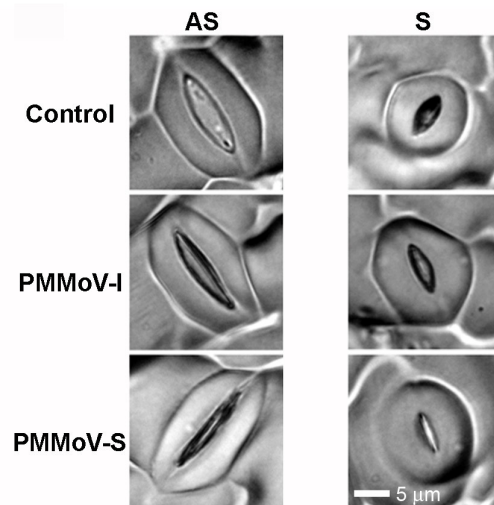
- Tonge, R., Shaw, J., Middleton, B., Rowlinson, R., Rayner, S., Young, J., Pognan, F., Hawkins, E., Currie, I. y Davidson, M. (2001) Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* 1: 377-396.
- Ünlü, M., Morgan, M.E. y Minden, J.S. (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18: 2071-2077.
- Valcke, R. (2003) Fluorescence imaging: the stethoscope of the plant physiologist. *Adv. Plant Physiol.* 6: 445-462.
- Van Der Straeten, D., Chaerle, L., Sharkov, G., Lambers, H. y Van Montagu, M. (1995) Salicylic acid enhances the activity of the alternative pathway of respiration in tobacco leaves and induces thermogenicity. *Planta* 196: 412-419.
- van Kooten, O., Meurs, C. y van Loon, L.C. (1990) Photosynthetic electron transport in tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol. Plantarum* 80: 446-452.
- van Wijk, K.J., Schnettger, B., Graf, H. y Krause, G.H. (1993) Photoinhibition and recovery in relation to heterogeneity of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1142: 59-68.
- van Wijk, K.J. (2001) Challenges and prospects of plant proteomics. *Plant Physiol.* 126: 501-508.
- van Wijk, K.J. (2004) Plastid proteomics. *Plant Physiol. Biochem.* 42: 963-977.
- Vranová, E., Inzé, d. y Van Breusegem, F. (2002) Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 53: 1227-1236.
- Wales, R., Nweman, B.J., Pappin, D. y Gray, J.C. (1989) The extrinsic 33 kDa polypeptide of the oxygen-evolving complex of photosystem II is a putative calcium-binding protein and is encoded by a multi-gene family in pea. *Plant Mol. Biol.* 12: 439-451.

- Walter, R.G. y Horton, P. (1991) Resolution of components of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in barley leaves. *Photosynth. Res.* 27: 121-133.
- Wardle, K. y Short, K.C. (1983) Stomatal response of *in vitro* cultured plantlets. I. Responses in epidermal strips of *Chrysanthemum* to environmental factors and growth regulators. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 178, 619–624.
- Wang, Y.B., Holroyd, G., Hetherington, A.M. y Ng, C.K.Y. (2004) Seeing 'cool' and 'hot'-infrared thermography as a tool for non-invasive, high-throughput screening of Arabidopsis guard cell signalling mutants. *J. Exp. Bot.* 55: 1187-1193.
- Weis, E., Meng, Q., Siebke, K., Lippert, K. y Esfeld, P. (1998) Topography of leaf carbon metabolism as analyzed by chlorophyll a-fluorescence. In *Photosynthesis: mechanisms and effects Vol 5*. Edited by G. Garab pp. 4259-4264. Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht.
- Wetter, C., Conti, M., Alschuh, D., Tabillion, R. y van Regemortel, M.H.V. (1984) Pepper mild mottle virus, a tobamovirus infecting pepper cultivars in Sicily. *Phytopathology* 74: 405-410.
- Whenham, R.J. y Fraser, R.S.S. (1981) Effect of systemic and local-lesion-forming strains of tobacco mosaic virus on abscisic acid concentration in tobacco leaves: consequences for the control of leaf growth. *Physiol. Plant Pathol.* 18: 267-278.
- Whenham, R.J., Fraser, R.S.S., Brown, L.P. y Payne, J.A. (1986) Tobacco-mosaic-virus-induced increase in abscisic-acid concentration in tobacco leaves: Intracellular location in light and dark-green areas, and relationship to symptom development. *Planta* 168: 592-598.
- Whitelegge, J.P. (2003) Thylakoid membrane proteomics. *Photosynth. Res.* 78: 265-277.

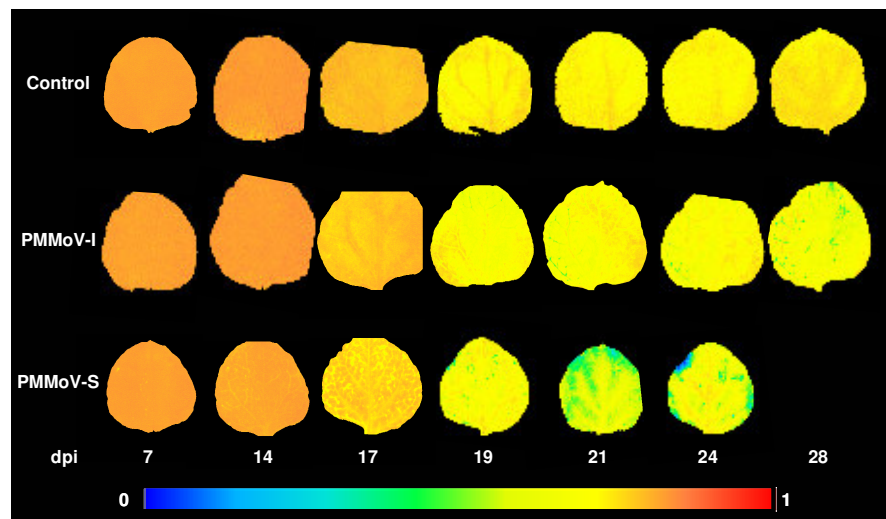
- Whitelegge, J.P. (2004) Mass spectrometry for high throughput quantitative proteomics in plant research: lesson from thylakoid membranes. *Plant Physiol. Bioch.* 42: 919-927.
- Whitelegge, J.P., Laganowsky, A., Nishio, J., Souda, P., Zhang, H.M. y Cramer, W.A. (2006) Sequencing covalente modifications of membrane proteins. *J. Exp. Bot.* 57: 1515-1522.
- Williams, K.L. y Hochstrasser, D.F. (1997) Proteome research: new frontiers in functional genomics. En: *Introduction to the Proteome*, Wilkins, M.R., Williams, K., Appel, R., y Hochstrasser, D., eds. Springer, Nueva York.
- Willmer, C.M., Wilson, A.B. y Jones, H.G. (1988) Changing responses of stomata to abscisic acid and carbon dioxide as leaves and plants age. *J. Exp. Bot.* 39: 401-410.
- Wilm, M. y Mann, M. (1996) Analytical properties of the nano-electrospray ion source. *Anal. Chem.* 68: 1-8.
- Wilson, K.A., McManus, M.T., Gordon, M.E. y Jordan, T.W. (2002) The proteomics of senescence in leaves of white clover, *Trifolium repens* L. *Proteomics* 2: 1114-1122.
- Wisniewski, M., Lindow, S.E. y Ashworth, E.N. (1997) Observations of ice nucleation and propagation in plants using infrared video thermography. *Plant Physiol.* 113: 327-334.
- Wolfbeis, O.S. (1985) Fluorescence of organic natural products. En: *Molecular luminescence spectroscopy: Methods and application. Part I*. Schulman SG (ed) John Wiley & Sons, New York, 167.
- Wright, D.P., Baldwin, B.C., Shephard, M.C. y Scholes, J.D. (1995a) Source-sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew. I. Alterations in carbohydrate metabolism. *Physiol Mol Plant Pathol* 47: 237-253.
- Wright, P.D., Baldwin, C.B., Shephard, C.M. y Scholes, J.D. (1995b) Source-sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew. II. Changes in the regulation of the Calvin cycle. *Physiol. Mol. Plant P.* 47: 255-267.

- Wulf, J.S., Herppich, W.B., Geyer, M. y Zude, M. (2003) Laser-induced fluorescence spectroscopy (LIFS) - a non-destructive method to detect tissue browning. *Acta Horticulturae* 1-2: 653-658.
- Yamada, S., Komori, T., Hashimoto, A., Kuwata, S., Imaseki, H. y Kubo, T. (2000) Differential expression of plastidic aldolase genes in *Nicotiana* plants under salt stress. *Plant Sci.* 54: 61-69.
- Yamamoto, Y., Tsuji, H. y Obokata, J. (1993) Structure and expression of a nuclear gene for the PSI-D subunit of photosystem I in *Nicotiana sylvestris*. *Plant. Mol. Biol.* 22: 985-994.
- Yan, S.-P., Zhang, Q.-Y., Tang, Z.-C., Su, W.-A y Sun, W.-N. (2006) Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. *Mol. Cell. Proteomics* 5: 484-496.
- Yi, X., Hargett, S.R., Frankel, L.K. y Bricker, T.M. (2006) The PsbQ protein is required in *Arabidopsis* for photosystem II assembly/stability and photoautotrophy under low light conditions. *J. Biol. Chem.* 281: 26260-26267.
- Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G.K., Li, S., Liu, B., Deng, Y., Dai, L., Zhou, Y., Zhan, X., Cao, M., Liu, J., Sun, J., Tang, J., Chen, Y., Huang, X., Lin, W., Ye, D., Tong, W., Cong, L., Geng, J., Han, Y., Li, L., Li, W., Hu, G., Huang, X., Li, W., Li, J., Liu, Z., Li, L., Liu, J., Qi, Q., Liu, J., Li, L., Li, T., Wang, W., Lu, H., Wu, T., Zhu, M., Ni, P., Han, H., Dong, W., Ren, X., Feng, X., Cui, P., Li, X., Wang, H., Xu, X., Zhai, W., Xu, Z., Zhang, J., He, S., Zhang, J., Xu, J., Zhang, K., Zheng, X., dong, J., Zeng, W., Tao, L., Ye, J., Tan, J., Ren, X., Chen, X., He, J., Liu, D., Tian, W., Tian, C., Xia, H., Bao, Q., Li, G., Gao, H., Cao, T., Wang, J., Zhao, W., Li, P., Chen, W., Wang, X., Zhang, Y., Hu, J., Wang, J., Liu, S., Yang, J., Zhang, G., Xiong, Y., Li, Z., Mao, L., Zhou, C., Zhu, Z., Chen, R., Hao, B., Zheng, W., Chen, s., Guo, W., Li, G., Liu, S., Tao, M., Wang, J., Zhu, L., Yuan, L. y Yang, H. (2002) A

- draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. spp. *Indica*). *Science* 296: 79-92.
- Žabka, M., Drastichová, K., Jegorov, A., Soukupová, J. y Nedbal, L. (2006) Direct evidence of plant-pathogenic activity of fungal metabolites of *Trichothecium roseum* on apple. *Mycopathologia* 162: 65-68.
- Zangerl, A.R., Hamilton, J.G., Miller, T.J., Crofts, A.R., Oxborough, K., Berenbaum, M.R. y de Lucia, E.H. (2002) Impact of folivory on photosynthesis is greater than the sum of its holes. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 22: 1088-1091.
- Zhou, Y.H., Peng, Y.H., Lei, J.L., Zou, L.Y., Zheng, J.H. y Yu, J.Q. (2004) Effects of potato virus Y^{NTN} infection on gas exchange and photosystem 2 function in leaves of *Solanum tuberosum* L. *Photosynthetica* 42: 417-423.
- Zhou, W., Eudes, F. y Laroche, A. (2006) Identification of differentially regulated proteins in response to a compatible interaction between the pathogen *Fusarium graminearum* and its host, *Triticum aestivum*. *Proteomics* 6: 4599-4609.
- Zivy, M. y de Vienne, D. (2000) Proteomics: a link between genomics, genetics and physiology. *Plant Mol. Biol.* 44: 575-580.
- Zolla, L., Rinalducci, S., Timperio, A.M. y Huber, C.V. (2004) Separation and identification of photosynthetic antenna membrane proteins by high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.* 10: 321-333.
- Zude, M. (2006) Detection of fruit tissue browning using laser-induced fluorescence spectroscopy. *Acta Horticulturae* 1-2: 85-90.



Anexo 1: Imágenes de microscopía óptica realizadas a partir de impresiones epidérmicas de hojas de *Nicotiana benthamiana*, que muestran el grado de apertura cada muestra.



Anexo 2: FV/FM de la hoja AS de *Nicotiana benthamiana* control e infectada con PMMoV a distintos tiempos post-infección.