

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)

ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDIN

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS



**FUNCIÓN DE LAS ESPECIES DE OXÍGENO Y NITRÓGENO
REACTIVO (ROS Y RNS) EN PLANTAS DE PIMIENTO
(*Capsicum annuum* L) DURANTE EL DESARROLLO Y EN
ESTRÉS POR BAJA TEMPERATURA**

**Role of reactive oxygen species and reactive nitrogen species
(ROS and RNS) in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants during
development and under low temperature stress**

Morad Airaki

TESIS DOCTORAL

Granada 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Morad Airaki
D.L.: GR 1713-2012
ISBN: 978-84-9028-059-1

**FUNCIÓN DE LAS ESPECIES DE OXÍGENO Y NITRÓGENO
REACTIVO (ROS Y RNS) EN PLANTAS DE PIMIENTO
(*Capsicum annuum* L) DURANTE EL DESARROLLO Y EN
ESTRÉS POR BAJA TEMPERATURA**

Memoria que presenta el Licenciado en Biología

Morad Airaki para optar al grado de **Doctorado Europeo**

Fdo. Morad Airaki

VºBº

LOS DIRECTORES DEL TRABAJO

Dr. Francisco Javier Corpas Aguirre
Investigador Científico del CSIC

Prof. José Manuel Palma Martínez
Profesor de Investigación del CSIC

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 (CSIC) de Granada, dentro del grupo de investigación de la Junta de Andalucía (BIO 192). Asimismo, ha sido financiado por un proyecto de Excelencia de la Junta de Andalucía (P06-CVI1820) y un proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación cofinanciado con fondos FEDER (BIO 2009-12003-C02-01).

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

+ IV Reunión de Biología Molecular de Plantas – Santiago de Compostela, 2-4 Julio, 2008:

- Título: Caracterización de los sistemas antioxidantes durante el desarrollo post-germinativo de plántulas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Autores: **Morad Airaki**, José M. Palma, Beatriz Sánchez-Calvo, Luis A. del Río, Francisco J. Corpas.

- Título: Expresión de las enzimas del ciclo antioxidante ascorbato-glutation en distintos órganos de plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Autores: Beatriz Sánchez-Calvo, **Morad Airaki**, José M. Palma, Luis A. del Río, Francisco J. Corpas.

+ Plant ROS meeting – Helsinki (Finland), July 8-10, 2009:

- Title: Analysis of Reactive Oxygen and Nitrogen Species (ROS and RNS) during germination and development in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). Authors: **Morad Airaki**, Beatriz Sánchez-Calvo, Raquel Valderrama, Mounira Chaki, Juan C. Bergara, Juan B. Barroso, Luis A del Río, José M. Palma, Francisco J. Corpas.

- Title: Metabolism of Reactive Nitrogen and Oxygen Species (RNS and ROS) in pepper plants (*Capsicum annuum* L.) under low temperature. Authors: **Morad Airaki**, Marina Leterrier, Juan B. Barroso, Luis A. del Río, José M. Palma, Francisco J. Corpas.

+ XVIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (SEFV), XI Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal – Zaragoza, 8-11 Septiembre, 2009:

Título: Metabolismo de ROS y RNS en plántulas de pimiento durante la germinación y en condiciones de estrés ambiental. Autores: **Morad Airaki**, Marina Leterrier, Beatriz Sáchez-Calvo, Raquel Valderrama, Mounira Chaki, Juan C. Bergara, Juan B. Barroso, Luis A. del Río, José M. Palma, Francisco J. Corpas.

+ International Symposium on the Pathophysiology of Reactive Oxygen and Nitrogen Species – Salamanca (Spain), May 19-21, 2010:

Title: Cold stress triggers RNS and ROS metabolism in pepper plants. Authors: **Morad Airaki**, Marina Leterrier, Mounira Chaki, Raquel Valderrama, Juan B. Barroso, Luis A. del Río, José M. Palma, Francisco J. Corpas.

+ XIII Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias (SUB) – Uruguay, 28-30 Mayo, 2010:

Título: Análisis diferencial del óxido nítrico (NO) y de sistemas antioxidantes en los distintos órganos de plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). Autores: Beatriz Sánchez-Calvo, **Morad Airaki**, Marina Leterrier, Juan B. Barroso, José M. Palma, Luis A. del Río, Francisco J. Corpas.

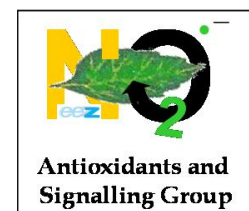
+ 3rd Plant NO Club International Meeting – Olomouc (Czech Republic), July 15-16, 2010:

- Title: Low temperature induces nitrosative and oxidative stress in pepper plants. Authors: **Morad Airaki**, Marina Leterrier, Mounira Chaki, Raquel Valderrama, Juan B. Barroso, Luis A. del Río, José M. Palma, Francisco J. Corpas.

Parte de los resultados de estas tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Airaki M, Leterrier M, Mateos RM, Valderrama R, Chaki M, Barroso JB, Del Río LA, Palma JM, Corpas FJ (2011) Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annum* L.) plants under low temperature stress. *Plant, Cell and Environment* doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02310.x.

Airaki M, Sánchez-Moreno L, Leterrier M, Barroso JB, Palma JM, Corpas FJ (2011) Detection and Quantification of S-Nitrosoglutathione (GSNO) in Pepper (*Capsicum annum* L.) Plant Organs by LC-ES/MS. *Plant and Cell Physiology* 52: 2006-2015.



Durante estos últimos años inmersos en la elaboración de este trabajo, he conocido, convivido y trabajado con muchas personas que han colaborado de una forma u otra en la realización de esta tesis Doctoral, además de recibir mucho apoyo y cariño. A todas ellas mis más sinceros agradecimientos.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis: el Prof. José Manuel Palma Martínez, por su confianza, orientación científica, además de sus consejos y buen humor. Al Dr. Francisco Javier Corpas Aguirre por su confianza, orientación científica y por su continuo aporte de ideas. Gracias a los dos por darme la oportunidad de llegar hasta este punto y apoyarme en todo momento.

Al Prof. Luis Alfonso del Río Legazpi, jefe del grupo de investigación, gracias por haber confiado en mí para formar parte de este grupo. A la Dra. Luisa María Sandalio, y a la Dra. María del Carmen Romero Puertas gracias por vuestra compañía durante estos años. Al Dr. Eduardo López Huertas, gracias por haberme acogido en tu laboratorio en estos últimos meses. A la Dra. Marina Leterrier, gracias por tu apoyo científico y por tu cariño.

A toda la gente del laboratorio: Mari Pepa por su preocupación de madre; Carmelo por su buen humor; Marichu mi compañera de laboratorio; Tamara mi otra compañera de laboratorio en estos últimos meses; Paz por su amistad y por estar siempre apoyándome y dándome ánimos; Dianita y Domi por los buenos momentos que pasamos juntos durante los primeros dos años; Elena por su amabilidad; Bea, Nieves y Daniel por todos los momentos graciosos que vivimos juntos; María Rodríguez por su apoyo y su amistad incondicional; Ana y Javi por compartir tantas cosas y por su amistad; Angus y Pablo por su amistad y buen humor, DK por su gracia, a los vecinos Isabel, Olivier, Pilar, Kees, Andrés, Mariam. Gracias a toda la gente que ha pasado por el laboratorio: Inma, Antonio, Alejandro, Santiago, Simeón, Álvaro, Pablo, Silvia, Lili y el pequeño David, gracias por los buenos momentos.

A todo el grupo de la unidad asociada de Jaén; A los Drs, Juan Bautista Barroso y Alfonso Carreras, por su ayuda, por los viajes a Jaén y por su agradable compañía; A Raquel, Mounira, Juan Carlos y Bea, gracias por vuestra ayuda, y por vuestra amabilidad. A Nieves de los servicios técnicos de la Universidad de Jaén. A Lourdes y

Rafa del servicio de Instrumentación de la Estación Experimental del Zaidín. Gracias por vuestra disposición y paciencia.

Como no, agradecerles a todos mis amigos y compañeros, por haber estado siempre ahí, y por tantos buenos momentos. Sin vosotros esto no hubiera sido igual. A Nieves, David, Fran y Raquel, gracias por todo, no cambiéis nunca, sin vosotros los pasillos del departamento de Bioquímica no hubieran sido iguales. Nieves, aun estando lejos siempre estarás con nosotros. A Quina, Raúl, Mamen, Manolo, Ana, Mary Carmen, José Carlos, gracias por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos. Al resto de amigos y compañeros, os agradezco a todos vuestra amistad.

A las "Maris": Nuria, Isa, Irene, Nadia y Miriam, gracias por todos los momentos agradables, por las risas, las cenas, las fiestas, San German... Aunque la mayoría de vosotras ya no está por Granada siempre estaréis en mi corazón.

A Luismi, aunque ya no estás entre nosotros, gracias por todos los buenos momentos que pasamos entre todos, siempre nos acordaremos de ti, y siempre te llevaremos en nuestros corazones. Descansa en paz amigo.

Gracias a Clara y Chema, por ofrecerme su hogar y hacerme sentir como si estuviera en casa, y considerarme como un miembro de vuestra pequeña familia, y gracias Chema por tus platos tan ricos e elaborados. Mil gracias.

A Fernando, Valle, Guada, Carmel, Vero y Carmen, fuisteis las primeras personas que conocí cuando llegué a Granada, y a lo largo de todos estos años habéis estado ahí apoyándome y ofreciéndome vuestra amistad. Gracias por todo y que sepáis que os llevaré siempre en mi corazón.

A Mercedes, Antonio, Pablo, Oihana, Alex, Dani, Cris, María, Nahia, Mónica, Mustafá, Elena, gracias a todos por los momentos agradables que hemos pasado juntos y que habéis hecho que mi estancia en Granada sea amena.

A todo el personal de la EEZ, por la disposición y ayuda de Rosa Clares y Loles, por la buena energía y alegría de Marisol. A Pedro por su simpatía y sus charlas sobre fútbol, a los informáticos Javier y César por su ayuda, qué haríamos sin ellos. A todos gracias.

A Pepe, gracias por estar ahí en esta última etapa apoyándome, aguantándome, animándome en los momentos de bajón y hacerme ver las cosas en positivo. Gracias por tu paciencia y tu comprensión y tus consejos.

Durante esta larga estancia en la EEZ, adquirí bastantes conocimientos científicos, pero también aprendí, sobre la vida, las relaciones, y sobre todo el valor de la familia y de los amigos. Por esta razón doy las gracias a toda mi familia. A mis hermanos y hermanas: Karima, Fouad, Amine, Imane y Hanae, que a pesar de estar lejos nunca dejaron de apoyarme y de animarme durante todos estos años. A mis sobrinos, Ahmed Reda y Mohamed (Simo). A mis cuñados Tarik y Hamid. Agradecer a mi cuñada Jill y a su familia el buen tratamiento que me ofrecieron en Chicago. A mis tíos y tías, con especial mención de mis tíos Halim y Latif que siempre me han apoyado. A mis abuelos maternos, aunque nunca entendieron qué estoy haciendo, pero nunca dudaron en darme ánimos y desearme lo mejor.

Y por supuesto a mis padres, esas dos personas que encontré a mi lado desde que abrí los ojos, y siguen estando ahí, dándome todo, apoyo moral y económico y siempre orgullosos de mí. Sin vosotros jamás hubiera estado aquí, todo en la vida os lo debo a vosotros. No existen palabras suficientes para expresar mi agradecimiento. Gracias, gracias y mil gracias.

A mis padres

Abreviaturas

$^1\text{O}_2$: Oxígeno en estado singlete

O_2^- : Radical superóxido

ABA: Ácido abscísico

ADH: Alcohol deshidrogenasa

AG: Aminoguanidina

APF: Fluoróforo 3'-(paminophenyl)-fluoresceína

APX: Ascorbato peroxidasa

ASC: Ascorbato

BSA: Albúmina sérica bovina

CaCl_2 : Clorura de calcio

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

CAT: Catalasa

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

cPTIO: 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-oxido

CuZn-SOD: Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc

Cy: Citosólica

Cys: Cisteína

DAF-2: 4,5-Diaminofluoresceína

DAF-FM DA: 4-aminometil-2',7'-difluorofluoresceína diacetato

DEPC: dietilpirocarbonato

DFMO: DL- α -cloruro de difluorometilornitina hidratado

DHA: Deshidroascorbato

DHAR: Deshidroascorbato reductasa

DHE: Dihidroetidio

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxinucleótido trifosfato

DPI: Diphenyleneiodonium

DTNB: Ácido 5,5'-Dithiobis 2-nitrobenzoico

DTT: 1,4-Ditioltreitol

EDRF: Factor relajante derivado del endotelio

EDTA: Ácido etilén-diamino-tetraacético

EM: Enzima málico dependiente de NADP

FAD: Flavín adenina dinucleótido

Fe-SOD: Superóxido dismutasa dependiente de hierro

FMN: Flavín mononucleótido

G6PDH: Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP

GR: Glutación reductasa

GSH: Glutación reducido (γ -glutamil-L-cisteina-glicina oxidado)

GSNO: S-nitrosoglutación

GSNOR: S-nitrosoglutación reductasa

GSSG: Glutación oxidado

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

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

HO: Radical hidroxilo

ICDH: Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP

IgG: Inmunoglobulina G

IPTG: 1-isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

KCl: Cloruro de potasio

KCN: Cianuro de potasio

L-arg: L-arginina

LB: Medio de cultivo de Luria-Bertani

LC-ES/MS: Cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas de ionización por electrospray

L-NAME: N^G-nitro-L-Arg metil ester

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

MDA: Malondialdehído

MDAR: Monodeshidroascorbato reductasa

MgCl₂: Cloruro de magnesio

Mn-SOD: Superóxido dismutasa dependiente de manganeso

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

NaCl: Cloruro de sodio

NADH: Nicotinamín adenina dinucleótido reducido

NADP: Nicotinamín adenina dinucleótido fosfato oxidado

NADPH: Nicotinamín adenina dinucleótido fosfato reducido

NBT: Azul de nitrotetrazolio

NEM: N-etilmaleimida

NOS: Óxido nítrico sintasa

NOX: NADPH oxidasa

NR: Nitrato reductasa

ONOO⁻: Peroxinitrito

PBS: Tampón fosfato salino

PCD: Muerte celular programada

pCMS: p-cloromercurifenilsulfónico

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PF: Peso fresco

PMSF: Fluoruro de fenil metil sulfonilo

PVDF: Difluoruro de polivinilo

PVPP: Polivinil polipirrolidona

RNA: Ácido ribonucleico

RNS: Especies de nitrógeno reactivo

RONs: Especies de oxígeno y nitrógeno reactivo

ROS: Especies de oxígeno reactivo

SA: Ácido salicílico

SDS: Dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

S-GAL: 3,4-ciclohexenoesculetina- β -D-galactopiranosido

SNOs: S-nitrosotiol

SNP: Nitroprusiato de sodio

SOD: Superóxido dismutasa

TBS: Tampón tris Sali

TCA: Ácido tricloroacético

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametil-etilén-diamina

Tris: Tris-hidroximetilaminometano

ÍNDICE

RESUMEN/SUMMARY -----	1
INTRODUCCIÓN/INTRODUCTION -----	5
1. El pimiento: historia y características-----	7
2. Cultivo del pimiento y características nutricionales-----	10
3. Metabolismo de especies de oxígeno reactivo-----	15
3.1. Especies de oxígeno reactivo (ROS) -----	14
3.2. Antioxidantes enzimáticos-----	18
3.2.1. Superóxido dismutasas-----	19
3.2.2. Catalasa-----	20
3.2.3. Enzimas del ciclo ascorbato-glutati3n-----	21
Ascorbato reductasa-----	22
Monodeshidroascorbato reductasa-----	23
Deshidroascorbato reductasa-----	24
Glutati3n reductasa-----	25
3.2.4. Deshidrogenasas dependientes de NADP-----	26
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa-----	26
Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP-----	27
Enzima málico dependiente de NADP-----	27
3.3. Antioxidantes no enzimáticos-----	28
3.3.1. Ácido asc3rbico (vitamina C) -----	28
3.3.2. Glutati3n-----	32
3.3.3. Carotenoides-----	34
3.3.4. Flavonoides-----	34
3.4. Estr3s oxidativo-----	35
Estr3s abi3tico-----	36
Estr3s Bi3tico-----	37

4. Metabolismo de especies de nitrógeno reactivo-----	38
4.1. El óxido nítrico-----	38
4.2. Sistemas generadores de NO-----	38
4.3. Especies de nitrógeno reactivo (RNS) -----	43
4.4. Estrés nitrosativo-----	46
5. ROS y RNS en condiciones de estrés medioambiental-----	47
5.1. Salinidad-----	48
5.2. Estrés hídrico-----	50
5.3. Daño mecánico-----	50
5.4. Radiación UV-----	51
5.6. Ozono-----	51
5.7. Metales pesados-----	52
5.8. Alta iluminación-----	53
5.8. Alta temperatura-----	54
5.9. Baja temperatura-----	55
OBJETIVOS/OBJECTIVES-----	57
MATERIAL Y MÉTODOS/MATERIALS AND METHODS-----	61
1. Material vegetal y condiciones de cultivo-----	63
2. Preparación de extractos crudos para ensayos bioquímicos-----	64
3. Determinación de actividades enzimáticas-----	65
3.1. Superóxido dismutasa-----	65
3.2. NADPH oxidasa-----	65
3.3. Catalasa-----	66
3.4. Ascorbato peroxidasa-----	66
3.5. Glutación reductasa-----	66
3.6. Monodeshidroascorbato reductasa-----	67
3.7. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa-----	67

3.8. 6-Fosfogluconato deshidrogenasa-----	68
3.9. Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP-----	68
3.10. Enzima málico dependiente de NADP-----	68
3.11. Nitrosoglutation reductasa-----	68
4. Otras determinaciones bioquímicas-----	69
4.1. Contenido de ascorbato-----	69
4.2. Contenido de glutatión-----	70
4.3. Peróxido de hidrógeno-----	70
4.4. Detección de óxido nítrico por espectrofluorimetría-----	71
4.5. Peroxidación lipídica-----	72
4.6. Concentración de proteínas-----	72
5. Electroforesis en geles de poliacrilamida (EGPA) -----	73
5.1. EGPA en condiciones nativas-----	73
5.2. EGPA en condiciones desnaturalizantes (EGPA-SDS) -----	73
5.3. Tinción de geles con azul Coomassie-----	74
5.4. Tinción con plata-----	74
6. Transferencia e inmunodetección de proteínas	
(Técnica de Western) -----	75
6.1. Transferencia de proteínas-----	75
6.2. Inmunodetección de proteínas por quimioluminiscencia-----	75
7. Microscopía láser confocal (CLSM) -----	76
7.1. Detección histoquímica de óxido nítrico-----	76
7.2. Detección histoquímica de peroxinitrito-----	77
7.3. Detección histoquímica de S-nitrosotioles totales (SNOs) -----	78
7.4. Detección histoquímica del anión superóxido-----	79
8. Extracción y análisis electroforético del RNA-----	79
8.1. Extracción de RNA total-----	79

8.2. Electroforesis en geles de agarosa-----	80
9. Síntesis de cDNA y PCR semicuantitativa-----	80
9.1. Obtención de cDNA por transcripción inversa (RT) -----	80
9.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) -----	81
9.3. PCR semicuantitativa-----	81
10. Diseño y síntesis de oligonucleótidos para la obtención del cDNA parcial de la <i>S</i> -nitrosoglutation reductasa-----	83
11. Transformación y aislamiento de plásmidos recombinantes-----	85
11.1. Purificación de fragmentos de cDNA y ligación en vectores de clonación-----	86
11.2. Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> -----	86
11.3. Transformación de bacterias competentes-----	86
11.4. Aislamiento de plásmidos recombinantes-----	87
12. Análisis estadístico-----	87
RESULTADOS/RESULTS-----	89
1. Metabolismo de ROS y RNS durante el desarrollo post-germinativo de plántulas de pimiento-----	91
1.1. Metabolismo de especies de oxígeno reactivo-----	91
1.1.1. Antioxidantes no enzimáticos-----	91
1.1.2. Antioxidantes enzimáticos-----	92
1.1.2.1. Superóxido dismutasa-----	92
1.1.2.2. Catalasa-----	92
1.1.2.3. Enzimas del ciclo ascorbato-glutation-----	94
1.1.2.4. Deshidrogenasas dependientes de NADP-----	94
1.1.3. Expresión de mRNA de genes antioxidantes-----	95
1.2. Metabolismo de especies de nitrógeno reactivo-----	99
1.2.1. Contenido en NO-----	99

1.2.2. S-nitrosoglutation reductasa-----	100
1.2.3. Nitración de proteínas-----	100
1.2.4. Detección de NO, O ₂ ⁻ y ONOO ⁻ mediante CLSM-----	104
1.2.4.1. Raíz-----	104
1.2.4.2. Tallo-----	105
1.2.4.3. Hoja-----	105
2. Efecto de la baja temperatura sobre las plantas de pimiento-----	109
2.1. Efecto de la baja temperatura sobre el fenotipo-----	109
2.2. Efecto de la baja temperatura sobre el metabolismo de ROS-----	109
2.2.1. Antioxidantes no enzimáticos-----	109
2.2.2. Antioxidantes enzimáticos-----	110
2.2.2.1. Superóxido dismutasa-----	110
2.2.2.2. Catalasa-----	110
2.2.2.3. Enzimas del ciclo ascorbato-glutation-----	111
2.2.2.4. Deshidrogenasas dependientes de NADP-----	112
2.2.3. Expresión de mRNA de genes antioxidantes-----	112
2.2.4. NADPH oxidasa-----	115
2.2.5. Peróxido de hidrógeno-----	115
2.2.6. Peroxidación lipídica-----	116
2.3. Efecto de la baja temperatura sobre el metabolismo de RNS-----	117
2.3.1. Contenido en NO-----	118
2.3.2. Fuentes de óxido nítrico-----	119
2.3.3. S-nitrosoglutation reductasa-----	119
2.3.4. Nitración de proteínas-----	120
2.3.5. Detección de NO, ONOO ⁻ y SNOs mediante CLSM-----	121
2.4. Aclimatación al frío-----	123
3. Detección y cuantificación de S-nitrosoglutation en órganos de plantas	

de pimiento mediante cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas de ionización por electrospray-----	125
3.1. Análisis y validación del método LC-ES/MS-----	125
3.2. Análisis por LC-ES/MS del contenido de GSH, GSSG y GSNO en los distintos órganos de plantas de pimiento -----	126
3.3. Metabolismo de GSNO en los distintos órganos de plantas de pimiento-----	127
DISCUSIÓN/DISCUSSION-----	135
1. Función de las ROS y sistemas antioxidantes en el desarrollo de las plantas de pimiento-----	137
2. Función de las RNS en el desarrollo de plantas de pimiento-----	141
3. La baja temperatura induce los sistemas antioxidantes y perturba la homeostasis redox en hojas de pimiento-----	144
4. Las deshidrogenasas generadoras de NADPH están implicadas en el mecanismo de respuesta a baja temperatura-----	147
5. La baja temperatura afecta la homeostasis de NO-----	148
6. La baja temperatura provoca estrés oxidativo y nitrosativo-----	149
7. El estrés por frío y la aclimatación al mismo implica la homeostasis del estado redox-----	150
8. Identificación y cuantificación de GSNO en plantas superiores-----	151
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS-----	155
BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES-----	159
PAPER I-----	203
PAPER II-----	221

RESUMEN
SUMMARY

Función de las especies de oxígeno y nitrógeno reactivo (ROS y RNS) en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) durante el desarrollo y en estrés por baja temperatura

El pimiento, miembro de la familia de las Solanáceas, es un cultivo muy importante ya que su fruto es el segundo producto hortícola más consumido en el mundo y una excelente fuente de nutrientes esenciales para humanos, especialmente vitamina C, β -caroteno y calcio. Esta Tesis Doctoral se ha centrado en el análisis del metabolismo de los antioxidantes y la homeostasis de las especies de oxígeno y nitrógeno reactivo (ROS y RNS, respectivamente) en distintos estadios de desarrollo (7, 10, 14 y 90 días) de plantas de pimiento sanas, y bajo un estrés ambiental como es la baja temperatura (LT). Así, durante el desarrollo de plantas de pimiento el metabolismo del óxido nítrico (NO), las ROS y las deshidrogenasas dependientes de NADP estaban moduladas diferencialmente dependiendo del estadio y los órganos analizados (raíces, tallos, hojas, y frutos) indicando una regulación espacial y temporal. Por otra parte, se demostró que el estrés por frío causa un desequilibrio en las enzimas antioxidantes y una bajada en el contenido de NO acompañado por un aumento en la peroxidación lipídica y la nitración de tirosina, indicando la inducción de un estrés nitro-oxidativo. Por último, durante el progreso de estos estudios se prestó una especial atención al metabolismo del S-nitroglutación (GSNO) ya que afecta al estado redox celular. Por lo tanto, se estableció un nuevo método analítico mediante cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas de ionización por electrospray (LC-ES/MS) que ha permitido detectar y cuantificar GSNO, además del glutatión en sus dos formas reducida y oxidada (GSH y GSSG, respectivamente) en tejidos vegetales. Como principal contribución de este trabajo, se puede indicar que esta es la primera vez que se ha acometido el estudio del metabolismo de ROS y RNS en plantas de pimiento, y por consiguiente se ha propuesto una función para estas especies durante el desarrollo y bajo condiciones de estrés por baja temperatura.

Role of reactive oxygen species and reactive nitrogen species (ROS and RNS) in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants during development and under low temperature stress

Pepper (*Capsicum annuum* L.), a member of the Solanaceae family, is a very important crop since its fruit is the second worldwide consumable produce and excellent source of many essential nutrients for humans, especially vitamin C, β -carotene and calcium. This PhD research project has focused on the analysis of the antioxidant metabolism and homeostasis of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS, respectively) during natural growth at different developmental stages (7, 10, 14 and 90 days) of healthy pepper plants, and under a specific environmental stress, low temperature (LT). Thus, during the development of pepper plants the metabolism of nitric oxide (NO), ROS and NADP-dehydrogenases were differentially modulated depending on the stage and the organs analyzed (roots, stems, leaves, and fruits) indicating a spatial and temporal regulation. On the other hand, it is demonstrated that cold stress causes an imbalance of antioxidative enzymes and a decrease in the NO content which is accompanied by a rise in lipid peroxidation and tyrosine nitration, indicating the induction of a nitro-oxidative stress. Finally, during the progress of these studies a special attention has been paid to the metabolism of S-nitrosoglutathione (GSNO) because it may affect the redox status on plant cells and tissues. Accordingly, it was set up a new method by combination of liquid chromatography–electrospray/mass spectrometry (LC-ES/MS) to detect and quantify GSNO as well as the reduced and oxidized glutathione forms (GSH and GSSG, respectively). As the main contribution of this work, it can be indicated that this is the first time that the metabolism of both ROS and RNS has been accomplished in pepper plants, and consequently a role for these species during development and under LT stress conditions has been postulated.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCTION

1. EL PIMIENTO: HISTORIA Y CARACTERÍSTICAS

El origen del pimiento es incierto, aunque se sitúa en el continente americano, probablemente en la zona de Bolivia y Perú. Esta planta era desconocida en el Viejo Mundo hasta que Cristóbal Colón la introdujera en España después de su primer viaje a América, y desde allí se distribuyó a Europa y al resto del mundo en colaboración con los portugueses. La palabra “capsicum” con la que se denomina a la especie proviene de su homónimo del latín “capsicum” (caja), por la forma peculiar de sus frutos. Su cultivo en España comenzó a realizarse en el siglo XVI. Posteriormente se extendió a Italia y desde ese país pasó a Francia para distribuirse, como se dijo anteriormente, al resto del mundo. La introducción del pimiento en Europa supuso un avance importante en las costumbres culinarias debido a que se empleaba como complemento de una especia muy popular, la pimienta negra. De hecho, llegó incluso a sustituirla. Su consumo en Europa data de hace varios siglos. Sin embargo, las variedades de pimientos grandes, suaves y poco picantes que se consumen en la actualidad se consiguieron a principios del siglo XX gracias a los cultivos intensivos.

Capsicum annuum L. pertenece a la familia de las solanáceas. Es una herbácea perenne, con ciclo de cultivo anual de porte variable entre los 0,5 m (en determinadas variedades de cultivo al aire libre) y más de 2 m (gran parte de los híbridos cultivados en invernaderos). El sistema radicular es pivotante y profundo dependiendo de la profundidad y textura del suelo, con numerosas raíces adventicias que horizontalmente pueden alcanzar una longitud comprendida entre 50 cm y 1 m. El tallo principal es de crecimiento limitado y erecto. A partir de cierta altura (“cruz”) emite 2 ó 3 ramificaciones (dependiendo de la variedad) y continúa ramificándose de forma dicotómica hasta el final de su ciclo en que los tallos secundarios se bifurcan después de brotar varias hojas, y así sucesivamente.

La hoja es entera, lampiña y lanceolada, con un ápice muy pronunciado (acuminado) y un pecíolo largo y poco aparente. El haz es glabro (liso y suave al tacto) y de color verde más o menos intenso dependiendo de la variedad, y brillante. El nervio principal parte de la base de la hoja, como una prolongación del pecíolo, del mismo modo que las nerviaciones secundarias que son pronunciadas y llegan casi al borde de la hoja. La inserción de las hojas en el tallo tiene lugar de forma alterna y su tamaño es

variable en función de la variedad, existiendo cierta correlación entre el tamaño de la hoja adulta y el peso medio del fruto (Fig. 1.1A). Las flores aparecen solitarias en cada nudo del tallo, con inserción en las axilas de las hojas. Son pequeñas y constan de una corola blanca (Fig. 1.1B). La polinización es autógama, aunque puede presentarse un porcentaje de alogamia que no supera el 10%. El fruto es una baya hueca, semicartilaginosa y deprimida, de color variable (verde, rojo, amarillo, naranja, violeta o blanco); por lo general, los frutos van pasando del color verde al anaranjado, al amarillo y al rojo a medida que van madurando. Su tamaño es variable, pudiendo pesar desde escasos gramos hasta más de 500 gr (Fig. 1.1C). Las semillas se encuentran insertas en una placenta cónica de disposición central. Son redondeadas, ligeramente reniformes, de color amarillo pálido y longitud variable entre 3 y 5 mm. (www.infoagro.com/hortalizas/pimiento.htm).

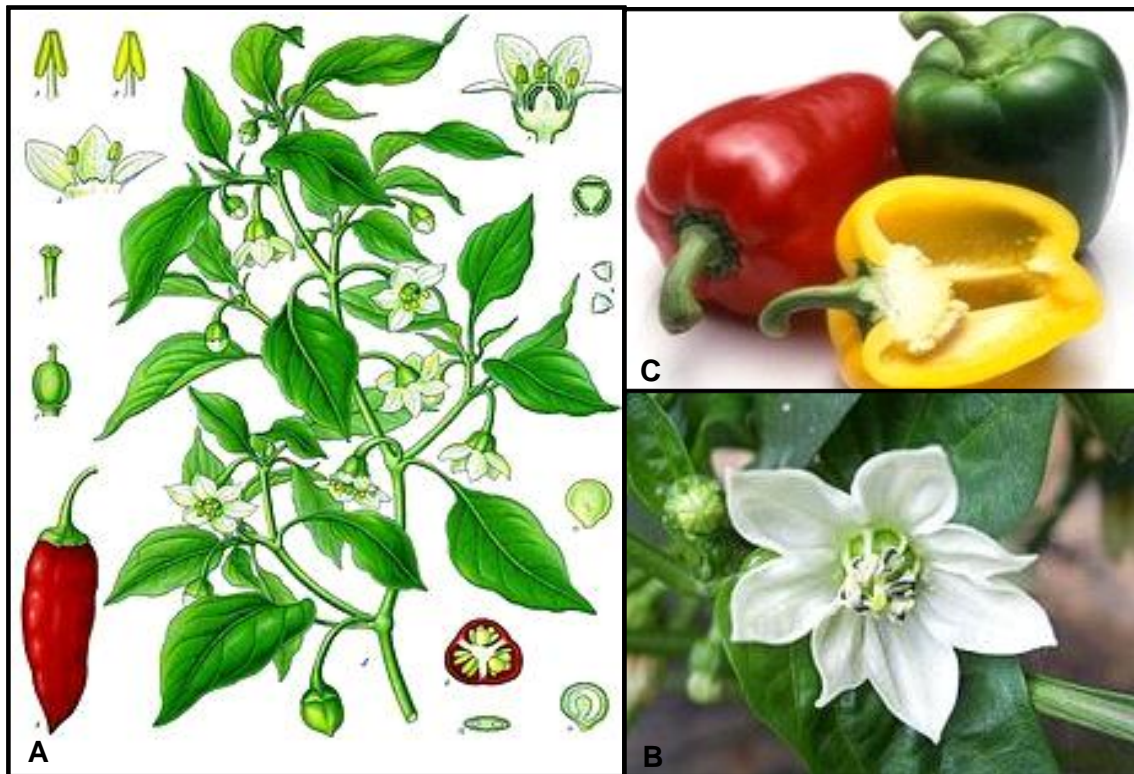


Fig. 1.1. Características del pimiento. (A) Dibujo mostrando las distintas partes de la planta de pimiento. (B) Flor de la planta de pimiento. (C) Frutos de pimiento.

Pueden considerarse tres grupos varietales de plantas de pimiento:

- 1) variedades dulces que son las que se cultivan actualmente en los invernaderos. Presentan frutos de gran tamaño para consumo en fresco e industria conservera;
- 2) variedades de sabor picante que son muy cultivadas en Sudamérica, y suelen ser variedades de fruto largo y delgado. La capsaicina es el componente responsable del sabor amargo o picante de los frutos de la familia *Capsicum*, y se encuentra en los tabiques divisorios, placenta y en las semillas;
- 3) variedades para la obtención de pimentón que son un subgrupo de las variedades dulces.

Dentro de las variedades de fruto dulce se pueden diferenciar tres tipos de pimientos:

Tipo California: son frutos cortos (7-10 cm), anchos (6-9 cm), con tres o cuatro cascotes bien marcados, con el cáliz y la base del pedúnculo por debajo o a nivel de los hombros y de carne más o menos gruesa (3-7 mm) (Fig. 1.2A). Son los cultivares más exigentes en temperatura, por lo que la plantación se realiza temprano (desde mediados de mayo a comienzos de agosto, dependiendo de la climatología de la zona), para alargar el ciclo productivo y evitar problemas de cuajado con el descenso excesivo de las temperaturas nocturnas.

Tipo Lamuyo: son frutos largos y cuadrados de carne gruesa. Los cultivares pertenecientes a este tipo suelen ser más vigorosos, de mayor porte y entrenudos más largos, y menos sensibles al frío que los de tipo California, por lo que es frecuente cultivarlos en ciclos más tardíos (Fig. 1.2B).

Tipo Italiano: frutos alargados, estrechos, acabados en punta, de carne fina, más tolerantes al frío, que se cultivan normalmente en ciclo único, con plantación tardía en septiembre u octubre y recolección entre diciembre y mayo, dando producciones de 6-7 kg.m⁻² (Fig. 1.2C).



Fig. 1.2. Tipos de frutos de pimiento según su forma: California (A), Lamuyo (B) y Dulce Italiano (C).

2. CULTIVO DEL PIMIENTO Y CARACTERÍSTICAS NUTRICIONALES

Para el cultivo de pimiento, es necesaria una temperatura ambiente media de 20°C, sin demasiados cambios bruscos y con una tasa de humedad no demasiado alta (50-70%), ya que humedades relativas muy elevadas favorecen el desarrollo de enfermedades aéreas y dificultan la fecundación. La coincidencia de altas temperaturas y baja humedad relativa puede ocasionar la caída de flores y de frutos recién cuajados. También requiere gran cantidad de luz, sobre todo durante el primer periodo de crecimiento, después de la germinación y durante la floración. El suelo ideal son los que poseen buen drenaje, con presencia de arenas y materia orgánica. Todos estos requerimientos hacen que sean cultivados en invernaderos, donde el manejo de las condiciones ambientales es más controlable.

La coincidencia de bajas temperaturas durante el desarrollo del botón floral (entre 15 y 10°C) da lugar a la formación de flores con alguna de las siguientes anomalías: pétalos curvados y sin desarrollar, formación de múltiples ovarios que pueden evolucionar a frutos distribuidos alrededor del principal, acortamiento de estambres y de pistilo, engrosamiento de ovario y pistilo, fusión de anteras, etc. Las bajas temperaturas también inducen la formación de frutos de menor tamaño, que pueden presentar deformaciones, reducen la viabilidad del polen y favorecen la formación de frutos partenocárpico. Las altas temperaturas provocan la caída de flores y frutitos.

La importancia económica del pimiento se debe a que se trata del segundo producto hortícola más consumido en todo el mundo después del tomate. Por ello, este fruto es de gran importancia agronómica, nutricional y comercial. Posiblemente debido

a su triple destino de consumo, pimiento fresco, para pimentón y para conserva, este producto ha alcanzado un gran valor comercial, principalmente en España, donde el cultivo del pimiento ha crecido espectacularmente y ha tenido como consecuencia el desarrollo del cultivo en invernaderos en todo nuestro litoral mediterráneo (Tabla 1.1). España es uno de los principales productores europeos de pimiento y sus principales zonas de cultivo son Almería y Murcia. De la producción española total dos terceras partes van destinadas al mercado nacional, mientras que el resto es exportado a otros países europeos.

El principal componente del pimiento es el **agua**, con bajos contenidos de hidratos de carbono, lo que hace que sea una hortaliza con un bajo aporte calórico. Es una buena fuente de fibra y, al igual que el resto de verduras, su contenido proteico es muy bajo y apenas aporta grasas. En cuanto a su contenido en vitaminas, los pimientos son muy ricos en **vitamina C**, sobre todo los de color rojo. De hecho, llegan a contener más del doble de la que se encuentra en frutas como la naranja o las fresas. Son buena fuente de carotenos, entre los que se encuentra la capsantina, pigmentos con propiedades antioxidantes que aportan el característico color rojo/amarillo/naranja a los frutos. También es destacable su contenido de **provitamina A** (β -caroteno) que el organismo transforma en vitamina A conforme lo necesita, folatos y de vitamina E (Howard et al., 2000; Navarro, et al., 2006). En menor cantidad están presentes otras vitaminas del grupo B como la B₆, B₃, B₂ y B₁. Su contenido en las citadas vitaminas C y E, junto con los carotenos, convierten al pimiento en una importante fuente de antioxidantes, sustancias beneficiosas para la salud (Tabla 1.2). La **vitamina C**, además de ser un potente antioxidante, interviene en la formación de colágeno, glóbulos rojos, huesos y dientes, al tiempo que favorece la absorción del hierro de los alimentos y aumenta la resistencia frente a las infecciones. La **vitamina A** es esencial para la visión, el buen estado de la piel, el cabello, las mucosas, los huesos y para el buen funcionamiento del sistema inmunológico. Los folatos intervienen en la producción de glóbulos rojos y blancos, en la síntesis de material genético y en la formación de anticuerpos del sistema inmunológico. Entre los **minerales**, cabe destacar la presencia de **potasio**. En menor proporción están presentes el magnesio, el fósforo y el calcio.

Tabla 1.1. Principales países productores de pimiento en el mundo durante el año 2002. Fuente: F.A.O.

Países	Producción pimientos frescos año 2002 (toneladas)
China	10.533.584
México	1.733.900
Turquía	1.500.000
España	989.600
Estados Unidos	885.630
Nigeria	715.000
Indonesia	550.000
Egipto	386.687
República de Corea	380.000
Italia	380.000
Países Bajos	290.000
Túnez	244.000
Bulgaria	205.000
Rumania	185.000
Marruecos	180.000
Argelia	175.000
Japón	159.300
Serbia	135.100
Ucrania	125.000
Argentina	121.000
Grecia	110.000
Hungría	100.000
Rep. Islámica de Irán	100.000
Israel	99.970
Chile	62.000

El calcio de los pimientos no se asimila apenas en relación con los lácteos u otros alimentos que se consideran muy buena fuente de este mineral. El potasio es necesario para la transmisión del impulso nervioso, la actividad muscular y regula el balance de agua dentro y fuera de la célula. El **magnesio** se relaciona con el funcionamiento del intestino, nervios y músculos, forma parte de huesos y dientes, mejora la inmunidad y posee un suave efecto laxante. El **fósforo** juega un papel importante en la formación de huesos y dientes, al igual que el magnesio y el calcio. (<http://propiedadesalimentos.jaimaalkauzar.es/propiedades-nutritivas-del-pimiento.html>).

Los frutos son clasificados generalmente en dos grupos: climatéricos, como son los tomates y los plátanos que muestran un aumento en la biosíntesis de etileno y un incremento de la respiración durante la maduración, mientras que los frutos no climatéricos como son las fresas y las uvas no muestran ningún aumento ni en la respiración celular ni en la biosíntesis de etileno. El pimiento se considera una especie no climatérica (Saltveit, 1977; Lurie et al., 1986) y tiene muchas variedades que se diferencian en la forma, el color y el sabor, entre otras características. La piel del pimiento es lisa y brillante y puede presentar varios colores. Generalmente, los pimientos son verdes cuando son inmaduros, y viran a rojos cuando maduros; sin embargo, en los últimos años, se obtuvieron nuevos cultivares con frutos maduros mostrando otros colores, como el amarillo, naranja, púrpura o marrón. A nivel molecular la información de los factores que controlan los cambios metabólicos importantes que ocurren durante la maduración en especies parecidas al pimiento es aún escasa. Durante la maduración de los frutos de pimiento, hay un desmantelamiento del aparato fotosintético junto con un incremento de la síntesis de carotenoides, la conversión de cloroplastos en cromoplastos y alteraciones en el metabolismo oxidativo de los peroxisomas del fruto (Camara et al., 1995, Mateos et al., 2003).

Durante la senescencia del fruto tiene lugar un proceso oxidativo propiciado por especies de oxígeno reactivo (ROS), de manera que las estructuras celulares y algunas enzimas son degradadas junto a un aumento de la peroxidación lipídica (Jiménez et al., 2003), lo cual es uno de las principales causas del deterioro de la calidad de los alimentos, lo que conduce a la aparición de sabores y aromas desagradables y la destrucción de vitaminas. La interacción entre las ROS y las proteínas es compleja, y la

formación de grupos carbonilo, producto de esta interacción, es considerada como una modificación irreversible, siendo un marcador de estrés oxidativo (Referencias de Leshem; Moller et al., 2004). En este contexto, la función de la barrera antioxidante celular es prevenir la expansión de las reacciones de oxidación, eliminando las ROS. En los últimos años, varios estudios demostraron la implicación de los antioxidantes en la fisiología del fruto, incluyendo respuestas a nivel de la mitocondria, peroxisomas y cloroplastos durante la maduración del pimiento y durante el almacenamiento del fruto a 20°C (Jiménez et al., 2002; Mateos et al., 2003; Martí et al., 2009).

Tabla 1.2 Composición de los pimientos por cada 100 g de material fresco. Fuente:

<http://www.botanical-online.com/pimimientos.htm>

Componentes	Pimiento verde	Pimiento rojo
Agua	91,1 g.	92,1 g
Energía	113 Kcal	113 Kcal
Grasa	0,19 g	0,19 g
Proteína	0,89 g	0,89 g
Hidratos de carbono	6,43 g	6,43 g
Fibra	1,8 g	2,0 g
Potasio	177 mg	177 mg
Fósforo	19 mg	19 mg
Magnesio	10 mg	10 mg
Calcio	9 mg	9 mg
Vitamina C	89,3 mg	190 mg
Vitamina B ₂	0,03 mg	0,03 mg
Vitamina B ₆	0,248 mg	0,248 mg
Vitamina A	632 IU	5700 IU
Vitamina E	0,69 mg	0,69 mg

3. METABOLISMO DE ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVO

3.1. Especies de oxígeno reactivo (ROS)

Desde la introducción del oxígeno molecular en nuestra atmósfera por las cianobacterias capaces de realizar la fotosíntesis hace 2700 millones de años, las especies de oxígeno reactivo (ROS, por sus siglas en inglés - Reactive Oxygen Species) han sido las acompañantes incómodas de la vida aeróbica.

La necesidad que tienen los organismos aerobios por el oxígeno eclipsa el hecho de que puede ser un gas tóxico y mutagénico; más aún, estos mismos organismos sobreviven ya que han desarrollado mecanismos antioxidantes muy eficientes (Halliwell, 2006; Halliwell & Gutteridge, 2007).

El término especies de oxígeno reactivo se refiere, tanto a los radicales libres del oxígeno, como son el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), el hidroxilo ($\cdot OH$) y el peróxilo, como a otras moléculas que no son radicales, como el oxígeno singlete (1O_2) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Un radical libre es cualquier molécula que contiene uno o más electrones desapareados y que compensa este exceso electrónico captando nuevos electrones hasta completar el orbital en el que se encuentra. Los radicales libres pueden formarse a través de numerosos mecanismos, entre los cuales se incluye la adición de un electrón a un no-radical. El oxígeno molecular en estado basal triplete es un radical; ya que no tiene completamente apareados sus electrones. Sus dos electrones tienen el mismo número cuántico de spin, es decir, sus spins son paralelos; de aquí su gran capacidad para reaccionar con la mayoría de las moléculas que no son radicales (Halliwell, 2006; Halliwell & Gutteridge, 2007). Sin embargo, este estado basal del oxígeno puede convertirse en diferentes ROS, ya sea por transferencia de energía o de electrones. Por transferencia de energía se forma el oxígeno singlete, y por transferencia de electrones el resultado es la reducción secuencial a radicales superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Fig. 1.3).

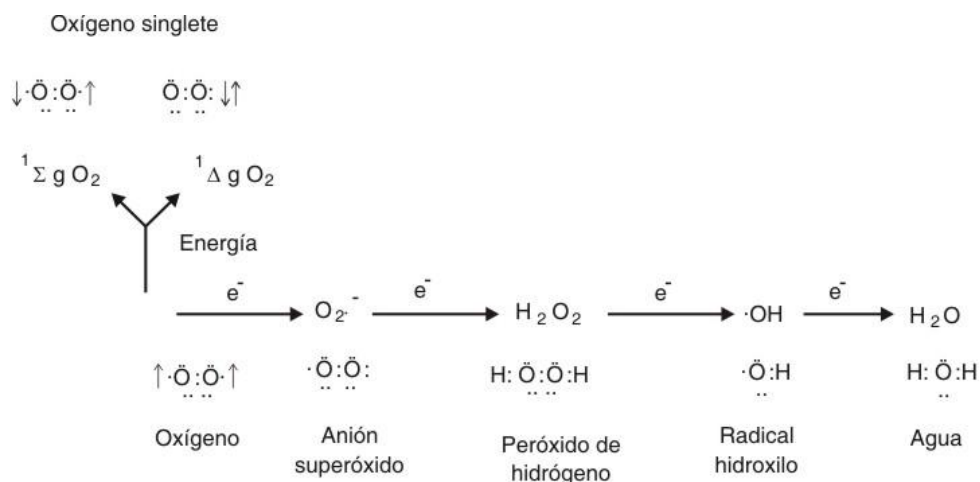


Fig. 1.3. Formación de las especies de oxígeno reactivo.

Las ROS que se producen en mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas (Apel and Hirt, 2004) durante los procesos de respiración y fotosíntesis bajo condiciones fisiológicas normales, y que se incrementan cuando la planta está expuesta a un medioambiente desfavorable (Gill and Tuteja, 2010), son eliminadas a través de una serie de complejos mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos localizados en diferentes compartimentos celulares (Alscher et al., 1997; Perl-Treves y Perl, 2002). Cuando el equilibrio entre la producción y la eliminación de ROS es perturbado se produce lo que se conoce como estrés oxidativo que provoca daño en membranas, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares llevando finalmente a la muerte celular o a la aparición de lesiones necróticas (Doke, 1997; Foyer and Noctor, 2005). El equilibrio entre producción y eliminación de las ROS puede ser obstaculizado por diferentes situaciones ambientales, estreses abióticos tales como sequía, bajas temperaturas, salinidad, metales pesados, contaminantes o herbicidas entre otros; como resultado, los niveles de ROS pueden elevarse rápidamente (Prasad et al., 1994; Dat et al., 2000; Sandalio et al., 2001; Romero-Puertas et al., 2004; Chaki et al., 2010, 2011). Esta alteración del equilibrio entre ROS y sistemas antioxidantes lleva a un incremento brusco de los niveles intracelulares de ROS, produciéndose un estrés oxidativo que puede provocar daños importantes en la estructura de las células.

Desde hace algunos años, se ha empezado a reconocer que las ROS tienen un papel importante en los procesos de señalización en plantas, y que controlan procesos fundamentales en las plantas, tales como el crecimiento, el desarrollo, la respuesta a estímulos medio-ambientales y la muerte celular programada (Apel and Hirt, 2004;

Bailey-Serres and Mittler, 2006; Gill and Tuteja, 2010). Por tanto, y debido a esa doble función de las ROS, las plantas necesitan, al menos, dos mecanismos diferentes para regular sus concentraciones intracelulares: uno que permita una modulación fina de los niveles bajos de ROS con finalidad relacionadas con la señalización y otro que permita la detoxificación de excesos de ROS, especialmente bajo condiciones de estrés (Mittler, 2002).

Las ROS juegan un papel central en la defensa de la planta frente a patógenos. Durante esta respuesta, las ROS son producidas en la planta por un incremento de la actividad de la enzima NADPH oxidasa unida a membrana plasmática, la peroxidasa unida a la pared celular y a las aminas oxidasas del apoplasto (Grant and Loake, 2000; Hammond-Kosack and Jones, 2000). A diferencia del superóxido, el H_2O_2 puede difundir al interior de las células y activar los genes de defensas de las plantas, incluyendo la muerte celular programada (PCD). La inducción de la PCD limita la expansión de la enfermedad desde el punto de infección. Durante las reacciones incompatibles, cuando un patógeno es detectado y las respuestas de defensa, incluyendo la PCD, son inducidas, la producción de H_2O_2 ocurre de manera bifásica. La acumulación muy rápida inicial es seguida de una producción secundaria prolongada de H_2O_2 . Durante las interacciones compatibles, cuando el patógeno infecta sistemáticamente a la planta hospedadora, sólo se produce el primer pico de producción de H_2O_2 (Apel and Hirt, 2004).

Una de las causas de la toxicidad biológica del H_2O_2 proviene de su capacidad para oxidar a los grupos $-SH$, la cual puede incrementarse en presencia de catalizadores metálicos por las reacciones del tipo Fenton o Haber-Weiss y provoca la inactivación de algunas enzimas (Gill and Tuteja, 2010; Dat et al., 2000). En presencia de radicales $O_2^{\cdot -}$ y de metales de transición como Fe^{3+} o Cu^{2+} , el H_2O_2 puede dar lugar a la formación de los radicales $\cdot OH$, mediante la reacción de Haber-Weiss (Halliwell and Gutteridge, 2007). El H_2O_2 juega un doble papel en las plantas: a bajas concentraciones puede actuar como molécula señal implicada en activar la señalización de aclimatación en la tolerancia a distintos estreses bióticos y abióticos y, a altas concentraciones conduce a la muerte celular programada (Quan et al., 2008).

En plantas, la producción del anión superóxido se realiza a través de la enzima NADPH oxidasa localizada en la membrana plasmática de las células o mediante la acción de la xantina oxidasa en la matriz peroxisomal y de la cadena de transporte electrónico dependiente de NADH en la membrana peroxisomal (del río et al., 1992, 1996; López-Huertas et al., 1996). La acción oxidante directa de esta molécula sobre biomoléculas es una de las causas de sus efectos tóxicos, pero como este radical no puede atravesar las membranas biológicas, sus efectos tóxicos se deben fundamentalmente a su capacidad para reducirse generando radicales hidroxilo o radicales peróxido de hidrógeno por dismutación, con o sin necesidad de catálisis enzimática.

El radical hidroxilo es el derivado de oxígeno reactivo más tóxico que se produce, tiene una vida media de nanosegundos y precisamente debido a su corta existencia ha sido difícil estudiarlo con detalle. El radical hidroxilo provoca la abstracción de una molécula de hidrógeno (H) de una molécula orgánica (RH) formando un radical orgánico (R \cdot) que reacciona con O $_2$ para formar el radical peroxilo (ROO \cdot), éste a su vez puede reaccionar con una segunda molécula orgánica para formar un hidroperóxido (ROOH) y un nuevo radical orgánico que continuará la cadena de reacciones (Nappi and Vass, 1998). Además, reacciona con la mayoría de los compuestos presentes en los sistemas biológicos provocando daño oxidativo en proteínas y en ácidos nucleicos, así como la rotura de las cadenas de estos últimos (Packer and Glazer, 1990; Halliwell and Gutteridge, 2000).

3.2. Antioxidantes enzimáticos

Su función es prevenir la iniciación de las oxidaciones en cadena, al eliminar las especies de oxígeno reactivo parcialmente reducidas (O $_2^{\cdot-}$ y H $_2$ O $_2$) (Halliwell and Gutteridge, 2007). A nivel subcelular, los antioxidantes enzimáticos están presentes en distintos orgánulos cerca de los lugares de producción de ROS para prevenir el daño oxidativo en ellos (Dhaunsi et al., 1993). Las principales enzimas con propiedades antioxidantes son la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, las enzimas del ciclo ascorbato-glutation como la ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR), monodeshidroascorbato reductasa y la deshidroascorbato reductasa (DHAR). Recientemente se está considerando las deshidrogenasas dependientes de NADP $^+$,

implicadas en la generación de NADPH, como enzimas antioxidantes, ya que soportan el buen funcionamiento del ciclo ascorbato-glutation (Valderrama et al., 2006).

3.2.1. Superóxido dismutasas (SODs, EC 1.15.1.1)

La actividad superóxido dismutasa (SOD) fue descubierta por primera vez por McCord y Fridovich en 1969, son las principales antioxidantes enzimáticas presentes en células procarióticas y eucarióticas, y son las primeras en la defensa contra los efectos tóxicos del radical superóxido producido en los diferentes compartimentos celulares (Fridovich, 1986; Halliwell and Gutteridge, 2000). Las SODs son metaloproteínas que catalizan la dismutación del anión superóxido hasta peróxido de hidrógeno y oxígeno y todos los organismos aeróbicos y en algunos anaeróbicos (Hassan, 1986) (fig. 1.4):



Fig. 1.4. Reacción catalizada por la superóxido dismutasa

Las SODs son generalmente clasificadas en tres grupos según el grupo prostético metálico ligado a la enzima: CuZn-, Fe-, y Mn- SODs. En plantas, el número, el tipo, y la localización de las isoenzimas de SOD varían dependiendo de la especie vegetal, de la etapa de desarrollo y de las condiciones medioambientales. Así, las CuZn-SODs se encuentran generalmente en cloroplastos (Salin, 1988, Wingsle et al., 1991; Ogawa et al., 1995) y en el citosol (Bowler et al., 1994), también en peroxisomas y apoplastos (Sandalio and del Río, 1987; Bueno et al., 1995; Ogawa et al., 1996; Corpas et al., 1998b; Corpas et al., 2006a). Las Fe-SODs se encuentran en cloroplastos (Bowler et al., 1994) y peroxisomas (Droillard and Paulin, 1990). Las Mn-SODs se encuentran en mitocondria (Bowler et al., 1994; del Río et al., 2003), y en peroxisomas (del Río et al., 1983; del Río et al., 2003; Sandalio and del Río, 1987; Corpas et al., 1998b; Corpas et al., 2006a). Entre estas SODs, la Mn-SOD es la única forma que se mostró ser esencial para la supervivencia de la vida aeróbica (Carlioz and Touati, 1986).

Las Cu/Zn-SODs son unas proteínas dimericas que presentan un átomo de Cu y otro de Zn en cada subunidad. Es la más abundante en plantas superiores y se localiza en citosol, cloroplasto, peroxisoma, núcleo y apoplasto (Sandalio and del Río, 1988;

Kanematsu and Asada, 1991; Ogawa et al., 1997; Sandalio et al., 1997; Corpas et al., 1998b, 2006a; del Río et al., 2002a). No obstante, en cotiledones de girasol se han identificado cuatro isoformas en la mitocondria y al menos una isoforma en peroxisomas (Corpas et al., 1998b). Además, se ha descrito que la Cu/Zn-SOD cataliza la descomposición de S-nitrosotioles de bajo peso molecular generando óxido nítrico (Jourdh'euil et al., 1999; Jonson et al., 2001).

Las Mn-SODs son unas proteínas homotetraméricas que han sido caracterizadas en una serie de organismos incluyendo bacterias, algas, hongos y animales (Bannister et al., 1987), y también en algunas plantas superiores (Sevilla et al., 1980a, 1980b, 1982; Fernández et al., 1982; Baum and Scandalios, 1981; Steller et al., 1994; Kröniger et al., 1995; Palma et al., 1998; Rodríguez-Serrano et al., 2007; Fernández-Ocaña et al., 2011). En células eucariotas, la Mn-SOD se localiza principalmente en la mitocondria (Fridovich, 1995; Halliwell and Gutteridge, 2007) pero también se ha descrito que en hojas de guisante, en pétalos de clavel y cotiledones de sandía y pepino, además de ubicarse en este orgánulo, también se localiza en el peroxisoma (del Río et al., 1983; Sandalio et al., 1987; Corpas et al., 1998a; Palma et al., 1998; Rodríguez-Serrano et al., 2007).

Las Fe-SODs son proteínas homodiméricas, probablemente es la isoforma más antigua, y se ha encontrado en células procarióticas y en plantas. Se ha aislado a partir de *Euglena gracilis* (Kanematsu and Asada, 1979) y de plantas superiores (Bridges and Salin, 1981). Esta isoenzima se localiza principalmente en cloroplastos (Asada, 1994) y peroxisomas (Droillard and Paulin, 1990).

3.2.2. Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6)

Es una enzima hemínica que cataliza la descomposición del H₂O₂ con una molécula de H₂O₂ que es reducida a agua, mientras que la otra es oxidada a O₂ (fig. 1.5):

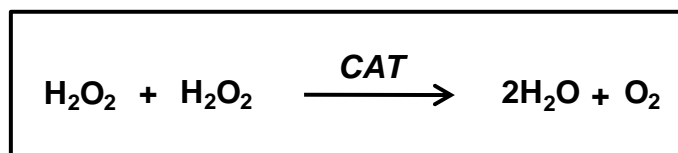


Fig. 1.5. Reacción catalizada por la catalasa.

Esta reacción se encuentra favorecida por concentraciones elevadas de H_2O_2 (Chance et al., 1997). Sin embargo, la catalasa también es capaz de llevar a cabo ciertas reacciones peroxidásicas a pH básico, en presencia de H_2O_2 , actuando sobre algunos alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos como sustratos (AH_2) (Halliwell and Gutteridge, 2007). La mayoría de los organismos anaerobios no contienen catalasa. La catalasa previene la difusión de H_2O_2 a otros compartimentos celulares. Son numerosos los estudios que han puesto de manifiesto que la catalasa es una enzima esencial en el mecanismo de defensa frente a distintos tipos de estrés (Willekens et al., 1997; Scandalios, 2005), y se han descrito diferentes isoformas de catalasa en plantas (Eising et al., 1990; Havir et al., 1996; Corpas et al., 1999). La actividad catalasa se encuentra localizada de forma exclusiva en peroxisomas, por lo que se utiliza habitualmente como marcador de estos orgánulos celulares (del Río et al., 2006).

3.2.3. Enzimas del ciclo ascorbato-glutación

El ciclo ascorbato-glutación, también denominado ciclo de Foyer-Halliwell-Asada, es un sistema antioxidante exclusivo de plantas y muy importante para la eliminación de H_2O_2 , especialmente en compartimentos celulares donde se produce este metabolito y no existe catalasa como son los cloroplastos y citosol (Doulis et al., 1998; Halliwell & Gutteridge, 2007). En este ciclo participan los antioxidantes no enzimáticos ascorbato y glutación, NADPH como poder reductor, y cuatro enzimas: la ascorbato peroxidasa (APX), la monodeshidroascorbato reductasa (MDAR), la deshidroascorbato reductasa (DHAR) y la glutación reductasa (GR) (Halliwell & Foyer, 1976; Asada & Badger, 1984; Foyer et al., 1997; del Río et al., 2002b) (Fig. 1.6).

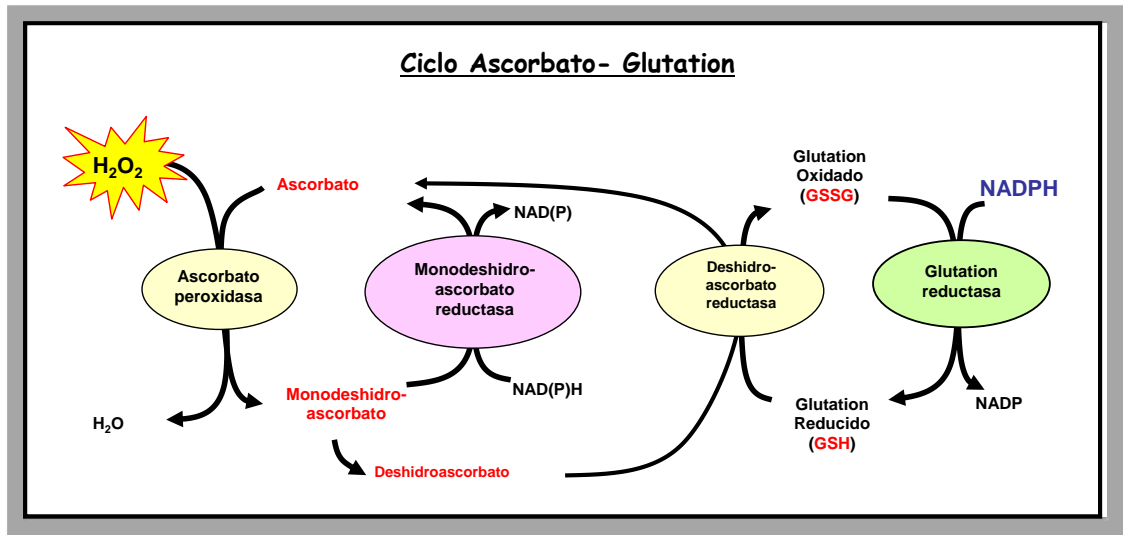
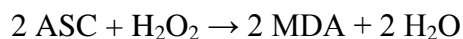


Fig. 1.6. Reducción de H₂O₂ por el ciclo ascorbato-glutation o de Foyer-Halliwell-Asada

Las enzimas de este ciclo se han descrito en cloroplastos, citosol, mitocondrias y peroxisomas (Halliwell and Foyer, 1976; Foyer and Halliwell, 1977; Jiménez et al., 1997; Foyer et al., 1997; Corpas et al., 2001; del Río et al., 2002a; Mittova et al., 2002; 2003a). La exposición a estrés oxidativo frecuentemente conduce al incremento de uno o más de los componentes del ciclo, aunque las localizaciones subcelulares de los cambios observados no han sido con frecuencia identificadas. Por ello, el ciclo ascorbato-glutation ha sido descrito como un componente importante de los mecanismos de defensa antioxidante de las células vegetales que confieren resistencia frente al estrés (Doulis et al., 1998).

Ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11)

La ascorbato peroxidasa es una peroxidasa hemínica que lleva a cabo la primera reacción del ciclo ascorbato-glutation, al reducir el H₂O₂ a H₂O empleando ascorbato como sustrato reductor, el cual se oxida a monodeshidroascorbato (MDA), según la reacción:



Esta enzima juega un papel fundamental en la eliminación de H₂O₂ en las plantas y está presente en el estroma (sAPX) y en los tilacoides (tAPX) dentro del cloroplasto, en el citosol (cAPX), mitocondrias y peroxisomas (Chen and Asada, 1989; Miyake & Asada, 1992; Bunkelmann & Trelease, 1996; Jiménez et al., 1997; Foyer et

al., 1997; Ishikawa et al., 1998; López-Huertas et al., 1999; Shigeoka et al., 2002). Las APXs son enzimas fundamentalmente monoméricas, de 30-40 kDa de masa molecular (Tanaka et al., 1991; Ishikawa et al., 1996; Morimura et al., 1996), aunque también se han descrito algunas formas diméricas (Mittler & Zilinskas, 1991). Las APXs cloroplastídicas de algunas plantas superiores como la espinaca, tabaco y calabaza están codificados por un único gen, y sus mRNAs se generan mediante *splicing* (ajuste) alternativo de dos exones del extremo 3' de gen (Ishikawa et al., 1997). Contrariamente, en *Arabidopsis* y arroz existen dos genes distintos que codifican la APX estromática y tilacoidal de forma independiente (Teixeira et al., 2006).

Ha sido ampliamente descrito que la expresión de APX se incrementa bajo condiciones de sobreproducción de H₂O₂, como las inducidas por estrés biótico o abiótico, lo que puede indicar que variaciones en la producción de H₂O₂ también regulan la APX (De Gara et al., 1997; Dat et al., 2000). Asimismo, se ha descrito un papel regulador para el ascorbato en la actividad APX durante la diferenciación celular, y bajo condiciones experimentales de déficit o enriquecimiento de ascorbato (De Gara et al., 1997). Además, el control de la expresión de los genes que codifican las APXs es sensible a diversos estímulos como el estrés provocado por agua, salinidad, altas temperaturas, congelación, ataque por patógenos, tratamiento con peróxido de hidrógeno y ácido abscísico (Zhang et al., 1997; Mittler et al., 1998; Yoshimura et al., 2000; Agrawal et al., 2003; Menezes- Benavente et al., 2004a; 2004b; Teixeira et al., 2006). También, la expresión de las distintas isoformas de APX puede variar de un tejido a otro (Teixeira et al., 2006).

Monodeshidroascorbato reductasa (MDAR; EC 1.6.5.4)

La MDAR cataliza la reducción de MDA a ascorbato usando NAD(P)H como donador de electrones (Asada & Takahashi, 1987). La MDAR es una enzima que contiene FAD y es la única que usa un radical orgánico como sustrato. También se ha descrito que reduce los radicales fenoxilo (Sakihama et al., 2000). La actividad MDAR está ampliamente distribuida en plantas superiores, pero también se ha descrito en *Euglena* (Shigeoka et al., 1987), *Neurospora crassa* (Munkres et al., 1984) y eritrocitos humanos (Goldenberg et al., 1983).

En plantas, la MDAR se localiza en diversos compartimentos celulares como cloroplastos (Hossain et al., 1984a; Sano et al., 2005), citosol y mitocondrias (Jiménez et al., 1997; Mittova et al., 2003b), glioxisomas (Bowditch & Donaldson, 1990) y peroxisomas de hojas (Jiménez et al., 1997; López-Huertas et al., 1999; Mittova et al., 2003b; Leterrier et al., 2005). La MDAR ha sido purificada hasta homogeneidad en frutos de pepino (Hossain & Asada, 1985) y nódulos de raíz de soja (Dalton et al., 1992), y su cDNA ha sido aislado en un número considerable de especies (Sano & Asada, 1994; Murthy & Zilinskas, 1994; Grantz et al., 1995; Leterrier et al., 2005). Recientemente, se ha descrito que *Arabidopsis* tiene 5 genes de MDAR y uno de ellos presenta múltiples puntos de transcripción lo cual permite dirigir la enzima a cloroplastos, mitocondrias (Obara et al., 2002; Chew et al., 2003) o peroxisomas (Lisenbee et al., 2005).

En cloroplastos, la MDAR puede tener dos funciones fisiológicas, la regeneración del ascorbato a partir del monodeshidroascorbato, y mediar en la fotorreducción del oxígeno a radical superóxido cuando el sustrato MAD está ausente (Miyake et al., 1998). En mitocondrias la posible función de la MDAR no está aún clara. En peroxisomas, la MDAR está localizada tanto en la matriz como en la membrana y sufre cambios de expresión frente a determinados estreses medioambientales indicando su implicación en los procesos de defensa (Leterrier et al., 2005).

Deshidroascorbato reductasa (DAR; EC 1.8.5.1)

La DAR cataliza la reducción divalente del deshidroascorbato (DHA) a ascorbato (ASC) empleando para ello glutatión reducido (GSH) (Hossain & Asada, 1984a; Villalba et al., 1995). Es una enzima poco caracterizada, debido a su baja estabilidad (Foyer & Halliwell, 1977; Trumper et al., 1994), lo que, unido a su escasa afinidad por su sustrato (Minetti et al., 1992), ha llevado a sugerir que la DAR *in vivo* no parece ser fundamental en el mantenimiento del ascorbato en su forma reducida. La DAR se ha purificado a partir de hojas de espinaca y se sabe que es un monómero de unos 23 kDa (Hossain & Asada, 1984b; Foyer & Halliwell, 1977). También se ha purificado la enzima de tallos de guisante (Jablonski & Anderson, 1981), tubérculos de patata (Dipierro & Borraccino, 1991) y de una monocotiledónea como el arroz (Kato et al.,

1997). Además se ha descrito la clonación y caracterización del gen que codifica la DAR en esta última especie vegetal (Urano et al., 2000) y en *Arabidopsis* (Creissen et al., 2001).

Glutación reductasa (GR; EC 1.6.4.2)

La GR es una flavoproteína que cataliza la reducción del glutati6n oxidado (GSSG) a glutati6n reducido (GSH), utilizando NADPH como donador de electrones. Es una prote6na dim6rica con FAD en el centro activo de cada subunidad (Halliwell & Gutteridge, 2007). Esta actividad enzimática se encuentra ampliamente distribuida en eucariotas y procariotas, implicándose en procesos metab6licos vitales para la c6lula y siendo crucial para el mantenimiento de su capacidad antioxidante (Meister & Anderson, 1983; Creissen et al., 1994). La GR se ha purificado y caracterizado en numerosas especies y tejidos vegetales (Guy & Carter, 1984; Wingsle, 1989; Anderson et al., 1990; Asada, 1994 Romero-Puertas et al., 2006), siendo las GRs m6s estudiadas las de guisante, particularmente, las isoformas localizadas en cloroplastos, citosol, mitocondrias y peroxisomas (Kalt-Torres et al., 1984; Bielawski & Joy, 1986; Edwards et al., 1990; Madamanchi et al., 1992; Creissen et al., 1995; Stevens et al., 1997; 2000; Rudhe et al., 2004; Romero-Puertas et al., 2006). Sin embargo, fue en 1997 cuando se evidenci6 por primera vez la localizaci6n de actividad GR en peroxisomas (Jim6nez et al., 1997). La forma nativa de la mayor6a de las GRs es un homod6mero de unos 100-120 kDa, y el tama6o de su subunidad est6 en un rango de 53-59 kDa (Wingsle, 1989; Edwards et al., 1990; Anderson et al., 1990; Madamanchi et al., 1992; Romero-Puertas et al., 2006).

La GR es una enzima importante en la protecci6n de la planta frente a diferentes tipos de estr6s que implican estr6s oxidativo, tales como los producidos por herbicidas, contaminantes atmosf6ricos, bajas temperaturas, estr6s fotooxidativo y estr6s h6drico (Rennenberg, 1982; Smith et al., 1989; Foyer et al., 1991; Mullineaux et al., 1994; Navari-Izzo and Izzo, 1994; Lascano et al., 1998; Schulz and Hartling, 2001; Schutzendubel & Polle, 2002; Gechev et al., 2003; Romero-Puertas et al., 2006).

En cuanto a las propiedades moleculares de las GRs de guisante, se concluye que hay dos tipos de cDNAs, uno que codifica a la forma citos6lica y otro que genera las isoformas resultantes de un procesamiento post-trascripci6n a partir de un 6nico

gen y que dirige a las GRs al resto de orgánulos. De hecho, la GR de guisante fue la primera proteína descrita en plantas con una doble secuencia señal, codificada por un único gen, para su importación en cloroplastos o mitocondrias (Creissen et al., 1995; Stvens et al., 1997; Cleary et al., 2002; Rudhe et al., 2002; 2004; Chew et al., 2003).

3.2.4. Deshidrogenasas dependientes de NADP

Al ciclo ascorbato-glutation habría que sumar las actividades de una serie de enzimas que suministran el poder reductor (NADPH), tanto en animales como en plantas, siendo alguna de ellas perteneciente a la llamada ruta oxidativa de las pentosas fosfato. La primera enzima implicada en esta ruta es la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH; EC 1.1.1.49), seguida de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH; EC 1.1.1.44). La G6PDH se ha localizado en el citosol, cloroplastos y peroxisomas (Corpas et al., 1998), y ha sido purificada, caracterizada y clonada en tubérculos de patata (Graeve et al., 1994). La velocidad a la que esta ruta trabaja depende del suministro de NADP⁺ a la primera enzima, proporcionado, entre otras, por la GR, que oxida el NADPH y disminuye la relación NADPH/NADP⁺ (Halliwell & Gutteridge, 2007). Además, el enzima málico (EM) y la isocitrato deshidrogenasa (ICDH) también aportan poder reductor. En cloroplastos existe una fuente adicional de NADPH que es la ferredoxina NADP reductasa del fotosistema I, y que suele ser la que mayormente contribuye al contenido celular de NADPH.

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH; EC 1.1.1.49)

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa es la primera enzima implicada en la ruta de las pentosas fosfato, y cataliza la oxidación de glucosa 6-fosfato hasta 6-fosfogluconato reduciendo NADP a NADPH. Estudios recientes han demostrado que la G6PDH juega un papel clave en la protección frente al estrés oxidativo en bacterias, levaduras y humanos, debido a que el NADPH generado mantiene los niveles adecuados de glutatión reducido necesarios para combatir el estrés oxidativo y mantener el medio reductor en la célula (Pandolfi et al., 1995; Juhnke et al., 1996; Miki et al., 1996; Moradas-Ferreira et al., 1996; Slekar et al., 1996; Valderrama et al., 2007). Hay evidencias que apoyan la idea de que la G6PDH es una enzima antioxidante que puede ser incluida en el grupo de la catalasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa y

glutación reductasa/peroxidasa (Martini and Ursini, 1996) puesto que el NADPH generado se utiliza para mantener el glutatión intracelular en su estado reducido (GSH).

En plantas superiores, se han identificado varias isoformas de G6PDH, localizadas en el citosol, en el cloroplasto y en peroxisomas (Heber *et al.*, 1967; Schnarrenberger *et al.*, 1973; Corpas *et al.*, 1998a; Wakao and Benning, 2005). La isoforma citosólica representa aproximadamente 90% de la actividad total en muchas especies/órganos (Debnam and Emes, 1999). Se ha demostrado que altas concentraciones de NADPH son capaces de inhibir tanto la isoforma cloroplastídica (Lendzian and Bassham, 1975) como la citosólica (Fickenscher and Scheibe, 1986).

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

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

La NADP-ICDH- es una proteína dimérica que se ha localizado en células procariotas y en diferentes compartimentos de eucarióticas como citosol, mitocondrias y peroxisomas (Illingworth & Tipton, 1970; González-Villasenor & Powers, 1986; Haselbeck & McAlister-Henn, 1991). La distribución subcelular de la actividad ICDH en plantas superiores se encuentra en aproximadamente un 90% en el citosol (Chen *et al.*, 1988, 1989; Fiew *et al.*, 1995; Canino *et al.*, 1996; Palomo *et al.*, 1998; Mhamdi *et al.* 2010), 10% en el cloroplasto (Randall & Givan, 1981), menos de 1% en peroxisoma (Corpas *et al.*, 1999), e incluso menos en la mitocondria (Satoh, 1972; Randall & Givan, 1981; Rasmusson & Møller, 1990; Attucci *et al.*, 1994; Møller & Rasmusson, 1998).

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

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

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

malato a piruvato. La actividad NADP-EM se ha encontrado en la matriz de la mitocondria de todas las plantas analizadas hasta la fecha. La presencia de esta enzima permite a la mitocondria de las plantas manejar una vía alternativa para el metabolismo de fosfoenolpiruvato (PEP) derivado de glicólisis. La isoforma citosólica participa en la regulación de pH intracelular (Davies & Patil, 1974) o en la provisión del poder reductor que puede usarse en los procesos que utilizan el NADPH. En el citosol el malato se puede formar a partir de PEP por la acción de las enzimas PEP carboxilasa y malato deshidrogenasa; posteriormente, se transporta al interior de la matriz mitocondrial donde la enzima málico lo reoxida de nuevo a piruvato. El nivel de expresión de NADP-EM citosólica y plastídica aumenta en respuesta al estrés por hongos, luz ultravioleta, sal y heridas (Schaaf *et al.*, 1995). Uno de los papeles más claro de la NADP-EM en plantas es su función como donador de CO₂ a la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) del ciclo de Calvin (von Caemmerer and Furbank, 2003). También tiene un papel muy importante en la fotosíntesis en algunas plantas.

3.3. Antioxidantes no enzimáticos

También son conocidos como antioxidantes estequiométricos por su capacidad de neutralizar de forma equimolar un radical libre por molécula, y normalmente actúan a concentraciones altas (Halliwell & Gutteridge, 2007). Entre los sistemas antioxidantes no enzimáticos más importantes destacan la vitamina C (ácido ascórbico), el glutatión, la vitamina E (α -tocoferol), el β -caroteno (provitamina A) y los flavonoides. Los antioxidantes no enzimáticos se diferencian por su naturaleza liposoluble o hidrosoluble.

3.3.1. Ácido ascórbico (vitamina C)

Es el antioxidante cuantitativamente predominante en las células vegetales, se encuentra en todos los compartimentos subcelulares, incluido el apoplasto, en concentraciones que oscilan entre 2 mM a 25 mM (Davey *et al.*, 2000). El ascorbato actúa para prevenir o minimizar los daños causados por las ROS en plantas (Smirnoff, 2005; Athar *et al.*, 2008) ya que es oxidado por el oxígeno, el anión superóxido, el oxígeno singlete y el peróxido de hidrógeno para dar lugar al radical monodeshidroascorbato, el cual se desproporciona en ascorbato o deshidroascorbato (Smirnoff, 2000).

Desempeña un papel fundamental en la fotoprotección y la regulación de la fotosíntesis, y preserva las actividades de enzimas que tienen iones metálicos de transición (Cu^{2+} , Fe^{3+}) como grupo prostético. El ascorbato es también un poderoso antioxidante secundario, ya que reduce la forma oxidada del α -tocoferol. Adicionalmente, es el reductor utilizado para la hidroxilación de residuos de prolina de la extensina, una proteína de la pared celular. También está implicado en la elongación de la raíz, el funcionamiento de los estomas, y desempeña una función crítica asociada a los mecanismos a través de los cuales las plantas reconocen los cambios medioambientales y responden a ellos (Foyer and Noctor, 2005). El ácido ascórbico es esencial para el crecimiento de las plantas (Alhagdow et al., 2007; Dowdle et al., 2007), participa en la resistencia a estrés, y parece controlar el tiempo de floración y el comienzo de la senescencia (Davey et al., 2000). Además, el ácido ascórbico y su forma oxidada el ácido deshidroascórbico (DHA) pueden actuar como agentes de señalización (Pastori et al., 2003; Fotopoulos et al., 2008) participando en la interacción con el medioambiente, por ejemplo el ozono (Sanmartin et al., 2003), los patógenos y los agentes oxidantes (Fotopoulos et al., 2006), y la pérdida de agua (Fotopoulos et al., 2008).

En los años cincuenta ya se suponía que la síntesis de ascorbato en plantas difería de la de animales (Loewus, 1963). Pero es a partir de los noventa, con la obtención de algunos mutantes deficientes en la síntesis de ascorbato, cuando se empieza a estudiar con más detalle las vías de síntesis de esta antioxidante en plantas. La síntesis de ácido ascórbico en animales implica la transformación de la D-glucosa (D-Glc) a ácido ascórbico vía D-glucuronato, L-gulonato y L-gulono-1,4-lactona (L-GulL) (Burns et al., 1960), el cual es oxidado a ácido ascórbico mediante la enzima L-gulono-1,4-lactona oxidasa (GulLO; EC 1.1.3.8) (Fig. 1.7). Esta enzima ha sido purificada a partir de rata, cabra y pollo (Nishikimi et al., 1976; Kiuchi et al., 1982). En plantas, la síntesis de ascorbato ocurre por diferentes vías, que descubriremos a continuación, y que tienen como precursor común la L-galactono-1,4-lactona (L-GalL), que es oxidada a ácido ascórbico mediante la enzima L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GalLDH; EC 1.3.2.3) (Wheeler et al., 1998; Conklin et al., 2000; Smirnoff et al., 2001; Wolucka et al., 2001; Agius et al., 2003; Wolucka and van Montagu, 2003; Lorence et al., 2004). Por otro lado, en hongos y algas, donde está

ausente el ascorbato, se ha observado la presencia de un compuesto análogo al ascorbato, el eritroascorbato, que presenta una ruta de síntesis alternativa en la que interviene una nueva aldonolactona oxidasa, la D-arabino-1,4-lactona oxidasa (D-ALO; EC 1.1.3.37), la cual es distinta a la GulLO de animales y la GalLDH de plantas (Smirnoff et al., 2001).

En plantas se han descrito varias vías posibles de síntesis de ascorbato (Fig. 1.8), pero la principal ruta fisiológica es la Smirnoff-Wheeler (Conklin et al., 1999) que pone en marcha v(GDP-L-Gal), L-galactosa-1-fosfato, L-galactosa y L-galactono-1,4-lactona (L-GalL) que es oxidada a ascorbato por la GalLDH (Wheeler et al., 1998; Bartoli et al., 2000; Wolucka and van Montagu 2003; Smirnoff et al., 2004; Ishikawa et al., 2006; Dowdle et al., 2007; Laing et al., 2007; Loannidi et al., 2009). Actualmente se han establecido otras rutas de síntesis de ácido ascórbico en plantas, como la que utiliza ácido D-galacturónico (Agius et al., 2003) derivado de pectinas, o la ruta de síntesis a partir de mio-inositol en *Arabidopsis* (Lorence et al., 2004; Zhang et al., 2008). Por otro lado, Loewus (1988) propone una vía alternativa a partir de la cual el ascorbato es sintetizado desde D-glucosa, vía L-sorbose. En judía y espinaca hay indicios de actividad capaz de convertir L-sorbose a ascorbato en una reacción dependiente de NADP^+ (Saito et al., 1990; Loewus et al., 1990). Loannidi et al. (2009) ha descrito que la expresión de la galactosa-4-fosfato fosfatasa es sobre-regulada durante el desarrollo del fruto, lo que sugiere un punto de control importante en la biosíntesis de ascorbato. Un homólogo de levadura, la arabinono-1,4-lactona oxidasa (ALO), que convierte la L-GalL, así como la L-gulono-1,4-lactona (L-GulL) en ascorbato (Huh et al., 1994; Lee et al., 1999; Hancock et al., 2000; Sauer et al., 2004; Hancock, 2009).

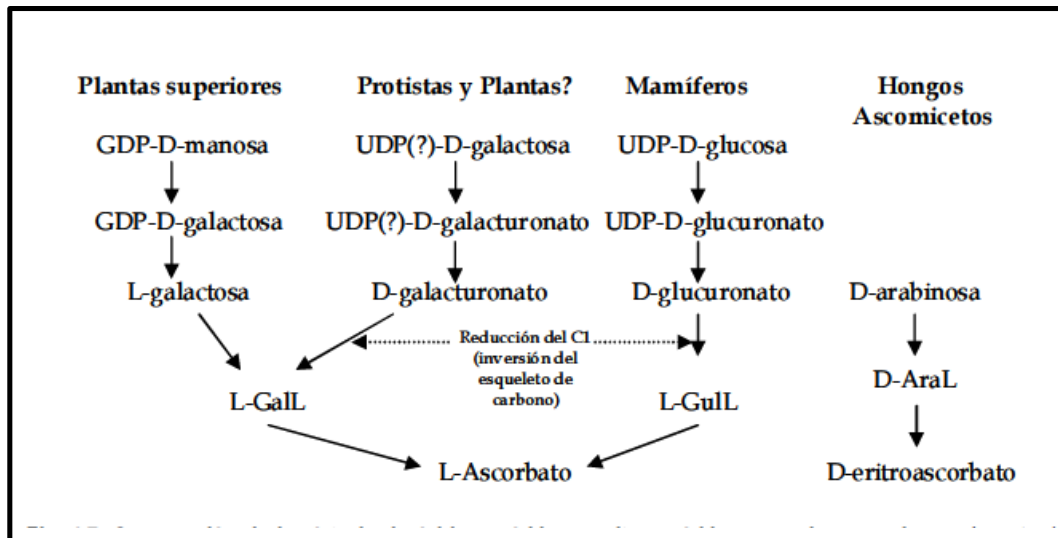


Fig. 1.7. Comparación de la síntesis de ácido ascórbico y eritroascórbico en varios organismos. La ruta de síntesis de ácido ascórbico varía entre los distintos grupos de organismos. En plantas (incluyendo algas clorofíticas) la aldonolactona precursora de ácido ascórbico es producida desde una aldosa, mientras que en mamíferos y algunos protistas ello ocurre desde el ácido glucurónico. Hay evidencias de que las plantas también podrían llevar a cabo esta ruta a partir del ácido glucurónico. Por otro lado, los hongos ascomicetos, incluyendo las levaduras, producen D-eritroascorbato, un análogo C₅ del ácido ascórbico, por medio de una ruta similar a la de las plantas. Comparaciones entra la secuencia de aminoácidos de las aldonolactonas deshidrogenasas (plantas) / oxidasas (animales) que producen ascorbato o eritroascorbato (levaduras) muestran un 26 a un 31% de identidad. Este diagrama fue descrito por Smirnoff (2001). L-GalL, L-galactono-1,4-lactona; L-GulL, L-gulono.1,4-lactona; D-AraL, D-arabino-1,4-lactona.

Los pasos previos a la L-galactosa-1P en la síntesis de ascorbato según la ruta descrita por Smirboff-Wheeler son comunes para otros procesos celulares como la síntesis de polisacáridos de la pared celular y la glicosilación de proteínas (Smirnoff et al., 2001). Esto nos indica que las reacciones exclusivas de la ruta de síntesis de ascorbato son las catalizadas por la GalDH y la GalLDH. Por otro lado, se ha observado que la actividad GalDH es inhibida en presencia de altas concentraciones de ascorbato por un mecanismo de retroalimentación (Tabata et al., 2002; Tamaoki et al., 2003; Pateraki et al., 2004).

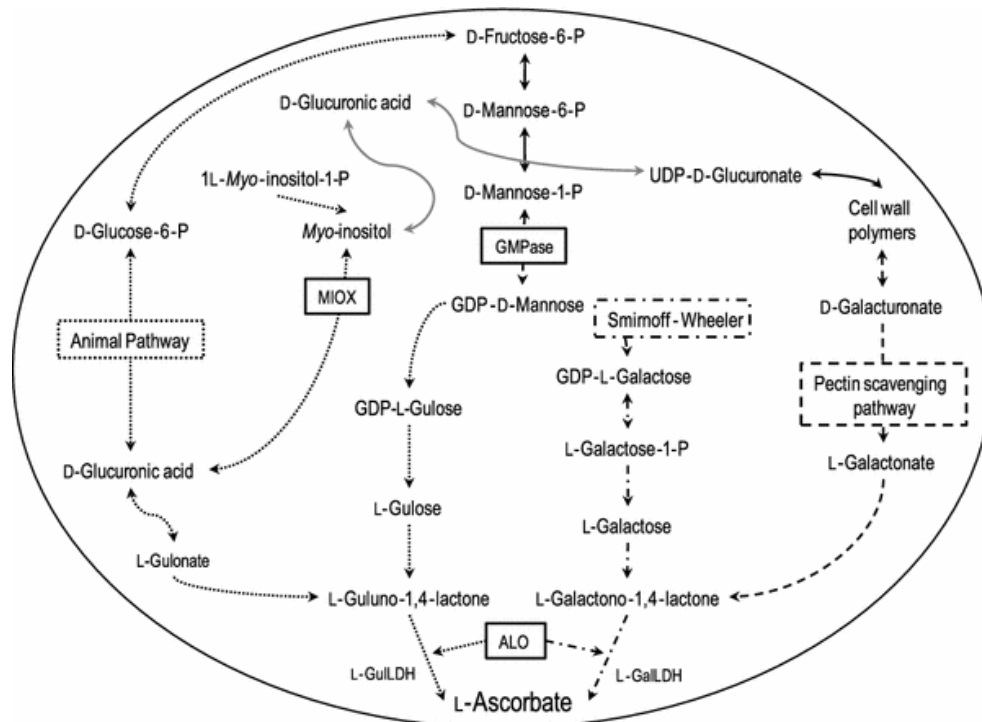


Fig. 1.8. Representación esquemática de rutas para la biosíntesis de ácido ascórbico: la ruta Smirnoff-Wheeler (Wheeler et al. 1998) la ruta de secuestro de pectina (Agius et al., 2003) y las rutas biosintéticas de ascorbato en animales y animales-like (Wolucka and van Montagu 2003; Lorence et al., 2004). GMPase, GDP-manosa pirofosforilasa; MIOX, mio-inositol oxigenasa; ALO, arabinona-1,4-lactona oxidasa; L-GulLDH, L-gulono-1,4-lactona deshidrogenasa; L-GalLDH, L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa.

3.3.2. Glutación

Lo que comúnmente se conoce como glutación es el glutación reducido (GSH o γ -glutamyl-L-cisteínglicina). Este tripéptido que existe abundantemente en los cloroplastos es sintetizado en dos pasos, catalizados por la γ -glutamylcisteína sintetasa (γ -ECS) y la glutación sintetasa, siendo el primero de ellos el paso limitante de su biosíntesis en plantas (Ogawa, 2005). El glutación se caracteriza por ser el compuesto tiólico no-proteico más abundante distribuido principalmente en células eucarióticas. Se encuentra en concentraciones milimolares, y presenta una alta capacidad de donar electrones. El 90% del glutación se encuentra normalmente en su estado reducido. El glutación oxidado puede de nuevo ser reducido a GSH por acción de la GR que utiliza NADPH como poder reductor (Li et al., 2004).

Se ha encontrado que el glutatión está involucrado en diferentes procesos en las plantas, entre los que destacan la diferenciación, la muerte celular programada, la senescencia, la regulación del ciclo celular, la floración, la acumulación de pigmentos, y la detoxificación de xenobióticos y metales pesados. Recientemente se le ha asignado un papel como regulador del crecimiento y como inductor de genes de defensa (Ogawa, 2005).

En su papel como antioxidante participa junto al ascorbato en el ciclo ascorbato-glutation que elimina el H_2O_2 intracelular (Creissen et al., 1992; Wingsle & Karpinski, 1996), y además de reaccionar directamente con el oxígeno singlete y los radicales hidroxilos, protege a los grupos tioles de las proteínas (Lascano et al., 1998; Gechev et al., 2002). Por otro lado, el glutatión juega un papel importante en la eliminación de xenobióticos cuando se conjugan con moléculas electrofílicas, por la acción de la enzima glutatión S-transferasa. En tercer lugar, el glutatión, como componente de las fitoquelatinas (polímeros de $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{ Gly}$) interviene en la quelación de metales pesados como el cadmio y arsénico, facilitando así su secuestro por la vacuola (Steffens et al., 1986; Foyer et al., 2001; Zhao et al., 2010). El GSH actúa también como cofactor de la glutatión peroxidasa eliminando H_2O_2 ; puede eliminar radicales libres por vías no enzimáticas; y participa en la desintoxicación de drogas con grupos funcionales que reducen parcialmente al oxígeno molecular (Smirnoff, 2000). El GSH está involucrado en otros procesos metabólicos, como el mantenimiento de la comunicación intercelular, el transporte intracelular de cobre y es cofactor de enzimas en diversas rutas metabólicas. Participa en la regulación del estado redox de los puentes disulfuro en proteínas con otras moléculas como la tiorredoxina y glutarredoxina entre otros componentes tiólicos. En animales, el GSH está sujeto a un control hormonal.

El GSH tiene un papel importante en la desintoxicación de ROS. Se ha visto que las células se protegen del estrés oxidativo y nitrosativo aumentando los niveles basales de glutatión (Chatterjee *et al.*, 2000). Su regeneración depende del consumo de NAD(P)H. También actúa como compuesto de transporte a larga distancia de azufre reducido, y está implicado en los procesos de transducción de señales (Puppo *et al.*, 2005). La subida o bajada de los niveles normales de GSH puede incrementar la susceptibilidad al estrés oxidativo y puede facilitar la señalización redox en procesos

importantes como la interacción incompatible planta-patógeno o la muerte celular programada (Foyer & Noctor, 2005).

3.3.3. Carotenoides

Son moléculas liposolubles sintetizadas por plantas y microorganismos. Son los responsables del color de muchas plantas, frutas y flores. Protegen las plantas y los animales frente al daño oxidativo. Los carotenoides de plantas se forman en el cloroplasto a partir del difosfato isopentil. La función natural de los carotenoides es la de colaborar en la absorción de la luz del sol durante la fotosíntesis y proteger a las células de la fotosensibilización. Además pueden actuar protegiendo a la célula frente al daño oxidativo ya que pueden atrapar (fundamentalmente el β -caroteno) el exceso de energía de la clorofila en estado triplete o del oxígeno singlete (Collins, 2001). Los carotenoides, constituidos por carotenos y xantofilas, son los pigmentos que proporcionan el color rojo y amarillento a las hojas de árboles y plantas durante el otoño, debido a su acumulación en los plastidios de dichas células. Éste parece ser un mecanismo de defensa de la planta que responde a las condiciones fotoinhibidoras de la aclimatación al invierno. Este mecanismo está acompañado de un aumento en la concentración de α -tocoferol y una disminución gradual del contenido de clorofila, así como de una transformación de los plastidios, de cloroplastos a cromoplastos (Hormaetxe et al., 2004). Estos cromoplastos también están presentes en algunos tipos de frutos y pétalos. El consumo de carotenoides evita el riesgo de ciertos tipos de cáncer y ayudan a regular el sistema inmune (Naik et al., 2003). Además, los carotenoides junto al α -tocoferol y el ascorbato, protegen a las membranas fotosintéticas frente a condiciones de estrés oxidativo (Hormaetxe et al., 2004).

3.3.4. Flavonoides

Son compuestos fenólicos que se encuentran en muchas plantas y tienen una alta capacidad para neutralizar los radicales libres. Su síntesis aumenta en plantas frente al aumento en la radiación ultravioleta, y podrían proteger a la célula frente a la peroxidación lipídica (Torel *et al.*, 1986). Numerosos estudios demuestran la acción directa de los flavonoides sobre las ROS, inhibiendo las lipoxigenasas y las ciclooxigenasas, e incluso la xantina oxidasa, aunque también pueden atrapar el H_2O_2 (Bors y col., 1990; Yamasaki et al., 1997). Se ha descrito que los polifenoles, que están

generalmente distribuidos en las plantas contribuyendo en el color y el sabor, son un buen indicador de la capacidad antioxidante de los pimientos (Namiki et al., 1990).

3.4. Estrés oxidativo

Cada año el estrés ambiental causa pérdidas considerables en la calidad y productividad de los cultivos, incluso bajo condiciones de producción protegida como invernaderos. Las condiciones ambientales desfavorables pueden ser bióticas, impuestas por otros organismos como bacterias, hongos, virus, insectos y nematodos, o abióticas, promovidas por un exceso o déficit en el ambiente físico o químico que las rodea. Los diferentes tipos de estrés disparan una amplia gama de respuestas en la planta que pueden ocasionar una reducción en las tasas de crecimiento y productividad como consecuencia de las alteraciones del metabolismo celular y la expresión genética. La duración, severidad y velocidad de un estrés al que se ven sometidas las plantas influyen directamente en sus respuestas. Independientemente de su naturaleza, un factor común en todas las condiciones adversas es la sobreproducción de especies de oxígeno reactivo (Inzé and Van Montagu, 1995; Asada, 2006). El estrés oxidativo es un estado alterado de la homeostasis redox celular, es decir, del balance entre oxidantes y antioxidantes. Así, en situaciones de estrés oxidativo se produce un desequilibrio del estado redox que se caracteriza por una sobreproducción de especies oxidantes frente a las defensas antioxidantes (Fig. 1.9). Dada su gran reactividad y en ausencia de mecanismos que las eliminen, las ROS producen daños en la estructura y la función de las células (Simontacchi et al., 2001).

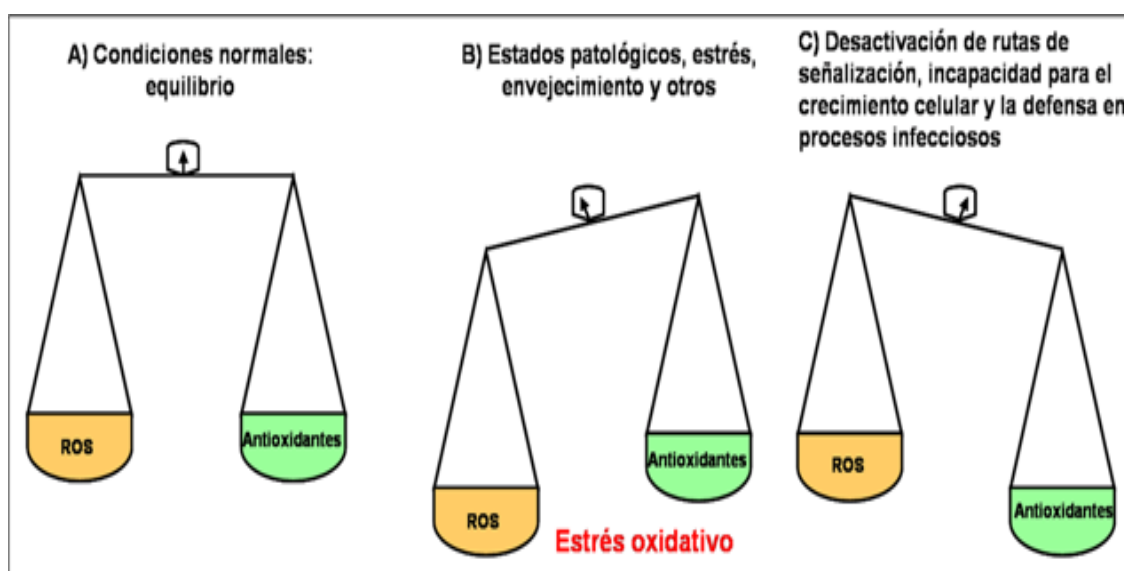


Fig. 1.9. Balance entre las reacciones de oxidación y los antioxidantes en diferentes situaciones fisiológicas. En las condiciones normales de equilibrio los antioxidantes son capaces de contrarrestar las reacciones de oxidación que se producen en la célula (A). Sin embargo en ciertos estados patológicos, de estrés y por envejecimiento celular se produce un exceso de reacciones oxidativas que superan la capacidad de los antioxidantes. En dichos casos se produce estrés oxidativo que tiende a evolucionar hacia los procesos de degeneración celular (B).

Estrés abiótico

En plantas, las ROS se producen continuamente en el cloroplasto, mitocondria y peroxisoma. En condiciones normales, la producción y descomposición de las ROS están estrictamente controladas. Sin embargo, el equilibrio entre la producción y la depuración de éstas puede ser alterado por diversos factores fisicoquímicos, como son el déficit hídrico, la salinidad, las temperaturas extremas, la excesiva o insuficiente radiación luminosa, la anaerobiosis por encharcamiento o inundación, los factores mecánicos como el viento o la compactación del suelo y las lesiones. Estos factores pueden afectar determinados aspectos fisiológicos de las plantas como son la germinación, crecimiento, desarrollo y reproducción (Potters et al., 2007). Frecuentemente, se presentan combinaciones de dos o más de estas condiciones (Cabrera, 2006).

Además, algunas de estas condiciones medioambientales adversas causan grandes pérdidas en la agricultura en todo el mundo, y, como consecuencia, grandes pérdidas económicas (Boyer, 1982; Bray et al., 2000; Mittler, 2006) que amenazan la sostenibilidad de la industria agrícola (Mahajan & Tuteja, 2005).

Los diferentes estreses disparan un amplio rango de respuestas en las plantas, desde la alteración del metabolismo celular y la expresión génica hasta cambios en el crecimiento y rendimiento de los cultivos (Bray et al., 2000). La respuesta al estrés depende de la especie, de la edad de la planta o del genotipo, así como de la duración y severidad del estrés.

A nivel celular, estas condiciones medioambientales adversas pueden inducir una producción anormal de especies de oxígeno reactivo, como el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo que pueden reaccionar con diferentes biomoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos provocando un estrés oxidativo (Mittler, 2002; Apel and Hirt, 2004) (Fig. 1.10).

Estrés biótico

Una de las más rápidas reacciones de defensa frente al ataque por patógenos es la llamada “explosión oxidativa”, la cual se caracteriza por una abundante producción de ROS, principalmente $O_2^{\cdot\cdot}$ y H_2O_2 en el sitio de invasión. La generación de $O_2^{\cdot\cdot}$ ha sido identificada en un amplio rango de interacciones planta-patógeno que involucran bacterias, hongos y virus (Low & Merida, 1996). Este tipo de estrés también puede ser provocado por insectos y nematodos, así como también por herbívoros.

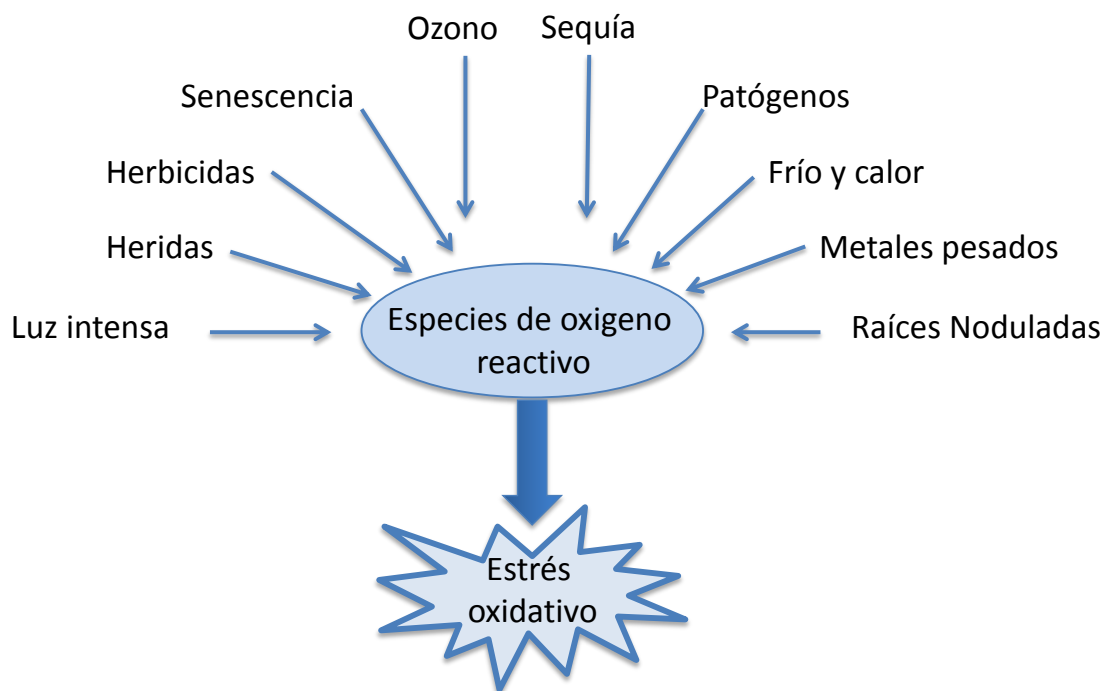


Fig. 1.10. Factores ambientales que aumentan la concentración de especies de oxígeno reactivo.

La interacción planta-patógeno puede ser de tipo compatible, en la cual el patógeno infecta la planta, provocando una enfermedad, o incompatible, en la que los mecanismos de defensa de la planta impiden su entrada o el establecimiento del invasor. En este último caso, las células que están en contacto con el patógeno pueden enviar señales a las células y tejidos vecinos para que se produzcan cambios bioquímicos destinados a evitar la diseminación del patógeno. Este sistema se denomina resistencia sistémica adquirida (Cabrera, 2006).

Numerosas enzimas han sido implicadas en la producción apoplástica de ROS, después del reconocimiento exitoso del patógeno. La utilización de inhibidores ha permitido involucrar a las NADPH oxidasas de membrana plasmática y a las peroxidasas de pared celular, como las principales fuentes de ROS en dichos casos (Torres et al., 2006). Las peroxidasas son un complejo grupo de proteínas que catalizan la óxido-reducción de varios sustratos que utilizan peróxido. En particular, las peroxidasas dependientes de pH en la pared celular, pueden llegar a ser una fuente importante de H₂O₂, si están en presencia de algún reductor que la célula libere en respuesta a algún estímulo (Torres et al., 2006).

4. METABOLISMO DE ESPECIES DE NITRÓGENO REACTIVO (RNS)

4.1. El óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$)

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

El óxido nítrico o monóxido de nitrógeno puede existir como tres especies distintas e interconvertibles, ya que puede adoptar una estructura energéticamente más favorable ganando o perdiendo un electrón. Estas especies son el propio radical ($\cdot\text{NO}$), el anión nitroxilo (NO^-) y el catión nitrosonio (NO^+), las cuales difieren en sus propiedades físicas y en su reactividad química (Stamler et al., 1992; Hughes, 1999; Wojtaszek, 2000).

El principal interés del NO consiste en su implicación en la polución del aire porque contribuye a la lluvia ácida, la reducción de la capa de ozono y tiene efectos nocivos sobre salud humana. Sin embargo, la atención sobre el NO cambió significativamente cuando fue identificado, separadamente, por Moncada e Ignarro, como el factor de relajación endotelial (EDRF, *endothelium-derived relaxing factor*) (Palmer et al., 1987; Ignarro et al., 1987). Más tarde, se demostró que el NO se genera

en mamíferos a partir de un aminoácido, la arginina, por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOSs) (Moncada, 1999; Alderton et al., 2001). De este modo, en animales el NO participa en un amplio espectro de funciones como el sistema cardiovascular, inmune y nervioso (Moncada, 1999). Sin embargo, el NO está también implicado en una amplia gama de patologías humanas como tumores, enfermedades cardíacas, asma, enfermedades infecciosas, diabetes, hipertensión, dermatitis, Alzheimer, Parkinson o esclerosis, entre otros. En plantas superiores, el NO también tiene una función importante en el crecimiento y desarrollo, la germinación de las semillas, crecimiento de las raíces primarias y laterales, floración, maduración de frutos, senescencia y estrés abiótico, además de ser una molécula señal en diferentes procesos intracelulares (Lamattina et al., 2003; Shapiro, 2005; Corpas et al., 2007; Besson-Bard et al., 2008; Neill et al., 2008; Zafra et al., 2010).

El óxido nítrico puede interactuar con diferentes biomoléculas como los lípidos, los ácidos nucleicos y las proteínas afectando sus funciones. Sin embargo, la interacción con las proteínas ha sido la más estudiada. En este sentido, el NO puede reaccionar directamente o indirectamente con las proteínas de distintas formas: con transición de metales presentes en la proteína dando complejos llamados metales nitrosilados; con grupos sulfhidrilos dando un proceso de *S*-nitrosilación; y por adición de un grupo nitro (-NO₂) en un proceso de nitración. Hasta ahora el análisis de la unión del NO al metal contenido en las proteínas ha sido estudiado con hemoglobinas (Besson-Bard et al., 2008); sin embargo hay muchos datos experimentales que muestran que ciertas actividades enzimáticas como la citocromo c oxidasa, la catalasa o la ascorbato peroxidasa pueden ser moduladas por este mecanismo (Millar & Day, 1996; Clark et al., 2000). La *S*-nitrosilación de proteínas es una modificación post-traducciona l de los residuos de cisteína producidos por el NO que puede modificar la función de un amplio espectro de proteínas (Stamler et al., 2001; Lindermayr et al., 2005; Wang et al., 2006; Lindermayr & Durner, 2009) (Fig. 1.11). Un especial atención se ha dado al proceso de *S*-nitrosilación del tripeptido glutatión (GSH) para formar el *S*-nitrosoglutatión (GSNO) ya que esta molécula puede funcionar como reserva móvil del NO (Durner & Klessig, 1999; Barroso et al., 2006) y puede regular el equilibrio entre GSNO y las proteínas nitrosiladas por un proceso de transnitrosilación. En este sentido, la enzima GSNO reductasa parece ser un elemento clave porque cataliza la reducción NADH dependiente

de GSNO a GSSG y NH_3 . Por consiguiente, esta enzima controla el nivel de GSNO intracelular y como resultado los efectos de NO en las células (Leterrier et al., 2011). La nitración de proteínas es otro proceso que introduce un grupo nitro ($-\text{NO}_2$) y hay varios aminoácidos que son preferentemente nitrados, como la tirosina, triptófano, cisteína y metionina. Sin embargo, en plantas la mayoría de los estudios están enfocados en la nitración de la tirosina (Corpas et al., 2009; Chaki et al., 2009b).

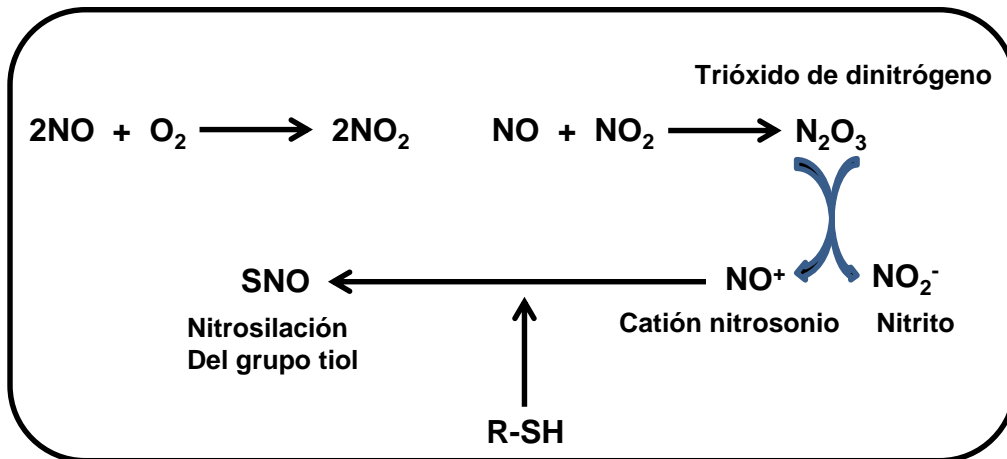
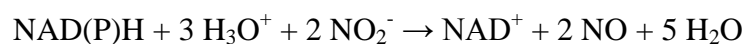


Fig. 1.11. Mecanismo de S-nitrosilación de proteínas.

4.2. Sistemas generadores de NO

Las plantas pueden generar $\cdot\text{NO}$ por sistemas tanto enzimáticos como no enzimáticos (Neill et al., 2003; del Río et al., 2004; Gupta et al., 2011).

Una de las rutas de producción de NO en plantas es la enzima nitrato reductasa (NR), la cual está localizada en el citosol y cataliza la reducción de nitrato a nitrito usando NADH como donador de electrones. Esta enzima, puede también catalizar la reducción de nitrito a NO (Yamasaki & Sakihama, 2000; Rockel et al., 2002) según la siguiente reacción:



La NR es una fuente enzimática importante de producción de NO en plantas, como está indicado por el doble mutante *nia*, deficiente en NR, que tiene niveles reducidos de nitrito y NO (Planchet et al., 2005).

La síntesis de NO vía NR requiere relativamente concentraciones bajas de nitrato y altas de nitrito porque la afinidad por el nitrito ($K_M = 100 \mu\text{M}$) es mayor comparada con la constante de inhibición del nitrato ($K_i = 50 \mu\text{M}$) (Rockel et al., 2002) y, por tanto, la producción de NO depende de la acumulación de nitrito. Además, las modificaciones post-traduccionales de la enzima NR afectan la producción de NO *in vitro* e *in vivo*.

La producción de NO mediada por NR es inducida por varios factores bióticos y abióticos como son los favorecedores o propiciadores (*elicitors*) químicos de algunos patógenos (Yamamoto-Katou et al., 2006, Shi et al., 2008; Srivastava et al., 2009), el estrés osmótico (Kolbert et al., 2010), el estrés hídrico (Sang et al., 2008), la transición floral (Seligman et al., 2008), por auxinas durante la formación de raíces laterales (Kolbert et al., 2008) y la hipoxia (Benamar et al., 2008; Blokhina et al., 2010).

Durante los años 80, se mostró en animales que la oxidación de la arginina a citrulina y NO estaba catalizada por la enzima NO sintasa (NOS) (Palmer et al., 1987). Después de descubrir el papel del NO en plantas en 1998 (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998), varios investigadores empezaron a buscar una actividad NOS en plantas aunque el genoma de *Arabidopsis thaliana* no mostró ningún gen con homología significativa al del NOS animal. Desde entonces han sido analizadas varias candidatas de enzimas tipo NOS en plantas, pero no se ha confirmado su funcionamiento como una vía de producción normal de NO, sino de forma subsidiaria (Zemojtel et al., 2006; Moreau et al., 2010). Aunque la base enzimática de la producción de NO a partir de la arginina sigue siendo algo difícil de alcanzar, existe una línea de investigación que proporciona continuamente nuevas evidencias de la implicación de una reacción tipo NOS en la regulación de varios procesos, como el desarrollo (Barroso et al., 1999; Corpas et al., 2004, 2006b, 2009a; Wang et al., 2009, 2010), la respuesta a estrés por cadmio (Besson-Bard et al., 2009; De Michele et al., 2009), y por temperatura (Corpas et al., 2008; Chaki et al., 2011), la respuesta a patógenos (Besson-Brad et al., 2008, Chaki et al., 2009a; Asai et al., 2009) y la protección contra la radiación UV-B (Tossi et al., 2009).

Se ha propuesto una ruta alternativa a través de la cual el NO es producido a partir de la arginina (Tun et al., 2006). La arginina es un sustrato de la ruta biosintética

que lleva a la producción de poliaminas, como la espermina y la espermidina. *In planta*, la síntesis de poliaminas depende de la disponibilidad de arginina como sustrato para la enzima arginina descarboxilasa. La producción de NO fue detectada suministrando espermina a las plantas, lo que sugiere que la síntesis de poliaminas a partir de la arginina está implicado en la producción de NO. No obstante, el mecanismo bioquímico por el cual el NO es producido a partir de poliaminas aún no se ha descrito (Yamasaki et al., 2006).

Hasta el momento, han sido descritas varias rutas bioquímicas de la producción de NO a partir de hidroxilaminas en bacterias y animales. Las hidroxilaminas pueden reaccionar directamente con el radical superóxido para formar NO (Vertovsky et al., 1996), mientras que en la bacteria *Nitrosomonas*, esta conversión está catalizada por la enzima hidroxilamina oxidoreductasa (EC1.7.3.4) (Hooper & Terry, 1979). Además, se planteó la hipótesis de que la L-hidroxiarginina es un intermediario en la reacción de conversión de la L-arginina a citrulina (DeMaster et al., 1989). Otra posible ruta de la formación de la hidroxilamina es la reacción de oxidación del amoníaco bacteriano (Hooper et al., 1979).

Un suplemento exógeno de hidroxilamina a cultivos celulares de tabaco deficiente en NR dio como resultado la producción de unas cantidades considerables de NO bajo condiciones aeróbicas, sugiriendo así la evidencia de la oxidación de la hidroxilamina a NO en plantas. La adición de peróxido de hidrógeno incrementó la producción de NO a partir de la hidroxilamina, mientras que la catalasa redujo la liberación de NO, lo que indica que la reacción es dependiente de las ROS (Rümer et al., 2009) (Fig. 1.12).

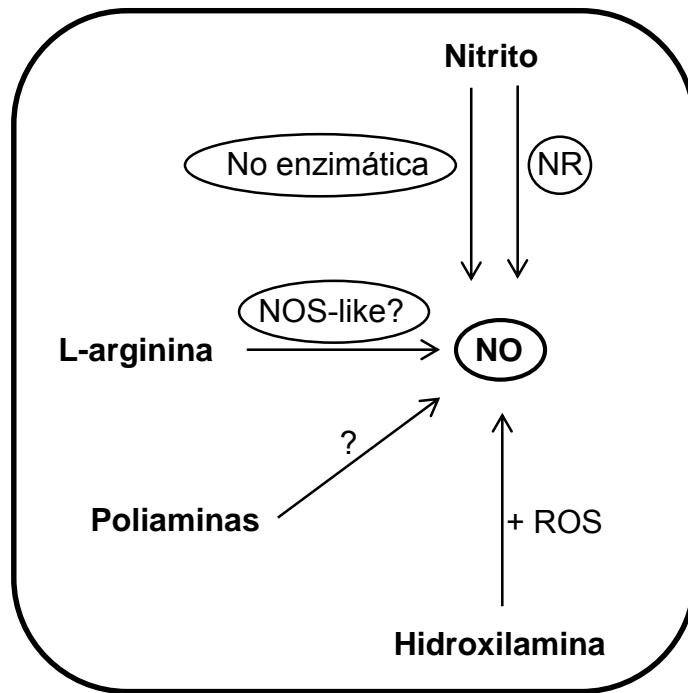


Fig. 1.12. Distintas formas de producción de NO en plantas.

4.3. Especies de nitrógeno reactivo (RNS)

Se forman por la interacción del óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) con otros radicales y con oxígeno. Las principales especies de nitrógeno reactivo son el $\cdot\text{NO}$ y otras moléculas relacionadas con él como el peroxinitrito (ONOO^-), el trióxido de dinitrógeno (N_2O_3), la 3-nitrotirosina (n-Tyr), el dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$), el catión nitrosonio (NO^+) y el S-nitrosoglutatión (GSNO) (Hausladen & Stamler, 1999; Halliwell & Gutteridge, 2000; Nathan, 2004; Halliwell & Gutteridge, 2007) (Fig. 1.13).

Las RNS pueden dañar y matar las células por distintos mecanismos como la inactivación de los diferentes complejos de la cadena respiratoria (Brown, 1999), daño a proteínas y lípidos (Berlett & Stadtman, 1997; Steinberg, 1997; Tien *et al.*, 1999; Prescott, 1999) e inhibición de la síntesis proteica o del DNA (Kim *et al.*, 1998; Bundy *et al.*, 2000).

Los nitrosotioles (SNOs), y particularmente el S-nitrosoglutatión (GSNO), parece que tienen un papel relevante en la bioquímica del NO porque pueden funcionar como un almacén de NO intracelular y como un vehículo de NO hacia la célula (Singh *et al.*, 1996). En este contexto, se considera que una reacción de S-transnitrosación es el principal mecanismo que regula los efectos biológicos de los SNOs (Liu *et al.*, 1998).

Por consiguiente, pueden estar implicados en los cambios post-traduccionales de señalización celular bajo condiciones fisiológicas y fitopatológicas. Sin embargo, en plantas superiores la información disponible sobre el metabolismo de SNOs y RNS es aún limitada comparada con la de animales.

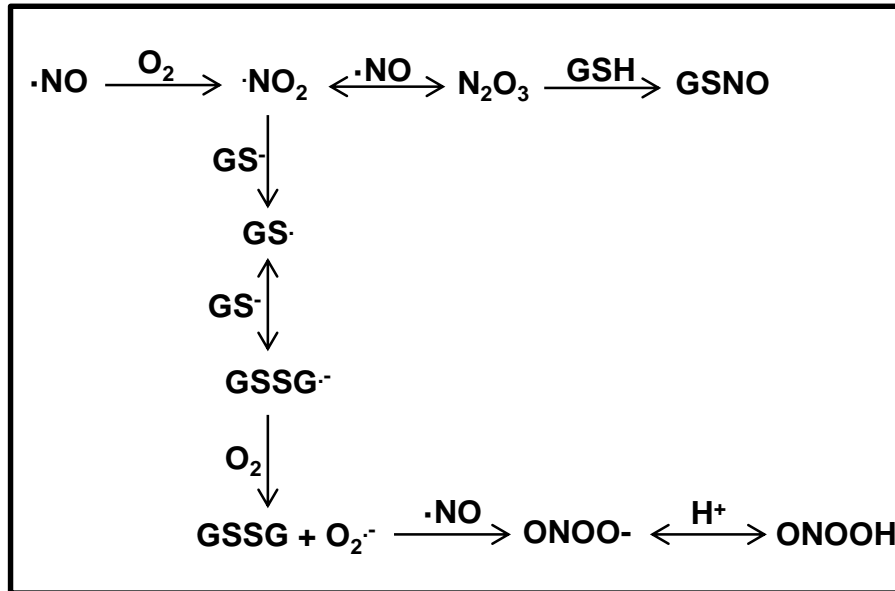
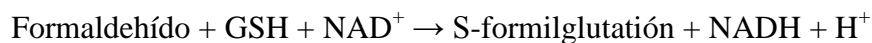


Fig. 1.13. Formación de especies de nitrógeno reactivo (RNS). $\cdot\text{NO}$, óxido nítrico; $\cdot\text{NO}_2$, dióxido de nitrógeno; N_2O_3 , trióxido de dinitrógeno; GSNO, S-nitrosoglutatión; ONOO^- , peroxinitrito; ONOOH, ácido peroxinitroso.

La alcohol deshidrogenasa 3 (ADH3) es una enzima ubicua y altamente conservada encontrada desde procariontas a eucariotas. Esta enzima está implicada en rutas celulares importantes porque lleva una parte de la detoxificación del formaldehído, catalizando la siguiente reacción (Strittmatter et al., 1955; Staab et al., 2008):



Sin embargo, el interés de esta enzima aumentó significativamente cuando se mostró que también cataliza la reducción de S-nitrosoglutatión (GSNO) a GSSG y NH_3 dependiente de NADH (Jensen et al., 1998; Liu et al., 2001), la cual puede ser considerada una reacción de desnitrosilación. Por tanto, esta actividad puede controlar el nivel intracelular de GSNO y, por consiguiente, los efectos del NO en las células. Así, esta actividad GSNO reductasa (GSNOR) puede cambiar el equilibrio entre el GSNO y las proteínas S-nitrosiladas y, como resultado, participar en la homeostasis del

NO celular. Además, esta reacción afecta el equilibrio de GSH y NADH, lo que indica que la GSNOR podría estar indirectamente implicada en el estado redox celular.

En *Arabidopsis thaliana* se ha visto que la mutación AtGSNOR1 modula el nivel de la formación de SNO celular, el cual parece regular múltiples formas de resistencia a enfermedades de las plantas (Feechan et al., 2005). La modulación de la actividad y expresión de la GSNOR ha sido observada bajo diferentes condiciones de estrés abiótico. En plantas de guisante crecidas con 50 μM de cadmio, que produce estrés oxidativo, el análisis de la actividad GSNOR y la expresión de sus transcritos mostraron una reducción del 31% provocada por el metal. Esto fue acompañado de bajos contenidos en NO, GSH y GSNO (Barroso et al., 2006). En plántulas de girasol expuestas a altas temperaturas (38°C durante 4 h), la actividad GSNOR y su expresión a nivel de proteína y gen disminuían en hipocotilos, lo cual iba acompañado por una acumulación de SNOs (Chaki et al., 2009b). Se ha propuesto, por tanto que la GSNOR regula el nivel de SNOs, siendo éstas las moléculas que proporcionarían el NO necesario para mediar el proceso de la nitración de tirosina (Chaki et al., 2010). Sin embargo, en plantas de guisante expuestas a las mismas condiciones de estrés, el comportamiento fue totalmente diferente porque la actividad GSNOR se incrementó, igual que hizo el contenido en SNOs (Corpas et al., 2008). El análisis de la actividad GSNOR en hojas de guisante expuestas a 8°C durante 48 h mostró un incremento del 67% comparado con las plantas control. Esto fue acompañado con un aumento del contenido SNOs de 5 veces (Corpas et al., 2008).

El peroxinitrito (ONOO^-) es un potente oxidante que se genera por una reacción no enzimática entre el $\cdot\text{NO}$ y el anión superóxido (O_2^-) (Fig. 1.14) (Squadrito y Pryor, 1998a), y tiene un papel importante en diferentes procesos fisiológicos tanto en células animales como en plantas (Halliwell y Gutteridge, 2007).

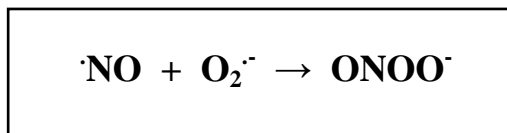


Fig. 1.14. Formación de peroxinitrito a partir de óxido nítrico y anión superóxido.

El peroxinitrito es un agente oxidante fuerte, principalmente dirigido a los tioles de la cisteína en proteínas (Pacher et al., 2007), inhibiendo por ejemplo las tirosina fosfatasas que contienen tioles, antioxidantes enzimáticos y cisteín- proteasas. Sin embargo, el peroxinitrito también modifica las proteínas mediante la nitración de varios amino ácidos (Álvarez & Radi, 2003). Los estudios se han centrado principalmente en las modificaciones de los residuos de tirosina propiciadas por el peroxinitrito porque la forma 3-nitrotirosina está considerada un aspecto clave en la citotoxicidad del peroxinitrito en animales (Radi, 2004). Las proteínas nitradas en los restos de tirosina son abundantes en todos los tejidos y células afectadas por alguna enfermedad (Greenacre & Ischiropoulos, 2001; Pacher et al., 2007). La nitración de la tirosina de las proteínas está asociada a cambios en la actividad catalítica de las enzimas, alteración de la organización del citoesqueleto y deficiencia en la señal de transducción (Schopfer et al., 2003). El peroxinitrito puede también reaccionar con residuos triptófano, dando nitrotriptofano, aunque el papel fisiológico de esta modificación no está claro (Álvarez & Radi, 2003; Yamakura & Ikeda, 2006).

El peroxinitrito es altamente reactivo y toxico en animales, y sus funciones fisiológicas no han sido aun totalmente determinadas. El peroxinitrito podría jugar un papel en la señalización del NO mediante modificaciones post-traduccionales específicas. Aunque el papel de señalización potencial del peroxinitrito no ha sido investigada con detalle, las proteínas nitradas en tirosina han sido detectadas en varias especies de plantas incluso el tabaco transgénico deficiente en nitrito reductasa (Morot-Gaudry-Talarmain et al., 2002), plantas de guisante, *Arabidopsis* y girasol expuestas a estrés abiótico (Corpas et al., 2008, 2009; Chaki et al., 2011) y, plantas de *Arabidopsis thaliana* infectadas con un patógeno avirulento (Romero-Puertas et al., 2007; Cecconi et al., 2009).

4.4. Estrés nitrosativo

Durante los últimos años el óxido nítrico (NO) surgió como una molécula señal en varios procesos fisiológicos importantes en plantas (Neill et al., 2003). El término especies de nitrógeno reactivo (RNS) se acuñó para denominar al NO y moléculas relacionadas con el mismo (RNSs) (Halliwell & Gutteridge, 2007). El estrés nitrosativo es inducido por niveles patofisiológicos de NO, nitración y S-nitrosotioles. Es cada vez

más evidente que el NO juega un papel importante en varios aspectos de los procesos de desarrollo, como la germinación y la dormancia de semillas, el crecimiento de raíces, el gravitropismo de raíces, la expansión de hojas, la fotomorfogénesis, la transición floral, el cierre estomático, la senescencia y la muerte celular programada (Wendehenne et al., 2004; Neill et al., 2008; Besson-Bard et al., 2008). Es también evidente que el NO y las moléculas derivadas del NO están implicadas en las respuesta de las plantas a una multitud de estreses abióticos como la salinidad, la alta intensidad luminosa, baja y alta temperatura, luz continua, oscuridad continua y daño mecánico (Valderrama et al., 2007; Corpas et al., 2008; Corpas y al., 2009).

El término estrés oxidativo describe el daño celular causado por la sobreproducción de ROS, y el término estrés nitrosativo se introdujo para describir un proceso similar causado por RNS en plantas bajo condiciones de estrés. Por consiguiente, se consideró que bajo una situación específica la planta sufre un estrés nitrosativo cuando hay una síntesis desregulada o sobreproducción de NO y productos derivados de NO que pueden tener consecuencias fisiológicas tóxicas. En este contexto, es también importante definir un marcador fiable de este tipo de estrés (Corpas et al., 2007). Hasta ahora, un conjunto de datos revelaron que una subida de la nitración de la tirosina de las proteínas podría ser un buen marcador para evaluar un proceso de estrés nitrosativo (Valderrama et al., 2007; Corpas et al., 2008; Chaki et al., 2011).

En los últimos años ha aumentado considerablemente el interés por los S-nitrosotioles (SNOs) (Feechan et al., 2005; Gaston et al., 2006; Corpas et al., 2008, Lindermayr et al., 2008). La principal razón reside en que la vida media del NO es muy corta mientras que los SNOs son generalmente más estables en solución. Los SNOs pueden participar en el transporte, almacenaje y liberación del NO, además de su implicación en las modificaciones post-traduccionales en la señalización celular y en condiciones de estrés (Lindermayr & Durner, 2009).

5. ROS Y RNS EN CONDICIONES DE ESTRÉS AMBIENTAL

Las plantas están expuestas a una amplia gama de condiciones medioambientales potencialmente estresantes como la salinidad, temperaturas extremas, sequía, radiaciones, gases tóxicos, metales pesados, etc, las cuales pueden afectar seriamente la producción del cultivo y deteriorar el medio ambiente. Así, se estimó que el estrés

abiótico fuera la primera causa de la pérdida de los cultivos en el mundo, que supera el 50% (Boyer et al., 1982). La implicación directa o indirecta del NO en el mecanismo de respuesta frente a algunos estreses ambientales ha sido descrita en diferentes especies de plantas.

Las plantas han desarrollado estrategias únicas para responder al estrés abiótico mediante adaptación de sus sistemas metabólicos para mantener la homeostasis celular (Apel & Hirt, 2004; Bhattacharjee, 2005; Gill & Tuteja, 2010). Como consecuencia, diversos estreses ambientales activan vías de señalización de la célula y respuestas celulares, como son las ROS (Mittler, 2002; Mittler et al., 2004; Miller et al., 2008; Jaspers & Kangasjärvi, 2010). El estrés oxidativo sucede debido a una acumulación excesiva de ROS bajo varias condiciones de estrés abiótico y puede provocar daño oxidativo (Fotopoulos et al., 2006), lo que conduce a la muerte celular (Tanou et al., 2009). Asimismo alguna ROS puede actuar de moléculas señalizadoras, las cuales pueden interactuar con otras vías de señalización afectando varios procesos fisiológicos de la planta (Mittler et al., 2004; Lee & Park, 2010). También hay indicios que sugieren que las plantas usan ROS y RNS como moléculas de transducción de la señal durante procesos fisiológicos y celulares fundamentales (Blokhina & Fagerstedt, 2010).

5.1. Salinidad

La salinidad afecta la productividad de la plantas debido a sus efectos negativos sobre el crecimiento de la planta y el balance iónico. En muchas especies de plantas se mostró que el NaCl provoca estrés oxidativo (Hernández et al., 1993; Hernández et al., 1995; Valderrama et al., 2006; Munns & Tester, 2008). La implicación del NO en el mecanismo de respuesta a la salinidad es claro, aunque los datos disponibles pueden ser a veces contradictorios, dependiendo de las especies y de la severidad del tratamiento con salinidad. En plantas de olivo crecidas *in vitro*, el estrés salino (200 mM NaCl) provoca un aumento en la producción de NO dependiente de L-arginina, de SNOs totales, y del número de proteínas que sufren nitración de tirosina en el rango de peso molecular situado entre 44 y 60 kDa. Además, el análisis con el microscopio de láser confocal (CLSM) usando fluoróforos específicos para NO y SNOs o anticuerpos para GSNO y 3-nitrotirosina también muestran un incremento general de las RNS,

principalmente en los tejidos vasculares (Valderrama et al., 2007). Existen también estudios que usan aproximaciones indirectas mediante la aplicación exógena de donadores de NO y los efectos en plantas expuestas a estrés salino. Así, en los callos de caña (*Phragmites communis*) bajo un tratamiento con 200 nM NaCl, la adición de SNP (nitroprusiato sódico, un donador de NO) estimula la expresión de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática indicando que el NO sirve como una señal que induce la resistencia a la sal mediante el incremento de la proporción K⁺/Na⁺ (Zhao et al., 2004).

Es conocido que la exposición de las plantas a la salinidad induce a la formación de ROS, que están implicadas en mecanismos dañinos pero también en procesos de crecimiento celular. Hay estudios que indican que la respuesta antioxidante está bien correlacionada con el aumento de la sensibilidad y tolerancia de los cultivares a la salinidad (Vaidyanathan, 2003; Bandeoglu et al., 2004; Menezes-Benavente, 2004a; de Azevedo Neto et al., 2006; Singh et al., 2007; DaCosta & Huang, 2007; Bernstein et al., 2010). Sin embargo, se ha demostrado que las ROS están implicadas en los procesos de crecimiento (Rodríguez et al., 2002; Foreman et al., 2003, Schopfer & Liskay, 2006), y se ha propuesto que las ROS apoplásticas tienen un papel en la expansión celular mediante efectos sobre la pared celular (Frahry & Schopfer, 2001; Liskay et al., 2004).

La interacción entre Ca²⁺ y ROS se ha estudiado durante las respuestas de defensa, crecimiento y cierre estomático (Pei et al., 2000; Sagi & Fluhr, 2001; Foreman et al., 2003; Jiang & Zhang, 2003; Mori & Schroeder, 2004; Hu et al., 2007). Así se ha descrito que los canales de calcio se activan por el peróxido de hidrógeno lo que resulta en un incremento del Ca²⁺ citosólico (Pei et al., 2000). También se ha demostrado que la NADPH oxidasa produce ROS que activan a los canales de Ca²⁺ y así controla la expansión celular (Foreman et al., 2003). La actividad NADPH oxidasa puede ser sucesivamente modulada por el Ca²⁺ citosólico (Sagi & Fluhr, 2001). Se ha descrito que el descenso de las concentraciones de ROS en la zona de crecimiento de hojas de maíz contribuye a la inhibición del crecimiento favorecida por la sal (Rodríguez et al., 2004). Esto parece ser el resultado de una inhibición de la NADPH oxidasa inducida por la sal (Rodríguez et al., 2007). Como un intento de restablecer los niveles normales de ROS parece que en condiciones de salinidad se proporcionaron ROS a la zona de crecimiento de la hoja mediante oxidación de poliaminas por la poliamina oxidasa (Rodríguez et al., 2009).

5.2. Estrés hídrico

El estrés hídrico, frecuentemente causado por la sequía, también tiene un serio impacto sobre el desarrollo y el crecimiento de las plantas. Así, una baja accesibilidad al agua provoca limitaciones físicas, y el mecanismo típico es el cierre estomático para conservar el agua. Así, la vía de intercambio de agua, CO₂ y O₂ está también cerrada, lo que resulta en un descenso de la fotosíntesis. En este sentido, se sabe que el cierre de estomas inducido por el NO aumenta la respuesta de las plantas frente al estrés por sequía (García-Mata & Lamattina, 2001). En maíz, el tratamiento con 10% de polietilén glicol induce el estrés hídrico, lo que conduce a un incremento rápido del NO en el mesófilo de las hojas. La actividad NOS fue inducida extraordinariamente en la fracción microsomal y citosólica por el estrés hídrico, mostrando la fracción microsomal la actividad más alta. Este comportamiento fue acompañado por un aumento de las enzimas antioxidantes como la SOD, APX y GR (Sang et al., 2008).

El estrés hídrico provoca una sobreproducción de ROS, como el anión superóxido (O₂⁻), el peróxido de hidrogeno (H₂O₂), el oxígeno singlete y el radical hidroxilo (Smirnoff, 1993; Miller et al., 2010). Una acumulación excesiva de ROS aumenta el estrés oxidativo, provocando daño celular y desorden metabólico (Jaleel et al., 2009). Para hacer frente al estrés oxidativo causado por ROS, la planta ha desarrollado un conjunto de sistemas antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos, para mantener la homeostasis de ROS bajo condiciones de estrés. Así, la activación de los sistemas antioxidantes tendrá efectos beneficiosos sobre el comportamiento de la planta en condiciones de estrés hídrico, porque una suficiente capacidad de los mismos puede propiciar la eliminación del exceso de ROS (Sang et al., 2008).

5.3. Daño mecánico

El daño mecánico en plantas puede ser una consecuencia de diversos estreses ambientales como el viento, la arena, la lluvia o los herbívoros. En general, las plantas responden con la inducción de varios genes porque la herida abierta podría ser un sitio de infección potencial para los patógenos. Por tanto, la expresión de los genes de defensa en el sitio de la herida es una barrera contra los microorganismos oportunistas (Reymond et al., 2000; Schilmiller & Howe, 2005). En *A. thaliana* se ha descrito que el daño mecánico induce una acumulación rápida de NO que podría estar implicada en los

ajustes y respuestas de defensa asociados al ácido jasmónico (Huang et al., 2004). En hojas de guisante el daño mecánico provoca una acumulación de NO después de 4 h, y esto fue acompañado por una inducción general de las actividades NOS y GSNOR, y un incremento en el contenido de SNOs (Corpas et al., 2008). Sin embargo, el patrón de proteínas que sufren nitración de tirosina no pareció estar afectado.

5.4. Radiación UV

La radiación UV-B (280-320 nm) se ha incrementado como consecuencia de la destrucción de la capa de ozono, y esta radiación afecta claramente el crecimiento de las plantas reduce la fotosíntesis e induce un estrés oxidativo incrementando el daño al DNA. En *A. thaliana* un inhibidor de NOS (L-NAME) y un secuestrador de NO (PTIO) bloquearon parcialmente la inducción, por radiación UV-B, del gen de la chalcona sintasa implicada en la producción de chalconas, moléculas que participan en los mecanismos de defensa y en la producción de pigmentos protectores como son los flavonoides (Mackerness et al., 2001). En maíz, la radiación UV-B estimuló fuertemente la actividad NOS mientras se redujo la biomasa de la hoja y la actividad exo- y endo-glucanasa (An et al., 2005). Se observó que la apocinina (compuesto orgánico natural estructuralmente relacionado con vainilla y usado como un inhibidor de la NADPH oxidasa) reduce el daño oxidativo inducido por radiación UV-B porque reduce la destrucción de la clorofila causada por H₂O₂, lo que estaba correlacionado con la producción de NO mediante una actividad NOS (Tossi et al., 2009). En el caso de hojas de maíz, la radiación UV-B provocó un aumento en la concentración de ABA, H₂O₂ y NO en hojas, y este ABA parece ser requerido para la atenuación mediada por el NO de los efectos perjudiciales de este estrés. El pre-tratamiento con DPI (inhibidor de la NADPH oxidasa) y L-NAME (inhibidor de la NOS) bloqueó parcialmente la acumulación de NO. Por otra parte, la acumulación de NO endógeno en hojas de maíz en respuesta a la radiación UV-B es dependiente de ABA y está relacionada con la tolerancia a grandes dosis de radiación UV-B (Tossi et al., 2009).

5.5. Ozono

El ozono es un gas contaminante que entra en la hoja por vía estomática, y los efectos que genera dependen de su concentración y el tiempo de exposición. Así, a bajo nivel de exposición el ozono reduce la fotosíntesis y el crecimiento, y provoca una senescencia

prematura de la hoja en las plantas sensibles. Sin embargo, la exposición a altas concentraciones de ozono provoca la muerte celular con daños visibles en las hojas (Kangasjärvi et al., 2005). En plantas de *Arabidopsis*, el tratamiento con ozono induce la actividad NOS, y esta inducción es precedida por una acumulación de ácido salicílico seguida por la muerte celular. Además, el tratamiento con NO exógeno aumenta los niveles de producción de etileno inducida por el ozono (Rao & Davis, 2001). Estudios posteriores han mostrado que la acumulación de NO en hojas de *Arabidopsis* después del tratamiento con ozono puede inducir la muerte celular con una inducción concomitante de los genes implicados en la biosíntesis del ácido salicílico, además de otros genes relacionados con la defensa (Ahlfors et al., 2009). Por otra parte, un tratamiento severo con ozono causa una subida de ROS acompañado por una producción alta de NO y una reducción del contenido de los antioxidantes solubles ascorbato y glutatión. En esta situación, se ha visto una expresión reducida de genes implicados en la utilización del carbono y de las rutas energéticas y de señalización, lo que sugiere una ineficaz respuesta de defensa. Además, se observó un solapamiento entre los genes inducidos por el etileno y el ozono, y un solapamiento significativo entre los genes reprimidos por el tratamiento con ozono y metil jasmonato (Mahalingam et al., 2006).

5.6. Metales pesados

En plantas, algunos metales pesados y metaloides pueden ser tóxicos incluso a muy bajas concentraciones, siendo por esa razón elementos fitotóxicos (Corpas et al., 2010; Xiong et al., 2010; Rascio & Navari-Izzo, 2011). Así, podemos distinguir dos categorías de metales pesados: elementos esenciales requeridos para el normal crecimiento y el metabolismo como son Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni y Zn (micronutrientes); y elementos no esenciales ya que no cumplen ningún papel fisiológico conocido como son Cd, Hg, Pb o As. El cadmio (Cd) es uno de los contaminantes más abundantes en el suelo (Arasimowicz-Jelonek et al., 2011). Existen varios trabajos que muestran la participación de NO en condiciones de estrés por cadmio. Por ejemplo, en raíces de *Pisum sativum* y *Brassica juncea*, en presencia de 100 μM de Cd se observó una mayor producción de NO endógeno (Bartha et al., 2005). Estos datos contrastan con los resultados observados en hojas y raíces de *Pisum sativum* crecidas con 50 μM CdCl_2 , donde se observó una inhibición de crecimiento y daños oxidativos (Romero-Puertas et

al., 2002), y una drástica reducción del contenido de NO (Rodríguez-Serrano et al., 2006; Barroso et al., 2006). Además, el bajo contenido de NO en las hojas iba acompañado por una reducción de GSH, GSNO y la actividad GSNOR (Barroso et al., 2006).

El arsénico es un metaloide componente de un amplio rango de materiales que se han convertido en contaminantes ambientales importantes que pueden provocar problemas de salud a los humanos por su acumulación en los cultivos destinados a la alimentación o en aguas potables (Tripathi et al., 2007; Zhao et al., 2010). Bajo condiciones de estrés con arsénico las plantas sufren alteraciones a distintos niveles como el transporte y la absorción de elementos, el metabolismo y la expresión genética (Abercrombie et al., 2008; Verbruggen et al., 2009; Zhao et al., 2009). Existen datos que indican que el metabolismo de ROS puede estar implicado y puede causar un estrés oxidativo en presencia de As (Dwivedi et al., 2010). En plantas de *Arabidopsis* expuestas a 0,5 mM de arsenato se ha observado una reducción significativa de los parámetros de crecimiento. Estos cambios van acompañados por una alteración de las enzimas antioxidantes catalasa y glutatión reductasa y el metabolismo del NO, con un incremento significativo del contenido de NO, de la actividad GSNOR y la nitración de la tirosina de proteínas. En este caso, el arsenato parece provocar un estrés oxidativo y nitrosativo siendo las actividades glutatión reductasa y GSNO reductasa los componentes clave en el mecanismo de respuesta (Leterrier et al., 2010).

5.7. Alta iluminación

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

al estrés (Charron et al., 2008). La alta intensidad luminosa reduce el tamaño de los cloroplastos (Maxwell et al., 1999) y causa una disminución de aproximadamente un 60% de las proteínas totales solubles y del contenido de clorofila. La alta intensidad luminosa es un estrés responsable de la inhibición directa de la cadena de transporte de electrones en los cloroplastos, llevando a una generación de ROS en varios lugares: oxígeno singlete en el PSII, el radical superóxido en el PSI, y el peróxido de hidrógeno en el estroma del cloroplasto y también en peroxisomas por la ruta de la fotorespiración (Niyogi, 1999; Asada, 2006). Por consiguiente, las plantas están obligadas a hacer frente a la generación de ROS para mantener la homeostasis redox. Junto con la vías de detoxificación de ROS en cloroplastos, existen otros sistemas de defensa frente a las ROS en orgánulos como las mitocondrias y los peroxisomas, además de otros compartimentos celulares como son el citosol, el apoplasto y la pared celular que también requieren un control estricto de los niveles de ROS (Apel & Hirt, 2004; Gechev et al., 2006).

5.8. Alta temperatura

Las temperaturas altas (HT) son consideradas uno de los mayores estreses abióticos que afectan negativamente el crecimiento vegetativo y reproductor. En general, la HT puede generar un estrés térmico, que origina seguidamente la síntesis de una familia específica de proteínas conocidas como proteínas de choque térmico (HSPs) (Larkindale & Vierling, 2008). La HT también puede causar una sobreproducción de ROS que podrían estar implicadas en la provocación de respuestas de defensa contra temperaturas perjudiciales (Suzuki & Mittler, 2006; Volkov et al., 2006; Kotak et al., 2008; Locato et al., 2008).

El estrés por alta temperatura (HT) puede causar la senescencia de hojas, un proceso de degeneración interna programada que conlleva a la muerte del tejido. Un fenómeno típico de la senescencia de hojas es la pérdida de clorofila, un daño de la membrana y un declive progresivo de la capacidad fotosintética (Djanaguiraman et al., 2009). El estrés por HT daña directamente el aparato fotosintético y disminuye el ritmo fotosintético y la duración del suministro de asimilados (Prasad et al., 2008, 2009). A alta temperatura, la sobreexcitación de moléculas de clorofila conlleva a la formación de ROS. Así, el estrés por HT puede estimular la acumulación de ROS en cloroplastos,

particularmente cuando la capacidad antioxidante para detoxificar las ROS es baja. Las enzimas antioxidantes están implicadas en la eliminación de ROS durante el estrés por HT (Liu & Huang, 2000). Asimismo, se observó una bajada general de la actividad de las enzimas antioxidantes durante la senescencia de hojas propiciada por HT (Srivalli & Khanna-Chopra, 2004).

5.9. Baja temperatura

La baja temperatura (LT) es otro de los factores ambientales más importantes que afectan el crecimiento de la planta, limitan su distribución geográfica y reducen el rendimiento de algunos cultivos. La exposición de las plantas a bajas temperaturas induce cambios a nivel fisiológico y bioquímico. La LT es un factor ambiental que tiene una influencia significativa en el crecimiento de plantas afectando la fotosíntesis, la absorción de agua y de nutrientes. Muchos cultivos económicamente importantes, como son el algodón, el maíz, el pimiento, el arroz, la soja, el tomate, algunas frutas tropicales y subtropicales son sensibles a la baja temperatura lo que afecta su producción y calidad (Sharma et al., 2005). La influencia de este tipo de estrés ha sido estudiada a diferentes niveles, desde plantas completas hasta niveles moleculares. Sin embargo, dependiendo del tipo de plantas (anual, bianual, arbusto o árbol), la intensidad y duración de la exposición de las plantas a LT, las estrategias pueden cambiar. Así, se visto que la LT regula la expresión de muchos genes (Shinozaki et al., 2003) y existen cambios bioquímicos que afectan el nivel de un número de proteínas, lípidos y metabolitos incluyendo la acumulación de péptidos crioprotectores , síntesis de crioprotectores de bajo peso molecular como son la prolina y la rafinosa, proteínas de anticongelación, deshidrinas, enzimas secuestradoras de ROS y antioxidantes solubles (Thomashow, 1999; Sharma et al., 2005; Hannah et al., 2005; Renaut et al., 2006; Lütz, 2010).

OBJETIVOS
OBJECTIVES

Las funciones de las especies de oxígeno y nitrógeno reactivo (ROS y RNS) tanto en la fisiología como en el mecanismo de respuesta al estrés en las plantas son numerosas. Sin embargo, no existen datos experimentales que analicen sus implicaciones de forma global durante el crecimiento y el desarrollo. Nuestro grupo de la Estación Experimental del Zaidín viene realizando una investigación líder en el metabolismo de las ROS y las RNS desde hace bastantes años, aportando evidencias de las funciones de estos metabolitos en la fisiología de las plantas tanto en situaciones normales de crecimiento como en condiciones de estrés tanto abiótico como biótico. La presente tesis doctoral, utilizando plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) como modelo experimental que puedan usarse como referente de otras especies agrícolas debido a su gran importancia agronómica, se ha diseñado con la finalidad de integrar el metabolismo de las ROS y las RNS en los principales órganos (raíz, tallos y hojas) de pimiento, desde los primeros estadios del desarrollo hasta la producción de frutos, y en la respuesta a un estrés medioambiental provocado por la baja temperatura, habida cuenta que ésta afecta de forma especial en el cuajado y la maduración de los frutos. Así, mediante aproximaciones multidisciplinares (fisiológicas, bioquímicas, celulares y moleculares) se han establecido los siguientes objetivos:

1. Caracterización de las principales ROS y RNS, así como de los sistemas antioxidantes, tanto de tipo enzimático como no enzimático, a lo largo del desarrollo de las plantas de pimiento a nivel de raíces, tallo y hojas, incluyendo los primeros días de desarrollo post-germinativo hasta su desarrollo como planta adulta.
2. Análisis de la respuesta de las principales ROS y RNS, así como de los sistemas antioxidantes, tanto de tipo enzimático como no enzimático, en las plantas de pimiento expuestas a estrés medioambiental provocado por baja temperatura y su posterior periodo de aclimatación.
3. Puesta a punto de un método analítico que permita la identificación y cuantificación de S-nitrosoglutatión (GSNO) en tejidos vegetales de manera que pueda usarse como herramienta en el estudio del metabolismo de las RNS en plantas.

The roles of the reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) both in the physiology and the mechanism of response to stress of plants are diverse. Nevertheless, no experimental data on their overall involvement in growth and development are available thus far. Our research group is contributing to lead the investigation of the ROS and RNS metabolism during last decades, providing evidence of the role of these metabolites in the physiology of plants under normal growth conditions but also under both abiotic and biotic stress situations. Using pepper (*Capsicum annuum* L.) plants as an experimental model which might serve as a reference for other crop species due to its great agricultural relevance, this Thesis has been designed with the aim of integrating the ROS and RNS metabolism in the main organs of pepper plants (root, shoot, and leaves) from the early developmental stages till the fruit setting, and in the response to environmental stress promoted by low temperature, taking into account that this event greatly influences the ripening and quality of fruits. Thus, through multidisciplinary approaches (physiological, biochemical, cellular and molecular) the following objectives have been issued:

1. Characterization of the main ROS, RNS and both enzymatic and non-enzymatic antioxidants throughout the development of pepper plants at the root, shoot and foliar level, including the first post-germination developmental days until the adult plant.
2. Analysis of the response of the main ROS, RNS and both enzymatic and non-enzymatic antioxidants in pepper plants exposed to environmental stress promoted by low temperature and further acclimation period.
3. Setting up of an analytical method which allows the identification and the quantification of S-nitrosoglutathione (GSNO) in plant tissues in such a way that it could be used as a tool in the investigation of the RNS metabolism in plants.

MATERIAL Y MÉTODOS
MATERIALS AND METHODS

1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se han utilizado semillas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) de la empresa Syngenta Seeds S.A. (El Ejido, Almería). Las semillas de pimiento fueron desinfectadas por inmersión en lejía comercial (hipoclorito sódico) al 50% (v/v) durante 5 min. A continuación, se hicieron 3 lavados con agua destilada. Las semillas se germinaron en un medio MS (Murashige and Skoog), sin sacarosa, en placas de petri cuadradas de 12 x 12 cm a 30°C y en oscuridad durante 5 días. Posteriormente, se trasladaron a una cámara de crecimiento a una temperatura de 22°C/18°C (día / noche), y un fotoperiodo de 16h. Se empleó el siguiente material para los diversos experimentos:

- Experimentos de desarrollo post-germinativo (I): raíces, tallos y hojas de plántulas de 7, 10 y 14 días. Las plantas se cultivaron en un medio MS, sin sacarosa, a 30°C y en oscuridad durante 5 días y posteriormente se trasladaron a la cámara de crecimiento durante 2 días (plántulas de 7 días), 5 días (plántulas de 10 días) y 9 días (plántulas de 14 días).
- Experimentos de desarrollo post-germinativo (II): Asimismo se emplearon raíces, tallos, hojas, flores y frutos de 90 días de edad. Estas plantas se cultivaron de la misma manera que las anteriores. En la cámara de crecimiento estas plantas se mantuvieron 10 días más, posteriormente se trasladaron a un invernadero en unas macetas que contenían una mezcla de tierra/vermiculita (2/1) durante 15 días. Después se extrajeron las plántulas cuidadosamente del soporte de tierra/vermiculita para no dañar el sistema radicular y se trasplantaron a botes hidropónicos de 2,5 litros de capacidad (3 plántulas por bote). Se utilizó un sistema de cultivo en medios líquidos con aireación controlada de la solución nutritiva en cada unidad de cultivo. Las plántulas se mantuvieron en estas condiciones durante 60 días. Para poder recoger los frutos (verdes) usados en los ensayos las plantas se mantuvieron en las mismas condiciones 30 días más (120 días en total).
- Experimentos del efecto del frío en plántulas de pimiento: en este caso se usaron hojas de plántulas de pimiento cultivadas en medio MS, sin sacarosa, a 30°C y oscuridad durante 5 días, después se trasladaron a la cámara de crecimiento durante 10 días y posteriormente a un invernadero en macetas que contenían

tierra/vermiculita (2/1) durante 15 días. Estas plántulas se incubaron a una temperatura de 8°C durante distintos periodos de tiempo (1, 2 y 3 días).

2. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS PARA ENSAYOS BIOQUÍMICOS

Se procedió a la recogida del material separando la plántula en: raíz, tallo y hojas de 7, 10 y 14 días, además de la raíz, tallo, hoja, flor y fruto de plantas de 90 días. Cada parte fue pesada y destinada a realizar estudios bioquímicos según se describe más adelante. También se usaron hojas de plántulas de pimiento de 30 días control y estresadas con frío.

En el caso de las raíces, tallos y hojas de plántulas de pimiento de 7, 10 y 14 días, el material se extrajo en un tubo eppendorf (1,5 ml) con tampón en una relación 1:2 (p/v), y la homogeneización se llevó a cabo con un micro homogeneizador (Heidolph). Los distintos órganos de las plantas de 90 días y las hojas de las plántulas de 30 días se homogeneizaron en mortero con nitrógeno líquido hasta la obtención de un polvo fino al que se le añadió el tampón en la proporción 1:2 (p/v). La composición del tampón de homogeneización fue la siguiente: Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, glicerol 10% (v/v), EDTA 0,1 mM, Tritón X-100 0,2% (v/v), DTT 5 mM y PVPP 2% (p/v). Tras la homogeneización, los extractos se filtraron a través de dos capas de nylon y se centrifugaron a 27.000 g durante 25 min a 4°C en una centrífuga refrigerada Sorvall. Con el sobrenadante obtenido se realizaron los correspondientes ensayos.

En la preparación de extractos destinados a la medida de la actividad ascorbato peroxidasa, se incluyó ascorbato 2 mM en el tampón de homogeneización.

Los sobrenadantes destinados a la medida de actividad S-nitrosoglutation reductasa (GSNOR) se pasaron por una columna de SephadexTM G-25 DNA Grade (NAPTM 10 Columns, de GE Healthcare), para eliminar las moléculas de pequeño tamaño que pudieran interferir en la medida.

Para la medida de ascorbato y glutatión, los extractos se obtuvieron pulverizando 0,6 – 0,7 g de tejido con mortero y pistilo en presencia de nitrógeno líquido. Posteriormente se añadió 2,5 ml de metafosfórico 5% (p/v). El homogenado se centrifugó a 19.000 g

durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se usó para la determinación de ascorbato y glutatión.

3. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

3.1. Superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1)

Las isoenzimas se separaron por EGPA en condiciones nativas (ver apartado 5.1 de Material y Métodos). Una vez finalizada la electroforesis, se reveló la actividad SOD en los geles según se describe en Beauchamp y Fridovich (1971). Los geles se incubaron durante 20 minutos en oscuridad con una solución de NBT (nitroblue tetrazolium) 2,45 mM, preparada en tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8. Después se incubaron con una solución de riboflavina 28 μ M y TEMED 28 mM en el mismo tampón durante 15 minutos, en oscuridad. Finalmente se expusieron los geles a la luz en tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8 durante 10-15 minutos hasta visualizar las bandas acromáticas sobre el fondo azul del gel. Para identificar el tipo de las isoenzimas de la SOD, una vez realizada la electroforesis de los extractos crudos, los geles fueron incubados separadamente a 25°C durante 30 minutos en presencia o ausencia de 2 mM KCN o 5 mM H₂O₂ preparados en 50 mM fosfato-K, pH 7,8. Las isoformas CuZn-SODs son inhibidas por el CN⁻ y H₂O₂; las Fe-SODs son inhibidas por H₂O₂ pero no por CN⁻, sin embargo, las Mn-SODs son resistentes a ambos inhibidores (Corpas et al., 1998b).

3.2. NADPH oxidasa (NOX; EC 1.6.3.1. 1)

Las isoenzimas de la NADPH oxidasa fueron reveladas en geles según describe López-Huertas et al. (1999), y modificado por Sagi & Fluhr (2001). Los geles fueron incubados en oscuridad durante 20 minutos en una solución que contiene 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,2 mM NBT, 0,1 mM MgCl₂, y 1 mM CaCl₂. A esta mezcla de reacción se añadió el NADPH (0,2 mM) y se observó la aparición de bandas azules sobre un fondo acromático. La reacción se paró por inmersión de los geles en agua destilada. Como control se añadió diphenyleneiodonium (DPI) 50 μ M, un inhibidor específico de la generación del radical superóxido por este sistema enzimático.

3.3. Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6)

Se siguió el método espectrofotométrico descrito por Aebi (1984), basado en la medida de la disminución de la absorbancia a 240nm debida a la descomposición del H₂O₂ por efecto de la catalasa. En una cubeta de cuarzo se añadieron la muestra, convenientemente diluida, y la mezcla de reacción, protegida de la luz, y formada por tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,0 y H₂O₂ 10,6 mM hasta completar un volumen final de 1 ml en la cubeta. La reacción se registró durante 2 minutos a 25°C en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 640, frente a un blanco compuesto por agua destilada. La actividad enzimática, expresada en $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína se calculó a partir de la velocidad inicial de la reacción y de un coeficiente de extinción molar para el H₂O₂ de $39,58 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (del Río et al., 1977).

3.4. Ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11)

Para llevar a cabo el análisis de esta actividad se utilizaron muestras preparadas en un medio de extracción conteniendo ascorbato 2 mM, para prevenir la inactivación de la APX. La actividad se determinó según describe Hossain and Asada (1984b) midiendo a 290 nm la oxidación del ácido ascórbico durante un minuto. La mezcla de reacción contenía tampón Hepes-NaOH 50 mM, pH 7,6, ascorbato 0,2 mM, H₂O₂ 0,3mM y la muestra convenientemente diluida. La reacción en 1 ml de volumen final, se llevó a cabo a 25°C y se inició con la adición del H₂O₂. La actividad enzimática, expresada en nmoles de ácido ascórbico oxidado. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el ácido ascórbico de $2,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Hossain and Asada, 1984b). Se utilizaron tres controles, uno sin H₂O₂, otro sin ascorbato y otro sin muestra. Como control negativo de la reacción se utilizó un inhibidor de la APX. El p-cloromercurifenilsulfónico (pCMS).

3.5. Glutación reductasa (GR; EC 1.6.4.2)

Se empleó el método espectrofotómetro de Edwards et al. (1990), basado en la medida de la tasa de oxidación del NADPH a 340 nm durante 3 minutos, la cual es necesaria para transformar el glutatión oxidado (GSSG) en glutatión reducido (GSH). La reacción se llevó a cabo a 25°C en un volumen final de 1 ml que contenía tampón Hepes-NaOH 0,1 M, pH 7,8, EDTA 1mM, MgCl₂ 3 mM, GSSG 0,5 mM, NADPH 0,2 mM y 100 μl de muestra. Se utilizaron tres controles, uno sin muestra y sin GSSG, otro sin GSSG, y

otro sin muestra. La actividad enzimática expresada en nmoles de NADPH oxidado $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el NADPH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Jiménez et al., 1997).

3.6. Monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR; EC 1.6.5.4)

Este ensayo espectrofotométrico está basado en la medida de la disminución de la absorbancia a 340nm por la desaparición de NADH. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 977 μl que contenía tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, ascórbico 40 mM, ascorbato oxidasa 0,5 U, NADH 8 mM y 25 μl de muestra. Se utilizó un blanco de reacción compuesto por el tampón, la muestra y NADH, así como una reacción control sin muestra. En este último caso, se comprobó el sistema de generación del radical monodeshidroascorbato (MDA) midiendo en la mezcla de ácido ascórbico 1 mM y 0,5 U de ascorbato oxidasa, esto debía de dar una medida de $\text{DO} \cdot \text{min}^{-1} = 0.01-0.02$. La actividad enzimática expresada en nmoles NADH $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el NADH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.7. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH; EC 1.1.1.49)

Se determinó espectrofotométricamente, midiendo la reducción del NADP^+ a 340 nm según Corpas et al. (1998a). la reacción se llevo a cabo a 25°C en un volumen final de 1 ml que contenía tampón Hepes 50 mM, pH 7,6, MgCl_2 1 mM y NADP^+ 0,8 mM, iniciándose la reacción por adición de glucosa-6-fosfato (G6P) 5 mM.

En este ensayo, una miliunidad de actividad se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir un nmol de NADP^+ $\cdot \text{min}^{-1}$ a 25°C. Dado que en esta determinación se mide conjuntamente la G6PDG y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), al generar la primera el sustrato de la segunda, es necesario corregir los datos restando al valor medido en este ensayo el obtenido luego de medir la actividad 6PGDH (ver apartado 3.8.). El coeficiente de extinción molar para el NADPH es de $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.8. 6-Fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH; EC 1.1.1.44)

Para determinar esta actividad se utilizó un medio de reacción similar al usado para la actividad G6PDH, sustituyendo el sustrato anterior por el 6-fosfogluconato (6PG) 5 mM (Corpas et al., 1998a). Una miliunidad de actividad se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir un nmol de $\text{NADP}^+ \cdot \text{min}^{-1}$ a 25°C, siendo el coeficiente de extinción molar para el NADPH es de $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.9. Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP^+ (NADP-ICDH; EC 1.1.1.42)

Se midió espectrofotométricamente el incremento de absorbancia a 340 nm debido a la reducción del NADP^+ según describen Goldberg & Ellis (1983). La reacción se llevó a cabo a 25°C en un medio (1 ml) que contenía tampón Hepes 50 mM, pH 7,6, MgCl_2 1 mM y NADP^+ 0,8 mM, iniciándose la reacción con la adición de 2R,3S-isocitrato 2 mM. La actividad enzimática expresada en nmoles de NADPH $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el NADPH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Vigil, 1983).

3.10. Enzima málico dependiente de NADP (EM; EC 1.1.1.40)

Para determinar esta actividad se utilizó un medio de reacción similar al usado para la actividad G6PDH, sustituyendo el sustrato por el ácido L-málico 5 mM (Barroso et al., 1998), y siguiendo la tasa de reducción del NADP^+ en presencia de malato. La actividad enzimática, expresada en nmoles de NADPH $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el NADPH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Vigil, 1983).

3.11. Nitrosoglutation reductasa (GSNOR; EC 1.2.1.1)

La determinación de la actividad GSNOR se realizó mediante la monitorización de la oxidación del NADH a 340 nm (Sakamoto et al., 2002; Barroso et al., 2006). Para llevar a cabo el análisis de esta actividad, los homogenados obtenidos anteriormente se pasaron a través de columnas NAD-10 para eliminar el posible GSNO endógeno. Las columnas fueron equilibradas con 15 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,8; posteriormente, se cargó 1 ml de muestra y se recogieron 1,5 ml eluyendo con el mismo tampón anterior.

Para el análisis cinético, se incubaron 50-150 μl de muestra con 650 μl de tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8, 0,5 mM EDTA y NADH 0,2 mM. La reacción se inició añadiendo 100 μl de S-nitrosoglutation (GSNO) a la mezcla, obteniéndose una concentración final de 400 μM . la solución de GSNO se preparó de forma extemporánea manteniéndose en frío y protegida de la luz. La actividad se determinó a 25°C, y se expresa en nmol de NADH consumido por min por mg de proteínas, siendo el coeficiente de extinción molar para el NADH es de $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4. OTRAS DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

4.1. Contenido de ascorbato

Se empleó el método del dipiridil descrito por Okamura (1980), con algunas modificaciones. Para la determinación de ascórbico total (ascorbato más deshidroascorbato; ASC + DHA) se preparó una mezcla de reacción que contenía 125 μl de muestra anteriormente preparada como se indica en el apartado 2, 25 μl de trietanolamina 1,5 M, 150 μl de tampón fosfato sódico 150 mM, pH 7,4 y 75 μl de DTT 10 mM. Para permitir que todo el ácido deshidroascórbico se redujera, la mezcla se agitó y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para eliminar el DTT se añadió 75 μl de N-etilmaleimida (NEM) 0,5% (p/v) y se incubó de nuevo a temperatura ambiente durante al menos 30 segundos. Posteriormente se añadió 300 μl de ácido tricloroacético 10% (p/v), 300 μl ácido fosfórico 44% (v/v), 300 μl de 2,2'-dipiridyl 4% (p/v) diluido en etanol 70% (v/v) y FeCl_3 al 3% (p/v). Esta mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C y, posteriormente, se midió la absorbancia a 525 nm. Para la determinación de ácido ascórbico reducido se añadió lo mismo que para la determinación de ascorbato total salvo el DTT y la NEM.

Para determinar la concentración de ascórbico total y reducido se preparó una curva patrón de ácido ascórbico comercial (10-60 μM) disuelto en ácido metafosfórico 5% (p/v), y se le dio el mismo tratamiento que a las muestras. Para determinar la concentración de dehidroascórbico se le resta a la medida de ascórbico total la de ascorbato reducido.

4.2. Contenido de glutatión

Esta medida se basa en el ensayo de reciclado de Anderson (1985), el cual es un proceso enzimático sensible y específico. En dicha técnica, el GSH es oxidado por el ácido 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzol) (DTNB) dando GSSG con la formación estequiométrica de TNB. En estas condiciones el GSSG es reducido a GSH por la glutatión reductasa en presencia de NADPH (Fig. 3.1). La formación de TNB es medida a 412 nm y es proporcional a la suma de GSH y GSSG presente. El ensayo puede ser también medido a 3410 nm (desaparición del NADPH).

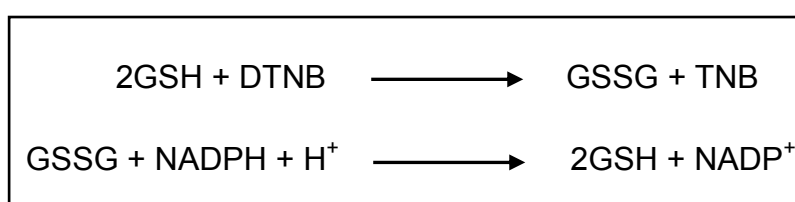


Fig. 3.1. Reacciones enzimáticas implicadas en la medida de glutatión.

Se preparó una curva patrón para el GSH y otra para el GSSG, en el rango de 0,5-5 μM , partiendo de soluciones madre con una concentración de 50 mM disueltas en ácido metafosfórico 5% (p/v) y que llevan el mismo tratamiento que las muestras.

La medida de GSSG requiere una previa derivatización de las muestras lo cual consiste en añadir 2 μl de 2-vinilpiridina en su forma monomérica (Fluka) y 6 μl de trietanolamina 1,5 M a 100 μl de muestra y posterior incubación durante una hora a temperatura ambiente. El mismo tratamiento se le da al blanco de muestra que, en lugar de muestra, lleva ácido metafosfórico 5% (p/v).

El siguiente tratamiento era común en las muestras destinadas a la medida de glutatión total y glutatión oxidado (derivatizadas). Para ello, se preparó una mezcla de reacción que contenía tampón fosfato sódico 143 mM, pH 7,5, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 6,3 mM, NADPH (0,248 mg/ml); a ello se añadió DTNB 6 mM y glutatión reductasa (266 U/ml), ambos diluidos en el tampón anterior; finalmente se incorporó la muestra.

4.3. Peróxido de hidrógeno

Se siguió el método de Frew et al. (1983), que se basa en la cuantificación del H_2O_2 a través de la oxidación de la 4-aminoantipirina catalizada por una peroxidasa. El ensayo

se llevó a cabo en un volumen de reacción de 1 ml que estaba compuesto por 400 µl de solución reactiva, 5 µl de muestra y 595 µl de agua Milli Q. Asimismo, el ensayo se llevó a cabo sobre una curva patrón de H₂O₂ para poder interpolar en ella los resultados de absorbancia de las muestras.

La solución reactiva estaba compuesta por fenol al 0,234% (p/v), 4-aminoantipirina al 0,1% (p/v), peroxidasa de rábano 20 nM, H₂O₂ 2,5 µM y tampón fosfato-K 0,1 M, pH 6,9. Esta solución se incubó con las muestras (o con las distintas concentraciones de H₂O₂ de la curva patrón) a temperatura ambiente durante 5 minutos, y a continuación se midió la absorbancia a 505 nm frente a un blanco formado por solución reactiva y agua Milli Q.

4.4. Detección de óxido nítrico (NO) por espectrofluorimetría

Se usaron extractos crudos de raíz, tallo y hojas de plántulas de pimiento de 7,10 y 14 días, además de hojas de plántulas de pimiento incubadas en frío (8°). A estos extractos se añadió el 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) en una concentración final de 10 µM. Las mezclas fueron incubadas a 37°C en oscuridad durante 2 h y la fluorescencia fue medida en un “QuantaMaster™ QM-4 fluorescent spectrophotometer (PTI® Photon Technology International, Lawrenceville, NJ, USA) utilizando como longitudes de onda de excitación y emisión 485 y 515 nm, respectivamente (Nakatsubo et al., 1998). Como controles de reacción las muestras fueron preincubadas durante 30 min con los siguientes compuestos: 1) cPTIO [2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-oxido] 1 mM, como secuestrador de NO; 2) L-NAME (N^G-nitro-L-Arg metil ester) 1mM, un análogo de la arginina que inhibe la actividad óxido nítrico sintasa (NOS) de mamíferos; 3) AG (aminoguanidina) 2 mM, otro inhibidor de la actividad NOS de mamíferos (Corpas et al., 2009); 4) Na-tungsteno 2 mM, inhibidor de la nitrato reductasa (Cantrel et al., 2011); 5) rotenona 1 µM, inhibidor de la cadena de transporte electrónica de la mitocondria (Møller, 2001); y 6) DFMO (DL-α-cloruro de difluorometilornitina hidratado) 2 mM, inhibidor de la biosíntesis de poliaminas mediante una inhibición selectiva e irreversible de la ornitina descarboxilasa (Yoda et al., 2006).

4.5. Peroxidación lipídica

Este parámetro se determinó midiendo la tasa de formación de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), empleando el malondialdehído (MDA) como compuesto de referencia (Buege & Aust, 1978). Todos los reactivos de este ensayo se prepararon en agua Milli-Q. Para el ensayo se añadieron 200 µl de muestra, convenientemente diluida, a 1 ml de la siguiente mezcla de reacción: ácido tricloroacético al 15% (p/v), ácido tiobarbitúrico al 0,375% (p/v) y ácido clorhídrico 0,25 N. Posteriormente, la mezcla se calentó durante 15 minutos a 95°C con agitación, se dejó enfriar y se centrifugó a 2.000 g durante 5 minutos. En el sobrenadante se efectuó la lectura de la densidad óptica a 535 nm. Los valores obtenidos se enfrentaron a una recta de calibración con distintas concentraciones de MDA (0,1-10 µM), para determinar la tasa de peroxidación lipídica de las muestras.

La detección de la peroxidación lipídica a nivel de tejidos se realizó usando el reactivo de Schiff que detecta los aldehídos originados a partir de los peróxidos lipídicos (Yamamoto et al., 2001). Se incubaron las hojas en el reactivo de Schiff durante una hora y posteriormente se descoloraron por inmersión en etanol hervido hasta la aparición de una coloración violeta indicando la presencia de peroxidación lipídica.

4.6. Concentración de proteínas

Se empleó el método de Bradford (1976), que permite determinar espectrofotométricamente el contenido de proteínas mediante la medida del complejo que éstas forman con el azul Coomassie. Se empleó el reactivo comercial de Bio-Rad “Protein Assay Dye Reagent”, y albúmina de suero bovino (BSA), fracción V; como proteína estándar para preparar la curva patrón de proteínas (0, 3, 6, 12 y 18 µg BSA). Se adicionaron 200 µl de reactivo Bio-Rad a 800 µl de un volumen compuesto por la muestra o BSA, convenientemente diluidas, y agua destilada, y se midió la absorbancia a 595 nm, de 5 a 15 minutos tras la adición del reactivo (período de estabilidad del complejo). Conocidos los valores de absorbancia, se elaboró una recta de regresión lineal con los datos de la curva patrón de albúmina y se calculó la concentración de proteínas interpolando los valores de absorbancia de las muestras.

5. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (EGPA)

5.1. EGPA en condiciones nativas

En la electroforesis nativa las proteínas se someten a migración sin desnaturalización. En esta situación, las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma. Además, en ciertos casos de mantienen las interacciones entre subunidades y entre proteínas, separándose los complejos. Se utilizó un equipo Mini-Protean III, de Bio Rad, donde se prepararon geles de 6,5 x 8 cm y 1,5 mm de grosor. Los geles se prepararon con una concentración de poliacrilamida del 10% (p/v) en tampón Tris-HCl 377 mM, pH 8,9. Estos geles se destinaron a la separación de las distintas isoformas de SODs y NADPH oxidasa. Los homogenados, preparados en glicerol al 10% (v/v), se cargaron directamente en el gel, añadiendo azul de bromofenol al 0,006% (p/v) a cada muestra. Se utilizó una intensidad de 15 mA por gel durante 30 minutos, y después de 25 mA hasta que el azul de bromofenol alcanzó prácticamente el final del gel. El tampón de electrodos utilizado fue glicina 38 mM, ajustado a pH 8,2 con el tampón de geles.

5.2. EGPA en condiciones desnaturalizantes (EGPA-SDS)

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

La electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes minimiza la agregación molecular y asegura la completa disociación de las proteínas en sus subunidades polipeptídicas, para este propósito se utiliza el SDS en combinación con un agente reductor DTT y calor.

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

Se prepararon geles de poliacrilamida a distintas concentraciones (10-15%, p/v), con un gel concentrador de poliacrilamida al 4% (p/v). Las muestras para electroforesis se prepararon en un tampón de carga Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, SDS 4% (p/v), glicerol 20% (v/v), azul de bromofenol 0,006% (p/v) y DTT 10 mM y se calentaron a 95°C durante 10 minutos para desnaturalizar las muestras. Después se cargaron en los geles, a los cuales se les aplicó un voltaje de 100 V durante 15-20 minutos, y después un voltaje de 200 V durante unos 45 minutos. El tampón de electrodos usado para el cátodo fue Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3, glicina 0,192 M y SDS 0.1% (p/v), y el tampón del ánodo de igual composición pero sin SDS.

5.3. Tinción de geles con azul Coomassie

Los geles se tiñeron con “Coomassie Brilliant Blue” R-250 al 0,1% (p/v), preparado en metanol al 50% (v/v) y ácido acético al 10% durante 30 minutos. Después se destiñeron con metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v), hasta que quedaron bandas azules sobre un fondo transparente.

5.4. Tinción con plata

Se utilizó la técnica descrita por Heukeshoven & Dernick (1985). Después de la electroforesis los geles se incubaron con etanol al 30% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) durante 3 horas para fijar las proteínas. A continuación, los geles se lavaron con agua desionizada 3 veces durante 5 minutos cada vez, y se incubaron con una solución reductora de ferricianuro potásico 1% (p/v) y tiosulfato de sodio al 1,6% (p/v) durante 15 minutos. Posteriormente, los geles se lavaron abundantemente hasta que desapareciese el color amarillento de los mismos y se incubaron en una solución de nitrato de plata 0,1% (p/v), en oscuridad, durante 30 minutos. El revelado se efectuó en

una solución de carbonato sódico 0,3 M y formaldehído 0,02% (v/v), hasta que aparecieron las bandas de proteínas. La reacción se detuvo añadiendo ácido acético al 3% (v/v).

6. TRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS (TÉCNICA DE WESTERN)

6.1 Transferencia de proteínas

Las proteínas separadas por EGPA-SDS se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF) de Millipore de 0,45 μm , utilizando un sistema de transferencia semiseco Trans-Blot SD de Bio-Rad. El tampón utilizado en la transferencia fue CAPS 10 mM, pH 11,0, con metanol al 10% (v/v). Debido a su naturaleza hidrofóbica, primero se activaron las membranas durante 15 segundos con metanol 100% (v/v), se lavaron 2 minutos con agua miliQ y posteriormente, se equilibraron con el tampón de transferencia. Se prepararon papeles Whatman cortados con las mismas medidas del gel, y estos papeles y los geles se equilibraron en el mismo tampón. La transferencia se llevó a cabo utilizando una intensidad de 1,5 mA/cm² de membrana durante 2 horas, según Corpas et al. (1998a).

6.2 Inmunodetección de proteínas por quimioluminiscencia

Para la detección de las proteínas transferidas a la membrana de PVDF se utilizó un método de quimioluminiscencia (Bunkelmann & Trelease, 1996), que se basa en la oxidación del luminol por el complejo peroxidasa de rábano-anti-IgG en presencia de H₂O₂, dando lugar a un compuesto intermediario que se estabiliza por la emisión de luz (Thorpe et al., 1985). La emisión de luz se potencia con 4-yodofenol, que actúa como transmisor de radicales de oxígeno al luminol.

Una vez concluida la transferencia de las proteínas, las membranas se lavaron con agua destilada. Para bloquear los sitios inespecíficos de unión de las inmunoglobulinas, las membranas se incubaron con leche en polvo desnatada al 1,5% (p/v), preparada en tampón TBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7,8, NaCl 0,18 M) durante 1,5-2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar las membranas, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente, en una dilución óptima, durante toda la noche a 4°C, o bien durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron con

TBS durante 40 minutos, cambiando el tampón cada 10 minutos, tras lo cual se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario, anti-IgG unida a peroxidasa de rábano. Las membranas se lavaron finalmente con TBS y se procedió a la detección de las proteínas por quimioluminiscencia. Para el revelado, las membranas se incubaron durante 2-4 minutos en oscuridad en 20 ml de un tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,6, NaCl 150 mM al que se le añadieron 8 mg de luminol, 200 µl de 4-yodofenol al 0,01% (solución de 10 mg/ml en DMSO) y 3,2 µl de H₂O₂ 30% (v/v). Las membranas se expusieron a una película autorradiográfica “Hyperfilm”, de Amersham Biosciences, en un accesorio para autorradiografía (Kodak). El tiempo de exposición variaba desde unos segundos hasta 20 minutos, según la intensidad luminosa obtenida en cada caso.

7. Microscopía láser confocal (CLSM)

En todos los ensayos que se describen a continuación sobre la detección de RNS y ROS en las muestras mediante el uso de CLSM, se realizaron cortes transversales entre 0,25 y 0,5 cm de longitud de raíces, tallos y hojas de plántulas de pimiento de 7, 10 y 14 días, así como de las hojas de las plántulas sometidas a estrés por baja temperatura (30-33 días de edad).

7.1. Detección histoquímica de óxido nítrico

Se siguió el método descrito por Corpas et al. (2008) utilizando el fluoróforo 4-aminometil-2',7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM DA, Calbiochem), un fluorocromo específico y sensible para NO. Este compuesto es permeable a la membrana plasmática y, una vez dentro de la célula, es hidrolizado por las esterasas citosolicas para dar DAF-FM, que no es permeable y queda “atrapado” en el interior de la célula. En presencia de NO y oxígeno, el DAF-FM, que es relativamente poco fluorescente, se convierte en su forma triazolica, que es foto-estable y muy fluorescente. De este modo, la fluorescencia emitida resulta ser directamente proporcional a la concentración de NO (Fig. 3.2).

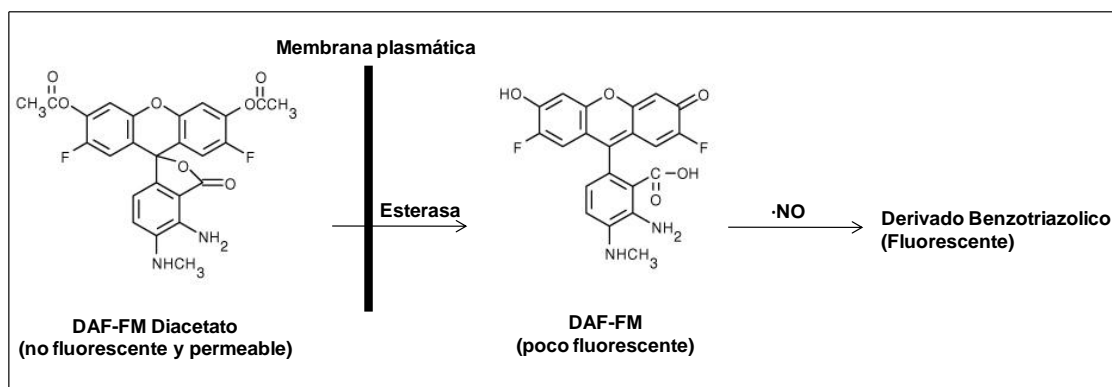


Fig. 3.2. Formación de derivados triazólicos a partir de DAF-FM en presencia de $\cdot\text{NO}$ y O_2 .

Se realizaron cortes de 0,5 cm de las tres partes (raíz, tallo y hoja) de plántulas de pimiento de 7, 10 y 14 días y también de las hojas de las plántulas sometidas a estrés por baja temperatura. Los cortes se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y oscuridad en la solución de DAF-2 DA. A continuación, se realizaron tres lavados de 15 minutos cada uno con el tampón Tris-HCl y seguidamente se incubaron en la solución de infiltración durante toda la noche a 4°C en oscuridad.

A continuación se procedió a polimerizar la solución de infiltración en moldes de 1,5 x 0,9 x 0,5 mm (Sorvall) en cuyo interior se introducían los cortes, la polimerización se conseguía adicionando 50 μl de persulfato amónico al 2% (p/v), obteniéndose de esta manera bloques de poliacrilamida que posteriormente serían cortados con el vibratomo (Leica UT 1000 ST). Se hicieron cortes de 80 ó 100 μm que se montaron sobre portas con la solución de tampón fosfato salino (PBS): glicerol (v/v) y se observaron directamente en el microscopio láser confocal (Leica TCS SL, Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Wetzlar, Germany) utilizando como λ de excitación y emisión 495 y 515nm, respectivamente.

7.2. Detección Histoquímica de peroxinitrito

Se siguió el método descrito por Chaki et al. (2009b) usando el 3'-(p-aminofenil)-fluoresceína (APF, Invitrogen). Este compuesto no es fluorescente hasta que reacciona con el anión peroxinitrito.

Se realizaron cortes de 0,5 cm de las tres partes (raíz, tallo y hoja) de plántulas de pimiento de 7, 10 y 14 días y también de las hojas de las plántulas sometidas a estrés por baja temperatura. Los cortes se incubaron con el APF durante una hora a

temperatura ambiente y oscuridad. A continuación se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno con el tampón Tris-HCl y se incubaron toda la noche con la solución de infiltración a 4°C y en oscuridad.

Se siguió el mismo proceso descrito en el apartado anterior utilizando como λ de excitación y emisión 495 y 515 nm, respectivamente.

7.3. Detección histoquímica de S-nitrosotioles totales (RSNOs)

Se siguió el método descrito por Valderrama et al. (2007) usando el fluoróforo Alexa flúor 488 Hg-link (Molecular probes). Alexa flúor 488 Hg-link es un compuesto de fenilmercurio que reacciona con el grupo tiol para formar uniones tiol estables (Fig. 3.3). Se usa para una detección directa de RSNOs en tejidos después de bloquear los grupos sulfídrico preincubando con N-etilmaleimida para evitar la formación de S-nitrosotioles durante el procesamiento.

Se realizaron cortes de 0,5 cm de las tres partes (raíz, tallo y hoja) de plántulas de pimiento de 7, 10 y 14 días y también de las hojas de las plántulas sometidas a estrés por baja temperatura. Los cortes se incubaron con N-etilmaleimida durante dos horas a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron tres lavados de 15 minutos cada uno con el tampón Tris-HCl, posteriormente se incubaron con β -mercaptoetanol durante 30 minutos, pasando ese tiempo se realizaron tres lavados de 15 minutos cada uno con el tampón Tris-HCl, y seguidamente se incubaron con el fluoróforo Alexa fluor 488 Hg-link durante una hora a temperatura ambiente en agitación y oscuridad. Por último, se realizaron tres lavados de 15 minutos cada uno con el tampón Tris-HCl y se incubaron toda la noche con la solución de infiltración a 4°C y oscuridad.

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

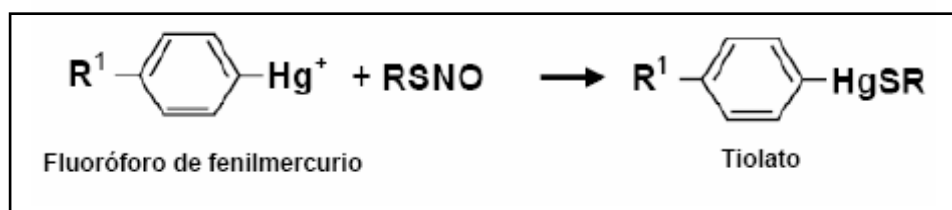


Fig. 3.3. Reacción de Alexa flúor 488 Hg-link con S-nitrosotioles.

7.4. Detección histoquímica del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

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

Se realizaron cortes de 0,5 cm de las tres partes (raíz, tallo y hoja) de plántulas de pimiento de 7, 10 y 14 días y también de las hojas de las plántulas sometidas a estrés por baja temperatura. Los cortes se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad en la solución de DHE. A continuación, se realizó un lavado de 20 minutos con el tampón Tris-HCl, y se incubaron con la solución de infiltración durante toda la noche a 4°C y oscuridad.

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

8. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DEL RNA

8.1. Extracción de RNA total

El aislamiento de RNA total de las muestras se llevó a cabo utilizando el reactivo comercial Trizol (GIBCOBRL, life Technologies), compuesto de una solución monofásica de fenol y de isotiocianato de guanidina (Chomczynski & Sacchi, 1987). Las plántulas se homogeneizaron en un mortero con nitrógeno líquido, pesándose el polvo obtenido y añadiendo inmediatamente el Trizol (1 ml por cada 100 mg de tejido). Después de incubarse durante 5 minutos a temperatura ambiente, se le añadió cloroformo (0,2 ml por ml de Trizol utilizado) y se agitó vigorosamente durante 15 segundos, volviéndose a incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 11.000 g durante 15 minutos a 4°C y se obtuvieron dos fases, una inferior, de fenol-cloroformo, y otra acuosa, superior, donde quedó el RNA. Esta fase acuosa se recuperó y se le añadió isopropanol puro (0,5 ml por cada ml de Trizol), incubándose durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se obtuvo el precipitado de RNA centrifugando a 11.000 g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol 75% (v/v), y se centrifugó a 7.500 g durante 5 minutos. Finalmente, se dejó

secar el precipitado durante unos minutos a temperatura ambiente, y se re suspendió en agua tratada con dietilpírocarbonato (DEPC) al 0,1 % (v/v).

8.2 Electroforesis en geles de agarosa

Para comprobar el estado del RNA y los productos de PCR, se realizaron de forma rutinaria electroforesis en geles de agarosa. En el primer caso se prepararon geles de agarosa (Serva) al 0,8% (p/v) en tampón TBE (Tris-HCl 45 mM pH 8.0, ácido bórico 45 mM y EDTA 1 mM). La agarosa se disolvió en tampón TBE con ayuda de un microondas y se dejó polimerizar, durante 30-45 min, antes de aplicar las muestras. Alícuotas de 1 µg de RNA de cada muestra se mezclaron con 2 µl de tampón de carga (glicerol 25% (v/v), EDTA-Na₂ 1 mM, pH 8, xileno-cianol 0,25% (p/v) y azul de bromofenol 0,25% (p/v)). El volumen final de carga se ajustó a 10 µl con agua Mili-Q tratada con DEPC. Las muestras se cargaron en el gel y se desarrolló la electroforesis en tampón TBE, a 100 V durante 30 minutos. Posteriormente y para el marcaje de las muestras en el gel, se incubó éste en un baño con bromuro de etidio (0,5 µg ml⁻¹ de agua) durante aproximadamente 15 minutos.

Para evitar la contaminación por RNAasas, todo el material necesario para la electroforesis (peine, soporte del gel y cubeta) se trató previamente con NaOH 50 mM durante 2 h y, posteriormente, se lavó con abundante agua Mili-Q tratada con DEPC.

El análisis de los productos de PCR se realizó en geles de agarosa del 0,8-2% (p/v) en tampón TBE. Un volumen de 15µl de cada muestra se mezcló con 3 µl de tampón de carga y se cargó en el gel. El desarrollo electroforético se efectuó en tampón TBE, a 100 V durante 30-120 minutos dependiendo de los casos. Como marcador de tamaño molecular, se empleó el “EZ Load™ 100bp PCR Molecular Ruler”, de BioRad. Como se explicó anteriormente, el gel fue incubado tras la electroforesis en un baño con bromuro de etidio (0,5 µg ml⁻¹ de agua) durante aproximadamente 15 minutos.

9. SÍNTESIS DE cDNA y PCR SEMICUANTITATIVA

9.1. Obtención de cDNA por transcripción inversa (RT)

La obtención del cDNA se realizó a partir del RNA total de plántulas de pimiento obtenido según se explica en el apartado (extracción de RNA total). Se partió de 2 µg de

RNA total, a los que se les añadió 1,6 µg de oligo-dT (de 23 pb). Se incubó a 70°C durante 10 minutos, y posteriormente se adicionaron los siguientes reactivos: dNTPs 1,5 mM, 0,03 U/µl de RNasin™ (inhibidor de RNasas, Finnzymes), tampón de la enzima (Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, MgCl₂ 5 mM, KCl 50 mM y DTT 2 mM) y 0,65 U/µl de transcriptasa inversa (AMV Reverse Transcriptase, Finnzymes), en un volumen final de 30 µl. La reacción se llevó a cabo incubando sucesivamente durante 40 minutos a 42°C, 5 minutos a 98°C, y otros 10 minutos a 4°C.

9.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Px2, de Thermo. Se realizó a partir de los cDNAs obtenidos por transcripción inversa, así como de los plásmidos para confirmar la clonación de los distintos fragmentos. La mezcla de reacción fue la siguiente: 25-20 ng de cDNA o de plásmido, dNTPs 0,25 mM, tampón de la enzima, a la concentración indicada por el fabricante, con MgCl₂ 1,5 mM, 0,125 U/µl de enzima DNA polimerasa (Ampli Taq Gold®, Roche), y 0,25-0,5 µM de cada cebador, en un volumen final de 20 µl.

9.3. PCR semicuantitativa

Para el estudio de la expresión de los genes de las enzimas catalasa, APX, GR, MDAR, G6PDH, 6PGDH, NADP-ICDH, Fe-SOD, Mn-SOD, CuZn-SOD y GSNOR se utilizó la técnica de PCR semicuantitativa (Marone et al., 2001). Esta técnica permite comparar la cantidad de un mRNA determinado entre muestras distintas, ya que si la reacción de PCR se detiene en aquella zona en la que la cantidad de DNA amplificado aún se encuentra en zona exponencial, la intensidad de las bandas amplificadas es proporcional a la cantidad inicial del cDNA en la muestra. Además es imprescindible el uso de un gen control (en nuestro caso hemos utilizado la actina), cuya expresión sea constitutiva y, por lo tanto, no varíe entre las distintas situaciones. Esto permite normalizar la intensidad de las bandas con respecto a este control interno, y minimizar, de esta forma, el error experimental.

Una vez obtenidos los cDNA de las distintas muestras, se midió su concentración y se hicieron diluciones de los mismos de forma que en todos ellos se dispusiera de la misma concentración inicial de cDNA total. Se puso a punto el número de ciclos en los cuales la cantidad de DNA amplificado por la polimerasa se encontrase en fase exponencial.

Para asegurarnos que todos los tubos de reacción contenían la misma cantidad de reactivos, y así partir de las mismas condiciones en cada uno de ellos, el procedimiento experimental fue el siguiente: a) se realizó una mezcla que contenía todos los reactivos menos los cDNA y los cebadores. De esta forma nos aseguramos de que en todos los tubos se partía de la misma cantidad de enzima; b) seguidamente, esta mezcla se repartió en los volúmenes necesarios para dos reacciones de PCR, y a cada tubo se le añadieron 60 ng del correspondiente cDNA, distribuyéndose este volumen, a su vez, en otros dos tubos. Así se aseguraba que en cada tubo tuviésemos la misma cantidad de cDNA; y c) una vez repartidos, a cada tubo se le añadieron sus cebadores correspondientes, bien los del gen control (actina) o bien los del gen problema.

Las reacciones se llevan a cabo de la siguiente forma: 30 ng de cDNA, dNTPs 0,25 mM, tampón de la enzima con MgCl₂ 2,5 mM, 0,5 U de enzima polimerasa (HotMaster TaqTM DNA Ploymerase, Eppendorf) y 0,5 μM de cada cebador, en un volumen final de reacción de 20 μl. El programa de PCR utilizado es el siguiente:

- 1) 94°C, 2 min
- 2) 94°C, 20 seg
55°C, 20 seg
65°C, 30 seg | x 28 ciclos
- 3) 65°C, 10 min

El número de ciclos y la temperatura de hibridación es variable según la pareja de cebadores utilizados. Los fragmentos obtenidos de cada PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) en tampón TBE. En la Tabla 3.1 se muestran los cebadores empleados para esta tesis.

10. DISEÑO Y SÍNTESIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA OBTENCIÓN DEL cDNA PARCIAL DE LA S-NITROSOGLUTATION REDUCTASA

En el transcurso de esta tesis se ha abordado la clonación del cDNA parcial de GSNOR de pimiento. Para el aislamiento del cDNA de GSNOR en pimiento se identificaron secuencias de plantas con cierto grado de identidad utilizando el programa BLAST del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Posteriormente se realizó un alineamiento entre dichas secuencias, utilizando el programa OMIGA 2 (Oxford Molecular), para localizar zonas conservadas interespecíficas, y diseñar oligonucleótidos a partir de esas zonas. Las secuencias alineadas fueron generalmente las de tomate, tabaco y patata. De las zonas conservadas encontradas se diseñaron los oligonucleótidos siguientes:

F-GSNOR-PP₁: 5'-CTTGACAAAGTATGTGTCC-3'

F-GSNOR-PP₂: 5'-AAGTCATTCGTTGCAAAGC-3'

R-GSNOR-PP₁: 5'-GTGAGTGTAGAACTTCTCC-3'

Una vez realizada las amplificaciones específicas de los fragmentos, el análisis por electroforesis de cada uno de los productos de la PCR mostró una única banda a partir del cDNA de plántula de pimiento de 10 días, la cual se purificó de los geles de agarosa, se clonó y se secuenció.

Los cebadores específicos de GSNOR en pimiento fueron los utilizados para los posteriores análisis de expresión mediante PCR semicuantitativa, según se indicó en el apartado 9.3.

Tabla. 3.1. Cebadores específicos utilizados en la PCR semicuantitativa, F, forward; R, reverse

Cebadores	Secuencias (5'–3')	Tamaño (bp)	Número de acceso
F-CAT	GATTTCTTCTCTTTCTCC		
R-CAT	CGATGTTCTTATTCAATACC	418	AF227952
F-APX	TGTGCTCCTCTTATGCTCC		
R-APX	CTCAAACCAGAACGCTCC	485	X81376
F-MnSOD	CATGCAGCTTCATCACCAGA		
R-MnSOD	ATAACAAGGCGCTTCAGCTC	314	AF036936
F-FeSOD	CATCACAGGACCTATGTCG		
R-FeSOD	GGTGTTTTCACTACAAGC	352	AY173123
F-CuZnSOD	TGTTAGTGGCACCATCCTCT		
R-CuZnSOD	GGCCGATAATACCACAAGCA	459	AF009734
F-GR	TTTGGTTTATGGAGCTGCC		
R-GR	CAGTGGGAGTTGCTTTCTG	509	AY547351
F-MDAR	ATGGAGAGGGTGAAGTCCG		
R-MDAR	GCCTTGACAGCCTGCTCAG	279	AY652702
F-G6PDH	ATTTGTTGGTGTGCGTT		
R-G6PDH	CATTGATTGAAGGACCT	255	AY652703
F-6PGDH	TGTAGTTATGCTCAGGGGATG		
R-6PGDH	CTCTCATATGTGTGAGCCCC	374	AY532646
F-ICDH	TTGTGCCAGAAGGTACAGAC		
R-ICDH	CAGATTCCAGCCTCCTCGTA	418	AY572426
F-ACT	ACTCTTAATCAATCCCTCC		
R-ACT	GCACTGTATGACTGACACC	573	AY572427

Para el aislamiento del cDNA completo de la GSNOR de plántulas de pimiento se diseñaron cebadores degenerados a partir de la secuencia de cDNA en *Solanum tuberosum*, *Lycopersicon esculentum* y *Nicotiana tabacum* (Fig. 3.4). Mediante PCR se amplificaron, clonaron y secuenciaron los distintos fragmentos. Los fragmentos

obtenidos se superponían entre sí dando lugar a la secuencia incompleta de la GSNOR de pimiento.

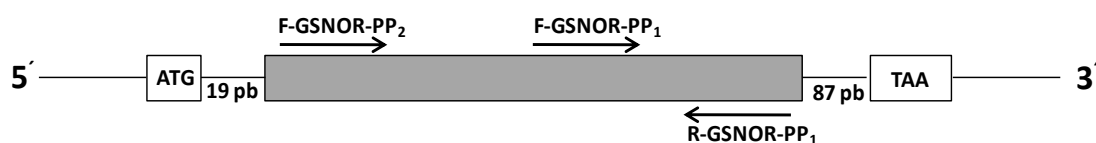


Fig. 3.4. Cebadores diseñados para el aislamiento de GSNOR a partir del alineamiento entre secuencias de cDNA de *Solanum tuberosum*, *Lycopersicon esculentum* y *Nicotiana tabacum*. ATG: codón de iniciación, TAA: codón stop, pb: pares de bases.

11. TRANSFORMACIÓN Y AISLAMIENTO DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

11.1. Purificación de fragmentos de cDNA y ligación en vectores de clonación

Los fragmentos de cDNA se purificaron a partir de geles de agarosa. Para recuperar los fragmentos de cDNA de los geles se utilizó el método comercial “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” de Amersham Biosciences, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las bandas del gel extraídas se solubilizaron a 60°C durante 10 minutos con un agente caotrópico que desnatura las proteínas, disuelve la agarosa y provoca la unión del DNA a una matriz de fibra de vidrio. Esta mezcla se cargó en una columna proporcionada por el *kit* y, tras una breve centrifugación se añadió una solución de lavado que contenía tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM y etanol 80% (v/v) para arrastrar las proteínas y las sales contaminantes mediante otra breve centrifugación. El proceso se completaba con un último paso de elución del correspondiente DNA con agua.

Después de la purificación de los fragmentos de DNA, éstos se clonaron en el vector pGEM[®]-T Easy, de Promega, usando el siguiente protocolo: 50 ng del plásmido, 3 U de la enzima T4 DNA ligasa y la cantidad que indica el protocolo de la enzima, en un volumen de 10 µl de mezcla de reacción, e incubándose a temperatura ambiente durante 1h.

11.2. Preparación de células competentes de *Escherichia coli*

El método utilizado fue el descrito por Hanahan (1983). Se cultivaron bacterias *E. coli* DH5 α en 5 ml de medio LB [Luria-Bertani: Triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v), pH 7,0] a 37°C durante 12-15h. Se adicionaron 4 ml de este cultivo a 100 ml de medio LB suplementado con MgSO₄ 10 mM. Se incubó a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 0,4-0,6 (fase logarítmica), y entonces se detuvo el crecimiento del cultivo colocándose en hielo durante 15 minutos. Las bacterias se recuperaron por centrifugación a 4.300 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en 32 ml de una solución compuesta por RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, CaCl₂ 10,2 mM, acetato potásico 30 mM y glicerol 12% (v/v), pH 5,8, preenfriada a 4°C, incubándose en hielo durante 15 minutos. Se volvió a centrifugar a 4.300g durante 10 minutos a 4°C, y el precipitado se resuspendió en otra solución compuesta por CAPS 100 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 5 y glicerol 12%(v/v), 6,8, preenfriada también a 4°C. Se hicieron alícuotas de las bacterias y se guardaron a -80°C.

11.3. Transformación de bacterias competentes

Se usó el método descrito por Lucotte & Baneyx (1993). Las bacterias de *E. coli* DH5 α , mantenidas a -80°C, se descongelaron en hielo, tras lo cual se añadieron 50-100 ng de los plásmidos de interés, y se mantuvieron durante 30 minutos en hielo. Posteriormente, se calentaron a 42°C durante 90 s, colocándose de nuevo en hielo durante 5 minutos. A esta mezcla se le adicionaron 1 ml de medio LB (dil. 1:5) y se incubó a 37°C durante 1h, con agitación. La suspensión de bacterias se sembró en placas de Petri conteniendo un medio comercial (S-GALTM/LB Agar Blend, Sigma) compuesto por LB (dil. 1:5), agar 1,2% (p/v), S-GalTM (3,4-ciclohexenoesculetina- β -D-galactopiranosido) 0,03% (p/v), citrato de amonio férrico 0,05% (p/v) e IPTG (1-isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) 0,003% (p/v), suplementando con 50 μ g/ml de ampicilina, y se incubaron durante toda la noche a 37°C.

11.4. Aislamiento de plásmidos recombinantes

Se seleccionaron las colonias individuales crecidas en las placas a partir de las cuales se iniciaron cultivos en 3 ml de LB (dil. 1:5) con ampicilina (100 μ g/ml), que se incubaron a 37°C en un agitador orbital a 190 rpm. Cuando los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ de

0,6 (12-16 h), se centrifugaron a 10.000 g durante 5 minutos para precipitar las bacterias, y se procedió a la extracción del DNA plasmídico utilizando el método comercial “Wizard Plus SV Miniprep” de promega

Todas las operaciones fueron realizadas a temperatura ambiente. Las bacterias se resuspendieron en 250 µl de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM, Rnasa A 100 µg/ml. Después, se les añadió 250 µl de solución de lisis [NaOH 0,2M y SDS 1% (p/v)] y se incubaron durante 1-5 minutos. Seguidamente, se le añadió 10 µl de una solución de proteasas, incubándose durante 5 minutos, tras los cuales, se le añadió 350 µl de solución de neutralización (acetato potásico 0,759 M, guanidina-HCl 4,09 M y ácido acético glacial 2,12 M, pH 4,2). Esta mezcla se centrifugó a 14.000 g durante 10 minutos, y el sobrenadante se pasó por la columna especificada en el método comercial, de forma que el DNA quedó fijado a la resina de la misma. Se centrifugó a 14.000 g durante 1 minuto, y posteriormente se le añadieron 750 µl de una solución de lavado [acetato potásico 60 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, etanol 60% (v/v)], volviéndose de nuevo a centrifugar a 14.000 g durante 1 minuto. Se volvió a lavar de nuevo la columna con 250 µl de solución de lavado, y se centrifugó durante 2 minutos en las mismas condiciones anteriores. Finalmente, el DNA se eluyó de la columna añadiendo 100 µl de agua a la misma y centrifugando a 14.000 g durante 1 minuto.

12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis comparativo de los diferentes valores obtenidos en los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral se empleó la t-Student.

RESULTADOS

RESULTS

1. METABOLISMO DE ROS Y RNS DURANTE EL DESARROLLO POST-GERMINATIVO DE PLÁNTULAS DE PIMINETO

La germinación y el desarrollo post-germinativo son etapas clave para el establecimiento de una planta en los que están implicados diversos procesos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares. Por otro lado, se ha demostrado que ciertas especies de oxígeno y nitrógeno reactivo (*ROS* y *RNS*) participan como moléculas señal en procesos fisiológicos y fitopatológicos. Para llevar a cabo este trabajo se emplearon plántulas de pimiento en distintos estados de desarrollo (7, 10, 14 y 90 días) y se analizaron los principales órganos (raíz, tallo y hoja) (Fig. 4.1).

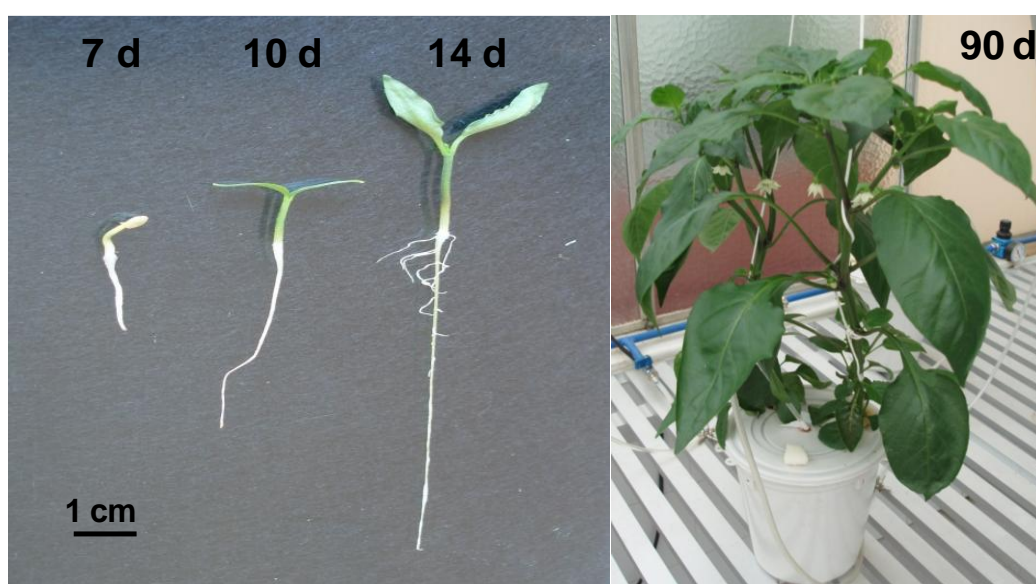


Fig. 4.1. Plántulas de pimiento de 7, 10, 14 días crecidas *in vitro* en medio MS y plantas adultas de 90 días (en floración) cultivadas en medios hidropónico.

1.1. Metabolismo de Especies de Oxígeno Reactivo (ROS)

1.1.1 Antioxidantes no enzimáticos

Se estudió el contenido de GSH y ascorbato en los distintos órganos de plantas de pimiento de 90 días (Tabla 4.1). Se observó en la tabla que los mayores valores se obtuvieron en hoja y fruto. Por lo general se observó también que, excepto en tallo, en el resto de órganos, el ascorbato se encontraba fundamentalmente en la forma reducida (ASC).

Tabla 4.1. Contenido en ascorbato y glutatión en extractos de diferentes órganos de plantas de pimiento de 90 días. Los valores son la media de al menos 3 experimentos diferentes \pm el error estándar de la media (SEM). PF: peso fresco.

	Ascorbato ($\mu\text{g/g}$ PF)		Deshidroascorbato ($\mu\text{g/g}$ PF)		Glutatión total ($\mu\text{g/g}$ PF)		ASC / DHA
Raíz	15,74	3,39	9,69	3,95	0,34	0,01	1,624
Tallo	24,12	1,92	36,69	5,68	0,65	0,04	0,657
Hoja	490,7	107,0	47,82	7,36	2,30	0,21	10,26
Flor	38,71	3,28	17,09	8,89	0,79	0,03	2,264
Fruto	245,3	15,4	58,31	25,31	1,38	0,16	4,205

1.1.2. Antioxidantes enzimáticos

1.1.2.1. Superóxido dismutasa (SOD):

Se comenzó estudiando el patrón isoenzimático de la SOD en los distintos órganos de las plantas de pimiento. Para ello, se llevó a cabo el análisis de la actividad SOD por PAGE nativa en raíz, tallo y hoja de plántulas de pimiento de 14 días. Dicho estudio mostró la presencia de 4 isoenzimas de la SOD que, en base al uso de inhibidores, fueron identificadas como una Mn-SOD, una Fe-SOD y dos CuZn-SODs, que se denominaron CuZn-SOD I y CuZn-SOD II según su creciente movilidad en el gel (Fig. 4.2). En las muestras analizadas se observó, sobre todo, una mayor intensidad en el patrón de las CuZn-SODs en tallos y hojas en relación con la actividad detectada en raíces.

1.1.2.2 Catalasa

Se midió la actividad catalasa tanto en plántulas de 7, 10 y 14 días (Fig. 4.3A) así como en plantas adultas de 90 días (Fig. 4.3B). Se observó una mayor actividad catalasa en tallos y hojas en los primeros días de desarrollo. Sin embargo, en las plantas adultas se observó mayor actividad catalasa en raíz, tallo y frutos verdes.

Fig. 4.2. Actividad SOD en extractos de raíz, tallo y hoja de plántulas de pimiento de 14 días. Las proteínas (20 µg) fueron separadas por PAGE nativa (acrilamida al 10%). Se muestra un experimento representativo de los realizados en nuestro estudio

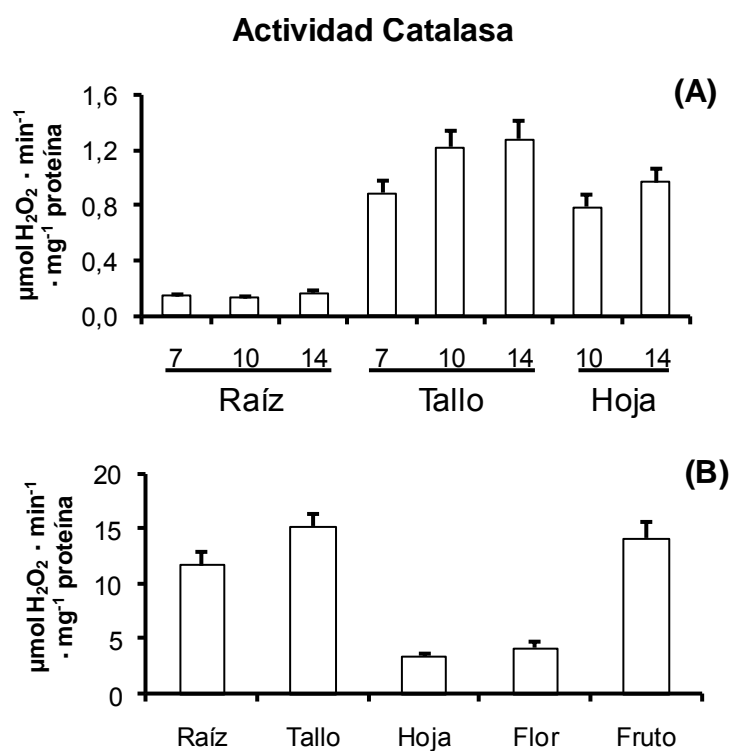
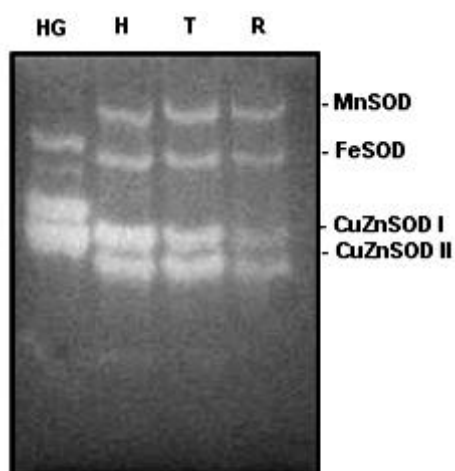


Fig. 4.3. Actividad catalasa en extractos de distintos órganos de plántulas de pimiento de 7, 10 y 14 días (A) y de plantas adultas (B) de pimiento. Los valores son la media de, al menos, 3 experimentos diferentes ± el error estándar de la media (SEM).

1.1.2.3 Enzimas del ciclo ascorbato-glutation:

Las actividades de las enzimas del ciclo ascorbato-glutation, que incluyen la APX, la MDAR y la GR fueron analizadas en los distintos órganos de plántulas de pimiento de 7, 10 y 14 días (Fig. 4.4) y en plantas adultas (Fig. 4.5).

A diferencia de la catalasa, en las plántulas de pimiento de 7, 10 y 14 días se detectó una mayor actividad APX en la raíz de, aproximadamente, dos o más veces superior a la actividad observada en los otros órganos (tallos y hojas) (Fig. 4.4A). La raíz de plántulas de 10 días fue el órgano donde más actividad MDAR se observó, siendo en las hojas de plántulas de 10 días donde menor actividad se determinó (Fig. 4.4B). También fue la raíz el órgano donde más actividad GR se obtuvo, seguido por el tallo y la hoja (Fig. 4.4C).

En plantas adultas la mayor actividad APX se detectó igualmente en la raíz, representando dos o más veces lo observado en los otros órganos. Los órganos que menos actividad mostraron fueron, en orden decreciente, flor, fruto, hoja y tallo, no observándose diferencias notables entre los tres últimos órganos (Fig. 4.5A). Por otro lado, el tallo fue el órgano donde mayor actividad MDAR se encontró en las plantas adultas de pimiento, seguido de raíz, flor y fruto, siendo la hoja el órgano que mostró menor actividad (Fig. 4.5B). Por último, con respecto a la actividad GR, fue también el tallo donde se obtuvo el mayor valor, seguido de flores, frutos, raíces y, por último, hojas (Fig. 4.5C).

1.1.2.4 Deshidrogenasas dependientes de NADP

La actividad de las principales deshidrogenasas dependientes de NADP se midió en los distintos órganos de plántulas de 7, 10 y 14 días (Fig. 4.6) y de plantas adultas de pimiento (Fig. 4.7).

En plántulas de pimiento de 7, 10 y 14 días, la mayor actividad G6PDH se observó en raíz y tallo y la menor actividad en la hoja (Fig. 4.6A). Con respecto a la 6PGDH, el órgano con mayor actividad fue la raíz, seguido del tallo, siendo las hojas las que menor actividad mostraban (Fig. 4.6B). En el caso de la actividad NADP-ICDH, la mayor actividad se detectó en las raíces de plántulas de 7 días, comprobándose que era dos veces mayor que la de la raíz de 10 días y 5 veces más mayor que la raíz de

14 días. Por lo contrario en las hojas se observó muy baja actividad (Fig. 4.6C). La actividad NADP-ME más alta fue la medida en raíz de plántulas de 7 días que fue dos veces mayor que la actividad observada en raíz de 10 y 14 días. La hoja fue el órgano con menos actividad NADP-EM observada (Fig. 4.6D).

En plantas adultas la mayor actividad G6PDH se detectó en el tallo. Los órganos que menor actividad mostraron fueron raíz, hoja y flor, si bien estos últimos órganos no mostraron diferencias significativas (Fig. 4.7A). Por otro lado, raíz y tallo fueron los órganos donde se encontró una actividad 6PGDH más alta seguidos del fruto y la hoja, siendo la flor el órgano con menor actividad detectada (Fig. 4.7B). La NADP-ICDH mostró un patrón similar a la 6PGDH. Así, en la raíz y el tallo es donde este sistema enzimático mostró mayores valores de actividad, seguido de la hoja y del fruto (Fig. 4.7C). Por último la actividad NADP-EM, fue en la hoja donde mayores valores se oLTuvieron, seguido de la raíz, el tallo y, por último, la flor y el fruto con valores similares (Fig. 4.7D).

1.1.3. Expresión de mRNA de genes antioxidantes

Mediante el empleo de oligonucleótidos específicos de las enzimas antioxidantes catalasa, SOD (Mn-SOD, Fe-SOD, CuZn-SODs), APX, MDAR y GR de pimiento, se analizó la expresión de los respectivos genes en plántulas de 7, 10 y 14 días además de los distintos órganos de plantas adultas (Fig. 4.8). En las muestras analizadas no se observaron cambios significativos en la expresión de la catalasa, excepto en la raíz de plantas adultas donde la expresión de la catalasa fue muy baja. Tampoco se observaron cambios significativos en la expresión de las distintas isoformas de la SOD, tanto la Mn-SOD como la Fe-SOD y la CuZn-SOD. Con respecto a la APX, igualmente no se detectaron cambios significativos en la expresión del gen analizado. En el caso de la MDAR, se detectó una inducción del gen estudiado en las hojas, la flor y los frutos. La expresión del gen de la GR, también parece prácticamente la misma para todos los órganos, excepto en las raíces y en las plántulas de 14 días, que mostraron bajos niveles de expresión.

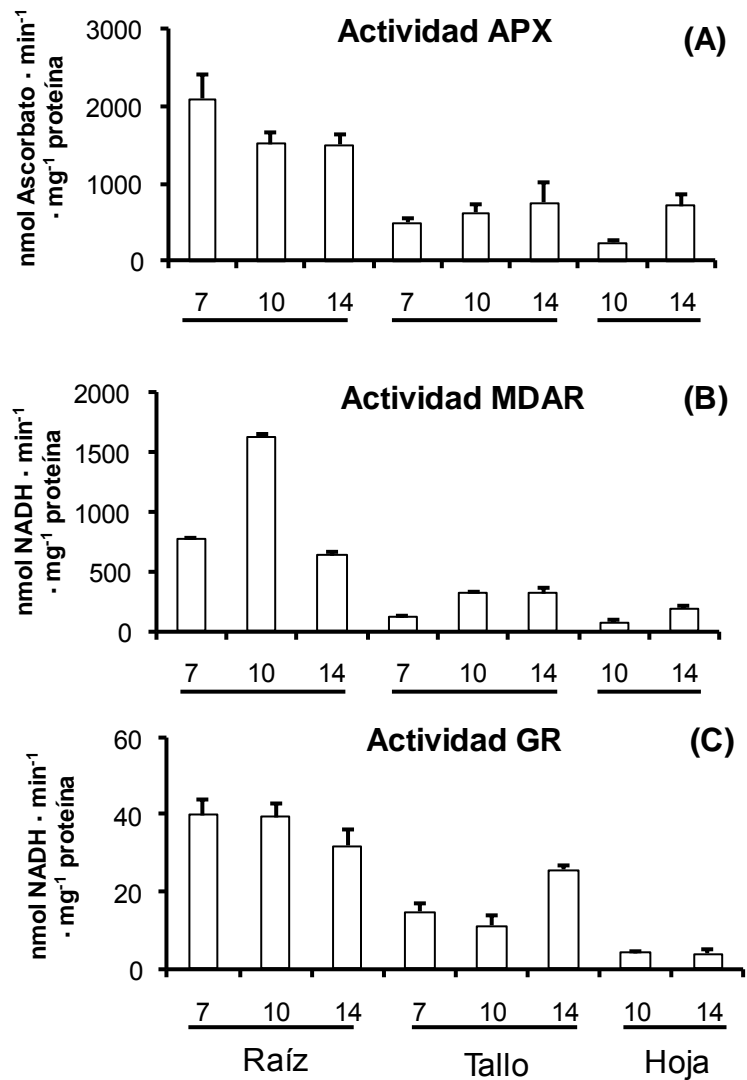


Fig. 4.4. Actividad de las enzimas del ciclo ascorbato-glutación en extractos de raíz, tallo y hoja de plántulas de pimienta de 7, 10 y 14 días. (A) APX, ascorbato peroxidasa; (B) MDAR, monodeshidroascorbato reductasa; (C) GR, glutación reductasa. Los valores son la media de, al menos, 3 experimentos diferentes \pm el error estándar de la media (SEM).

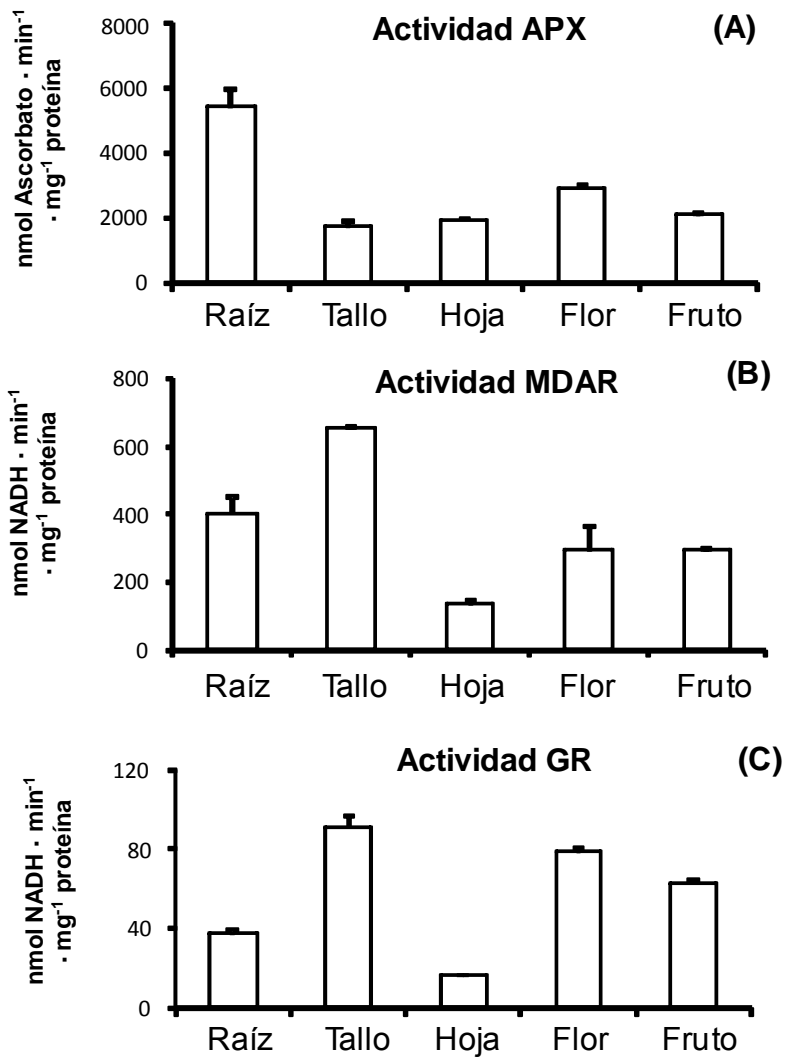


Fig. 4.5. Actividad de las enzimas del ciclo ascorbato-glutación en extractos de raíz, tallo, hoja, flor y fruto de plantas de pimienta de 90 días. (A) APX, ascorbato peroxidasa; (B) MDAR, monodeshidroascorbato reductasa; (C) GR, glutación reductasa. Los valores son la media de, al menos, 3 experimentos diferentes \pm el error estándar de la media (SEM).

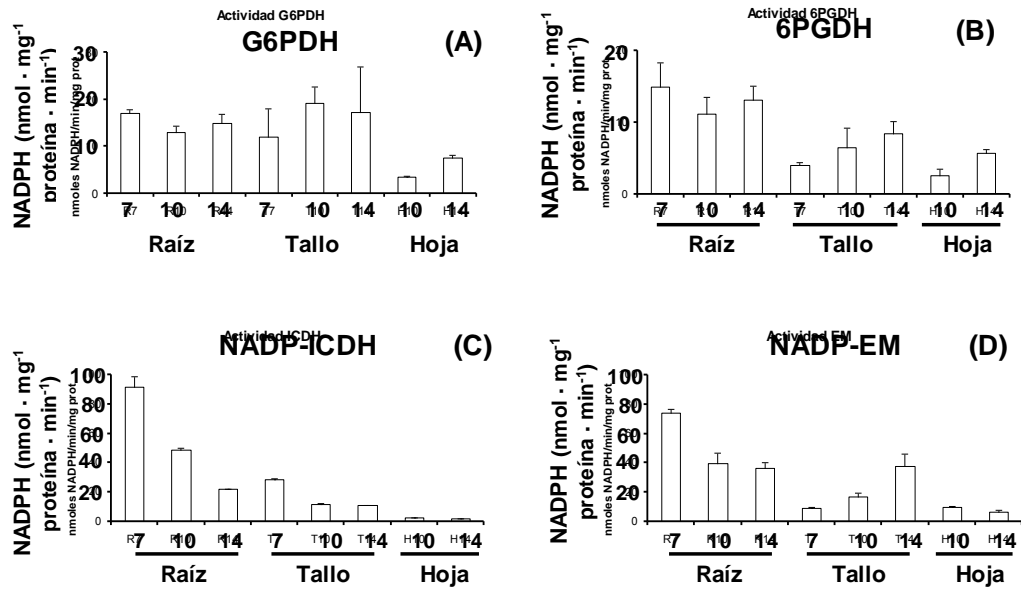


Fig. 4.6. Actividad de las deshidrogenasas dependientes de NADP en extractos de raíz, tallo y hoja de plántulas de pimiento de 7, 10 y 14 días. (A) G6PDH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; (B) 6PGDH, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; (C) NADP-ICDH, isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP; (D) EM, enzima málico dependiente de NADP. Los valores son la media de, al menos, 3 experimentos diferentes \pm el error estándar de la media.

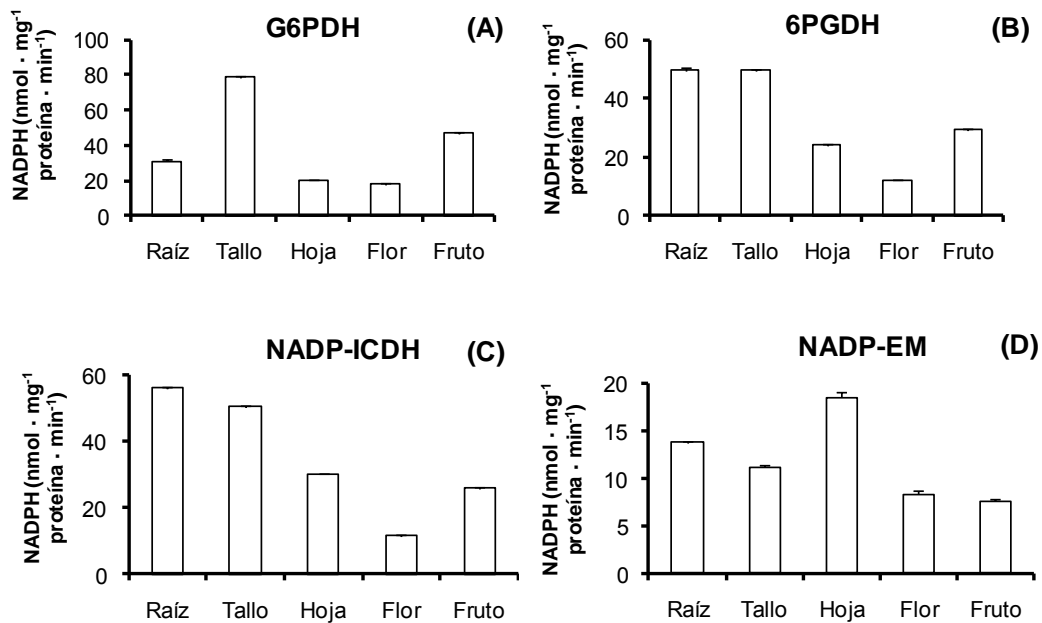


Fig. 4.7. Actividad de las deshidrogenasas dependientes de NADP en extractos de raíz, tallo, hoja, flor y fruto de plantas de pimiento de 90 días. (A) G6PDH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; (B) 6PGDH, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; (C) NADP-ICDH, isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP; (D) EM, enzima málico dependiente de NADP. Los valores son la media de, al menos, 3 experimentos diferentes \pm el error estándar de la media (SEM).

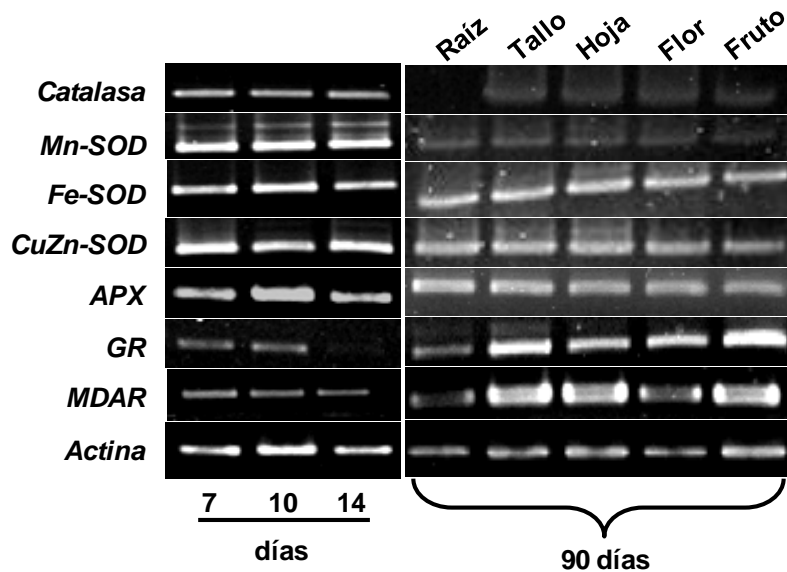


Fig. 4.8. Análisis de la expresión de mRNA de las enzimas antioxidantes catalasa, superóxido dismutasa (Mn-SOD, Fe-SOD, CuZn-SOD), ascorbato peroxidasa (APX), monodeshidroascorbato reductasa (MDAR) y glutatión reductasa (GR) en plántulas de pimienta de 7, 10 y 14 días y en distintos órganos de plantas adultas. La RT-PCR semicuantitativa se realizó sobre el RNA total aislado de plántulas de pimienta y de distintos órganos de plantas adultas. Los resultados mostrados son representativos de, al menos, tres experimentos independientes.

1.2. Metabolismo de Especies de Nitrógeno Reactivo (RNS)

1.2.1. Contenido en NO

Se determinó el contenido de NO endógeno en extractos de distintos órganos de plántulas de pimienta usando el compuesto DAF-2. En los primeros días de desarrollo de las plántulas de pimienta se observó un mayor contenido de NO en los tallos de 14 y de 10 días, que fue casi dos veces superior a los valores determinados en las raíces de 7 y 14 días. Las hojas de 10 y 14 y el tallo de 7 días fueron los órganos donde se observó menor contenido en NO (Fig. 4.9).

En plantas adultas, el mayor contenido en NO se observó en las hojas, y valores que fueron alrededor de un 33% menos en la flor y un 50% en raíz. Sin embargo los órganos con menos contenido en NO fueron el tallo y el fruto, este último órgano donde se obtuvieron valores casi indetectables (Fig. 4.10).

1.2.2. S-nitrosoglutation reductasa (GSNOR)

Se determinó la actividad GSNOR en los distintos órganos de plántulas de pimiento en los primeros días de desarrollo y de plantas adultas (Fig. 4.11). En los primeros días de desarrollo se observó una mayor actividad GSNOR en la raíz de 7 días, seguida por la raíz de 10 días y la hoja de 14 días, que registraron casi la mitad de actividad (Fig. 4.11A). Sin embargo, en plantas adultas, una mayor actividad GSNOR se observó en los frutos seguido, con un 40% menos de actividad, por las hojas, siendo los órganos que menos actividad GSNOR registraron las flor y las raíz (Fig. 4.11B).

Mediante el empleo de oligonucleótidos específicos de la enzima GSNOR de pimiento, se analizó la expresión del respectivo gen en plántulas de 7, 10 y 14 (Fig. 4.12). Como se puede apreciar, no se observaron cambios significativos en la expresión de la GSNOR comparado con el patrón de actina.

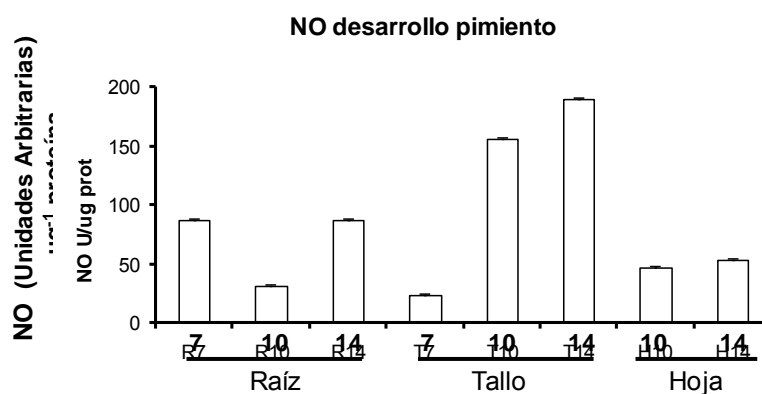


Fig. 4.9. Detección espectrofluométrica de NO con DAF-2 en raíz, tallo y hoja de plántulas de pimiento de 7, 10 y 14 días. La fluorescencia producida se expresó en unidades arbitrarias por microgramo de proteína. Los valores son la media de, al menos, 3 experimentos diferentes \pm el error estándar de la media (SEM).

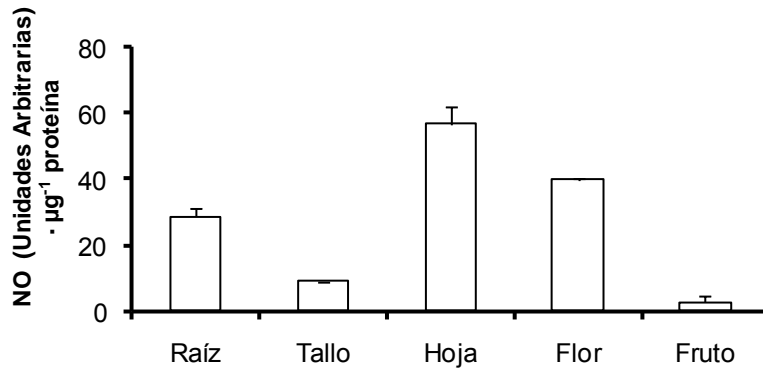


Fig. 4.10. Detección espectrofluométrica de NO con DAF-2 en raíz, tallo, hoja, flor y fruto de plantas de pimiento de 90 días. La fluorescencia producida se expresó en unidades arbitrarias por microgramo de proteína. Los valores son la media de al menos 3 experimentos diferentes \pm el error estándar de la media (SEM).

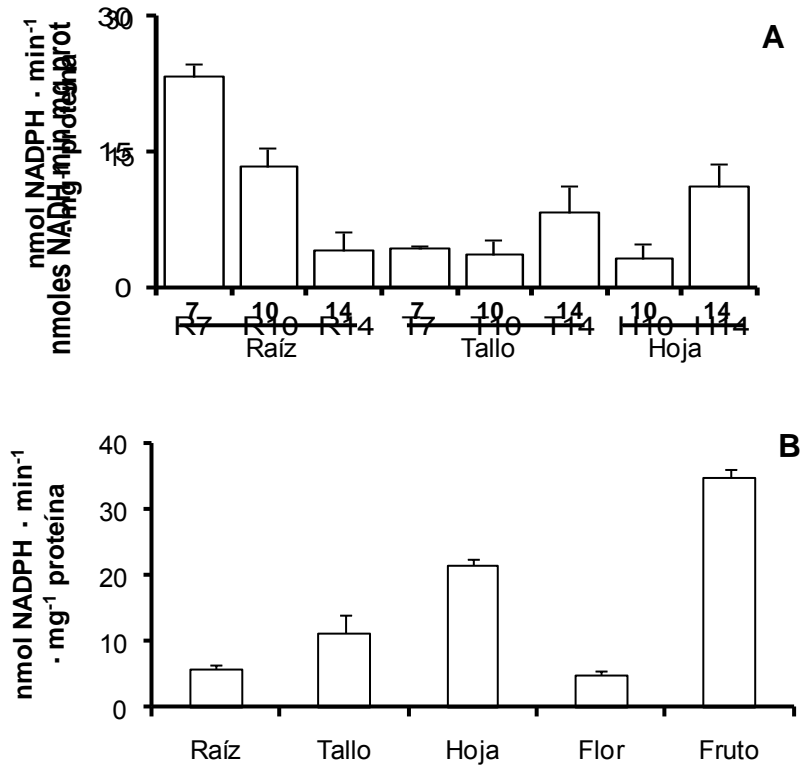


Fig. 4.11. Ensayo espectrofotométrico de la actividad S-nitrosoglutation reductasa (GSNOR) en raíz, tallo y hoja de plántulas de pimiento de 7, 10 y 14 días (A) y de raíz, tallo, hoja, flor y fruto de plantas de pimiento de 90 días. Los valores son la media de, al menos, 3 experimentos diferentes \pm el error estándar de la media (SEM).

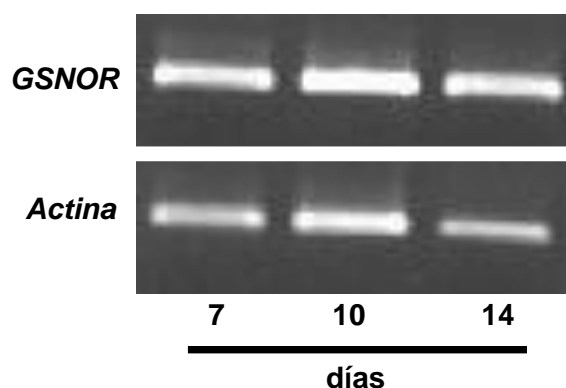


Fig. 4.12. Análisis de la expresión de mRNA de la enzima GSNOR en plántulas de pimiento de 7, 10 y 14 días. La RT-PCR semicuantitativa se realizó sobre el RNA total aislado de plántulas de pimiento. Los resultados mostrados son representativos de, al menos, tres experimentos independientes.

1.2.3. Nitración de proteínas

El análisis por transferencia de western del patrón de proteínas nitradas en raíces de pimiento de 7, 10, 14 y 90 días, usando un anticuerpo frente a la nitrotirosina (NO₂-Tyr), se muestra en la Fig. 4.13. Durante los primeros estadios de desarrollo (7, 10 y 14 días) se detectaron 5 bandas inmunoreactivas, con pesos moleculares de aproximadamente 38, 45, 56, 62 y 91 kDa. Estas bandas son más intensas a los 7 y 10 días. La intensidad de las bandas disminuyó durante el día 14 y tiende a desaparecer en las raíces de plantas adultas (90 días), como es el caso de las bandas 91 y 62 kDa.

En el caso de los tallos, se detectaron 5 bandas inmunoreactivas, con pesos moleculares de aproximadamente 34, 42, 59, 64 y 91 kDa (Fig. 4.14), siendo las bandas más abundantes las de 59, 64 y 91 kDa. La intensidad de estas bandas aumentó en el caso de los tallos de las plantas adultas, sobre todo, la banda de 59 kDa. Mientras que las bandas de 34 y 42 kDa son más intensas en el tallo de plántulas de 7 días, estas desaparecieron en el tallo de plantas adultas (90 días).

En las hojas de 10, 14 y 90 días, se detectaron 6 bandas inmunoreactivas, con pesos moleculares de aproximadamente 34, 41, 52, 66, 71 y 91 kDa (Fig. 4.15). Se observó el aumento de la intensificación de algunas bandas cuando se pasa de hojas de 10 y 14 días a hojas de plantas adultas (90 días), como es el caso de las bandas de 34 y 71 kDa.

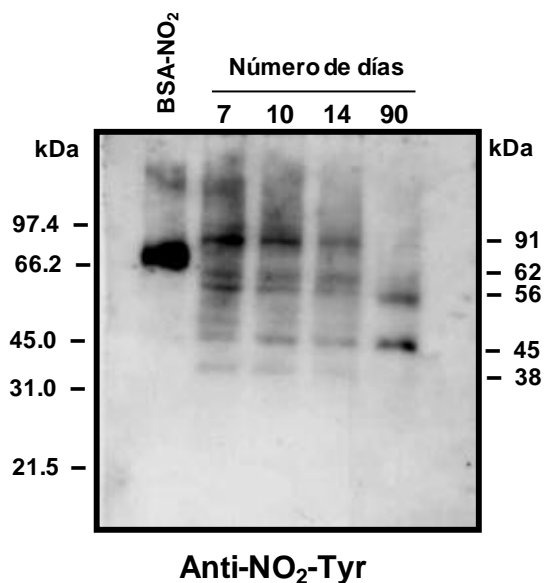


Fig. 4.13. Immunodetección de nitroproteínas en raíces de plantas de 7, 10, 14 y 90 días. La inmunodetección se realizó usando un anticuerpo frente a la 3-nitrotirosina (NO₂-Tyr) (dilución 1:8000). Se usó BSA nitrada comercial (NO₂-BSA, 2 mg de proteínas) como control positivo. Los números que están a la izquierda del inmunoblot indican los pesos moleculares relativos de los marcadores y los de la derecha los correspondientes a las bandas de nitroproteínas más abundantes.

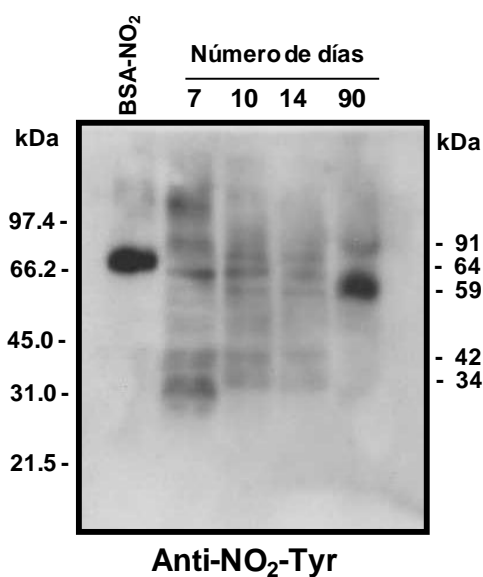


Fig. 4.14. Immunodetección de nitroproteínas en tallos de plantas de 7, 10, 14 y 90 días. La inmunodetección se realizó usando un anticuerpo frente a la 3-nitrotirosina (NO₂-Tyr) (dilución 1:8000). Se usó BSA nitrada comercial (NO₂-BSA, 2 mg de proteínas) como control positivo. Los números que están a la izquierda del inmunoblot indican los pesos moleculares relativos de los marcadores y los de la derecha los correspondientes a las bandas de nitroproteínas más abundantes.

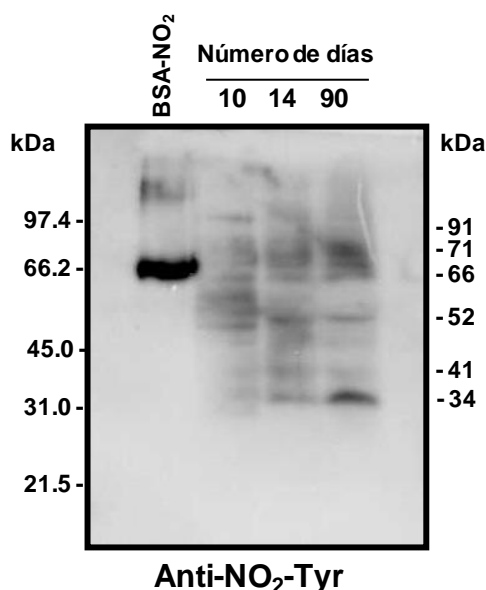


Fig. 4.15. Immunodetección de nitroproteínas en hojas de plantas de 7, 10, 14 y 90 días. La inmunodetección se realizó usando un anticuerpo frente a la 3-nitrotirosina (NO₂-Tyr) (dilución 1:8000). Se usó BSA nitrada comercial (NO₂-BSA, 2 mg de proteínas) como control positivo. Los números que están a la izquierda del inmunoblot indican los pesos moleculares relativos de los marcadores y los de la derecha los correspondientes a las bandas de nitroproteínas más abundantes.

1.2.4 Detección y localización de NO, O₂⁻ y ONOO⁻ mediante microscopia de láser confocal en los distintos órganos de pimiento durante el desarrollo

1.2.4.1. Raíz

Se analizó el contenido de NO en los distintos órganos de la planta usando el fluoróforo DAF-FM DA que genera una fluorescencia verde, atribuible a la presencia de NO (Fig. 4.16A, B y C). La localización de NO endógeno mostró una fluorescencia verde intensa en la epidermis en la raíz de 7 y 10 días, mientras que en la raíz de 14 días dicha fluorescencia se redujo ligeramente. La presencia del radical superóxido (O₂⁻) se detectó mediante el fluoróforo dihidroetidio (DHE) (Fig. 4.16D, E y F). Esta se hizo en el ápice de raíces de pimiento de 7, 10 y 14 días. Una fluorescencia verde intensa, que indicaba la presencia de O₂⁻, fue observada solamente en raíz de 14 días. Por otra parte, se analizó la producción celular de ONOO⁻ usando el fluoróforo 3´-(p-aminofenil) fluoresceína (APF). La fluorescencia verde atribuible al ONOO⁻ se observó en los tejidos vasculares y en la epidermis y no hubo diferencias significativas entre las raíces de las distintas edades (Fig. 4.16G, H, I).

1.2.4.2. Tallo

En tallos de 7 días se observó una intensa fluorescencia verde, atribuible a la presencia de NO, en la epidermis y tejidos vasculares. Sin embargo, apenas se pudo detectar dicha fluorescencia en tallos de 10 y 14 días (Fig. 4.17A, B y C). Por otro lado, la presencia de radicales superóxido en el tallo fue apenas detectable, pudiendo apreciarse solamente una débil fluorescencia verde a nivel de la epidermis, más detectable en los tallos de 10 días (Fig. 4.17D, E y F). Finalmente, se observó una intensa fluorescencia verde atribuible a la presencia de ONOO⁻ en los tallos de 7 días, siendo esta fluorescencia más fuerte a nivel de la epidermis y tejidos vasculares. Dicha fluorescencia disminuyó considerablemente en el caso de los tallos de 10 y 14 días (Fig. 4.17G, H y I).

1.2.4.3. Hoja

La localización de NO endógeno mostró una fluorescencia verde intensa en las células de la epidermis superiores y inferiores y tejidos vasculares (xilema y floema), y una intensidad baja en el parénquima en empalizada en hojas de 10 días. Esta fluorescencia fue ligeramente menor en hojas de 14 días (Fig. 4.18A y B). La localización de O₂⁻ se observó a nivel de los tejidos vasculares, si bien los mismos mostraban una fluorescencia baja (Fig. 4.18C y D). Por otra parte, se analizó la producción celular de ONOO⁻. Tanto en hojas de 10 y de 14 días, la fluorescencia verde atribuible al ONOO⁻ apenas se observó en estos órganos (Fig. 4.18E y F).

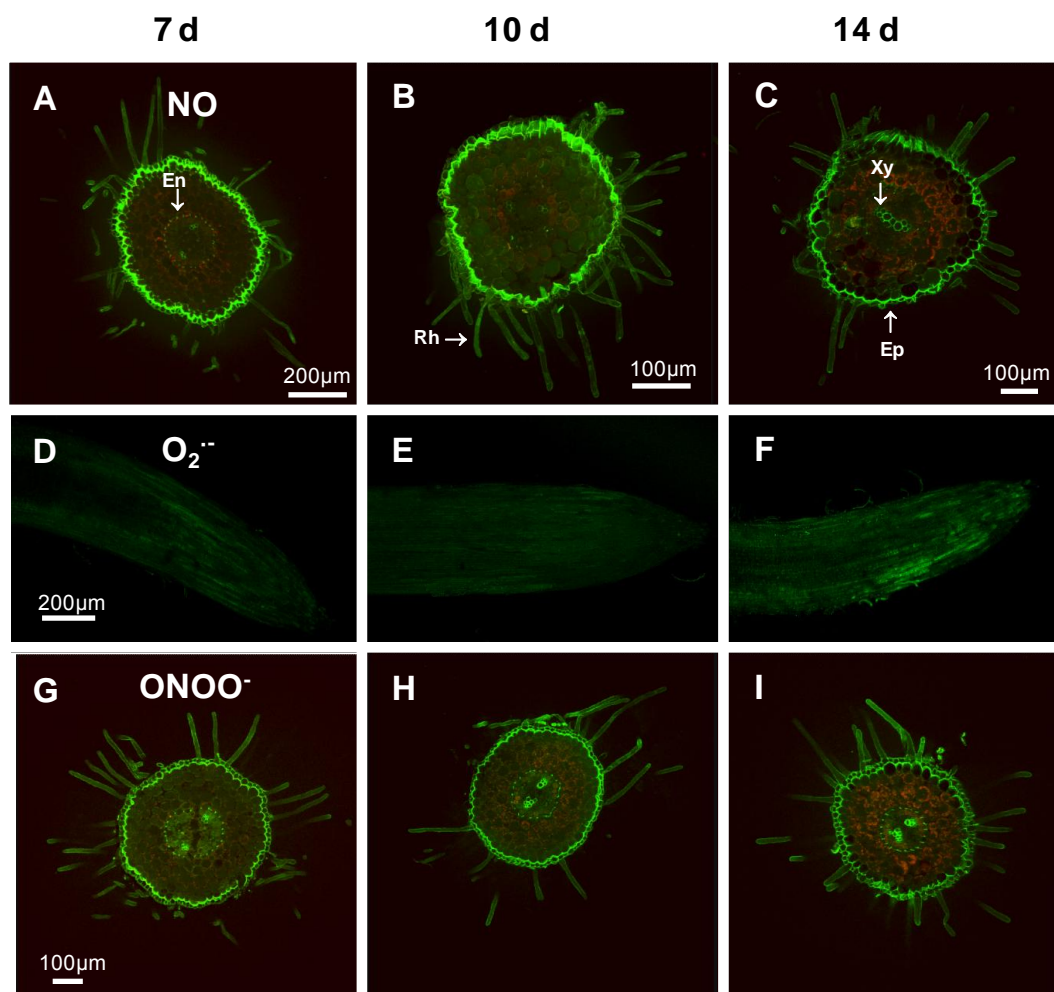


Fig. 4.16. Imágenes representativas ilustrando la detección y localización celular mediante microscopía de láser confocal (CLSM) de NO (A, B y C), $O_2^{\bullet-}$ (D, E y F) y $ONOO^-$ (G, H y I) en secciones transversales de raíces de plántulas de pimienta de 7, 10 y 14 días. La fluorescencia verde corresponde a la detección de NO, $O_2^{\bullet-}$ y $ONOO^-$ con sus correspondientes fluoróforos, DAF-FM DA, DHE y APF, respectivamente. En, endodermis. Ep, epidermis. Xy, xilema. Rh, pelos absorbentes.

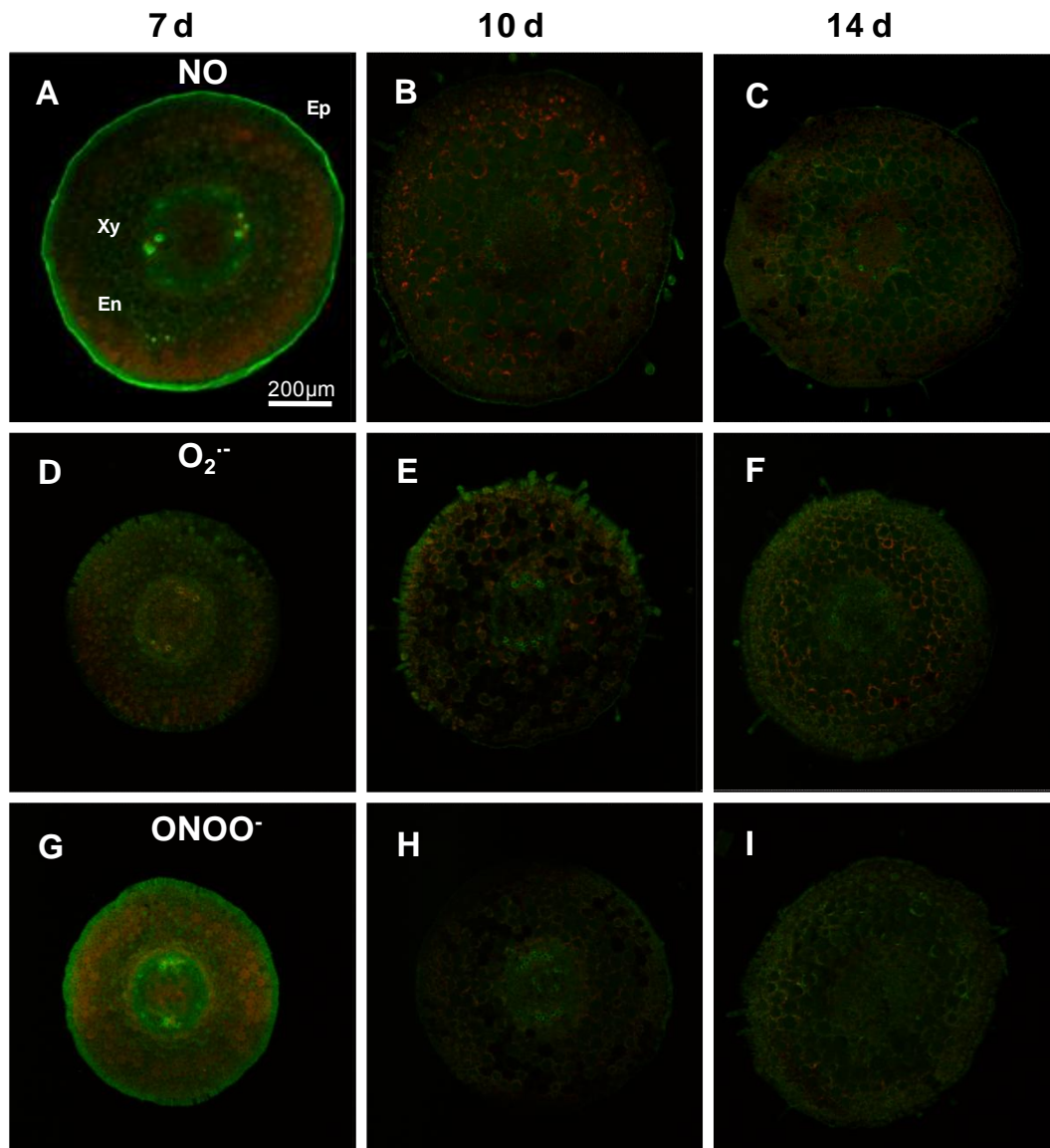


Fig. 4.17. Imágenes representativas ilustrando la detección y localización celular mediante microscopía de láser confocal (CLSM) de NO (A, B y C), $O_2^{\bullet-}$ (D, E y F) y $ONOO^-$ (G, H y I) en secciones transversales de tallos de plántulas de pimienta de 7, 10 y 14 días. La fluorescencia verde corresponde a la detección de NO, $O_2^{\bullet-}$ y $ONOO^-$ gracias al uso de sus respectivos fluoróforos, DAF-FM DA, DHE y APF, respectivamente. En, endodermis. Ep, epidermis. Xy, xilema.

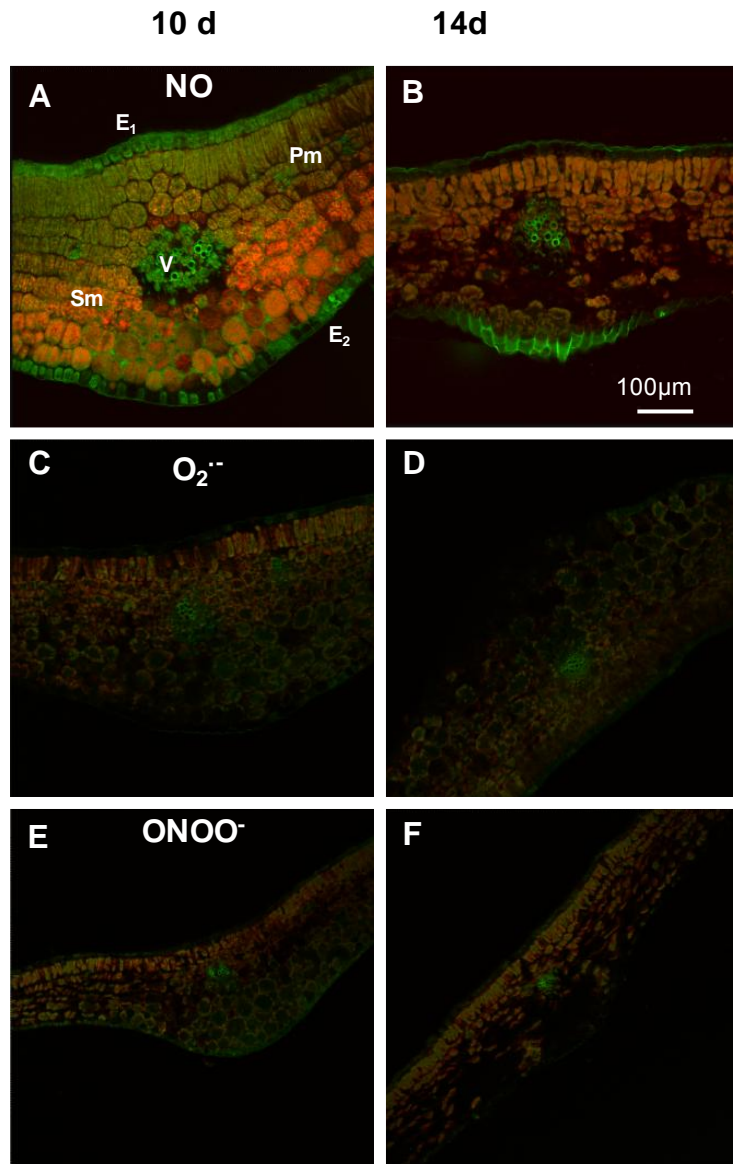


Fig. 4.18. Imágenes representativas ilustrando la detección y localización celular mediante microscopía láser confocal (CLSM) de NO (A y B), $O_2^{\cdot-}$ (C y D) y $ONOO^-$ (E y F) en secciones transversales de hojas de plántulas de pimienta de 10 y 14 días. La fluorescencia verde corresponde a la detección de NO, $O_2^{\cdot-}$ y $ONOO^-$ gracias al uso de sus respectivos fluoróforos, DAF-FM DA, DHE y APF, respectivamente. E₁, epidermis adaxial. E₂, epidermis abaxial. Pm, parénquima en empalizada. Sm, parénquima esponjoso. V, haces vasculares.

2. EFECTO DE LA BAJA TEMPERATURA SOBRE LAS PLANTAS DE PIMIENTO

2.1. Efecto de la baja temperatura sobre el fenotipo

El fenotipo de las plantas de pimiento de 30 días expuestas a baja temperatura (LT) durante 1, 2 y 3 días consecutivos se muestra en la Fig. 4.19. La LT causó un incremento en la flacidez de los tallos y hojas desde el primer hasta el tercer día, aunque los síntomas más fuertes se observaron durante el primer día. Después del primer día, estos órganos empezaron a recuperar su aspecto original, el cual fue casi completo durante el tercer día.

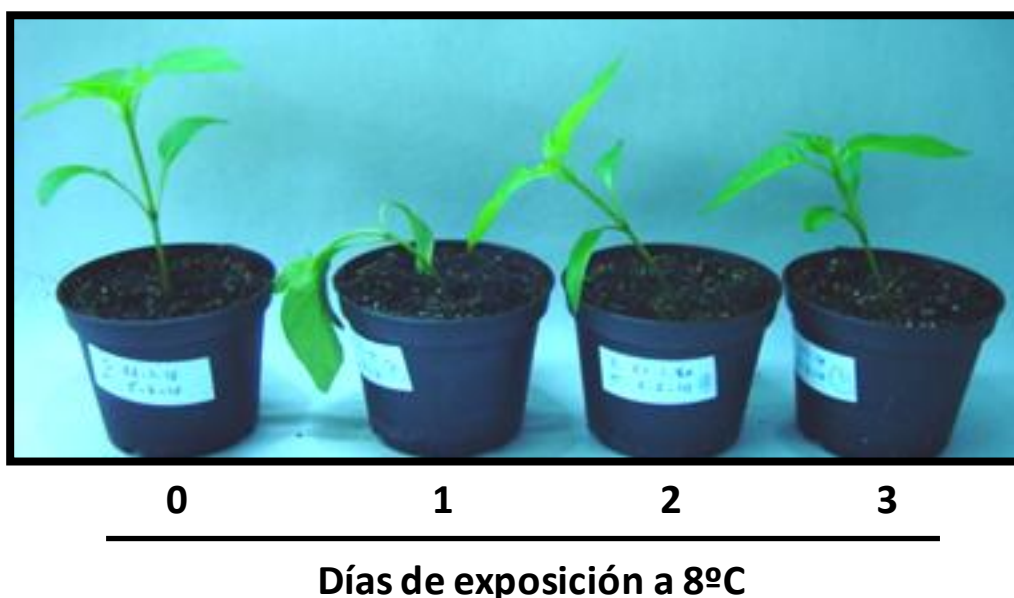


Fig. 4.19. Fenotipo de plantas de pimiento de 30 días expuestas a baja temperatura (8°C) durante varios días (1 a 3 días).

2.2. Efecto de la baja temperatura sobre el metabolismo de ROS

2.2.1. Antioxidantes no enzimáticos

Para saber cómo afecta la baja temperatura (LT) a los antioxidantes no enzimáticos, se estudió el contenido de GSH y ascorbato en hojas de plántulas de pimiento Control y estresadas por LT (tabla 4.2). El ascorbato total (reducido y oxidado) y el GSH incrementaron 35 y 88%, respectivamente, en las hojas expuestas a LT durante 24 horas comparadas con las plantas control. Estos niveles se mantuvieron durante el segundo y el tercer día de tratamiento a 8°C. El contenido de glutatión oxidado (GSSG) se redujo

un 50% después de 24 horas de tratamiento con LT no observándose después cambios significativos en comparación con las plantas control. La razón GSH/GSSG experimentó un incremento de 3,7 veces después de 24 horas de tratamiento con LT, bajando dicho índice a partir del primer día de tratamiento.

Tabla 4.2. Contenido en ascorbato total y glutation (reducido y oxidado) en extractos de hojas de plántulas de pimienta expuestas a baja temperatura (8°C) durante 1, 2 y 3 días. Los valores son la media de, al menos, 3 experimentos diferentes \pm el error estándar de la media (SEM). PF: peso fresco. *Las diferencias respecto al control son significativas con $P > 0,05$.

Días	Ascorbato ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ PF)	Glutation (GSH) ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ PF)	GSSG ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ PF)	GSH/GSSG
0	77,28 \pm 4,13	91,90 \pm 0,56	7,20 \pm 0,56	12,76
1	104,04 \pm 1,43*	172,50 \pm 0,76*	3,59 \pm 0,34*	48,05
2	112,30 \pm 1,45*	141,90 \pm 0,65*	8,09 \pm 0,26	17,54
3	101,26 \pm 2,45*	142,90 \pm 0,18*	6,53 \pm 0,55	21,88

2.2.2. Antioxidantes enzimáticos

2.2.2.1. Superóxido dismutasa (SOD)

El análisis de la actividad SOD por PAGE nativa mostró en todos los tratamientos la presencia de 4 isoenzimas de la SOD que fueron identificadas como una Mn-SOD, una Fe-SOD y dos CuZn-SODs (CuZn-SOD I y CuZn-SOD II) (Fig. 4.20). En los distintos experimentos llevados a cabo, no se observaron cambios significativos en el patrón de las isoenzimas de SOD después de 3 días de tratamiento con LT.

2.2.2.2. Catalasa

La actividad Catalasa, una enzima antioxidante característica, incremento un 34 a 36% durante el primer y el segundo día, y no estuvo significativamente afectada durante el tercer día (Fig. 4.21).

Fig. 4.20. Actividad SOD en extractos de hojas de pimiento de 30 días expuestas a baja temperatura (8°C) durante 0 a 3 días. Las proteínas (20 µg) fueron separadas por PAGE nativa (acrilamida al 10%) y se llevó a cabo la tinción con NLT, específica para la detección de SOD y geles.

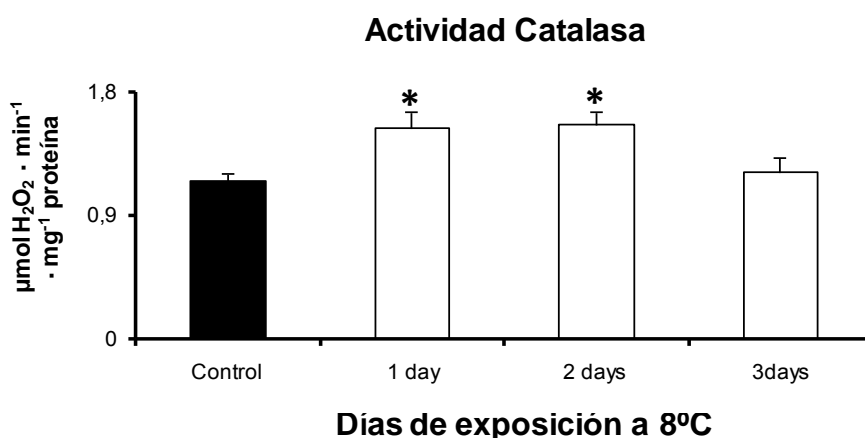
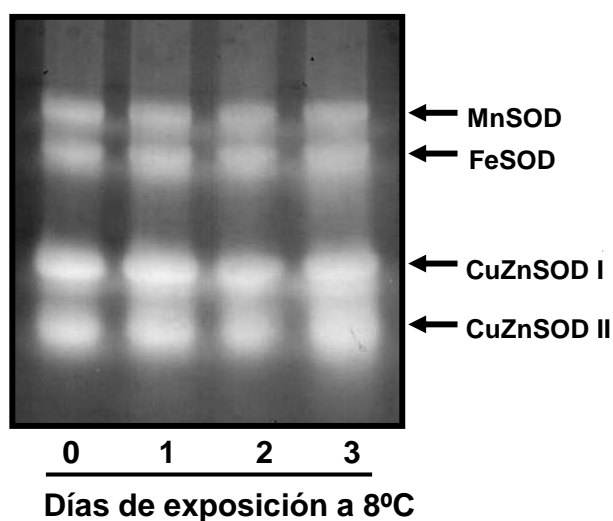


Fig. 4.21. Actividad catalasa en extractos de hojas de pimiento de 30 días expuestas a baja temperatura (8°C) durante 0 a 3 días. Los valores son la media de, al menos, 3 experimentos diferentes \pm el error estándar de la media (SEM). *Las diferencias respecto al control son significativas con $P > 0,05$.

2.2.2.3. Enzimas del ciclo ascorbato-Glutation

Las actividades de las enzimas del ciclo ascorbato-glutación, que incluyen la APX, la MDAR y la GR fueron analizadas en las muestras sometidas a estrés por baja temperatura (Fig. 4.22). Las actividades APX y MDAR fueron inducidas un 40% y un 31%, respectivamente, después de 24 horas de tratamiento con LT (Fig. 4.22A y B, respectivamente). Mientras que la APX se mantuvo significativamente mayor que en plantas control a lo largo del experimento, durante los días 2 y 3 no se observaron

diferencias significativas en la actividad MDAR con respecto al control. Por otra parte, la actividad GR se redujo un 49% y un 73% durante el segundo y el tercer día de estrés con LT, respectivamente, mientras que el tratamiento a 8°C no afectó esta actividad en las primeras 24 horas (Fig. 4.22C).

2.2.2.4. Deshidrogenasas dependientes de NADP

El efecto de la LT sobre la actividad de las principales deshidrogenasas dependientes de NADP se muestra en la Fig. 4.23. La actividad G6PDH incrementó de forma significativa de 32% a 44% durante los 3 días de exposición a LT (Fig. 4.23A). La actividad 6PGDH también aumentó significativamente entre 30-33% después del primer día, y este incremento se mantuvo hasta el final del tratamiento (Fig. 4.23B). La actividad NADP-ICDH igualmente aumentó un 26% en el primer y segundo día de tratamiento, pero no se observaron cambios significativos en el tercer día comparado con las plantas control (Fig. 4.23C). La actividad NADP-ME se incrementó de forma significativa un 23% durante el primer día, y un 40% y un 31% durante el segundo y el tercer día de tratamiento a LT, respectivamente (Fig. 4.23D).

2.2.3. Expresión de mRNA

El análisis de la expresión de mRNA por RT-PCR semicuantitativa de las 7 enzimas antioxidantes: catalasa, Mn-SOD, Fe-SOD, CuZn-SOD, APX, MDAR y GR de plántulas de pimiento expuestas a LT durante 1 a 3 días se muestra en la Fig. 4.24. En general, ninguno de los genes analizados muestra cambios de expresión significativos durante los días de exposición a LT.

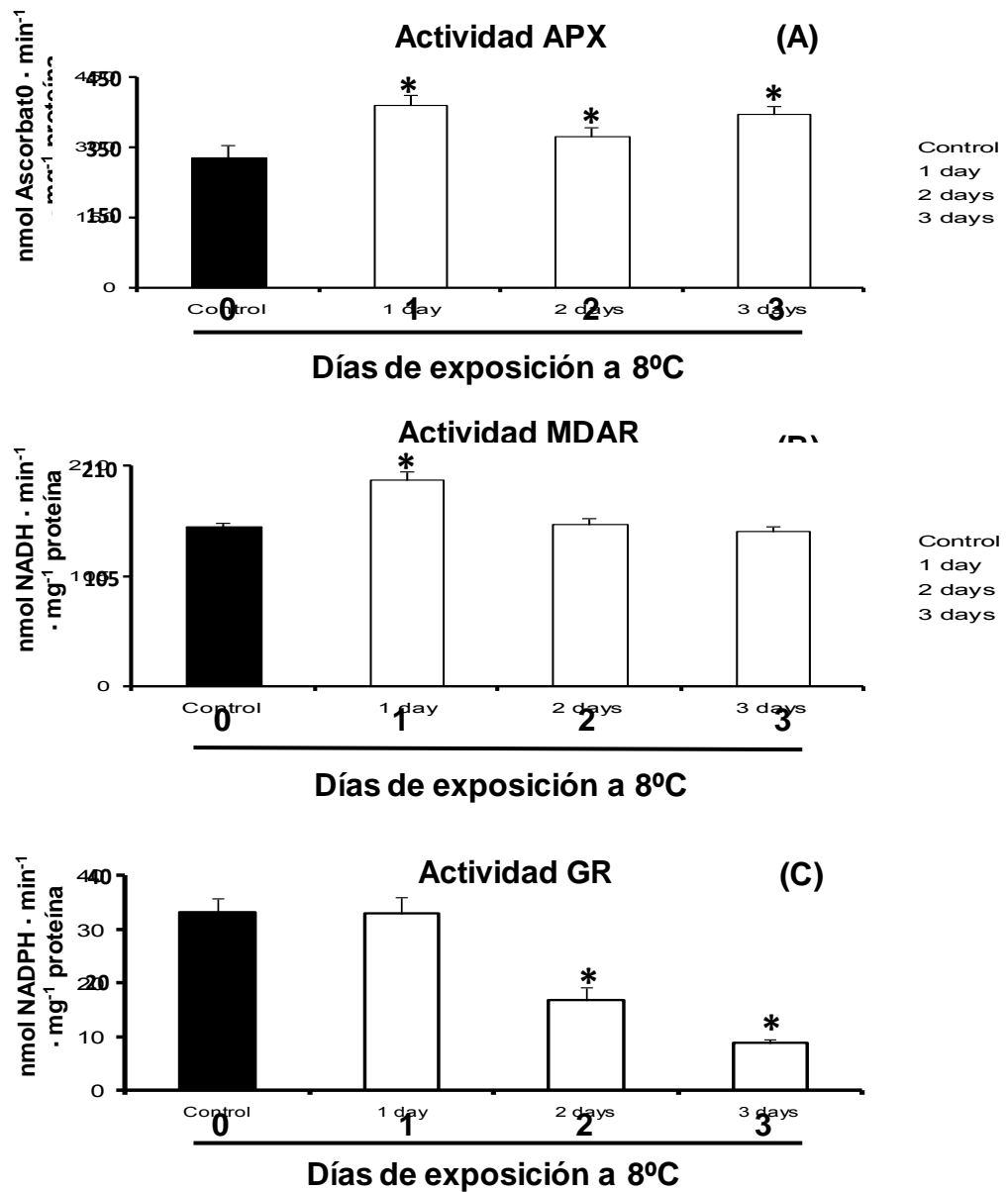


Fig. 4.22. Actividad de las enzimas del ciclo ascorbato-glutiación en extractos de hojas de plántulas de pimiento de 30 días expuestas a LT (8°C) durante 0 a 3 días. (A) APX, ascorbato peroxidasa (B) MDAR, monodeshidroascorbato reductasa (C) GR, glutatiión reductasa. Los valores son la media de, al menos, 3 experimentos diferentes \pm el error estándar de la media (SEM). *Las diferencias respecto al control son significativas con $P > 0,05$.

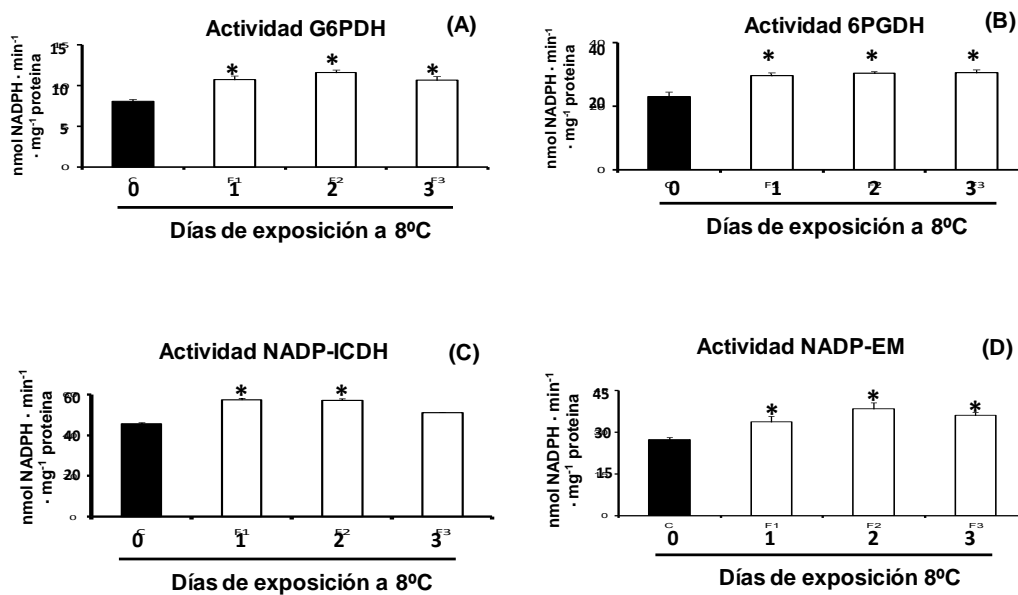


Fig. 4.23. Actividad de las deshidrogenasas dependientes de NADP en extractos de hojas de plántulas de pimiento de 30 días expuestas a LT (8°C) de 0 a 3 días. (A) G6PDH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; (B) 6PGDH, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; (C) NADP-ICDH, isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP; (D) EM, enzima málico dependiente de NADP. Los valores son la media de al menos 3 experimentos diferentes \pm el error estándar de la media (SEM). *Las diferencias respecto al control son significativas con $P > 0,05$.

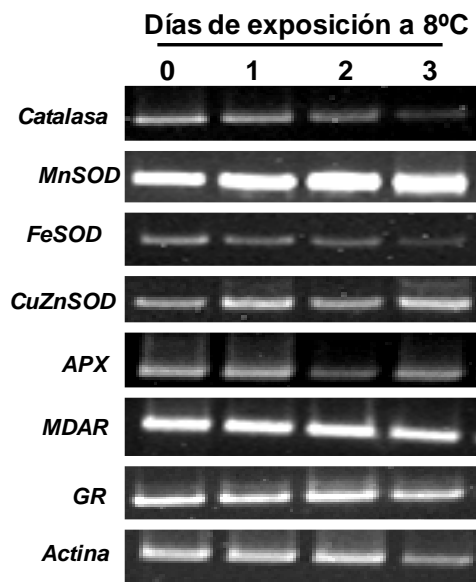


Fig. 4.24. Análisis de la expresión de mRNA de las enzimas antioxidantes catalasa, Mn-SOD, Fe-SOD, CuZn-SOD, APX, MDAR y GR en hojas de pimiento expuestas a LT (8°C) durante 3 días. La RT-PCR semicuantitativa se realizó sobre el RNA total aislado de hojas de pimiento. Los resultados mostrados son representativos de, al menos, tres experimentos independientes.

2.2.4. NADPH oxidasa

La actividad NADPH oxidasa (NOX) es considerada una fuente importante de los radicales superóxido en plantas (Sagi & Fluhr 2001; Fluhr 2009; Miller et al. 2009). El análisis de la actividad NOX en hojas de pimiento en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes, mostró la presencia de 3 isoenzimas, designadas I a III según su creciente movilidad en los geles (Fig. 4.25). Se observó que la isoenzima NOX III fue inducida en las hojas de pimiento después de 24 horas de exposición de las plantas a LT; sin embargo, la actividad NOX I disminuyó después de 24 horas de tratamiento a LT.

2.2.5. Peróxido de hidrógeno

Se determinó, mediante espectrofotometría, el contenido en peróxido de hidrógeno en extractos crudos de hojas de plántulas de pimiento control y expuestas a baja temperatura. Como se muestra en la Fig. 4.26, no se mostraron cambios significativos en la concentración de H₂O₂ en los extractos crudos de hojas expuestas a baja temperatura comparados con las hojas de las plantas control.

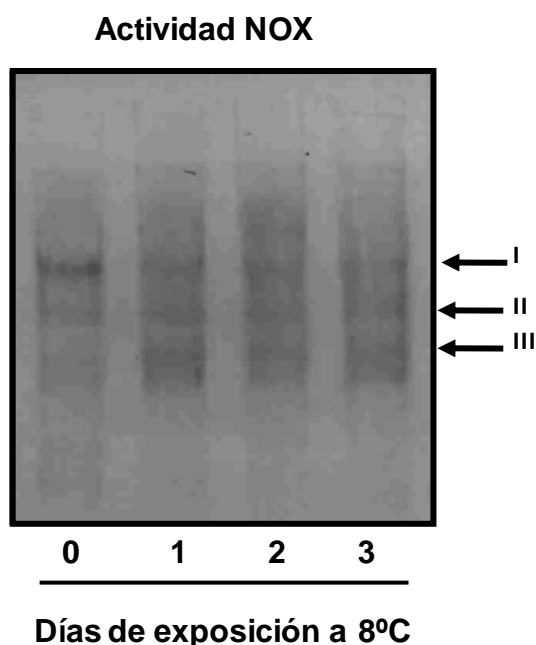


Fig. 4.25. Detección de las isoenzimas de NADPH oxidasa (NOX) de hojas de plántulas de pimiento expuestas a baja temperatura (8°C) de 0 a 3 días. Las muestras de proteínas (20 µg) fueron separadas por

PAGE nativa (acrilamida al 6%), los geles se incubaron con NLT y NADPH hasta que se observó la aparición de las bandas específicas de actividad.

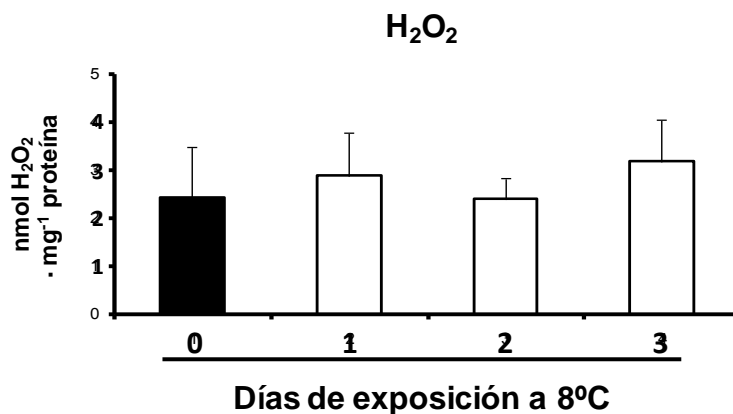


Fig. 4.26. Contenido del H₂O₂ en extractos de hojas de plántulas de pimiento expuestas a baja temperatura (8°C) de 0 a 3 días. Los valores son la media de, al menos, 3 experimentos diferentes ± el error estándar de la media (SEM).

2.2.6. Peroxidación lipídica

La peroxidación de los lípidos insaturados en las membranas es reconocida como un marcador de los daños oxidativos causados por ROS. Para verificar el potencial de los daños provocados por ROS en plantas de pimiento durante el tratamiento por LT, se usó un método histoquímico mediante el reactivo de Schiff que permite la detección de aldehídos originados a partir de los peróxidos lipídicos (Yamamoto et al. 2001). Las hojas de plántulas de pimiento expuestas varios días a LT y teñidas para la peroxidación lipídica se muestran en la Fig. 4.27. La coloración rosácea corresponde a la presencia de oxidación lipídica. Se observó una clara intensificación de esta coloración en los nervios principal y secundarios de las hojas de las plantas expuestas durante 1 y 2 días a LT. Sin embargo, no se observaron diferencias en las hojas de las plantas expuestas durante 3 días a LT comparadas con las hojas de las plantas control.

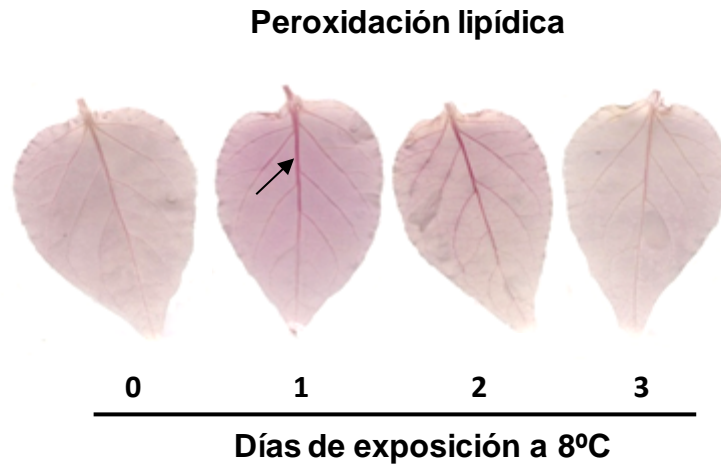


Fig. 4.27. Detección histoquímica de la peroxidación lipídica en hojas de plántulas de pimiento de 30 días expuestas a baja temperatura (8°C) de 0 a 3 días. La coloración rosácea indicada mediante la flecha muestra la presencia de peroxidación lipídica detectada con el reactivo de Schiff.

2.3. Efecto de la baja temperatura sobre el metabolismo de RNS

2.3.1. Contenido en NO

Como se puede observar, cuando las plántulas de pimiento fueron expuestas a 8°C durante 3 días, el contenido de NO se redujo entre un 52% y un 64% respecto a las plantas control. (Fig. 4.28).

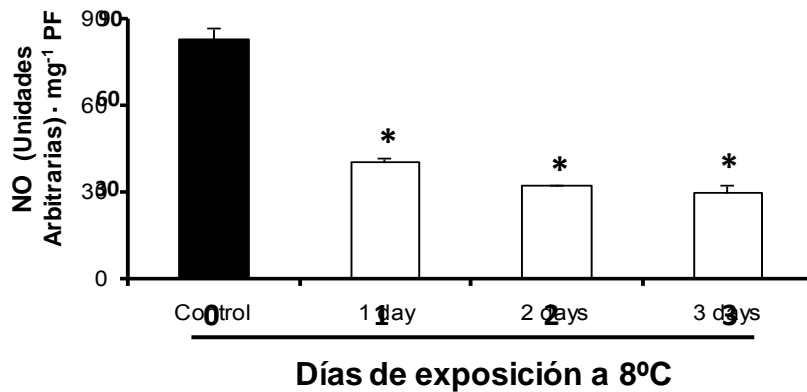


Fig. 4.28. Detección espectrofluométrica del NO con DAF-2 en hojas de pimiento de plantas expuestas a baja temperatura (8°C) durante 3 días. La fluorescencia producida se expresó en unidades arbitrarias por miligramo de peso fresco (PF). Los valores son la media de, al menos, 3 experimentos diferentes \pm el error estándar de la media (SEM). *Las diferencias respecto al control son significativas con $P > 0,05$.

2.3.2. Fuentes del óxido nítrico

Teniendo en cuenta estos resultados y los obtenidos sobre producción de NO en las hojas en los experimentos de desarrollo post-germinativo de plantas de pimiento, se decidió caracterizar la fuente productora de este radical en dicho órgano. En plantas, la biosíntesis de NO puede llevarse a cabo a través de distintas vías, de las cuales podríamos citar la actividad NO sintasa dependiente de L-arginina, la actividad nitrato reductasa (NR), la cadena de transporte electrónica mitocondrial o bien propiciada por poliaminas. Para examinar las contribuciones relativas de estas fuentes potenciales en hojas de pimiento se usaron aproximaciones farmacológicas. Por consiguiente, en los ensayos de la medida de producción de NO se estudiaron los efectos de los inhibidores específicos de cada ruta (Fig. 4.29). Como resultado, los extractos de hojas fueron preincubados con 1 mM L-NAME (un análogo de la L-arginina que inhibe la actividad NOS en mamíferos), 1 mM aminoguanidina (un inhibidor de NOS en animales), 1 mM tungsteno (inhibidor de NR), 1 mM rotenona (inhibidor de la cadena de transporte de electrones mitocondriales) y 2 mM DFMO (inhibidor de la biosíntesis de poliaminas). Además, el cPTIO (secuestrador de NO) como control negativo y, de hecho, afectó eficientemente la fluorescencia detectada con DAF-2, reduciéndola en un 68% en comparación con las muestras control. De este modo, la producción de NO fue fuertemente reducida con el tungsteno (70%), seguida por los inhibidores de NOS, la aminoguanidina (53%) y L-NAME (49%). La rotenona redujo la producción de NO un 19% y el DFMO en un 9%. Por lo tanto, los resultados sugieren que las actividades dependientes de L-arginina son las que más contribuyen a la producción de NO en hojas de pimiento.

2.3.3. S-nitrosoglutation reductasa (GSNOR)

La actividad GSNOR mostró un incremento del 32% durante el primer y tercer día de tratamiento, pero no se observaron efectos significativos después de someter las plantas a LT durante el segundo día (Fig. 4.30).

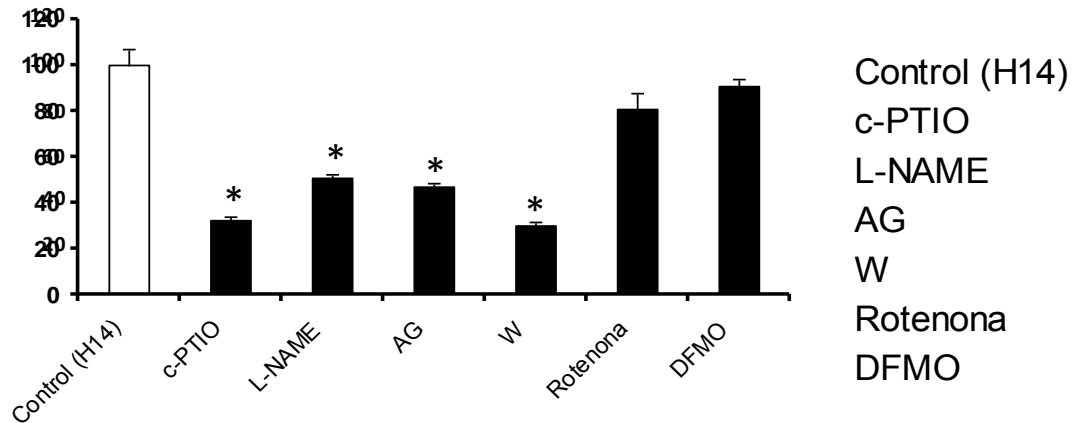


Fig. 4.29. Caracterización farmacológica de los sistemas de producción de NO en hojas de pimiento por espectrofluorimetría usando el compuesto DAF-2. En todos los casos las muestras de hojas fueron preincubadas durante 30 minutos con los diferentes inhibidores: 1 mM L-NAME (un análogo de la L-arginina que inhibe la actividad NOS en mamíferos), 1 mM aminoguanidina (AG, un inhibidor de la NOS animal), 1 mM tungsteno (un inhibidor de la nitrato reductasa NR), 1 mM rotenona (inhibidor de la cadena de transporte de electrones mitocondriales) y 2 mM difluorometilomitina (DFMO, inhibidor de la biosíntesis de poliaminas). Como control, las muestras de hojas fueron preincubadas con cPTIO, un secuestrador de NO. Los valores son la media de, al menos, 3 experimentos diferentes \pm el error estándar de la media (SEM). *Las diferencias respecto al control son significativas con $P > 0,05$.

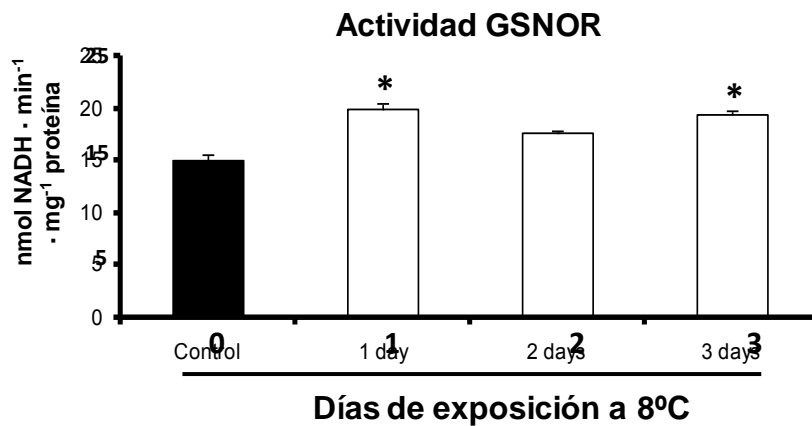


Fig. 4.30. Ensayo espectrofotométrico de la actividad S-nitrosoglutation reductasa (GSNOR) en hojas de pimiento de plantas expuestas a baja temperatura (8°C) durante 3 días. Los valores son la media de, al menos, 3 experimentos diferentes \pm el error estándar de la media (SEM). *Las diferencias respecto al control son significativas con $P > 0,05$.

2.3.4. Nitración de proteínas

El análisis por transferencia de western del patrón de proteínas nitradas en hojas de pimiento durante los 3 días de exposición a LT, usando un anticuerpo frente a la nitrotirosina (NO₂-Tyr), se muestra en la Fig. 4.31. En las hojas control se detectaron 4 bandas inmunoreactivas, con pesos moleculares de aproximadamente 45, 71, 91 y 97 kDa, Siendo las bandas más abundantes las de 71 y 91 kDa. Después de un día de exposición a LT tuvo lugar una intensificación de estas bandas de proteínas nitradas, pero después de 2 días de tratamiento disminuyó la intensidad de las mismas, siendo casi indetectable el tercer día.

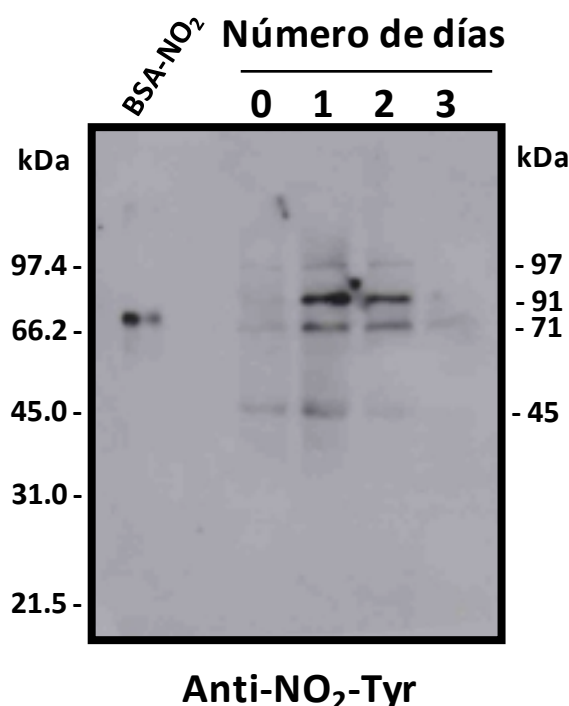


Fig. 4.31. Immunodetección de nitroproteínas en hojas de plantas expuestas a baja temperatura (8°C) durante 3 días. Las muestras de hojas (50 µg de proteínas por pocillo) fueron sometidas a una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y un análisis con Western. La inmunodetección se realizó usando un anticuerpo frente a la 3-nitrotirosina (NO₂-Tyr) (dilución 1:8000). Se usó BSA nitrada comercial (NO₂-BSA, 2 mg de proteínas) como control positivo. Los números que están a la izquierda del inmunoblot indican los pesos moleculares relativos de los marcadores y los de la derecha los correspondientes a las bandas de nitroproteínas más abundantes.

2.3.5. Detección de NO, ONOO⁻ y SNOs mediante microscopía de láser confocal

Teniendo en cuenta que muchos de los parámetros analizados parecen sufrir cambios significativos después del primer día de la exposición de las plantas a LT, se seleccionó este tiempo para el análisis *in vivo* del metabolismo de RNS de hojas de pimiento mediante CLSM, usando fluoróforos específicos para el NO, el ONOO⁻ y los SNOs (Fig. 4.32).

El NO fue analizado usando el fluoróforo DAF-FM DA que origina una fluorescencia verde atribuible al NO. En las hojas control, la localización del NO endógeno mostró una fluorescencia verde intensa en el parénquima en empalizada, en tejidos vasculares (xilema y floema), y una intensidad baja en las células epidérmicas tanto superiores como inferiores (Fig. 4.32A). En plantas expuestas a LT durante 24 horas la fluorescencia verde se redujo ligeramente en todos los tipos de tejidos (Fig. 4.32B).

Por otra parte, se analizó la producción celular de ONOO⁻ usando el fluoróforo 3'-(p-aminofenil) fluoresceína (APF). En hojas control, sólo se observó fluorescencia en los tejidos vasculares, si bien no fue tan intensa como en la detección de NO (Fig. 4.32C). Sin embargo, en plantas expuestas durante 24 horas a LT, la fluorescencia verde se incrementó en los tejidos vasculares así como en el parénquima en empalizada (Fig. 4.32D).

Con respecto a los nitrosotioles, estos se detectaron usando el fluoróforo Alexa Fluor 488 Hg-link (AF) que reacciona con los tioles S-nitrosilados (SNOs) mediante la reacción de Saville (Chaki et al. 2009b). En hojas control, la fluorescencia verde atribuible a los SNOs se presentó principalmente en el tejido vascular, y en los parénquimas esponjoso y en empalizada (Fig. 4.32E). Tras 24 horas a 8°C se observó una intensificación de la fluorescencia en los mismos tipos de tejidos (Fig. 4.32F).

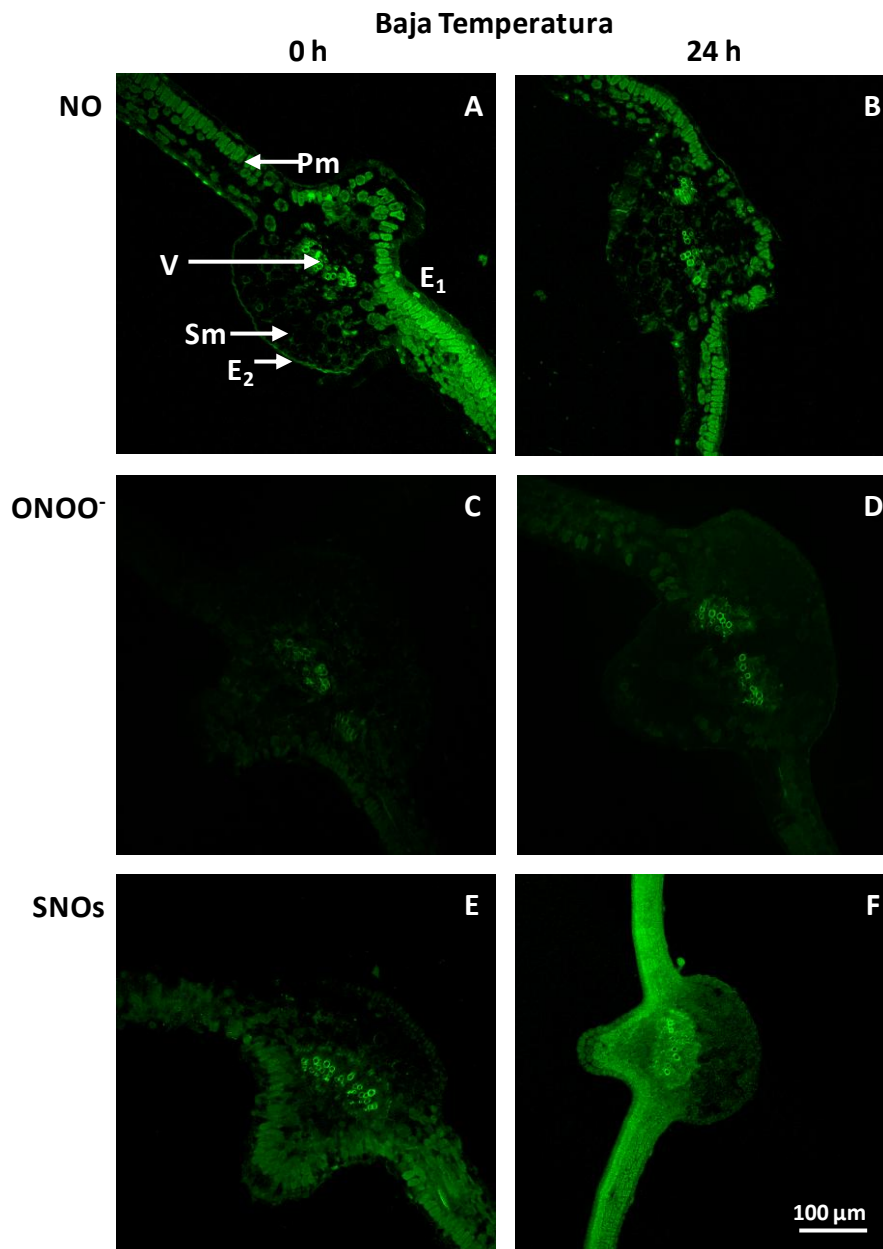


Fig. 4.32. Imágenes representativas ilustrando la detección y la visualización mediante CLSM de NO (A y B), ONOO⁻ (C y D) y nitrosotioles (SNOs) (E y F) en secciones transversales de hojas de plántulas de pimiento control (0) y expuestas a baja temperatura (8°C) durante 24 horas. La intensa fluorescencia verde corresponde a la detección de NO, ONOO⁻ y SNOs mediante el uso de los respectivos fluoróforos DAF-DM DA, APF y AF, respectivamente. E₁, epidermis adaxial. E₂, epidermis abaxial. Pm, parénquima en empalizada. Sm, parénquima esponjoso. V, nervio principal.

2.4. Aclimatación al frío

Considerando que las plantas de pimiento parecen sufrir un proceso de aclimatación al frío puesto que algunos de los parámetros analizados recuperaron su nivel normal al cabo de los tres días, se analizó el comportamiento de algunos de los índices anteriores incluyendo las actividades catalasa y NADP-ICDH, contenido en NO, y la peroxidación lipídica, en hojas de plantas de pimiento expuestas a varias situaciones:

- (I) Plantas de pimiento control crecidas a temperatura óptima.
- (II) Plantas de pimiento expuestas a 8°C (LT) durante 24 horas.
- (III) Plantas de pimiento expuestas a 8°C durante 24 h y después a temperatura óptima durante 24 h.
- (IV) Plantas de pimiento expuestas a 8°C durante 24 h, luego a temperatura óptima durante 24 h y, de nuevo expuestas a 8°C durante otras 24 h.

En estas condiciones, las actividades catalasa y NADP-ICDH se incrementaron en los tres tratamientos con respecto a las plantas control (Fig. 33A y B, respectivamente). Por lo contrario, el contenido en NO parecía estar significativamente afectado de forma negativa en los tres tratamientos, aunque se detectó una pequeña recuperación en el tratamiento III (Fig. 33C). Por otro lado, la peroxidación lipídica, que aumentó por el tratamiento a 8°C, se redujo notoriamente durante el tratamiento III, manteniéndose los daños observados tras el tratamiento IV (Fig. 33D).

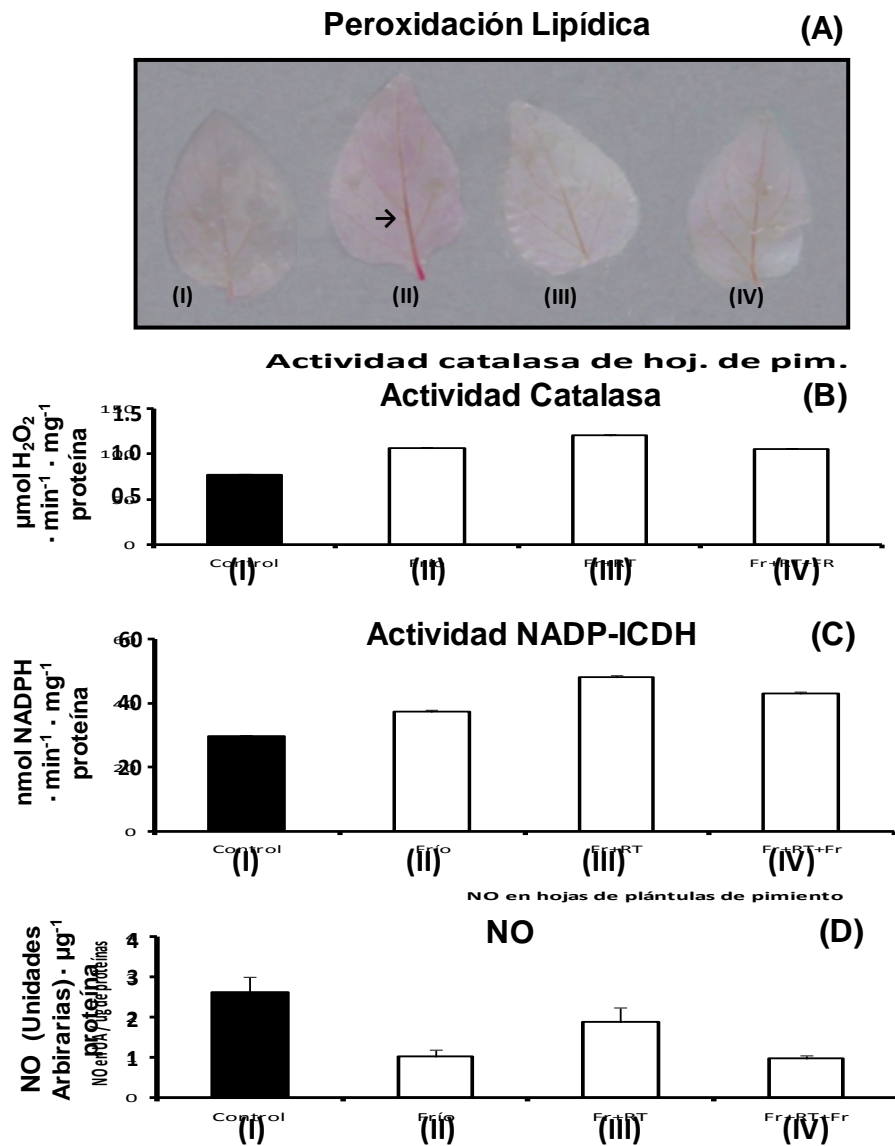


Fig. 4.33. (A) Detección histoquímica de la peroxidación lipídica, (B) actividad catalasa, (C) actividad NADP-ICDH, y (D) contenido en NO en hojas de plantas de pimienta incubadas en distintas condiciones. (I) Plantas control expuestas a temperatura óptima. (II) plantas expuestas a 8°C durante 24 h. (III) plantas expuestas a 8°C durante 24 h y posteriormente trasladadas a temperatura óptima durante otras 24 h. (IV) Plantas expuestas a 8°C durante 24 h, trasladadas a temperatura óptima durante 24 h y, finalmente expuestas otra vez a 8°C durante 24 h.

Paralelamente a los estudios del metabolismo de ROS y RNS durante el desarrollo y en condiciones de estrés por frío en plantas de pimiento, se llevó a cabo la puesta a punto de una nueva técnica más precisa que puede ser utilizada en futuras investigaciones sobre ROS y RNS en plantas superiores. Para ello, se desarrolló un nuevo método de detección y cuantificación de S-nitrosoglutatión.

3. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE S-NITROSOGLUTATION (GSNO) EN ÓRGANOS DE PLANTAS DE PIMIENTO (*Capsicum annuum* L.) MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE IONIZACIÓN POR ELECTROSPRAY (LC-ES/MS)

3.1. Análisis y validación del método LC-ES/MS

Con el propósito de identificar y cuantificar S-nitrosoglutatión (GSNO) y desarrollar un método para distinguir entre este RNS y el glutatión reducido y oxidado (GSH y GSSG, respectivamente) en plantas, se ha puesto a punto un método basado en una cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas de ionización por electrospray (LC-ES/MS) partiendo inicialmente de estándares comerciales para cada uno de los compuestos a identificar (GSNO, GSH y GSSG). La Fig. 3.34 muestra el cromatograma de LC-ES/MS típico de los principales iones obtenidos de la fragmentación molecular de los estándares. Para la cuantificación, los estándares de cada compuesto fueron preparados por separado. La linealidad de este procedimiento fue comprobada analizando las curvas de calibración. Se usaron cinco concentraciones en el rango de 1-10 ppm para GSH y GSSG, y de 0,1-10 ppm para GSNO. Las curvas de calibración indicaron un comportamiento lineal en las concentraciones seleccionadas con valores de R^2 alrededor de 0,999 y siempre superiores a 0,986 (Tabla 4.3). Por otra parte, basándose en los análisis estadísticos en la regresión lineal de las curvas de calibración de cada compuesto (Cuadros et al., 1993), se estimó la sensibilidad, el límite de cuantificación (LOQ) y el límite de detección (LOD) (Tabla 4.3). En consecuencia, LOD y LOQ fueron calculados como 3 y 10 veces, respectivamente de la relación señal/ruido, dando valores más bajos (10 veces) que la detección real. Por tanto, los datos fueron presentados usando los valores calculados del análisis de las curvas de calibración. Se inyectó cada estándar (30 μ l) a 5°C para prevenir una posible

degradación. La estabilidad de los estándares durante el análisis fue evaluada comparando sus concentraciones al inicio y al final de cada tanda durante los análisis (6-7 horas al día). Se investigaron los parámetros críticos que afectan la LC-ES/MS, a saber, el voltaje de cono y la energía de colisión. Para establecer el voltaje de cono y la energía de colisión óptimos para la detección de GSH, GSSG y GSNO, las señales de m/z 307,76, 337,00 y 612,90 de los iones precursores contra el voltaje de cono fueron evaluados, respectivamente. La Tabla 4.4 muestra la reacción múltiple de supervisión (MRM) optimizada para cada compuesto incluso el voltaje de cono, la energía de colisión, el ion precursor y la transición. Bajo estas condiciones, los tiempos de retención fueron de 3,36 min para el GSH, 7,30 min para el GSSG y 9,05 min para el GSNO. La Fig. 4.35 muestra los patrones de fragmentación de cada compuesto donde se muestran los iones precursores y productores de GSH (Fig. 4.35A), GSSG (Fig. 4.35B) y GSNO (Fig. 4.35C). El método de LC-ES/MS fue validado preparando soluciones de los tres estándares disponibles en la solución de extracción que fueron añadidos a muestras vegetales para comprobar el grado de recuperación de los mismos. La Tabla 4.5 muestra el porcentaje de recuperación de los estándares de GSH, GSSG, y GSNO añadidos a extractos de hojas de pimiento y analizados el mismo día (intra-día) y durante 3 días consecutivos (inter-día). La precisión del método fue evaluada por la desviación estándar relativa (RSD) de la inyección de cuatro réplicas. De este modo, la exactitud y precisión del intra-día y del inter-día proporcionaron valores aceptables, con recuperaciones de hasta un 70% de GSH y GSSG, y un RSD del $\leq 10\%$, con la excepción de GSSG, pinchado con 10 μg . Sin embargo, el porcentaje de recuperación del GSNO fue del 100%.

3.2. Análisis por LC-ES/MS del contenido de GSH, GSSG y GSNO en los distintos órganos de plantas de pimiento (raíz, tallo y hoja)

Una vez optimizado el método de espectrometría de masa, fue posible analizar estos compuestos en los diferentes órganos de plantas de pimiento.

El cultivo de las plantas se realizó como se indicó en el apartado correspondiente de material y métodos, y se mantuvo su crecimiento hasta los 30 días, momento en que se recogió el material vegetal para los ensayos correspondientes. Para los análisis cromatográficos, los órganos (raíces, tallos y hojas) de plantas de pimiento (300 mg) fueron homogenizados con mortero y pistilo añadiendo 1 ml de HCl 0,1 M. los

extractos se filtraron y centrifugaron a 21.000 g durante 20 min y a 4°C. Los sobrenadantes recuperados se filtraron a través de filtros de nylon de 0,45 µm, y se analizaron inmediatamente por LC-ES/MS. Todas las etapas de esta extracción se hicieron a 4°C y en oscuridad para evitar la degradación potencial de las muestras.

La Fig. 4.36 muestra distintos cromatogramas LC-ES/MS representativos de los principales iones productores obtenidos después de una fragmentación molecular de GSH (Fig. 4.36A), GSSG (Fig. 4.36B) y GSNO (Fig. 4.36C) en hojas de pimiento de 30 días. Aunque el tiempo de retención obtenido de cada compuesto en hojas de pimiento fue un poco más corto comparado con los tiempos de retención de los estándares correspondientes, la transición (m/z) de cada molécula fue idéntica lo que corrobora la identidad de estos compuestos en hojas. En raíces y hojas se obtuvieron cromatogramas y tiempos de retención similares a los de hojas (datos no demostrados).

La Tabla 4.6 muestra la cuantificación de GSH, GSSG y GSNO en hojas, tallos y raíces de plantas de pimiento de 30 días. En hojas, el contenido de GSH fue de aproximadamente 1,5 y 1,9 veces más alto que en raíces y tallos, respectivamente; sin embargo, el contenido de GSSG y GSNO fue de 1,4 a 1,8 veces más alto en raíces que en tallos y hojas, respectivamente. De este modo, los datos de las hojas de pimiento hicieron que las razones GSH/GSSG y GSH/GSNO sean más altas.

3.3. Metabolismo de GSNO en los distintos órganos de plantas de pimiento

Para profundizar más en el metabolismo de GSNO, en el material seleccionado (raíz, tallo y hoja), además de determinar la concentración de GSNO, se analizó el contenido de NO y la actividad GSNO reductasa (GSNOR) la cual metaboliza el GSNO hasta GSSG y NH₃. La detección del óxido nítrico (NO) por espectrofluorimetría y por microscopio de láser confocal (CLSM) y el ensayo de la actividad GSNO reductasa por espectrofotometría están descritos en el apartado Material y Métodos.

Las hojas y los tallos mostraron una actividad GSNOR similar, que fue 2,5 veces más alta que la de las raíces (Fig 4.37A). Comparando los datos del contenido de GSNO con los de la actividad GSNOR, se podría observar que estos resultados fueron opuestos a los encontrados para el GSNO presentados en la Tabla 4.6 (y representados asimismo en la Fig. 4.37B). Por otra parte, el contenido de NO en los diferentes órganos de plantas de pimiento mostró que las hojas y tallos tenían niveles similares pero en raíces dicho contenido fue de 2,7 veces superior (Fig. 4.37C).

La Fig. 4.38 muestra la localización celular de NO por CLSM en secciones transversales de los diferentes órganos de plantas de pimiento de 30 días de edad. En raíces, el NO se encontró principalmente en el xilema, células epidérmicas y las raíces laterales formadas de estas células. En el tallo, el NO está distribuido en todas las células, mientras que en hojas, el NO fue más destacable en las células epidérmicas y en los tejidos vasculares.

Tabla 4.3. Parámetros de la línea de regresión ($y = b + mx$) obtenida de las curvas de calibración de los estándares de GSH, GSSG y GSNO donde b es la intersección de y, m es la pendiente, r es el coeficiente de correlación, y r^2 es el cuadrado del coeficiente de correlación. La linealidad, la sensibilidad, el límite de cuantificación (LOQ) y el límite de detección (LOD) fueron determinados por análisis de las curvas de calibración (Cuadros et al., 1993).

	r	r ²	b	m	Linealidad	Sensibilidad (mg · l ⁻¹)	LOD (mg · l ⁻¹)	LOQ (mg · l ⁻¹)
GSH	0.994964	0.989954	5122.7	1635.1	0.94414	0.44	1.17	3.90
GSSG	0.993242	0.986529	2127.2	1604.4	0.88314	0.75	1.58	5.27
GSNO	0.999685	0.999371	1838.6	246.1	0.98225	0.13	0.31	1.03

Tabla 4.4. Condiciones de MRM optimizadas para el análisis del glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y S-nitrosoglutatión (GSNO).

	Voltaje de cono (V)	Energía de colisión (eV)	Ión Precursor (m/z)	Transición (m/z)
GSH	20	15	307.76	307.76→178.81
GSSG	25	20	612.90	612.90→354.61
GSNO	15	15	337.00	337.00→231.94

Tabla 4.5. Porcentaje de recuperaciones obtenidas de diferentes cantidades de estándares (GSH, GSSG y GSNO) después de ser añadidos a extractos de hojas y analizados por el método LC-ES/MS optimizado. Se analizaron cuatro réplicas a 2 niveles de concentraciones diferentes y las muestras fueron extraídas en el mismo día (intra-día) y en 3 días consecutivos (inter-día). RDS, desviación estándar relativa.

	μg	Variación intra-día n=4		Variación inter-día n=4 per 3 días	
		Recuperación (%)	RSD	Recuperación (%)	RSD
GSH	50	73	8.9	70	9.3
	100	60	1.3	67	8.4
GSSG	10	38	8.0	37	11.6
	20	68	14.4	69	10.6
GSNO	1	100	7.3	100	12.3
	2	100	9.8	100	9.0

Tabla 4.6. Contenido de glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y S-nitrosoglutation (GSNO) en órganos de plantas de pimiento identificado y cuantificado por LC-ES/MS. PF, peso fresco.

Órganos	GSH ($\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{PF}$)	GSSG ($\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{PF}$)	GSNO ($\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{PF}$)	GSH/GSSG	GSH/GSNO
Raíz	583.5 ± 7.6	6.2 ± 0.3	7.9 ± 1.9	73	74
Tallo	437.3 ± 65.6	5.8 ± 0.5	4.2 ± 0.4	75	104
Hoja	867.8 ± 14.6	3.5 ± 0.5	5.5 ± 1.0	248	158

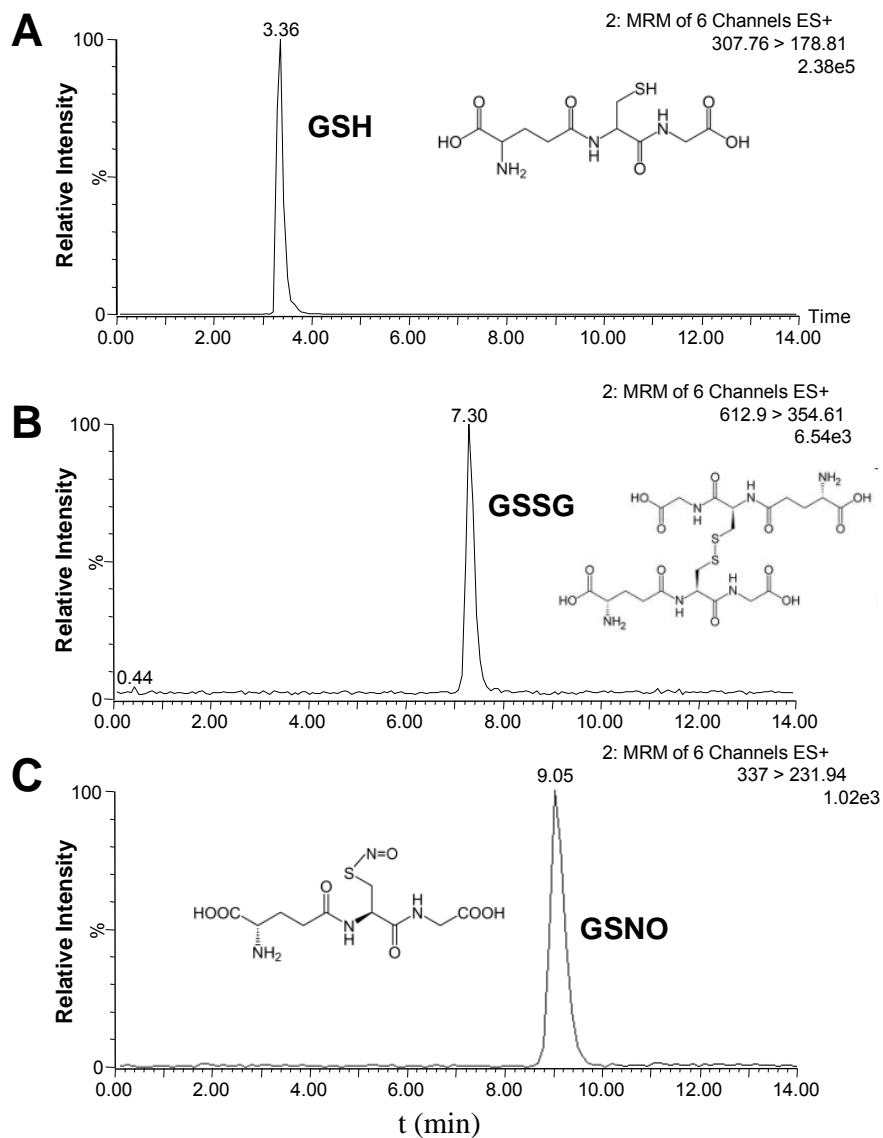


Fig. 4.34. LC-ES/MS cromatogramas de la mezcla de los tres estándares: GSH, GSSG y GSNO preparados en agua (3 ppm). Los cromatogramas muestran las transiciones de (A) GSH (307,76 → 178,81), (B) GSSG (612,90 → 354,61) y (C) GSNO (337,00 → 231,94).

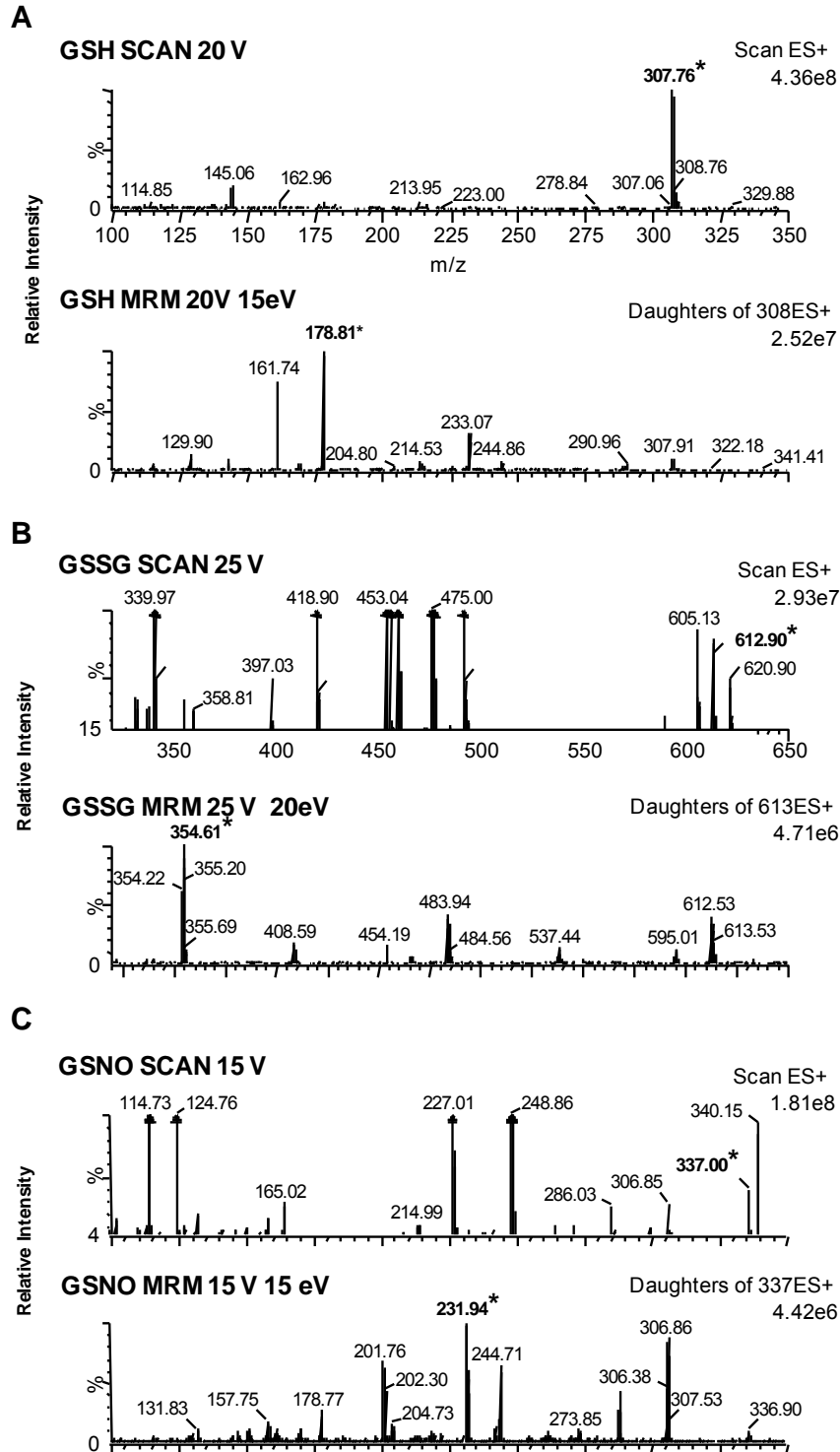


Fig. 4.35. Patrones de fragmentación de los compuestos analizados GSH, GSSG y GSNO. **A**, iones precursoros (m/z 307,76, parte alta) y productos (m/z 178,81, parte baja) de GSH estándar analizado en modo positivo. **B**, iones precursoros (m/z 612,90, parte alta) y productos (m/z 354,61, parte baja) de GSSG estándar analizado en modo positivo. **C**, iones precursoros (m/z 337,00, parte alta) y productos (m/z 231,94, parte baja) de GSNO estándar analizado en modo positivo. *, indica los iones correspondientes a cada uno de los compuestos.

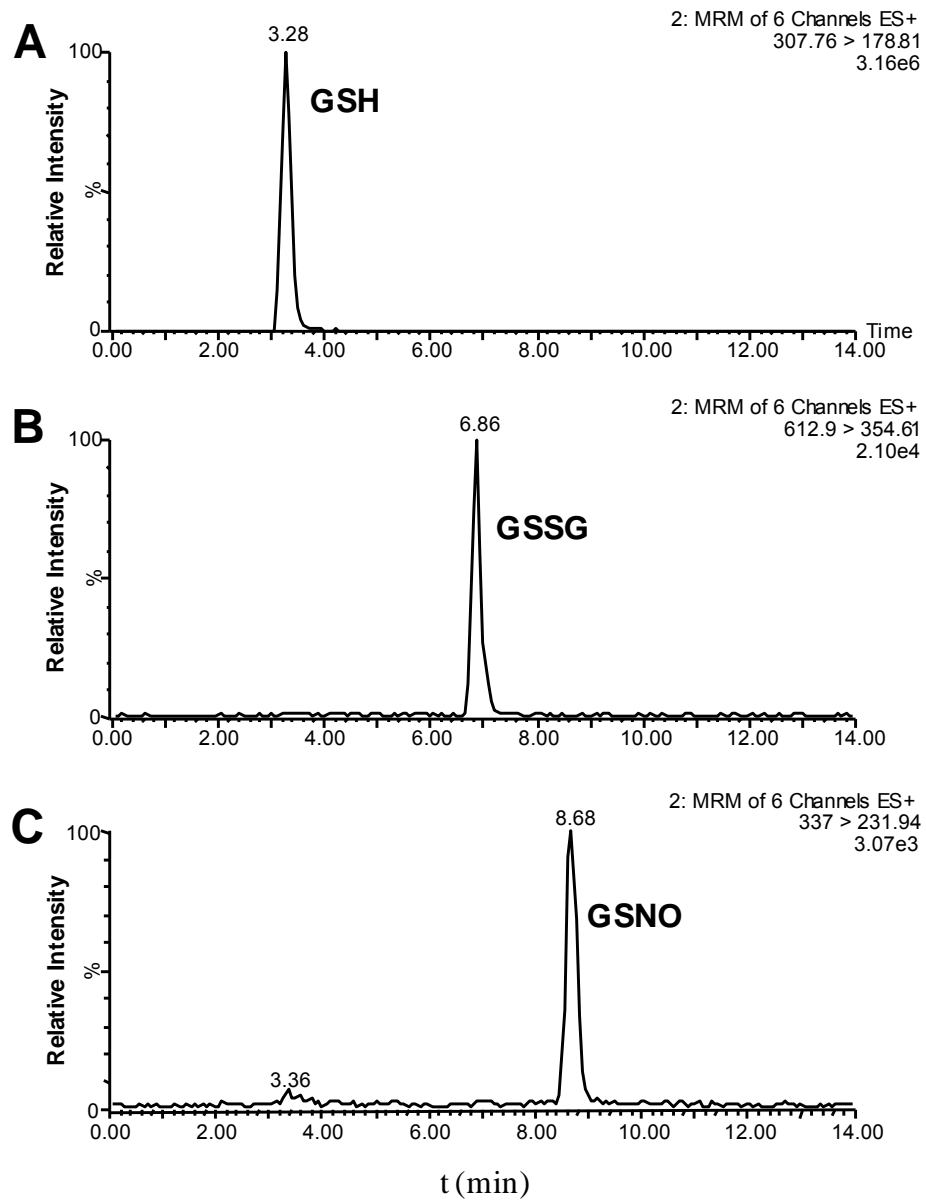


Fig. 4.36. LC-ES/MS Cromatograma de hojas de pimienta. Los cromatogramas muestran las transiciones de (A) GSH (307,76 → 178,81), (B) GSSG (612,90 → 354,61) y (C) GSNO (337,00 → 231,94).

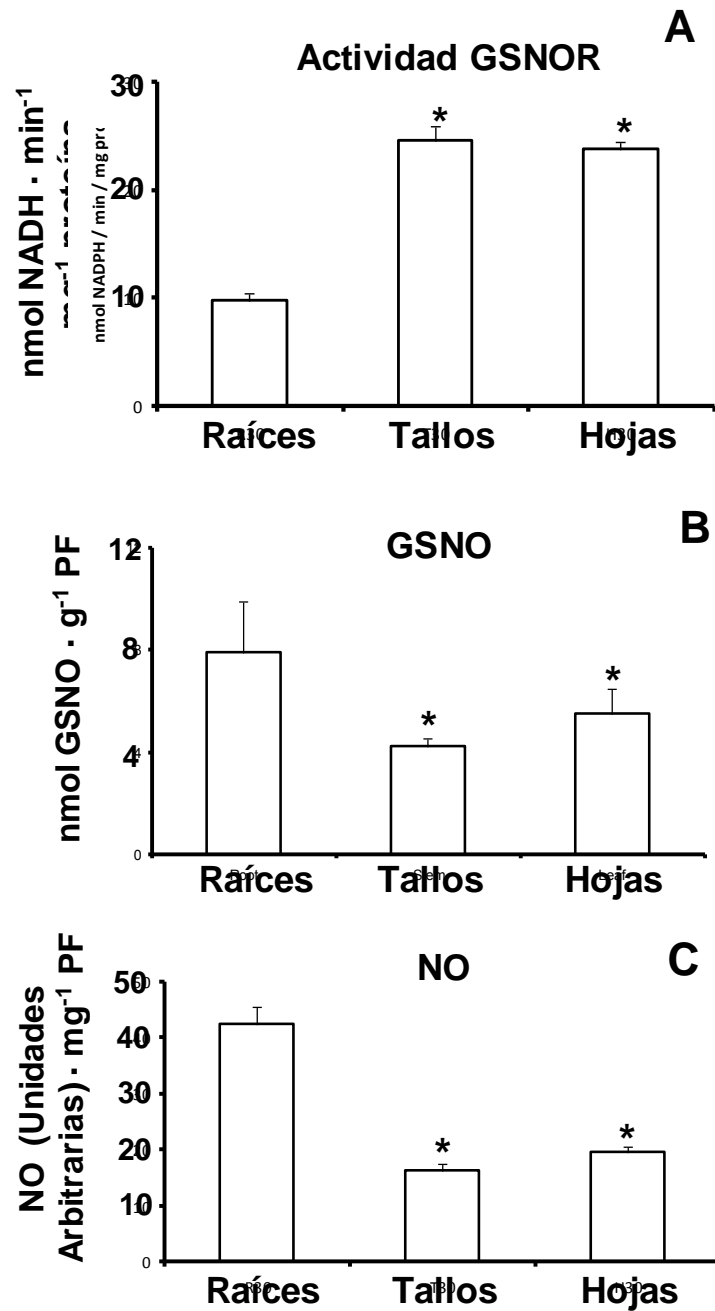


Fig. 4.37. Actividad S-nitrosoglutación reductasa (GSNOR), GSNO y contenido de NO en distintos órganos de plantas de pimienta. **A**, Actividad GSNOR. **B**, Contenido de GSNO detectado y cuantificado por LC-ES/MS (datos de la Tabla 1.4). **C**, Detección espectrofluorométrica de NO con DAF-2 en raíces, tallos y hojas de plantas de pimienta. La fluorescencia producida fue expresada como unidades arbitrarias por mg de peso fresco (PF). Los resultados son la media de 3 experimentos diferentes. * Las diferencias en comparación con los valores de raíces fueron significativas a $P < 0,05$.

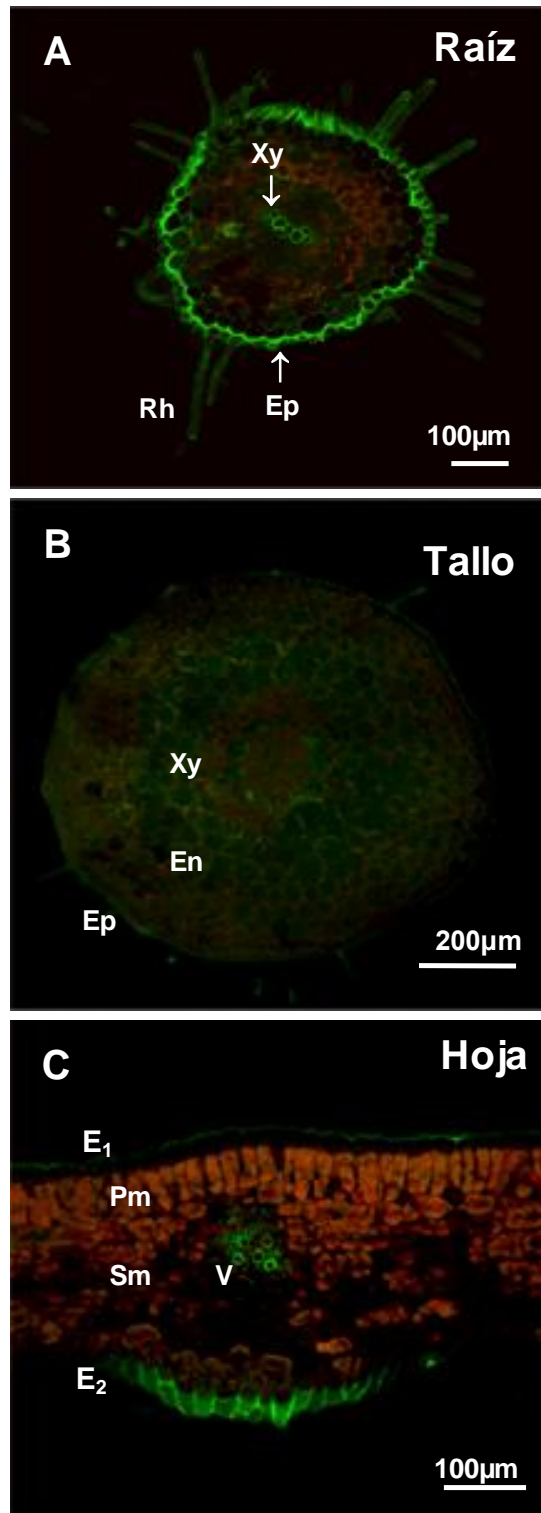


Fig. 4.38. Imágenes representativas ilustrando la detección y localización del NO endógeno por CLSM órganos de plantas de pimienta usando como fluoróforo DAF-FM DA 10 µM. **A**, Secciones transversales de raíces. **B**, Secciones transversales de tallos. **C**, Secciones transversales de hojas. El color naranja-amarillo corresponde a la autofluorescencia de los tejidos. Cada foto fue preparada a partir de 35-40 secciones transversales que fueron analizadas por CLSM. Xy, xilema; Ep, epidermis; Rh, pelos radicales; E₁, epidermis adaxial; E₂, epidermis abaxial; Pm, mesófilo en empalizada; Sm, mesófilo esponjoso; V, vena principal.

DISCUSIÓN
DISCUSSION

El objetivo principal del trabajo que se presenta en esta Memoria Doctoral ha consistido en el estudio de la posible implicación de las especies de oxígeno y de nitrógeno reactivo (ROS y RNS respectivamente) en procesos de transducción de señales, durante la germinación y en las primeras etapas del desarrollo, además de en plantas adultas portadoras de frutos. Paralelamente, se ha estudiado la implicación de las ROS y RNS, como componentes relevantes de los fenómenos de estrés oxidativo y nitrosativo, en el mecanismo de daño celular producido por situaciones de estrés abiótico, como es la baja temperatura. El análisis de esta situación permitirá definir y caracterizar patrones de comportamiento de las principales especies de oxígeno y nitrógeno reactivo frente a procesos de estrés abiótico.

Las plantas de pimiento son uno de los cultivos hortícolas más importantes a escala mundial, debido a que su fruto tiene una gran repercusión agronómica, nutricional y comercial. En España, el cultivo de pimiento ha crecido espectacularmente y ha tenido como consecuencia el desarrollo del cultivo en invernaderos en todo el litoral mediterráneo español (Namesny, 1996; 2006).

Los frutos de pimiento son, además, importantes fuentes naturales de antioxidantes como carotenoides, vitamina C o ascorbato y vitamina E o α -tocoferol, entre otros (Howard et al., 2000; Navarro, et al., 2006). En frutos frescos el contenido en vitamina C puede incluso más del doble del que se encuentra en frutas como las naranjas y las fresas (Davey et al., 2000; Proteggente et al., 2002; Mateos et al., 2005).

Las plantas poseen sistemas enzimáticos encargados de regular los niveles celulares de ROS. Entre estos sistemas, el ciclo ascorbato-glutation desempeña un papel fundamental por implicar enzimas y compuestos antioxidantes solubles como el ascorbato y glutatión que regulan el estado redox de la célula. Por tanto, es de gran interés el estudio de los diversos sistemas antioxidantes en frutos de pimiento, habida cuenta del vínculo establecido entre estos sistemas y las cualidades nutricionales de los productos naturales.

1. Función de las ROS y sistemas antioxidantes en el desarrollo de las plantas de pimiento

Las ROS son producidas durante el metabolismo celular normal. Estas especies están implicadas en varios aspectos de la fisiología de la semilla; así, la generación de ROS

puede provocar estrés oxidativo y daño de los componentes celulares (proteínas, lípidos, DNA y polisacáridos) que conduce al deterioro de la semilla. Por otra parte, las ROS tienen un papel en la interrupción de la dormancia de la semilla (Bailly 2004, Oracz et al. 2007, Müller et al. 2009, Oracz et al. 2009), sin duda alguna debido a que las ROS sirven como moléculas mensajeras que juegan un papel en el crecimiento de la planta y los procesos de desarrollo (Rodríguez et al., 2002; Foreman et al., 2003).

Los resultados obtenidos de la actividad catalasa y SOD en los primeros días de desarrollo de las plántulas de pimiento mostraron una mayor actividad de estas enzimas antioxidantes en tallos y hojas, lo que podría sugerir la implicación de sus respectivas ROS (O_2^- y H_2O_2) en los procesos de germinación y desarrollo en esta especie vegetal. En *Ipomoea triloba*, la actividad de estas dos enzimas fue mayor durante la germinación y los primeros estadios de desarrollo de la raíz (Pergo & Ishii-Iwamoto, 2011). En plantas de guisante (*Pisum sativum* L.) se observó igualmente un aumento de las actividades catalasa y SOD debido probablemente al aumento de la disponibilidad del oxígeno en raíz (Wojtyla et al., 2006). Estas enzimas son probablemente las principales enzimas antioxidantes implicadas en el secuestro de las ROS en la parte aérea de las plantas durante la germinación. Por el contrario, se observó en raíces de 14 días menos intensidad en las isoformas de SOD (Fig. 4.2), lo que se corresponde con las imágenes de CLSM de localización del radical superóxido, donde se observó una fluorescencia intensa solamente en raíz de 14 días (Fig. 4.16F).

Las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión protegen a las células vegetales frente al estrés oxidativo usando una serie de reacciones redox, principalmente en los tejidos fotosintéticos (Foyer & Halliwell, 1976). Las enzimas de este ciclo se localizan principalmente en cloroplastos, mitocondrias, citosol y peroxisomas (Jiménez et al., 1997; Foyer et al., 1997; Mittova et al., 2002). La APX tiene un papel importante en la eliminación de H_2O_2 usando el ascorbato como donador de electrones. Esta proteína está implicada en la respuesta de defensa frente al estrés oxidativo. En nuestro caso se observó un aumento de la actividad APX en raíces de plantas senescentes (90 días; Fig. 4.5) y un bajo contenido en ascorbato (Tabla 4.1). Este incremento de la actividad APX puede ser una respuesta al estrés oxidativo generado durante la senescencia de las plantas de pimiento, favorecida por un incremento de la producción de H_2O_2 en

peroxisomas, según se ha descrito anteriormente (Pastori & del Río, 1997; Jiménez et al, 1998).

Las actividades G6PDH y 6PGDH son altas en raíces de plántulas de pimiento en los primeros días de desarrollo; este aumento de la actividad de las dos enzimas proporcionaría NADPH para proveer a estos órganos de poder reductor para sus reacciones de oxidación-reducción. La presencia de las deshidrogenasas del tramo oxidativo de la ruta de las pentosas fosfato representa un apoyo a los sistemas antioxidantes por su eficiente reciclaje de NADPH para su posterior utilización en el ciclo ascorbato-glutati6n. Ello contribuiría a disminuir un exceso en la concentraci6n de per6xido de hidr6geno en la c6lula (Mateos et al., 2003).

El NADPH podría ser empleado por las NADPH oxidasas de la membrana plasmática de las c6lulas vegetales. Estas NADPH oxidasas controlan el desarrollo de la planta produciendo ROS, las cuales participan en la expansi6n de las c6lulas de la planta a trav6s de la activaci6n de canales de Ca^{2+} (Foreman et al., 2003). En ciertas situaciones de estr6s, principalmente ataque por pat6genos, se ha observado una activaci6n de dicha actividad NADPH oxidasa. Ello genera un aumento en la generaci6n del radical super6xido al medio que r6pidamente es desproporcionado a H_2O_2 , siendo 6ste liberado para intervenir en la transducci6n de señaes (Mori & Schroeder, 2004). En nuestro caso, se podría pensar que la NADPH oxidasa podría ser una de las enzimas implicadas en la producci6n de ROS controlando así el desarrollo de la planta. Las ROS y los niveles de NADPH pueden tomar parte en los procesos de señaalizaci6n que tienen lugar en el proceso de desarrollo de la planta. De hecho, el desarrollo y el crecimiento de las plantas est6n dirigidos por reacciones de transferencia electr6nica en las que el NAD(P)H es un compuesto clave para interaccionar con las ROS. El NADPH actúa, junto con el glutati6n y el ascorbato, para modular el estado redox de la c6lula y para transmitir la informaci6n necesaria que regula las rutas de señaalizaci6n (Noctor, 2006).

En este trabajo las hojas y los frutos son los 6rganos que muestran un mayor contenido de ascorbato y glutati6n. Los niveles detectados son del mismo orden que los descritos en otros trabajos anteriores (Proteggente et al., 2002, Palma et al., 2007). El mayor contenido en ascorbato en estos 6rganos se debe, sin duda, a que la mayor parte

se acumula en cloroplastos de tejidos verdes, según se ha descrito anteriormente (Palma et al., 2007). En frutos amarillos y rojos, el ascorbato se mantiene en altos niveles localizados fundamentalmente en los cromoplastos (Mateos et al., 2003). A pesar de los importantes cambios metabólicos que sufren los frutos durante la maduración (transformación de los cloroplastos en cromoplastos; degradación de clorofila, mayor síntesis de carotenoides, alteraciones metabólicas en los peroxisomas, etc.) (Mateos et al., 2003; Palma et al., 2011), éstos mantienen los niveles de ascorbato. No en vano el ascorbato se sintetiza en las mitocondrias, que mantienen su funcionalidad, al menos en este tipo de metabolismo. La galactono- γ -lactona deshidrogenasa (GalLDH) es una de las principales enzimas implicadas en la síntesis de ascorbato. En trabajos realizados en nuestro laboratorio (Mateos Bernal, 2006) se ha observado que la mayor actividad de esta enzima se da en los frutos, lo que coincide con la cantidad de ascorbato en los mismos. Dado que los niveles de ascorbato no sufren modificaciones en la maduración de los frutos de pimiento, a pesar de los importantes cambios metabólicos sufridos en estos órganos, se ha sugerido que la vitamina C podría actuar como un tampón redox que amortiguaría los desequilibrios oxidativos que pudieran ocurrir durante el proceso, pudiendo abortarlo (Palma et al., 2007, 2011).

Es notorio destacar la correspondencia existente entre el cociente ASC/DHA y las actividades enzimáticas de cada órgano. Así en todos los órganos, exceptuando tallos, el coeficiente ASC/DHA fue mayor que 1, lo que indica que el ascorbato se encuentra mayormente en su forma reducida (Tabla 7). Por el contrario, en tallos este coeficiente es menor que 1 y, por tanto, son mayores los niveles de ascorbato oxidado o deshidroascorbato. Estos datos sustentarían los valores observados en las actividades MDAR y DAR que son mayores en tallos. Puesto que la forma más abundante del ascorbato es la reducida (ASC), en tallos, ambas enzimas serían las encargadas de regenerar el ASC en los tallos para que pudiera ser utilizado de manera eficiente en la maquinaria antioxidante de la planta. Por otro lado, el patrón de actividad de la MDAR y la GR en los distintos órganos fue paralelo. Esto sugiere la funcionalidad de esta parte del ciclo ascorbato en dichos órganos, dado que ambas necesitan de poder reductor en forma de NADPH para el buen funcionamiento de las otras enzimas del ciclo.

Se observó una discrepancia entre la expresión de los genes que codifican las enzimas del ciclo ascorbato-glutation y la actividad de las mismas en los distintos

órganos, lo que indica que el ciclo parece tener una regulación post-traducciona propia de cada órgano. Este fenómeno ya ha sido descrito en los sistemas antioxidantes enzimáticos, lo que hace pensar en una interrelación compleja entre los distintos antioxidantes de la célula (Mateos, 2006). No obstante, convendría seguir investigando este aspecto, dada la multiplicidad génica/isoenzimática de estos sistemas antioxidantes.

2. Función de las RNS en el desarrollo de plantas de pimiento

El NO tiene un papel importante en un amplio rango de respuestas fisiológicas durante el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Lamattina et al., 2003; Neill et al., 2003; Corpas et al., 2004b; del Río et al., 2004; Shapiro, 2005; Corpas et al., 2006b; Wilson et al., 2007; Corpas et al., 2008b; Palavan-Unsal & Arisan 2009). Este gas puede regular el crecimiento de la planta dependiendo de la dosis, de modo que a bajas concentraciones estimula el crecimiento y altas concentraciones lo inhibe (Anderson & Mansfield, 1979; Hufton et al., 1996; Leshem & Haramaty, 1996; Gouvea et al., 1997; Prado et al., 2004; Lehner et al., 2009; Jin et al., 2009). La molécula NO parece ser que se sintetiza principalmente en tejidos que se encuentran en fase de crecimiento, como el eje embrionario y los cotiledones; en cambio, sus niveles bajan en órganos senescentes y maduros (Beligni & Lamattina, 2001).

En raíces, se mostró que los donadores exógenos de NO inducen la elongación de la raíz (Kopyra & Gwózdź, 2003) y provocan la formación de raíces de forma espontánea (Pagnussat et al., 2002). En nuestro modelo experimental se observó la presencia de NO en la epidermis de la raíz de 7 y 10 días (Fig. 4.16A y B), lo que podría indicar la implicación de NO en una cascada de señales durante el desarrollo y la formación de nuevas raíces. Kopyra y Gwózdź (2003) han descrito que los donadores de NO contrarrestan los efectos inhibidores de metales pesados y salinidad sobre el crecimiento de la raíz, y esto sugiere que el NO detectado en la raíz podría tener un papel protector en condiciones de estrés abiótico (Hung et al., 2002; Zhao et al., 2004). Además, la producción de NO en la raíz podría servir como molécula que participe en la interacción de la planta con microorganismos del suelo tanto beneficiosos (micorrizas o rizobacterias) (Stöhr & Ullrich, 2002; Horchani et al. 2011) como patógenos (Murakami et al., 2011).

Las hojas son los principales órganos donde tiene lugar la fotosíntesis y su desarrollo está altamente regulado (Bharathan & Sinha, 2001). En hojas, el NO ha sido estudiado principalmente desde el punto de vista de su implicación en el mecanismo de respuesta a estrés biótico (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998; Foissner et al., 2000). La presencia de NO en peroxisomas de hojas fue descrito en la década pasada (Corpas et al., 2004), y se estudió también el efecto del NO sobre algunos procesos bioquímicos de mitocondrias y cloroplastos de hojas (Yamasaki et al., 2001; Zottini et al., 2002; Takahashi & Yamasaki, 2002; Jasid et al., 2006). Una función importante de NO en hojas está referida a su participación en la señalización por ácido abscísico en las células guarda estomatales (Neill et al., 2002; Gracia-Mata et al., 2003). Pero también ha sido descrita la inhibición de la producción de NO durante la senescencia (Corpas et al., 2004) y estrés por cadmio (Barroso et al., 2006; Rodríguez-Serrano et al., 2006) en hojas de guisante, y por tratamiento con calor en hojas de trigo, orquídea y aloe (Xu & Zhao, 2003). Sin embargo, en tabaco el nivel de NO en hojas fue mayor en situaciones de alta temperatura, estrés hiperosmótico, epi-iluminación y estrés por sal (Gould et al., 2003). Los resultados obtenidos aquí muestran que las hojas son los órganos con menos contenido de NO (Fig. 4.9), y en las imágenes del CLSM se observó menos intensidad en las hojas de 14 días (Fig. 4.18A y B). Esto sugiere que estos niveles de NO generado en hojas podría ser suficiente para un desarrollo óptimo de estos órganos.

En tallos de 7 días se observó la presencia de NO en la epidermis y tejidos vasculares (Fig. 4.17A). El NO presente en estos órganos podría tener una importancia fisiológica en distintos procesos como son la elongación del tallo, el desarrollo del meristemo y la comunicación entre órganos por el sistema vascular, según se ha descrito anteriormente (Corpas et al., 2006).

Actualmente, está bien establecido que el GSNO es el sustrato fisiológico preferido de la enzima formaldehído deshidrogenada dependiente de glutatión (Leterrier et al., 2011) porque cataliza la reducción dependiente de NADH del S-nitrosoglutatión (GSNO) a GSSG y NH_3 , siendo por esa razón re-denominada como GSNO reductasa (GSNOR). La presencia de la actividad GSNOR en plantas ha sido demostrada fehacientemente (Sakamoto et al., 2002; Díaz et al., 2003, Feechan et al., 2005; Barroso et al., 2006; Espunya et al., 2006; Leterrier et al., 2011). Ha sido descrito que la actividad GSNOR es necesaria para la aclimatación de las plantas a la alta temperatura y

para un desarrollo normal bajo condiciones óptimas de crecimiento (Lee et al., 2008). En *Arabidopsis*, el análisis de la actividad y expresión de la GSNOR mediante métodos de inmunolocalización e histoquímicos mostró que esta proteína está diferencialmente expresada, siendo más alta en raíces y hojas desde los primeros estadios de desarrollo (Espunya et al., 2006). Además, la sobreexpresión y la supresión de la GSNOR en plantas de *Arabidopsis* transgénicas tuvo un fenotipo de raíz corta que estaba correlacionado con un bajo nivel de GSH intracelular y una alteración en su distribución espacial en las raíces, sugiriendo así que la GSNOR y, por consiguiente, el GSNO podrían estar implicados en la regulación del estado redox del órgano (Espunya et al., 2006). Por otro lado, la GSNOR está implicada en el mecanismo de respuesta frente a distintos estreses bióticos (Feechan et al., 2005; Rustérucchi et al., 2007; Chaki et al., 2009a) y abióticos incluyendo metales pesados (Barroso et al., 2006), herida mecánica y el ácido salicílico (Díaz et al., 2003; Chaki et al., 2011b), baja y alta temperatura (Corpas et al., 2008; Lee et al., 2008; Airaki et al., 2011; Chaki et al., 2011a) y su gen se expresa diferencialmente dependiendo del tipo de célula y de órgano (Corpas et al., 2007). En el presente estudio, hay que señalar que entre los tres órganos de las plantas de pimiento analizados, las raíces mostraron el más alto contenido de GSNO, lo que parece estar relacionado con el más alto contenido de NO y la más baja actividad GSNOR. En este contexto, el análisis de esta actividad en los diferentes órganos de la planta de pimiento con la cuantificación simultánea de NO mostró que en plantas de pimiento no estresadas, hay equilibrio entre estos compuestos. Así, una alta actividad GSNOR provocó un bajo contenido de GSNO que dio también un bajo contenido en NO. Este comportamiento se observó en tallos y hojas. Sin embargo, las raíces mostraron un comportamiento totalmente opuesto.

La nitración de tirosina es una modificación covalente de las proteínas por adición de un grupo nitro (-NO₂) en posición orto del anillo de un residuo de tirosina formando 3-nitrotirosina (Ischiropoulos, 1998, 2003; Gow et al., 2004; Radi, 2004). En animales, esta modificación de las proteínas ha sido usada como marcador de enfermedades patológicas y de estrés oxidativo (Ischiropoulos, 2003), y también es considerada como un marcador del estrés nitrosativo. Sin embargo, en plantas se dispone de poca información sobre la nitración de la tirosina de proteínas (Perazzolli et al., 2004; Corpas et al., 2007; Hebelstrup et al., 2008). No obstante, diversos trabajos

han descrito cambios en el patrón de proteínas nitradas bajo condiciones de estrés abiótico o biótico en distintas especies vegetales (Saito et al., 2006; Valderrama et al., 2007; Corpas et al., 2008a; Chaki et al., 2009a, 2010; Airaki et al., 2011), pero sin llegar a identificar cuáles son las posibles proteínas modificadas. Otros trabajos sí realizaron una identificación de las proteínas susceptibles de modificación por nitración en situaciones de estrés de la planta (Cecconi et al., 2009; Chaki et al., 2011) o en condiciones fisiológicas (Chaki et al., 2009b; Lozano-Juste et al., 2011). En este trabajo se analizó, en condiciones fisiológicas, el patrón de nitración de proteínas en extractos crudos de raíces, tallos y hojas durante distintos días de desarrollo (7, 10, 14 y 90 días), observándose un cambio del patrón de proteínas que sufren nitración de tirosina en los órganos de las plantas senescentes (90 días). En este caso se detectaron diferentes proteínas inmunoreactivas frente al anticuerpo anti-nitrotirosina con un tamaño molecular aparente entre 34 y 91 kDa. Se ha descrito una disminución de los niveles de la nitración de tirosina en plantas transgénicas de tabaco que expresan elevados niveles de citoquininas (Wilhemová et al., 2006) y en cotiledones de soja de 25 días (Jasid et al., 2009). Esta disminución de nitración de la tirosina durante la senescencia puede estar relacionada con el descenso de NO que se produce en estas condiciones, lo que a su vez, llevaría a una menor producción de peroxinitrito y, por tanto, a una menor nitración de los residuos de tirosina de las proteínas. Diversos trabajos que establecen una relación entre NO y senescencia se han realizado mediante una aplicación exógena del mismo, mostrando que la fumigación con NO retrasaba la senescencia, prolongaba la vida de frutas y vegetales (Leshem et al., 1998) y atenuaba la inducción de la senescencia en *Arabidopsis* (Mishina et al., 2007). Por otro lado, los niveles de NO endógeno disminuyen conforme avanza el proceso de senescencia en flores (Leshem et al., 1998), hojas de tabaco (Wilhemová et al., 2006), en haces vasculares de hojas de guisante senescentes (Corpas et al., 2004), y en cotiledones de soja de 25 días respecto a cotiledones de 10 días (Jasid et al., 2009).

3. La baja temperatura induce los sistemas antioxidantes y perturba la homeostasis redox en hojas de pimiento

Entre los distintos estreses abióticos que afectan a las plantas, la baja temperatura (LT) puede considerarse como uno de los más perjudiciales (Hannah et al., 2005; Sharma et al., 2005; Janská et al., 2010). Así, varios estudios mostraron que la LT induce cambios

en la expresión de centenares de genes seguido por un incremento de los niveles de varios metabolitos, de los cuales algunos tienen efectos protectores frente a los daños provocados por el estrés por frío (Seki et al., 2002; Shinozaki et al., 2003; Sharma et al., 2005; Chinnusamy, Zhu and Zhu, 2007; Zhu, Dong and Zhu, 2007; Winfield et al., 2010). Aunque hay varios trabajos enfocados en el análisis de la respuesta de los antioxidantes a la LT, hay disponible poca información sobre la implicación del NO y de las moléculas derivadas del NO en este proceso. Por consiguiente, uno de los objetivos principales de esta tesis fue el estudio del metabolismo de los antioxidantes y la homeostasis de ROS y RNS en plantas de pimiento bajo condiciones de LT, puesto que este estrés ambiental afecta considerablemente el crecimiento de estas plantas.

Durante el periodo de tiempo en el cual las plantas de pimiento fueron expuestas a LT (3 días) se observó una inducción total de los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. La catalasa y la APX, implicadas en la eliminación directa del H₂O₂, fueron inducidas después de 24 h incluso cuando el contenido de esta molécula aparentemente no cambiaba. Se observó un incremento similar en la actividad MDAR además del observado en el contenido de ascorbato y GSH. Sin embargo, la actividad GR se mantenía durante el primer día, con una reducción significativa durante el segundo día de exposición a LT. En otras especies de plantas, la respuesta de los sistemas antioxidantes al estrés por LT depende de cómo de baja es la temperatura y de la duración del tratamiento. Por ejemplo, en plantas de tabaco expuestas a LT bajo condiciones normales de luz, se indujeron la Fe-SOD cloroplastídica y la CuZn-SOD citosólica (Tsang et al., 1991). En arroz, la LT induce un incremento rápido en la actividad APX y después incrementos graduales de las actividades SOD, MDAR Y GR, lo que sugiere regulaciones diferenciales de estas enzimas; en cambio, la actividad catalasa no se afectó significativamente (Oidaira et al., 2000). En plántulas de arroz expuestas al calor (42°C durante 24 h) antes de LT (5°C durante 7 días) se observó un comportamiento interesante de la APX. Así, las plantas no desarrollaron daño por frío y se observó un nivel más alto de la actividad y expresión de la APX, mientras que la actividad catalasa disminuyó y no se observaron diferencias significativas en la actividad SOD (Sato et al., 2001). En plantas de guisante expuestas a LT (8°C) durante 48 h, la actividad MDAR no mostró ningún cambio significativo pero los transcritos de MDAR y APX aumentaron 2,2 y 2,6 veces, respectivamente (Leterrier et al., 2005,

2007). En hojas de espino (*Crataegus azarolus*) expuestas a LT (4°C) durante 24 h, las actividades MDAR y DHAR aumentaron y alcanzaron un máximo después de 16 h de tratamiento. Esto iba acompañado por un incremento en la expresión génica de ambas enzimas (Eltelib et al., 2010). En el género *Coffea*, se observaron distintos niveles de tolerancia al frío, siendo el genotipo Icatu el mejor documentado porque tiene incrementos significativos en las actividades de la CuZn-SOD cloroplastídica y la APX (Fortunato et al., 2010). Por último, en los ejes embrionarios de lotus (*Nelumbo nucifera*) expuestos a LT (4°C) durante 48 h el gen de la Mn-SOD fue inducido 8 veces (Naydenov et al., 2010).

El GSH es uno de los principales antioxidantes solubles de bajo peso molecular, además del principal compuesto tiólico no proteico en plantas (Foyer and Noctor 2005a,b; Noctor 2006; Szalai et al., 2009). El glutatión contribuye a mantener la señalización y la homeostasis redox celular (Meyer, 2008). Así, el glutatión ejerce un papel protector basado en la capacidad reductora del GSH y de la relación GSH/GSSG. En hojas de plantas de pimiento expuestas a LT se observó un incremento significativo de GSH desde el primer al tercer día de tratamiento con LT y un incremento significativo en la relación GSH/GSSG. En plantas de maíz el tratamiento con una combinación de dos fitoprotectores (CGA 154 281 [4-dichloroacetyl-3,4-dihydro-3-methyl-2H-1,4-benzooxazine (benoxacor)] y BAS 145 138 {1-dichloroacetyl-hexahydro-3,3,8 δα-trimethyl-pyrrolo-[1,2-α]-pyrimidine-6-(2H)-one-(dicyclonone)}) provocó un aumento del GSH total, con una protección simultánea frente a LT (5°C) (Kocsy et al., 2001a). Se encontró un resultado similar en plantas de judías, donde el pretratamiento de las hojas con H₂O₂ provocó un aumento del nivel de GSH y, por consiguiente, un incremento de la tolerancia a LT (Yu, Murphy and Lin, 2003).

El ascorbato es un secuestrador potente de ROS que reacciona con el H₂O₂ en una reacción catalizada por la APX, y no enzimáticamente con el ¹O₂, el O₂^{•-} e hidroperóxidos lipídicos (Foyer, 2001; Asada, 2006). En hojas de pimiento, la LT indujo un aumento en el contenido de ascorbato, habiéndose descrito resultados similares en otras especies de plantas. En hojas de espinacas expuestas a 10°C, el contenido de ascorbato se incrementó y, después de 7 días, fue de aproximadamente un 41% más alto que en plantas cultivadas a 25°C (Proietti et al., 2009). En el alga microscópica *Dunaliella salina*, durante el crecimiento a LT (13°C durante 24 h) se

incrementó el *pool* de ascorbato total en un 10-50%. Esto iba acompañado por un aumento de GSH y de la actividad SOD (Haghjou, Shariati and Smirnov, 2009).

Se debe tener en cuenta que la producción de ROS y los sistemas antioxidantes tienen múltiples localizaciones subcelulares incluyendo los cloroplastos, el citosol, la mitocondria y los peroxisomas, entre otros, y en nuestras condiciones experimentales, estos orgánulos pueden participar en una buena modulación de los niveles de ROS que podrían contribuir también al control del posible daño o ser usados para la señalización en condiciones de baja temperatura (Corpas et al., 2001; Mittler, 2002; Møller et al., 2007; Miller et al., 2010; Møller and Sweetlove, 2010). En plantas de *Arabidopsis* expuestas a LT, se acumuló el H₂O₂ en las células, y se incrementó la actividad de la enzima APX (O'Kane et al., 1996). En hojas de maíz, la LT indujo cambios en la distribución del H₂O₂ y de los antioxidantes entre las células de la vaina y el mesófilo (Pastori, Foyer and Mullineaux, 2000). En nuestro caso, el contenido en H₂O₂ no mostró ningún cambio significativo por el tratamiento a LT, lo cual podría sugerir una posible participación de este metabolito en los procesos de señalización al no provocar daños celulares.

4. Las deshidrogenasas generadoras de NADPH están implicadas en el mecanismo de respuesta a baja temperatura

El NADPH es esencial para la defensa frente al estrés oxidativo, ya que es la coenzima necesaria para la reducción del GSSG por la GR en el ciclo ascorbato-glutatión, y también es necesario para las actividades NADPH oxidasa y tiorredoxina reductasa (Noctor, Queval and Gakière, 2006), entre otras. El aumento general de la actividad de las principales deshidrogenasas generadoras de NADPH incluyendo la G6PDH, la 6PGDH, la NADP-ICDH y la ME, observado en plantas de pimiento expuestas a LT sugiere que estas enzimas deben jugar un papel importante en el proceso de la aclimatación al frío observada durante exposición a LT. En el caso de LT, un incremento en la actividad G6PDH ha sido descrito en alfalfa (Krasnuk, Jung and Witham, 1976), en especies de género *Lolium* (Bredemeijer and Esselink, 1995), en soja (van Heerden et al., 2003), en plátano (Lin et al., 2001), y en el álamo (Lin et al., 2005). En las raíces de arroz y en hojas de guisante, la actividad y la expresión de la NADP-ICDH también está inducida por LT (Saruyama and Tanida, 1995; Lu et al.,

2005; Leterrier et al., 2007; Lee et al., 2009). Recientemente, ha sido descrito en hojas de plántulas de maíz que los transcritos de ME están sobreexpresados en respuesta al estrés por frío (Nguyen et al., 2009).

Estos resultados sugieren que bajo condiciones de estrés por LT las plantas de pimienta parecen responder incrementando la producción de NADPH ya que el aumento de todas las actividades de las deshidrogenasas generadoras de NADPH se mantuvo durante los 3 días de tratamiento.

5. La baja temperatura afecta la homeostasis de NO

En hojas de pimienta, la LT provocó una disminución en el contenido de NO y esto podría estar correlacionado con el aumento de GSH ya que ambas moléculas pueden reaccionar no enzimáticamente para formar GSNO, que podría ser considerado el S-nitrosotiol más abundante en plantas y una molécula transportadora de NO a larga distancia que puede operar bajo ciertas condiciones de estrés (Lindermayr et al., 2005; Barroso et al., 2006; Chaki et al., 2009a, 2011). Este comportamiento está también bien correlacionado con la actividad GSNOR observada durante las primeras 24 h de exposición a LT. Además, el análisis por CLSM permitió observar que las hojas de las plantas de pimienta expuestas a LT mostraron un aumento en los niveles de ONOO⁻, que se forma por la reacción entre NO y O₂⁻ ($k = 1,9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$) (Kissner et al., 1998). Esta acción podría explicar el incremento de la nitración proteica observada durante el primer y el segundo día de exposición al estrés por LT, porque el ONOO⁻ es una molécula que puede favorecer esta modificación post-traducciona (Radi, 2004; Szabó, Ischiropoulos and Radi, 2007). El origen del NO necesario para formar el ONOO⁻ podría ser el creciente contenido de SNOs. Es conocido que los SNOs, en presencia de algunos metales y reductores como es el GSH y el ascorbato - que aumentaron en pimienta por la LT (Tabla 4.2) - pueden ser descompuestos dando lugar al NO según se ha descrito anteriormente (Holmes and Williams, 2000; Smith and Dasgupta, 2000). Por otra parte, en otras especies de plantas ha sido descrito que la LT puede promover un efecto opuesto sobre el contenido de NO. En hojas de plantas de guisante expuestas a LT durante 48 h se observó un aumento en el contenido de NO, que fue acompañado por un incremento de los SNOs, la actividad GSNO reductasa y las proteínas nitradas en tirosina (Corpas et al., 2008). Un comportamiento similar del NO

fue descrito en plantas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a 4°C durante 1-4 h (Cantrel et al., 2011) o durante la aclimatación al frío (Zhao et al., 2009) donde incrementó el contenido del NO. Por consiguiente, todos estos resultados sostienen la existencia de una conexión entre el metabolismo de NO y el estrés por LT.

6. La baja temperatura provoca estrés oxidativo y nitrosativo

En plantas de pimiento, los síntomas fenotípicos observados durante el primer y el segundo día de tratamiento a LT iban acompañados por un aumento de la peroxidación lipídica y de la nitración de la tirosina de las proteínas (NO₂-Tyr), que son considerados marcadores bioquímicos del estrés oxidativo y nitrosativo, respectivamente (Requena et al., 1996; Corpas et al., 2007) (Fig. 1.5). Existen varios ejemplos donde el aumento de los productos oxidados como son los lípidos se considera un parámetro fiable para indicar el daño de las membranas celulares, siendo las membranas de los cloroplastos las primeras y donde el daño es más aparente (Krarsch and Wise, 2000). En nuestro caso, se usó un procedimiento histoquímico para detectar la peroxidación lipídica pues en comparación con los métodos bioquímicos, permite detectarla en células individuales de un tejido compuesto de distintos tipos de células. Así, en hojas se observó que la LT produce peroxidación lipídica en los tejidos vasculares, lo que explicaría la flacidez de la hoja durante las primeras 48 h de exposición a LT. De modo parecido, la recuperación observada durante el tercer día estaría correlacionada con la menor peroxidación lipídica detectada en las hojas. Además, el aumento de la actividad NADPH oxidasa en la membrana puede también contribuir al daño producido. El estrés oxidativo observado por el tratamiento por LT en hojas de plantas de pimiento durante el primer y segundo día estaría de acuerdo con estudios previos descritos en plantas de maíz (Prasad et al., 1994; Hodges et al., 1997; Pinhero et al., 1997).

Con respecto al aumento de la nitración de la tirosina de proteínas (NO₂-Tyr), hay poca información disponible en plantas (Corpas et al., 2009a). Sin embargo, los datos existentes parecen indicar que este parámetro podría ser también un buen marcador para establecer si un estrés medioambiental específico está acompañado por un estrés nitrosativo. Varios trabajos sugieren que esta correlación tiene lugar porque distintos estreses ambientales, que provocan estrés oxidativo, también inducen un aumento en la nitración de la tirosina de proteínas. Así, este proceso se ha descrito en distintas

especies vegetales como en olivo y *Arabidopsis* bajo condiciones de estrés salino (Valderrama et al., 2007 Corpas et al., 2009b), en plántulas de guisante y girasol que han sufrido daño mecánico (Corpas et al., 2008; Chaki et al., 2011), en suspensiones celulares BY-2 de tabaco en respuesta a estrés biótico (Saito et al., 2006), y en plántulas de girasol después de la infección por mildiú (Chaki et al., 2009a).

7. El estrés por frío y la aclimatación al mismo implica la homeostasis del estado redox

Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que en plantas de pimiento expuestas a LT durante 24-48 h se produjo un desequilibrio general del metabolismo de ROS y RNS con el resultado de un estrés oxidativo y nitrosativo. Sin embargo, se observó también que durante el tercer día de tratamiento a LT las plantas de pimiento empezaron a recuperarse y esto debe indicar que está teniendo lugar un mecanismo de aclimatación al frío, con la aportación de las deshidrogenasas generadoras de NADPH para restablecer un estado redox óptimo (altos niveles de GSH y ascorbato) que permita a las plantas dicha aclimatación. Esto iba acompañado por una recuperación en la turgencia de las hojas hacia un fenotipo normal y por la reducción de la peroxidación lipídica y nitración de proteínas.

Según los datos descritos en otras especies de plantas (Kocsy et al., 2001b), el alto contenido de GSH observado en hojas de pimiento podría ser uno de los factores que contribuyen a la aclimatación al frío observada. Así, esta estrategia garantizaría el suministro de GSH para el ciclo ascorbato-glutatión y otros procesos como son la reacción con el NO para formar el S-nitrosoglutatión. Desde un punto de vista aplicado, este proceso de la aclimatación al frío podría ser usado como una estrategia agronómica para mejorar la resistencia de las plantas de pimiento a LT y tal vez también a otros estreses ambientales.

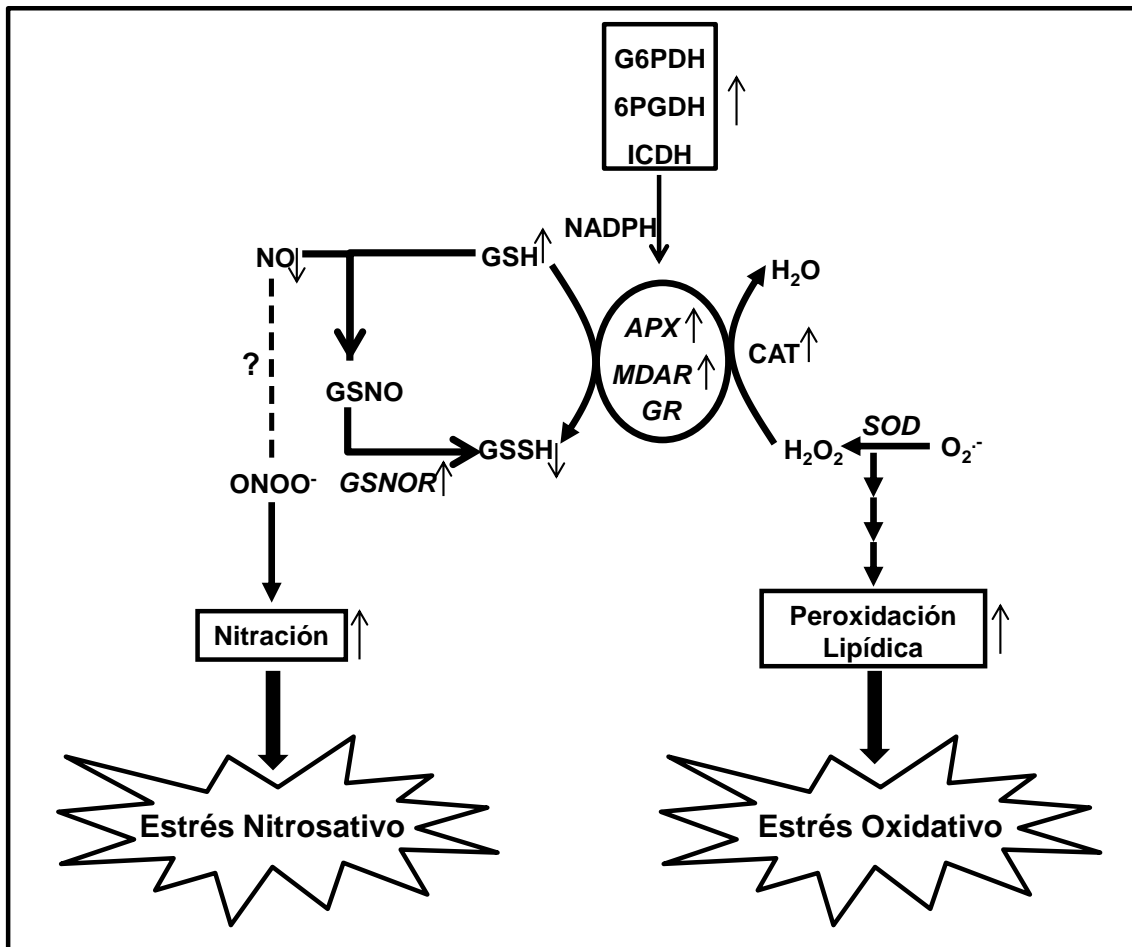


Fig. 5.1. Modelo del metabolismo de ROS y RNS durante las primeras 24 horas de tratamiento con baja temperatura (8°C). Las flechas orientadas hacia arriba en cada parámetro indican un aumento, y hacia abajo una disminución. SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; APX, ascorbato peroxidasa; MDAR, monodeshidroascorbato reductasa; GR, glutatión reductasa; G6PDH, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; 6PGDH, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; ICDH, isocitrato deshidrogenasa; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; ONOO⁻, peroxinitrito; GSNO, S-nitrosoglutatión; GSNOR, S-nitrosoglutatión reductasa.

8. Identificación y cuantificación de GSNO en plantas superiores

La importancia fisiológica y fitopatológica de los compuestos tiólicos de bajo peso molecular incluyendo el glutatión reducido (GSH) y su correspondiente forma disulfúrica, el glutatión oxidado (GSSG), está bien documentada en animales (Ault and Lawrence, 2003; Biswas and Rahman, 2009; Reynaert, 2011) y en plantas (Rouhier et al., 2008; Foyer and Noctor, 2011). La importancia fisiológica de estos compuestos es aún mayor si se considera su interacción con el radical libre NO para formar el GSNO que es metabolizado por la enzima GSNO reductasa (Leterrier et al., 2011). Aunque hay

métodos bien establecidos para determinar los niveles de GSH y GSSG, como indicadores del estado redox celular, para conocimiento nuestro, no hay, hasta el presente, ningún trabajo que haya cuantificado el contenido de GSNO en plantas. Por esta razón a lo largo del desarrollo de esta memoria, se inició la puesta a punto de un método analítico combinando la cromatografía líquida con la espectrometría de masa como una de las herramientas más efectivas en la investigación biológica, particularmente para el análisis de cantidades muy bajas de compuestos en matrices biológicas complejas. Esta técnica está generalmente caracterizada por una alta especificidad, sensibilidad y un alto rendimiento potencial. Por consiguiente, el principal objetivo de este trabajo fue establecer un método sensible y reproducible basado en la cromatografía líquida asociada con la espectrometría de masa y espectrometría de masa en tándem (LC/MS) para detectar y cuantificar GSNO en muestras de plantas.

El GSNO es medianamente estable ya que se descompone con una constante de segundo orden de $3 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 37°C y pH 7,4 (Park, 1988). Sin embargo, esta estabilidad es relativa y depende de la presencia de otros compuestos en el medio. Por ejemplo, el GSNO en la presencia de reductores, como son el glutatión o el ascorbato y el Cu^{2+} puede ser descompuesto para producir NO y GSSG (Gorren et al., 1996; Holmes and Williams, 2000; Smith and Dasgupta 2000). En plantas, el GSNO es considerado como un donador de NO puesto que bajo condiciones fisiológicas libera espontáneamente NO (Lindermayr et al., 2005; Tada et al., 2008; Palmieri et al., 2010). En tejidos animales, el GSNO ha sido medido usando diferentes técnicas como son el HPLC con detección UV (Park, 1988; Tsikas et al., 1999; Steffens et al., 2001) o el HPLC con detección electroquímica (Yap et al., 2010). Sin embargo, la evidencia experimental disponible sobre la presencia de GSNO en plantas es escasa. Se han descrito algunos trabajos que, por métodos inmunohistoquímicos, usando un anticuerpo comercial frente al GSNO, demuestran la presencia y el contenido relativo de GSNO en varias especies de plantas bajo condiciones de estrés abiótico. Así, en secciones de hojas de guisante, el análisis inmunohistoquímico mostró la presencia de GSNO en las células del colénquima que fue drásticamente reducido cuando las plantas crecían en presencia de Cd^{2+} 50 μM (Barroso et al., 2006). Sin embargo, en hojas de olivo, usando microscopía láser confocal, se localizó el GSNO en los tejidos vasculares y en las

células del mesófilo esponjoso, sin bien bajo condiciones de estrés salino su intensidad disminuía en los tejidos vasculares pero aumentaba en las células del mesófilo esponjoso (Valderrama et al., 2007). Un comportamiento similar fue observado en hipocotilos de girasol después de la infección con el patógeno *Plasmopora halstedii* (Chaki et al., 2009). Recientemente, ha sido también descrito, usando análisis inmunohistoquímico, que el contenido de GSNO se incrementó en hipocotilos de girasol después de un daño mecánico o de un estrés por calor (Chaki et al., 2011a,b).

Cuando se utilizó el método de espectrometría de masas de ionización por electrospray (LC-ES/MS) en hojas de la planta modelo *A. thaliana*, también fue posible detectar y cuantificar estos compuestos, demostrando que esta aproximación descrita en esta memoria puede ser útil para otras especies de plantas. Con un objetivo comparativo, se determinaron de forma alternativa los contenidos de GSH y GSSG por un método espectrofotométrico (ensayo de reciclaje enzimático; Griffith, 1980). Así, se encontró que el contenido de GSH, medido por ambos métodos (LC-ES/MS y el ensayo de reciclaje enzimático), fue muy similar, y se encontraba en el rango de los valores observados en trabajos previos descritos en *Arabidopsis*, que oscilaron entre 50 y 700 nmol g⁻¹ PF, habida cuenta que estos valores suelen variar dependiendo del estadio de desarrollo de la planta, de los órganos analizados y de las técnicas utilizadas (Meyer et al., 2001). Por ejemplo, en hojas de plantas de *Arabidopsis* de 5 semanas crecidas en condiciones de día corto, el contenido de GSH, cuantificado por HPLC de fase reversa después de la derivatización con el monobromobimano, fue de 345 nmol g⁻¹ PF (Ball et al., 2004), y en hojas de *Arabidopsis* crecidas en tierra bajo condiciones de día largo el contenido de GSH fue de 256,7 nmol g⁻¹ PF (Bermúdez et al., 2010). Por otra parte, en semillas de *Arabidopsis* el contenido de GSH cuantificado por un método espectrofotométrico fue de 390 nmol g⁻¹ PF (De Ridder et al., 2002; Lee et al., 2006). De modo parecido, en raíces de plantas de *Arabidopsis* de 3 semanas el contenido de GSH fue de 247 nmol g⁻¹ PF (Takahashi et al., 2000), pero en brotes de plantas crecidas en el medio MS este contenido fue de 480 nmol g⁻¹ PF. Por otro lado, el contenido de GSH fue de 50 nmol g⁻¹ PF en suspensiones celulares de *Arabidopsis* determinado por un ensayo espectrofotométrico (May and Leaver, 1993). En el caso del GSSG, que es menos abundante que el GSH, hay una diferencia significativa para ambos métodos, siendo más alto el contenido de GSSG determinado por el ensayo espectrofotométrico,

lo que podría ser debido a la oxidación del GSH durante el proceso de extracción y el tiempo necesario para su derivatización con el 2-vinilpiridina. Sin embargo, estos datos son difíciles de comparar debido a que muchos de los datos publicados están referidos a glutatión total (GSH + GSSG).

Considerando estos antecedentes, el método analítico descrito aquí para identificar y cuantificar simultáneamente GSNO, GSH y GSSG en diferentes órganos de plantas de pimiento proporciona una herramienta de investigación muy útil y potente para poder profundizar en el metabolismo del NO y sus interacciones con otras moléculas en plantas. La identificación de cada analito fue clara e inequívoca basada en su tiempo de retención y en su exacta relación m/z. Los puntos clave del éxito de este método de detección de GSNO en plantas son: (i) un método de extracción simple y sin etapas de derivatización; (ii) un ensayo realizado bajo condiciones controladas con un pH ácido, baja temperatura y poca luz; (iii) un periodo de tiempo muy corto entre la extracción y la medida por LC-ES/MS; y (iv) el tiempo de análisis requerido para cada muestra es muy corto. Todos estos factores han permitido desarrollar un método analítico preciso y fiable de GSNO, GSH y GSSG en las diferentes especies de plantas y en los órganos de las plantas de pimiento.

CONCLUSIONES
CONCLUSIONS

1. En este trabajo se investiga por primera vez el metabolismo de las especies de oxígeno y nitrógeno reactivo (ROS y RNS, respectivamente) en plantas de pimiento en dos condiciones, una fisiológica como es el desarrollo post-germinativo, y otra de estrés ambiental caracterizada por la baja temperatura.
2. Durante el desarrollo de las plantas de pimiento se produce una modulación diferencial del metabolismo de las ROS, del óxido nítrico y de las NADP-deshidrogenasas que es dependiente tanto del estadio de desarrollo como de los órganos analizados, ya sean raíces, tallos, hojas o frutos. Esta circunstancia parece indicar que en las condiciones fisiológicas estudiadas el metabolismo de ROS y RNS tienen una regulación temporal y espacial. Por otro lado, el perfil del contenido de NO en los primeros estadios del desarrollo permite proponer que este radical está implicado en la cascada de señales que lleva a la formación y elongación de las raíces.
3. El estrés por baja temperatura provoca una alteración en el metabolismo de ROS y RNS y, en base al incremento tanto de la peroxidación lipídica como de las proteínas nitradas, se puede concluir que este estrés medioambiental conlleva un estrés nitrosativo. Asimismo, durante el periodo de aclimatación al frío de las plantas de pimiento, las deshidrogenasas generadoras de poder reductor en forma de NADPH, el ascorbato y el glutatión son elementos claves en este proceso de gran importancia en la supervivencia de las plantas.
4. La puesta a punto de un sistema analítico que usa la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas de ionización por electrospray (LC-ES/MS) para identificar y cuantificar el S-nitrosoglutation (GSNO) en los distintos órganos de plantas de pimiento aporta una herramienta de gran valor para profundizar en el metabolismo del óxido nítrico así como en el estado redox de la célula.

1. The metabolism of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS, respectively) in pepper plants has been studied for the first time under two conditions, physiological with a temporal and spatial analysis during plant development, and under environmental stress characterized by low temperature.
2. During the development of pepper plants, there is a differential regulation in the metabolism of ROS, nitric oxide and the NADP-dehydrogenases which depends on the organs analyzed, either roots, stems, leaves or fruits. Under these circumstances, it can be point out that the metabolism of ROS and RNS has a temporal and spatial regulation. Additionally, considering the NO profile during the seedling development, it seems that this radical is involved in the signaling cascade that allows roots formation and elongation.
3. Low temperature stress provokes an alteration of ROS and RNS metabolism, as deduced from to the rise observed in both lipid peroxidation and protein tyrosine nitration; it can be concluded that this environmental stress is accompanied by a nitro-oxidative stress where the NADPH recycling enzymes, the ascorbate and the glutathione are key elements in the mechanism of cold acclimation of pepper plants.
4. A liquid chromatography–electrospray/mass spectrometry (LC-ES/MS) method was set up to detect and quantify simultaneously S-nitrosoglutathione (GSNO) as well reduced and oxidized glutathione forms (GSH and GSSG, respectively) in different pepper plant organs including roots, stems and leaves. This is a valuable new tool to advance in the research of the NO metabolism in plants and its interaction with non-enzymatic antioxidants, specifically with GSH.

BIBLIOGRAFÍA
REFERENCES

- Abercrombie JM, Halfhill MD, Ranjan P, Rao MR, Saxton AM, Yuan JS, Stewart CN JR** (2008) Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* plants to As (V) stress. *BMC Plant Biology* **8**: 87
- Aebi** (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymology* **105**: 121-126
- Agius F, González-Lamothe R, Caballero JL, Muñoz-Blanco J, Botella MA, Valpuesta V** (2003) Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnology* **21**: 177-181
- Agrawal GK, Jwa NS, Iwahashi H, Rakwal R** (2003) Importance of ascorbate peroxidase OsAPx1 and OsAPx2 in the rice pathogen response pathway and growth and reproduction revealed by their transcriptional profiling. *Genes* **322**: 93-103
- Ahlfors R, Brosche M, Kollist H, Kangasjarvi J** (2009) Nitric oxide modulates ozone-induced cell death, hormone biosynthesis and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **58**: 1–12
- Airaki M, Leterrier M, Mateos RM, Valderrama R, Chaki M, Barroso JB, del Río LA, Palma JM, Corpas FJ** (2011) Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. *Plant Cell and Environment* doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02310.x
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG** (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* **357**: 593-615
- Alhaghdow M, Mounet F, Gilbert L, Nunes-Nesi A, Garcia V, Just D, Petit J, Beauvoit B, Fernie AR, Rothan C, Baldet P** (2007) Silencing of the mitochondrial ascorbate synthesizing enzyme L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase affects plant and fruit development in tomato. *Plant Physiology* **145**: 1408–1422
- Alscher RG, Donahue JL, Cramer CL** (1997) Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiologia Plantarum* **100**: 224-233
- Alvarez B, Radi R** (2003) Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* **25**: 295-311
- An LZ, Liu YH, Zhang MX, Chen T, Wang XL** (2005) Effects of nitric oxide on growth of maize seedling leaves in the presence or absence of ultraviolet-B radiation. *Journal of Plant Physiology* **162**: 317-326
- Anderson S, Mansfield TA** (1979) The effects of nitric oxide pollution on the growth of tomato. *Environmental Pollution* **20**: 113-121
- Anderson ME** (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology* **113**: 548-555
- Anderson JV, Hess JL, Chevone BI** (1990) Purification, characterization, and immunological properties of two isoforms of glutathione reductase from Eastern white pine needles. *Plant Physiology* **94**: 1402-1409
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 373-399

Apostol I, Heinstejn PF, Low PS (1989) Rapid Stimulation of an Oxidative Burst during Elicitation of Cultured Plant Cells: Role in Defense and Signal Transduction. *Plant Physiology* **90**: 109-116

Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J, Gwózdź EA (2011) The message of nitric oxide in cadmium challenged plants. *Plant Science* doi:10.1016/j.plantsci.2011.03.019

Asada K, Badger MR (1984) Photoreduction of O_2^{18} and $(H_2O)-O_2^{18}$ with concomitant evolution of O_2^{16} in intact spinach chloroplasts. Evidence for scavenging of hydrogen peroxide by peroxidase. *Plant and Cell Physiology* **25**: 1169-1179

Asada K, Takahashi M (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. En Photoinhibition (eds. Kyle DJ, Osmond DB & Arntzen DJ), pp. 227-287. elsevier. Amsterdam

Asada K (1994) Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. En: Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. Foyer CH y Mullineaux PM (Eds.), págs: 77-104. C. R. C. Press, Boca Ratón

Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* **141**: 391-396

Asai S, Yoshioka H (2009) Nitric oxide as a partner of reactive oxygen species participates in disease resistance to necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 619-629

Athar HR, Khan A, Ashraf M (2008) Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. *Environmental Experimental Botany* **63**: 224-231

Attucci S, Rivoal J, Brouquisse R, Carde J.P, Pradet A, Raymond P (1994) Characterization of a mitochondrial NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in axes of germinating sunflower seeds. *Plant Science*. **102**: 49-59

Ault JG, Lawrence DA (2003) Glutathione distribution in normal and oxidatively stressed cells. *Experimental Cell Research* **285**: 9-14

Azevedo Neto AD, Prisco JT, Eneas-Filho J, Abreu CEB, Filho EG (2006). Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany* **56**: 87-94

Bailey-Serres J, Mittler R (2006) The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiology* **141**: 311-312

Bailly C (2004) Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* **14**: 93-107

Ball L, Accotto GP, Bechtold U, Creissen G, Funck D, Jimenez A, Kular B, Leyland N, Mejia-Carranza J, Reynolds H, Karpinski S, Mullineaux PM (2004) Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 2448-2462

Bandeoglu E, Eyidogan F, Yücel M, Oktem HA (2004). Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl-salinity stress. *Plant Growth Regulation*, **42**: 69-77

Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G (1987) Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *CRC. Critical Reviews in Biochemistry* **22**: 111-180

- Barroso JB, Peragon J, Contreras-Jurado C, Garcia-Salguero L, Corpas FJ, Esteban FJ, Peinado MA, De La Higuera M, Lupianez JA** (1998) Impact of starvation-refeeding on kinetics and protein expression of trout liver NADPH-production systems. *American Journal of Physiology* **274**: 1578-1587
- Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A, Sandalio LM, Valderrama R, Palma JM, Lupiáñez JA, del Río LA** (1999) Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. *Journal of the Biological Chemistry* **274**: 36729-36733
- Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A, Rodríguez-Serrano M, Esteban FJ, Fernández-Ocaña A, Chaki M, Romero-Puertas MC, Valderrama R, Sandalio LM, del Río LA** (2006) Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1785-1793
- Bartels D** (2001) Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance? *Trends Plant Science* **6**: 284-286
- Bartha B, Kolbert Z, Erdei L** (2005) Nitric oxide production induced by heavy metals in *Brassica juncea* L. Czern. and *Pisum sativum* L. *Acta Biologica Szegediensis* **49**: 9-12
- Bartoli CG, Pastori GM, Foyer CH** (2000) Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiology* **123**: 335-344
- Bartosz G** (1997) Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum* **19**: 47-64
- Baum JA, Scandalios JG** (1981) Isolation and characterization of the cytosolic and mitochondrial superoxide dismutases of maize. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **206**: 249-264
- Beauchamp CO, Fridovich I** (1971) Superoxide dismutase. Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**: 276-287
- Beligni MV, Lamattina L** (2001) Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant Cell and Environment* **24**: 267-278
- Benamar A, Rolletschek H, Borisjuk L, Avelange-Macherel MH, Curien G, Mostefai HA, Andriantsitohaina R, Macherel D** (2008) Nitrite-nitric oxide control of mitochondrial respiration at the frontier of anoxia. *Biochimica et Biophysica Acta* **1777**: 1268-1275
- Berlett BS, Stadtman ER** (1997) Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *The Journal of the Biological Chemistry* **272**: 20313-20316
- Bermúdez MA, Páez-Ochoa MA, Gotor C, Romero LC** (2010) Arabidopsis S-sulfocysteine synthase activity is essential for chloroplast function and long-day light-dependent redox control. *Plant Cell* **22**: 403-416
- Bernstein N, Kravchik M, Dudai N** (2010) Salinity-induced changes in essential oil, pigments and salts accumulation in sweet basil (*Ocimum basilicum*) in relation to alterations of morphological development. *Annals of Applied Biology* **156**: 167-177
- Besson-Bard A, Griveau S, Bedioui F, Wendehenne D** (2008) Real-time electrochemical detection of extracellular nitric oxide in tobacco cells exposed to cryptogein, an elicitor of defence responses. *Journal of Experimental Botany* **59**: 3407-3414

- Besson-Bard A, Courtois C, Gauthier A, Dahan J, Dobrowolska G, Jeandroz S, Pugin A, Wendehenne D** (2008) Nitric oxide in plants: production and cross-talk with Ca²⁺ signaling. *Molecular Plant* **1**: 218–228
- Besson-Bard A, Alain P, Wendehenne D** (2008) New insights into nitric oxide signalling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 21–39
- Besson-Bard A, Gravot A, Richaud P, Auroy P, Duc C, Gaymard F, Taconnat L, Renou JP, Pugin A, Wendehenne D** (2009) Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in Arabidopsis by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiology* **149**: 1302-1315
- Bharathan G, Sinha NR** (2001) The regulation of compound leaf development. *Plant Physiology* **127**: 1533-1538
- Bhattacharjee S** (2005) Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plant. *Current Science* **89**: 1113-1121
- Bielawski W, Joy KW** (1986) Properties of glutathione reductase from chloroplasts and root of pea. *Phytochemistry* **25**: 2261-2265
- Biswas SK, Rahman I** (2009) Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: The role of glutathione. *Molecular Aspects of Medicine* **30**: 60-76
- Blokhina O, Fagerstedt KV** (2010) Oxidative metabolism ROS and NO under oxygen deprivation. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**: 359–373
- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M** (1990) Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology* **186**: 343-355
- Bowditch ML, Donaldson RP** (1990) Ascorbate free-radical reduction by glyoxysomal membranes. *Plant Physiology* **94**: 531-537
- Bowler C, Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D** (1994) Superoxide dismutase in plants. *Critical Review in Plant Science* **13**: 199–218
- Bowler C, Fluhr R** (2000) The role of calcium and activated oxygen as signals for controlling cross-tolerance. *Trends in Plant Science* **5**: 241-246
- Boyer JS** (1982) Plant productivity and environment. *Science* **218**: 443-448
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254
- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E** (2000) Response to abiotic stress. In: Buchanan B, Gruissen W, Jones R (eds) Biochemistry and molecular biology of plants. *American Society of Plant Physiologists*, Rockville; MD, pp 1158-1203
- Bredemeijer GMM, Esselink G** (1995) Glucose 6-phosphate dehydrogenase during cold-hardening in *Lolium perenne*. *Plant Physiology* **145**: 565-569
- Bridges SM, Salin, ML** (1981) Distribution of iron containing superoxide dismutases in vascular plants. *Plant Physiology* **68**: 275–278
- Brown GC** (1999) Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochimica et Biophysica Acta* **1411**: 351-369

- Buege JA, Aust SD** (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* **52**: 302-310
- Bueno P, Varela J, Gimeénez-Gallego G, del Río LA** (1995) Peroxisomal copper, zinc superoxide dismutase. Characterization of the isoenzyme from watermelon cotyledons. *Plant Physiology* **108**: 1151-1160
- Bundy RE, Marczin N, Chester AH, Yacoub M** (2000) A redox-based mechanism for nitric oxide-induced inhibition of DNA synthesis in human vascular smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology* **129**: 1513-1521
- Bunkelmann JR, Trelease RN** (1996) Ascorbate peroxidase. A prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes. *Plant Physiology* **110**: 589-598
- Burns JJ, Conney AH, Dayton PG, Evans C, Martin GR, Taller D** (1960) Observations on the drug-induced synthesis of D-glucuronic, L-gulonic and L-ascorbic acids in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **129**: 132-138
- Cabrera YA** (2006) Efecto de *Phytophthora capsici* sobre el metabolismo del glutatión en suspensiones celulares de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Univ. Autónoma de Yucatán. Mérida, México. Tesis de Licenciatura
- Cámara B, Hugueney P, Bouvier F, Kuntz M, Moneger R** (1995) Biochemistry and molecular biology of chromoplast development. *International Review of Cytology* **163**: 175-247
- Canino S, Nieri B, Pistelli L, Alpi A, De Bellis L** (1996) NADP⁺-isocitrate dehydrogenase in germinating cucumber cotyledons: purification and characterization of a cytosolic isoenzyme. *Physiology Plant* **98**: 13-19
- Cantrel C, Vazquez T, Puyaubert J, Rezé N, Lesch M, Kaiser WM, Dutilleul C, Guillas I, Zachowski A, Baudouin E** (2011) Nitric oxide participates in cold-responsive phosphosphingolipid formation and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **189**: 415-427
- Carliz A, Touati D** (1986) Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? *EMBO Journal* **5**: 623-630
- Cecconi D, Orzetti S, Vandelle E, Rinalducci S, Zolla L, Delledonne M** (2009) Protein nitration during defense response in *Arabidopsis thaliana*. *Electrophoresis* **30**: 2460-2468
- Chaki M** (2007) Function of reactive nitrogen species in sunflower (*Helianthus annuus*) in response to abiotic and biotic stresses. PhD thesis, University of Jaén, Spain.
- Chaki M, Fernández-Ocaña AM, Valderrama R, Carreras A, Esteban FJ, Luque F, Gómez-Rodríguez MV, Begara-Morales JC, Corpas FJ, Barroso JB** (2009a). Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower-mildew interaction. *Plant Cell Physiology* **50**: 265-279
- Chaki M, Valderrama R, Fernández-Ocaña AM, Carreras A, López-Jaramillo J, Luque F, Palma JM, Pedrajas JR, Begara-Morales JC, Sánchez-Calvo B, Gómez-Rodríguez MV, Corpas FJ, Barroso JB** (2009b) Protein targets of tyrosine nitration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls. *Journal of Experimental Botany* **60**: 4221-4234
- Chaki M, Valderrama R, Fernández-Ocaña AM, Carreras A, Gómez-Rodríguez MV, López-Jaramillo J, Pedradas JR, Begara-Morales JC, Sánchez-Calvo B, Luque F, Leterrier M, Corpas FJ, Barroso JB** (2010) Mechanical wounding induces a nitrosative stress by down-

regulation of GSNO reductase and a rise of S-nitrosothiols in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Journal of Experimental Botany* **62**: 1803-1813

Chaki M, Valderrama R, Fernández-Ocaña AM, Carreras A, Gómez-Rodríguez MV, López-Jaramillo J, Begara-Morales JC, Sánchez-Calvo B, Luque F, Leterrier M, Corpas FJ, Barroso JB (2011a) High temperature triggers the metabolism of S-nitrosothiols in sunflower mediating a process of nitrosative stress which provokes the inhibition of ferredoxin–NADP reductase by tyrosine nitration. *Plant Cell and Environment* **34**: 1803-1818

Chaki M, Valderrama R, Fernández-Ocaña AM, Carreras A, Gómez-Rodríguez MV, Pedrajas JR, Begara-Morales JC, Sánchez-Calvo B, Luque F, Leterrier M, Corpas FJ, Barroso JB (2011b) Mechanical wounding induces a nitrosative stress by down-regulation of GSNO reductase and an increase in S-nitrosothiols in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Journal of Experimental Botany* **62**: 1803-1813

Chance B, Sies H, Boveris A (1997) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews* **59**: 527-535

Charron JB, Ouellet F, Houde M, Sarhan F (2008) The plant Apolipoprotein D ortholog protects Arabidopsis against oxidative stress. *BMC Plant Biology* **8**: 86

Chatterjee S, Noack H, Possel H, Wolf G (2000) Induction of nitric oxide synthesis lowers intracellular glutathione in microglia of primary glial cultures. *Glia*. **29**: 98-101

Chen R, Maréchal P, Vidal J, Jacquot JP, Gadal P (1988) Purification and comparative properties of the cytosolic isocitrate dehydrogenases (NADP) from pea (*Pisum sativum*) roots and green leaves. *European Journal of Biochemistry* **175**: 565-572

Chen R, Bismuth E, Chapigny ML, Gadal P (1989) Chromatographic and immunological evidence that chloroplastic and cytosolic pea (*Pisum sativum* L.) NADPisocitrate dehydrogenases are distinct isoenzymes. *Planta* **178**: 157-163

Chen GX, Asada K (1989) Ascorbate peroxidase in tea leaves. Occurrence of 2 isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant and Cell Physiology* **30**: 987-998

Chew O, Whelan J, Millar AH (2003) Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in Arabidopsis mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 46869-46877

Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK (2007) Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Science* **12**: 444-451

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**: 156-159

Clark D, Durner J, Navarre DA, Klessig DF (2000) Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Molecular Plant Microbe Interactions* **13**: 1380-1384

Cleary SP, Tan FC, Nakrieko KA, Thompson SJ, Mullineaux PM, Creissen GP, von Stedingk E, Glaser E, Smith AG, Robinson C (2002) Isolated plant mitochondria import chloroplast precursor proteins in vitro with the same efficiency as chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 5562-5569

Collins AR (2001) Carotenoids and genomic stability. *Mutation Research* **475**: 21-28

- Conklin PL, Norris SR, Wheeler GL, Williams EH, Smirnoff N, Last RL** (1999) Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**: 4198-4203
- Conklin PL, Saracco SA, Norris SR, Last RL** (2000) Identification of ascorbic acid-deficient *Arabidopsis thaliana* mutants. *Genetics* **154**: 847-856
- Corpas FJ, Barroso JB, Sandalio LM, Distefano S, Palma JM, Lupiáñez JA, del Río LA** (1998a) A dehydrogenase mediated recycling system of NADPH in plant peroxisomes. *Biochemical Journal* **330**: 777-784
- Corpas FJ, Sandalio LM, del Río LA, Trelease RN** (1998b) Copper-zinc superoxide dismutase is a constituent enzyme of the matrix of peroxisomes in the cotyledons of oilseed plants. *New Phytologist* **138**: 307-314.
- Corpas FJ, Palma JM, Sandalio LM, López-Huertas E, Romero-Puertas MC, Barroso JB, del Río LA** (1999) Purification of catalase from pea leaf peroxisomes: Identification of five different isoforms. *Free Radical Research* **31**: 235-241
- Corpas FJ, Barroso JB, del Río L** (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science* **6**: 145-150
- Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Quirós M, León AM, Romero-Puertas MC, Esteban FJ, Valderrama R, Palma JM, Sandalio LM, Gómez M, del Río LA** (2004) Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiology* **136**: 2722-2733
- Corpas FJ, Fernandez-Ocana A, Carreras A, Valderrama R, Luque F, Esteban FJ, Rodriguez-Serrano M, Chaki M, Pedrajas JR, Sandalio LM, del Río LA, Barroso JB** (2006a) The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant Cell Physiology* **47**: 984-994
- Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Valderrama R, Palma JM, León AM, Sandalio LM, del Río LA** (2006b) Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta* **224**: 246-254
- Corpas FJ, Carreras A, Valderrama R, Chaki M, Palma JM, del Río LA, Barroso JB** (2007) Reactive nitrogen species and nitrosative stress in plants. *Plant Stress* **1**: 37-41
- Corpas FJ, Chaki M, Fernández-Ocaña A, Valderrama R, Palma JM, Carreras A, Begara-Morales JC, Airaki M, del Río LA, Barroso JB** (2008a) Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant and Cell Physiology* **49**: 1711-1722
- Corpas FJ, Del Río LA, Barroso JB** (2008b) Post-translational modifications mediated by reactive nitrogen species: Nitrosative stress responses or components of signal transduction pathways? *Plant Signal and Behaviour* **3**: 301-303
- Corpas FJ, Chaki M, Leterrier M, Barroso JB** (2009c) Protein tyrosine nitration: a new challenge in plants. *Plant Signaling & Behaviour* **4**: 920-923
- Corpas FJ, Palma JM, Del Río LA, Barroso JB** (2009a) Evidence supporting the existence of L arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytologist* **184**: 9-14

- Corpas FJ, Palma JM, Leterrier M, del Río LA, Barroso JB** (2010) Nitric oxide and abiotic stress in higher plants. In *Nitric oxide in Plant Physiology*. (Hayat S, Mori M, Pichtel J, Ahmad A (editors) pp 51-63. Wiley-Vch, Germany (ISBN: 978-3-527-32519-1)
- Costa-Pereira AP, Cotter TG** (1999) Metabolic alterations associated with apoptosis. En: GP Studzinski (Ed.), *Apoptosis: a practical approach*, pages: 141-156. *Oxford University Press*, New York
- Creissen G, Edwards EA, Enard C, Wellburn A, Mullineux PM** (1992) Molecular characterization of glutathione reductase cDNAs from pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Journal* **2**: 129-131
- Creissen G, Edwards EA, Mullineux PM** (1994) Glutathione reductase and ascorbate peroxidase. En *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plant* (eds. Foyer C & Mullineux PM), pp 343-364. CRC Press, Boca Raton
- Creissen G, Reynolds H, Xue Y, Mullineux PM** (1995) Simultaneous targeting of pea glutathione reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplasts and mitochondria in transgenic tobacco. *Plant Journal* **8**: 167-175
- Creissen G, Jimenez A, Mullineux PM** (2001) Characterization and genetic manipulation of dehydroascorbate reductase in *Arabidopsis thaliana*. En *Oxygen, Free Radicals and Oxidative Stress in Plant*. Abstract book, Nice
- Dacosta M., Huang B** (2007): Changes in antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation for bentgrass species in responses to drought stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **132**: 319–326
- Dalton DA, Langeberg L, Robbins M** (1992) Purification and characterisation of monodehydroascorbate reductase from soybean root nodules. *Archive of Biochemistry and Biophysics* **292**: 281-286
- Dangl JL, Dietrich RA, Richberg MH** (1996) Death Don't Have No Mercy: Cell Death Programs in Plant-Microbe Interactions. *Plant Cell*. **8**: 1793-1807
- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* **57**: 779-795
- Davey MD, Van Montagu M, Inze D, Sanmartin M, Kanellis AK, Smirnoff N, Benzie IJJ, Strain JJ, Favell D, Fletcher J.** (2000) Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**: 825–860
- Davies DD, Patil KD** (1974) Regulation of malic enzyme of *Solanum tuberosum* by metabolites. *Biochemical Journal* **137**: 45-53
- de Azevedo Neto AD, Prisco JT, Enéas-Filho J, Medeiros JV, Gomes-Filho E** (2006) Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants. *Journal of Plant Physiology* **162**: 1114-1122
- De Gara L, Pinto MC, Arrigoni O** (1997) Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. *Physiologia Plantarum* **100**: 894-900

- De Michele R, Vurro E, Rigo C, Costa A, Elviri L, Di Valentin M, Careri M, Zottini M, Sanità di Toppi L, Lo Schiavo F** (2009) Nitric oxide is involved in cadmium-induced programmed cell death in Arabidopsis suspension cultures. *Plant Physiology* **150**: 217-228
- del Río LA, Gómez M, Leal A, López-Gorgé J** (1977) A more sensitive modification of the catalase assay with the Clark oxygen electrode. Application to the kinetic study of the pea leaf enzyme. *Analytical biochemistry* **80**: 409-415
- del Río LA, Lyon DS, Olah I, Glick B, Salin ML** (1983) Immunocytochemical evidence for a peroxisomal localization of manganese superoxide dismutase in leaf protoplasts from a higher plant. *Planta* **158**: 216-224
- del Río LA, Sandalio LM, Palma JM, Bueno P, Corpas FJ** (1992) Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radical Biology and Medicine* **13**: 557-580
- del Río LA, Palma JM, Sandalio LM, Corpas FJ, Pastori GM, Bueno P, López-Huertas E** (1996) Peroxisomes are a source of superoxide and hydrogen peroxide in stressed plants. *Biochemical Society transactions* **24**: 434-438
- del Río LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gómez M, Barroso JB** (2002a) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1255-1272
- del Río LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gómez M, Barroso JB** (2002b) Peroxisomes, reactive oxygen metabolism and stress related enzyme activities. *En Plant Peroxisomes. Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications* (eds. Baker A & Graham IA), pp 221-258. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- del Río LA, Sandalio LM, Altomare DA, Zilinskas BA** (2003) Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **54**: 923-933
- del Río LA, Corpas FJ, Barroso JB** (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry*. **65**: 783-792
- del Río LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB** (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* **141**: 330-335
- Debnam PM, Emes MJ** (1999) Subcellular distribution of enzymes of the oxidative pentose phosphate pathway in root and leaf tissues. *Journal of Experimental Botany* **50**: 1653-1661
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb CJ** (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585-588
- DeMaster EG, Raij L, Archer SL, Weir EK** (1989) Hydroxylamine is a vasorelaxant and a possible intermediate in the oxidative conversion of L-arginine to nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **163**: 527-533
- DeRidder BP, Dixon DP, Beussman DJ, Edwards R, Goldsbrough PB** (2002) Induction of glutathione S-transferase in Arabidopsis by herbicides safeners. *Plant Physiology* **130**: 1497-1505

- Dhaunsi GS, Singh I, Hanevold CD** (1993) Peroxisomal participation in the cellular response to the oxidative stress of endotoxin. *Molecular and Cellular Biochemistry* **126**: 25-35
- Díaz M, Achkor H, Titarenko E, Martínez MC** (2003) The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. *FEBS Letters* **543**: 136-139
- Dipierro S, Borraccino G** (1991) Dehydroascorbate reductase from potato tuber. *Phytochemistry* **30**: 427-429
- Djanaguiraman M, Prasad PV, Seppanen M** (2010) Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**: 999-1007
- Doke N** (1985) NADPH-dependent O₂⁻ generation in membrane fraction isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiological plant pathology* **27**: 311-322
- Doke N** (1997) The oxidative burst: roles in signal transduction and plant stress. In: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, pp. 785-813, Scandalios J. G. (ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Doulis AG, Donahue JL, Alischer RG** (1998) Differential responses to paraquat-induced oxidative injury in a pea (*Pisum sativum*) protoplast system. *Physiologia Plantarum* **102**: 461-471
- Dowdle J, Ishikawa T, Gatzek S, Rolinski S, Smirnoff N** (2007) Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *The Plant Journal* **52**: 673-689
- Draper J** (1997) Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defence. *Trends in Plant Science* **2**: 162-165
- Droillard MJ, Paulin A** (1990) Isozymes of superoxide dismutase in mitochondria and peroxisomes isolated from petals of carnation (*Dianthus caryophyllus*) during senescence. *Plant Physiology* **94**: 1187-1192
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF** (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **95**: 10328-10333
- Durner J, Klessig DF** (1999) Nitric oxide as a signal in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 369-374
- Dwivedi S, Tripathi RD, Tripathi P, Kumar A, Dave R, Mishra S, Singh R, Sharma D, Rai UN, Chakrabarty D, Trivedi PK, Adhikari B, Bag MK, Dhankher OP, Tuli R** (2010) Arsenate exposure affects amino acids, mineral nutrient status and antioxidants in rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. *Environmental Science and Technology* **44**: 9542-9549
- Edwards EA, Rawsthorne S, Mullineaux P** (1990) Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) *Planta* **180**: 278-284
- Eising R, Trelease RN, Ni W** (1990) Biogenesis of catalase in glyoxysomes and leaf-type peroxisomes of sunflower cotyledons. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **278**: 258-264

- Etelib HA, Badejo AA, Fujikawa Y, Esaka M** (2010) Gene expression of monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase during fruit ripening and in response to environmental stresses in acerola (*Malpighia glabra*). *Journal of Plant Physiology* **168**: 619-627
- Espunya MC, Díaz M, Moreno-Romero J, Martínez MC** (2006) Modification of intracellular levels of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase alters glutathione homeostasis and root development. *Plant Cell and Environment* **29**: 1002-1011
- Feechan A, Kwon E, Yun B.W, Wang Y, Pallas JA, Loake GJ** (2005) A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **102**: 8054-8059
- Fernández VM, Sevilla S, López-Gorgé J, del Río LA** (1982) Evidence of manganese (III) binding to the manganese superoxide dismutase from a higher plant (*Pisum sativum* L). *Journal of Inorganic Biochemistry* **16**: 79-84
- Fernández-Ocaña A, Chaki M, Luque F, Gómez-Rodríguez MV, Carreras A, Valderrama R, Begara-Morales JC, Hernández LE, Corpas FJ, Barroso JB** (2011) Functional analysis of superoxide dismutases (SODs) in sunflower under biotic and abiotic stress conditions. Identification of two new genes of mitochondrial Mn-SOD. *Journal of Plant Physiology* **168**:1303-1308
- Fickenscher K, Scheibe R** (1986) Purification and properties of the cytoplasmic glucose-6-phosphate dehydrogenase from pea leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **247**: 393-402
- Fiew S, Müller-Röber B, Gálvez S, Willmitzer L** (1995) Cloning and expression analysis of the cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase from potato. Implications for nitrogen metabolism. *Plant Physiology* **107**: 905-913
- Fluhr R** (2009) Reactive Oxygen-Generating NADPH Oxidases in Plants. Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. Signaling and Communication in Plants, 1-23, DOI: 10.1007/978-3-642-00390-5_1
- Foissner I, Wendehenne D, Langebartels C, Durner J** (2000) In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *Plant Journal* **23**: 817-824
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD, Davies JM, Dolan L** (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**: 442-446
- Fortunato AS, Lidon FC, Batista-Santos P, Leitão AE, Pais IP, Ribeiro AI, Ramalho JC** (2010) Biochemical and molecular characterization of the antioxidative system of *Coffea* sp. under cold conditions in genotypes with contrasting tolerance. *Journal of Plant Physiology* **167**: 333-342
- Foster MW, Hess DT, Stamler JS** (2009) Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends in Molecular Medicine* **15**: 391-404
- Fotopoulos V, Sanmartin M, Kanellis AK** (2006) Effect of ascorbate oxidase over-expression on ascorbate recycling gene expression in response to agents imposing oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* **57**: 3933-3943

- Fotopoulos V, De Tullio MC, Barnes J, Kanellis AK** (2008) Altered stomatal dynamics in ascorbate oxidase over-expressing tobacco plants suggest a role for dehydroascorbate signalling. *Journal of Experimental Botany* **59**: 729–737
- Foyer CH, Halliwell B** (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**: 21-25
- Foyer CH, Halliwell B** (1977) Purification and properties of dehydroascorbate reductase from spinach leaves. *Phytochemistry* **16**: 1347-1350
- Foyer C, Lelandais M, Galap C, Kunert KJ** (1991) Effects of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *Plant Physiology* **97**: 863-872
- Foyer CH, López-Delgado H, Dat JF, Scott IM** (1997) Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum* **100**: 241-254
- Foyer CH, Theodoulou FL, Delrot S** (2001) The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. *Trends in plant science* **6**: 486-492
- Foyer CH, Noctor G** (2005a) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* **17**: 1866-1875
- Foyer CH, Noctor G** (2005b) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment* **28**: 1056–1071
- Foyer CH, Noctor G** (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology* **155**: 2-18
- Frahry G, Schopfer P** (2001) NADH-stimulated, cyanide-resistant superoxide production in maize coleoptiles analyzed with a tetrazolium-based assay. *Planta* **212**: 175-183
- Frew JE, Jones P, Scholes G** (1983) Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide and organic hydroperoxides at low concentrations in aqueous solutions. *Analytica Chimica Acta* **155**: 135-150
- Fridovich I** (1986) Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology* **58**: 61-97
- Fridovich I** (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry* **64**: 97-112
- Gálvez S, Gadal P** (1995) On the function of the NADP-dependent isocitrate dehydrogenase isoenzymes in living organisms. *Plant Science* **105**: 1-14
- García-Mata C, Lamattina L** (2001) Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiology* **126**: 1196–1204
- García-Mata C, Gay R, Sokolovski S, Hills A, Lamattina L, Blatt MR** (2003) Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **100**: 11116-11121

- Gaston B, Singel D, Doctor A, Stamler JS** (2006) S-Nitrosothiol signaling in respiratory biology. *American Journal of Respiratory and Critical Care in Medicine* **173**: 1186–1193
- Gechev T, Gadjev I, Van Breusegem F, Inzé D, Dukiandjiev S, Toneva V, Minkov I** (2002) Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**: 708-714
- Gechev T, Willekens H, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W, Toneva V, Minkov I** (2003) Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *Journal of Plant Physiology* **160**: 509-515
- Gechev TS, Van Breusegem F, Stone JM, Denev I, Laloi C** (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays* **28**: 1091-1101
- Gill SS, Tuteja N** (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**: 909-930
- Goldberg DM, Ellis G** (1983) Isocitrate. En *Methods in Enzymatic Analysis* (eds. HU Bergmeyer), pp. 183-190. Academic press, New York
- Goldenberg H, Grebing C, Low H** (1983) NADH-monodehydroascorbate reductase in human erythrocyte membranes. *Biochemistry International* **6**: 1-9
- Gonzalez-Villasenor LI, Powers DA** (1986) A multilocus system for studying tissue and subcellular specialization. The pH and temperature dependence of the two major NADPdependent isocitrate dehydrogenase isozymes of the fish *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Biological Chemistry* **261**: 11471-11477
- Gorren AC, Schrammel A, Schmidt K, Mayer B** (1996) Decomposition of S-nitrosoglutathione in the presence of copper ions and glutathione. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **330**: 219-228
- Gould KS, Lamotte O, Klinguer A, Pugin A, Wendehenne D** (2003) Nitric oxide production in tobacco leaf cell: a generalized stress response? *Plant Cell and Environment* **26**: 1851-1862
- Gouvea CM, Souza CP, Magalhaes CAN, Martin IS** (1997) NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation* **21**: 183–187
- Gow AJ, Farkouh CR, Munson DA, Posencheg MA, Ischiropoulos H** (2004) Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **287**: 262-268
- Grace SC, Logan BA** (1996) Acclimation of Foliar Antioxidant Systems to Growth Irradiance in Three Broad-Leaved Evergreen Species. *Plant Physiology* **112**: 1631-1640
- Graeve K, Schaewen A, Scheibe R** (1994) Purification, characterization, and cDNA sequence of glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solatum tuberosum* L.). *The Plant Journal* **5**: 353-361
- Grant JJ, Loake GJ** (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology* **124**: 21-29
- Grantz AA, Beummell DA, Bennett AB** (1995) Ascorbate free radical reductase mRNA levels are induced by wounding. *Plant physiology* **108**: 411-418

- Greenacre SA, Ischiropoulos H** (2001) Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radical Research* **34**: 541-581
- Greenberg JT** (1996) Programmed cell death: a way of life for plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 12094-12097
- Griffith OW** (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* **106**: 207-212
- Gupta KJ, Fernie AR, Kaiser WM, van Dongen JT** (2011) On the origins of nitric oxide. *Trends in Plant Science* **16**: 160-168
- Guy CL, Carter JV** (1984) Characterization of partially purified glutathione reductase from cold-hardened and nonhardened spinach leaf tissue. *Cryobiology* **21**: 454-464
- Haghjou MM, Shariati M, Smirnoff N** (2009) The effect of acute high light and low temperature stresses on the ascorbate-glutathione cycle and superoxide dismutase activity in two *Dunaliella salina* strains. *Physiologia Plantarum* **135**: 272-280
- Halliwell B, Foyer CH** (1976) Ascorbic acid, metal ions and the superoxide radical. *Biochemical Journal* **155**: 697-700
- Halliwell B, Gutteridge JMC** (2000) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Halliwell B** (2006) Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology* **141**: 312-322
- Halliwell B, Gutteridge JMC** (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, London
- Hammond-Kosack K, Jones JDG** (2000) Responses to plant pathogens. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (eds). Pp 1102-156 Rockville, MD: *Am. Soc. Plant Physiology*
- Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**: 557-580
- Hancock RD, Galpin JR, Viola R** (2000) Biosynthesis of L-ascorbic acid (vitamin C) by *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* **186**: 245-250
- Hancock RD** (2009) Recent patents on vitamin C: opportunities for crop improvement and single-step biological manufacture. *Recent Patents on Food Nutrition and Agriculture* **1**: 39-49
- Hannah MA, Heyer AG, Hinch D.K** (2005) A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* **1**: 179-196
- Haselbeck RJ, McAlister-Henn L** (1991) Isolation, nucleotide sequence, and disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding mitochondrial NADP(H)-specific isocitrate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 2339-2345
- Hassan HM** (1989) Microbial superoxide dismutases. En: *Advances in genetic*. Scandalios J.G. (Ed.), págs: 65-97. Academia Press, San Diego Hossain MA and Asada K (1984)
- Havir EA, Brisson LF, Zelitch I** (1996) Distribution of catalase isoforms in *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* **41**: 699-702

- Hausladen A, Stamler IS** (1999) Nitrosative stress. *Methods Enzymology* **300**: 389-395
- Hebelstrup KH, Jensen EO** Expression of NO scavenging hemoglobin is involved in the timing of bolting in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **227**: 917-927
- Heber U, Hudson MA, Hillier UW** (1967) Lokalisation von Enzymen des Reduktiven und des oxidativen Pentosephosphatzklus in den Chloroplasten und Permeabilität der Chloroplastenmembranen gegenüber Metaboliten. *Z Naturforsch* **22b**: 1200-1215
- Hernández JA, Corpas FJ, Gómez M, del Río LA, Sevilla F** (1993) Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Physiologia Plantarum* **89**: 103–110
- Hernández JA, Olmos E, Corpas FJ, Sevilla F, del Río LA** (1995) Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea-plants. *Plant Science* **105**: 151–167
- Heukeshoven J, Dernick R** (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* **6**: 103-112
- Hodges DM, Andrews CJ, Johnson DA, Hamilton RI** (1997) Antioxidant enzyme and compound responses to chilling stress and their combining abilities in differentially sensitive maize hybrids. *Crop Science* **37**: 857–863
- Holmes AJ, Williams DLH** (2000) Reaction of ascorbic acid with S-nitrosothiols: clear evidence for two distinct reaction pathways. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 2*: 1639-1644
- Hooper AB, Terry, KR** (1979) Hydroxylamine oxidoreductase of *Nitrosomonas*: production of nitric oxide from hydroxylamine. *Biochimica et Biophysica Acta* **571**: 12–20
- Horchani F, Prévot M, Boscari A, Evangelisti E, Meilhoc E, Bruand C, Raymond P, Boncompagni E, Aschi-Smiti S, Puppo A, Brouquisse R** (2011) Both plant and bacterial nitrate reductases contribute to nitric oxide production in *Medicago truncatula* nitrogen-fixing nodules. *Plant Physiology* **155**: 1023-1036
- Hormaetxe K, Hernández A, Becerril JM, García-Plazaola JI** (2004) Role of red carotenoids in photoprotection during winter acclimation in *Buxus sempervirens* leaves. *Plant Biology* **6**: 325-332
- Hossain MA, Asada K** (1984a) Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant and Cell Physiology* **25**: 85-92
- Hossain MA, Asada K** (1984b) Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide. Its protection by ascorbate. *Plant and Cell Physiology* **25**: 1285-1295
- Hossain MA, Nakano Y, Asada K** (1984) Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. *Plant and Cell Physiology* **25**: 385-395
- Hossain MA, Asada K** (1985) Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **260**: 12920-12926

- Howard LR, Talcott ST, Brenes CH, Villalon B** (2000) Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 1713-1720
- Hu X, Jiang M, Zhang J, Zhang A, Lin F, Tan M** (2007) Calcium-calmodulin is required for abscisic acid-induced antioxidant defense and functions both upstream and downstream of H₂O₂ production in leaves of maize (*Zea mays*) plants. *New Phytologist* **173**: 27-38
- Huang X, Stettmaier K, Michel C, Hutzler P, Mueller MJ, Durner J** (2004) Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **218**: 938-946
- Hufton CA, Besford RT, Wellburn AR** (1996) Effects of NO (+NO₂) pollution on growth, nitrate reductase activities and associated protein contents in glasshouse lettuce grown hydroponically in winter CO₂ enrichment. *New Phytologist* **133**: 495-501
- Hughes M.N** (1999) Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxytrite. *Biochimica et Biophysica Acta* **1411**: 263-272
- Huh WK, Kim ST, Yang KS, Seok YJ, Hah YC, Kang SO** (1994) Characterisation of D-arabinono-1,4-lactone oxidase from *Candida albicans* ATCC 10231. *European Journal of Biochemistry* **225**: 1073-1079
- Hung KT, Chang CJ, Kao CH** (2002) Paraquat toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Journal of Plant Physiology* **159**: 159-166
- Igamberdiev AU, Gardeström P** (2003) Regulation of NAD and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases by reduction levels of pyridine nucleotides in mitochondria and cytosol of pea leaves. *Biochimica et Biophysica Acta* **1606**: 117-125
- Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS** (1987) Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circulation Research* **61**: 866-879
- Illingworth JA, Tipton KF** (1970) Purification and properties of the nicotinamideadenine dinucleotide phosphate-dependent isocitrate dehydrogenase from pig liver cytoplasm. *Biochemistry Journal* **118**: 253-258
- Inze D, Van Montagu M** (1995) Oxidative stress in plants. *Current Opinion in Biotechnology* **6**: 153-158
- Ischiropoulos H** (1998) Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Archives of Biochemistry Biophysics* **356**: 1-11
- Ischiropoulos H** (2003) Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **305**: 776-83
- Ishikawa T, Takeda T, Shigeoka S** (1996) Purification and characterization of cytosolic ascorbate peroxidase from komatsuna (*Brassica rapa*). *Plant Science* **120**: 11-18
- Ishikawa T, Yoshimura K, Tamoi M, Takeda T, Shigeoka S** (1997) Alternative mRNA splicing of 3'- terminal exons generates ascorbate peroxidase isoenzymes in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. *Biochemical Journal* **328**: 795-800

- Ishikawa T, Yoshimura K, Sakai K, Tamoi M, Takeda T, Shigeoka S** (1998) Molecular characterization and physiological role of a glyoxysome-bound ascorbate peroxidase from spinach. *Plant and Cell Physiology* **39**: 23-34
- Ishikawa T, Dowdle J, Smirnoff N** (2006) Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. *Physiologia Plantarum* **126**: 343-355
- Jablonski PP, Anderson JW** (1981) Light dependent reduction of dehydroascorbate by ruptured pea chloroplasts. *Plant Physiology* **67**: 1239-1244
- Jaleel CA, Manivannan P, Wahid A, Farooq M, Al-Juburi HJ, Somasundaram R, Vam RP** (2009) Drought stress in plants a review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture and Biology* **11**: 100-105
- Janská A, Marsík P, Zelenková S, Ovesná J** (2010) Cold stress and acclimation - what is important for metabolic adjustment? *Plant Biology (Stuttg)* **12**: 395-405
- Jasid S, Galatro A, Villordo JJ, Puntarulo S, Simontacchi M** (2009) Role of nitric oxide in soybean cotyledon senescence. *Plant Science* **176**: 662-668
- Jaspers P, Kangasjärvi J** (2010) Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiologia Plantarum* **138**: 405-413
- Jensen DE, Belka GK, Du Bois GC** (1998) S-nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochemical Journal* **331**: 659-668
- Jiang M, Zhang J** (2003) Cross-talk between calcium and reactive oxygen species originated from NADPH oxidase in abscisic acid-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Plant, Cell and Environment* **26**: 929-939
- Jiménez A, Hernández JA, del Río LA, Sevilla F** (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology* **114**: 275-284
- Jimenez A, Hernandez JA, Pastori G, del Rio LA, Sevilla F** (1998) Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiology* **118**: 1327-35
- Jiménez A, Gómez JM, Navarro E, Sevilla F** (2002) Changes in the antioxidative systems in mitochondria during ripening of pepper fruits. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 515-520
- Jiménez A, Romojaro F, Gómez JM, Llanos MR, Sevilla F** (2003) Antioxidant systems and their relationship with the response of pepper fruits to storage at 20 degrees C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 6293-6299
- Jin CW, Du ST, Zhang YS, Tang C, Lin XY** (2009) Atmospheric nitric oxide stimulates plant growth and improves the quality of spinach (*Spinacia oleracea*). *Annals Applied Biology* **155**: 113-120
- Johnson MA, Macdonald TL, Mannick JB, Conaway MR, Gaston B** (2001) Accelerated S-nitrosothiol breakdown by amyotrophic lateral sclerosis mutant copper,zinc-superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 39872-39878

Jourd'heuil D, Laroux FS, Miles AM, Wink DA, Grisham MB (1999) Effect of superoxide dismutase on the stability of S-nitrosothiols. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **361**: 323-330.

Juhnke H, Krems B, Kotter P, Entian KD (1996) Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress. *Molecular and General Genetics* **252**: 456

Kalt-Torres W, Burke JJ, Anderson JM (1984) Chloroplast glutathione reductase: purification and properties. *Physiologia Plantarum* **61**: 271-278

Kanematsu S, Asada K (1979) Ferric and manganic superoxide dismutases in *Euglena gracilis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **195**: 535-545

Kanematsu S, Asada K (1991) Chloroplast and cytosol isozymes of CuZn-superoxide dismutase: their characteristic amino acid sequences. *Free Radical Research Communications* **1**: 383-390

Kangasjärvi J, Jaspers P, Kollist H (2005) Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Cell and Environment* **28**: 1021-1036

Kato Y, Urano J, Maki Y, Ushimaru T (1997) Purification and characterization of dehydroascorbate reductase from rice. *Plant and Cell Physiology* **38**: 173-178

Kim EJ, Chung HJ, Suh B, Hah YC, Roe JH (1998) Transcriptional and posttranscriptional regulation by nickel of sod N gene encoding Ni-containing SOD from *Streptomyces coelicolor* Müller. *Molecular Microbiology* **27**: 187-195

Kissner R, Nauser T, Bugnon P, Lye PG, Koppenol WH (1998) Formation and properties of peroxyxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chemical Research in Toxicology* **11**: 557

Kiuchi K, Nishikimi M, Yagi K (1982) Purification and characterization of L-gulonolactone oxidase from chicken kidney microsomes. *Biochemistry* **21**: 5076-5082

Kliebenstein DJ, Monde RA, Last RL (1998) Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology* **118**: 637-650

Kocsy G, von Ballmoos P, Rügsegger A, Szalai G, Galiba G, Brunold C (2001a) Increasing the glutathione content in a chilling-sensitive maize genotype using safeners increased protection against chilling-induced injury. *Plant Physiology* **127**: 1147-1156

Kocsy G, Galiba G, Brunold C (2001b) Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum* **113**: 158-164

Kolbert Z, Bartha B, Erdei L (2008) Exogenous auxin-induced NO synthesis is Nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordia. *Journal of Plant Physiology* **165**: 967-975

Kolbert Z, Ortega L, Erdei L (2010) Involvement of nitrate reductase (NR) in Osmotic stress-induced NO generation of *Arabidopsis thaliana* L. roots. *Journal of Plant Physiology* **167**: 77-80

Kopyra M, Gwozdz EA (2003) nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**: 1011-1017

- Kotak S, Larkindale J, Lee U, von Koskull-Doring P, Vierling E, Scharf KD** (2008) Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 310–316
- Krarsch HA, Wise RR** (2000) The ultrastructure of chilling stress. *Plant Cell and Environment* **23**: 397-350
- Krasnuk M, Jung A, Witham FH** (1976) Electrophoretic studies of several dehydrogenases in relation to cold tolerance of alfalfa. *Cryobiology* **13**: 375-393
- Kröniger W, Rennenberg H, Tadros MH, Polle A** (1995) Purification and properties of manganese superoxide dismutase from Norway spruce (*Picea abies* L. Karst). *Plant Cell Physiology* **36**: 191-196
- Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, Bloom RE, Bodde S, Jones JD, Schroeder JI** (2003) NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO Journal* **22**: 2623-2633
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* **227**: 680-685
- Laing WA, Wright MA, Cooney J, Bulley SM** (2007) The missing step of the L-galactose pathway of ascorbate biosynthesis in plants, an L-galactose guanyltransferase, increases leaf ascorbate content. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* **104**: 9534–9539
- Lamattina L, García-Mata C, Graziano M, Pagnussat G** (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 109-136
- Lamb C, Dixon RA** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 251-275
- Larkindale E, Vierling E** (2008) Core genome responses involved in acclimation to high temperature. *Plant Physiology* **146**: 748–761
- Lascano HR, Gómez LD, Casano LM, Trippi VS** (1998) Changes in glutathione reductase activity and protein content in wheat leaves and chloroplasts exposed to photooxidative stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**: 321-329
- Lee B, Huh W, Kim S, Lee J, Kang S** (1999) Bacterial production of D-erythroascorbic acid and L-ascorbic acid through functional expression of *Saccharomyces cerevisiae* D-arabinono-1,4-lactone oxidase in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 4685-4687
- Lee U, Wie C, Fernandez BO, Feelisch M, Vierling E** (2008) Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 786-802
- Lee DG, Ahsan N, Lee SH, Lee JJ, Bahk JD, Kang KY, Lee BH** (2009) Chilling stress-induced proteomic changes in rice roots. *Journal Plant Physiology* **166**: 1-11
- Lee S, Park CM** (2010) Modulation of reactive oxygen species by salicylic acid in *Arabidopsis* seed germination under high salinity. *Plant Signaling and Behaviour* **5**: 1534-1536
- Lehner C, Kerschbaum HH, Luz-Meindl U** (2009) Nitric oxide suppresses growth and development in the unicellular green alga *Micrasterias denticulate*. *Journal of Plant Physiology* **166**: 117-127

- Lendzian K, Bassham JA** (1975) Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in spinach chloroplasts by ribulose 1,5-diphosphate and NADPH/NADP⁺ ratios. *Biochimica et Biophysica Acta* **396**: 260-275
- Leshem YY, Haramaty E** (1996) The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. Foliage. *Journal of Plant Physiology* **148**: 258-263
- Leshem YY, Wills RBH, KU VVV** (1998) Evidence for the function of the free radical gas-nitric oxide (NO)- as an endogenous maturation and senescence regulation factor in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**: 825-833
- Leterrier M, Corpas FJ, Barroso JB, Sandalio LM, del Río LA** (2005) Peroxisomal monodehydroascorbate reductase. Genomic clone characterization and functional analysis under environmental stress conditions. *Plant Physiology* **138**: 2111-2123
- Leterrier M, del Río LA, Corpas FJ** (2007) Cytosolic NADP-isocitrate dehydrogenase of pea plants: genomic clone characterization and functional analysis under abiotic stress conditions. *Free Radical Research* **41**: 191-199
- Leterrier M, Airaki M, Barroso JB, Palma JM, del Río LA, Corpas FJ** (2010) Arsenic impairs the metabolism of RNS and ROS in Arabidopsis plant. En: *International Symposium on the Pathophysiology of Reactive Oxygen and Nitrogen Species*, p.220 Salamanca, Spain (ISBN: 978-84-692-9284-6)
- Leterrier M, Chaki M, Airaki M, Valderrama R, Palma JM, Barroso JB, Corpas FJ** (2011) Function of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signaling & Behaviour* **6**: doi 10.4161/psb.6.6.15161
- Li Y, Wei G, Chen J** (2004) Glutathione: a review on biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **66**: 233-242
- Lin SZ, Cai SY, Chen XM** (2001) Effect of cold acclimation on calmodulin content and its regulative enzymes activities in banana seedlings. *Chinese Journal of Tropical Crops* **22**: 29-35
- Lin SZ, Zhang ZY, Liu W, Lin YZ, Zhang Q, Zhu BQ** (2005) Role of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Freezing-induced Freezing Resistance of *Populus suaveolens*. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* **31**: 34-40
- Lindermayr C, Saalbach G, Durner J** (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology* **137**: 921-30
- Lindermayr C, Saalbach G, Bahnweg G, Durner J** (2006) Differential inhibition of Arabidopsis methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 4285-4291
- Lindermayr C, Sell S, Durner J** (2008) Generation and detection of S-nitrosothiols. *Methods in Molecular Biology* **476**: 217-229
- Lindermayr C, Durner J** (2009) S-nitrosylation in plants: pattern and function. *Journal of Proteomics* **73**: 1-9
- Lisenbee CS, Lingard MJ, Trelease RN** (2005) Arabidopsis peroxisomes possess functionally redundant membrane and matrix isoforms of monodehydroascorbate reductase. *Plant Journal* **43**: 900-914

- Liszka A, van der Zalm E, Schopfer P** (2004) Production of reactive oxygen intermediates, H₂O₂, and OH by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiology* **136**: 3114–3123
- Liu Z, Rudd A, Freedman JE, Loscalzo J** (1998) S-Transnitrosation reactions are involved in the metabolic fate and biological actions of nitric oxide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **284**: 526–534
- Liu XZ, Huang BR** (2000) Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass. *Crop Science* **40**: 503-510
- Liu L, Hausladen A, Zeng M, Que L, Heitman J, Stamler JS** (2001) A metabolic enzyme for S-nitrosotiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**: 490-494
- Loannidi E, Kalamaki MS, Engineer C, Pateraki I, Alexandrou D, Mellidou I, Giovannonni J, Kanellis AK** (2009) Expression profiling of ascorbic acid-related genes during tomato fruit development and ripening and in response to stress conditions. *Journal of Experimental Botany* **60**: 663-678
- Locato V, Gadaleta C, De Gara L, De Pinto MC** (2008) Production of reactive species and modulation of antioxidant network in response to heat shock: a critical balance for cell fate. *Plant Cell and Environment* **31**: 1606–1619
- Loewus FA** (1963) Tracer studies on ascorbic acid formation in plants. *Phytochemistry* **2**: 109-128
- Loewus FA** (1988) Ascorbic acid and its metabolic products. En *The Biochemistry of Plants* (ed. Preiss J) Vol. 14, Pp. 85-107. Academic Press, New York
- Loewus MW, Bedgar DL, Saito K, Loewus FA** (1990) Conversion of L-sorbosone to L-ascorbic acid by a NADP-dependent dehydrogenase in bean spinach leaf. *Plant Physiology* **94**: 1492-1495
- Logan BA, Demming-Adams B, Adams WW, Grace SC** (1998a) Antioxidants and xanthophyll cycle-dependent energy dissipation in *Curcubita pepo* and *Vinca major* acclimated to four growth PFDs in the field. *Journal of Experimental Botany* **49**: 1869-1879
- Logan BA, Grace SC, Adams WW, Demmig-Adams B** (1998b) Seasonal differences in xanthophyll cycle characteristics and antioxidants in *Mahonia repens* growing in different light environments. *Oecologia* **116**: 9-17
- López-Huertas E, Sandalio LM, del Río LA** (1996) Superoxide radical generation in plant peroxisomal membranes: characterization of redox proteins involved. *Biochemical Society Transactions* **24**: 195S
- López-Huertas E, Sandalio LM, Gómez M, del Río LA** (1997) Superoxide radical generation in peroxisomal membranes: evidences for the participation of the 18 kDa integral membrane polypeptide. *Free Radical Research* **26**: 497-506
- López-Huertas E, Corpas FJ, Sandalio LM, del Río LA** (1999) Characterization of membrane polypeptides from pea leaf peroxisomes involved in superoxide radical generation. *Biochemical Journal* **337** (Pt 3): 531-536
- Lorence A, Chevone BI, Mendes P, Nessler CL** (2004) Myo-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiology* **134**: 1200-1205

- Low PS, Merida JR** (1996) The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. *Physiologiae Plantarum* **96**: 533-542
- Lozano-Juste J, Colom-Moreno R, León J** (2011) In vivo protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **62**: 3501-3517
- Lu B, Yuan Y, Zhang C, Ou J, Zhou W, Lin Q** (2005) Modulation of key enzymes involved in ammonium assimilation and carbon metabolism by low temperature in rice (*Oryza sativa* L.) roots. *Plant Science* **169**: 295-302
- Lucotte G, Baneyx F** (1993) *Introduction of Molecular Cloning Techniques*. VCH Publishers Inc., New York
- Lurie S, Shapiro B, Ben-Yehoshua S** (1986) Effects of water stress and degree of ripeness on rate of senescence of harvested bell pepper fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **111**: 880-885
- Lütz C** (2010) Cell physiology of plants growing in cold environments. *Protoplasma* **244**: 53-73
- Madamanchi NR, Anderson JV, Alischer RG, Cramer CL, Hess JL** (1992) Purification of multiple forms of glutathione reductase from pea (*Pisum sativum* L.) seedlings and enzyme levels in ozone-fumigated pea leaves. *Plant Physiology* **100**: 138-145
- Mackerness SAH, John CF, Jordan B, Thomas B** (2001) Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Letters* **489**: 237-242
- Mahajan S, Tuteja N** (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **444**: 139-158
- Mahalingam R, Jambunathan N, Gunjan SK, Faustin E, Weng H, Ayoubi P** (2006) Analysis of oxidative signalling induced by ozone in *Arabidopsis thaliana* *Plant Cell and Environment* **29**: 1357-1371
- Martí MC, Camejo D, Olmos E, Sandalio LM, Fernández-García N, Jiménez A, Sevilla F** (2009) Characterisation and changes in the antioxidant system of chloroplasts and chromoplasts isolated from green and mature pepper fruits. *Plant Biology* **11**: 613-624
- Martini G, Ursini MV** (1996) A new lease of life for an old enzyme. *Bioessays* **18**: 631-637
- Mateos RM, León AM, Sandalio LM, Gómez M, del Río LA, Palma JM** (2003) Peroxisomes from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.): purification, characterization and antioxidant activity. *Journal of Plant Physiology* **160**: 1507-1516
- Mateos RM, Jiménez A, Bacarizo S, Corpas FJ, Lundkvist M, Sevilla F, del Río LA, Palma JM** (2005) Metabolismo del ascorbato durante la maduración de los frutos de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *IX Congreso Luso-Español de Fisiología Vegetal*, Libro de resúmenes, p. 126, Evora
- Mateos RM** (2006) Antioxidantes de pimiento (*Capsicum annuum* L.): estudio bioquímico y molecular de la maduración del fruto y de la respuesta a estrés abiótico. Tesis Doctoral, Universidad de Granada
- Maxwell K, Marrison JL, Leech RM, Griffiths H, Horton P** (1999) Chloroplast acclimation in leaves of *Guzmania monostachia* in response to high light. *Plant Physiology* **121**: 89-96

- May MJ, Leaver CJ** (1993) Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant Physiology* **103**: 621-27
- McCord JM, Fridovich I** (1969) Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte cuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* **244**: 6049-6055
- Meister A, Anderson ME** (1983) Glutathione. *Annual Review of Biochemistry* **52**: 711-760
- Menezes- Benavente L, Kernodle SP, Margis-Pinheiro M, Scandalios JG** (2004a) Salt-induced antioxidant metabolism defenses in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Redox Report* **9**: 29-36
- Menezes- Benavente L, Teixeira FK, Kamei CL, Margis-Pinheiro M** (2004b) Salt stress induces expression of genes encoding antioxidant enzymes in seedlings of a Brazilian indica rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Science* **166**: 323-331
- Meyer AJ, May MJ, Fricker M** (2001) Quantitative in vivo measurement of glutathione in *Arabidopsis* cells. *Plant Journal* **27**: 67-78
- Meyer AJ** (2008) The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *Journal of Plant Physiology* **165**: 1390-1403
- Mhamdi A, Mauve C, Gouia H, Saindrenan P, Hodges M, Noctor G** (2010) Cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase contributes to redox homeostasis and the regulation of pathogen responses in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell and Environment* **33**: 1112-1123
- Miki T, Tsujimoto Y, Miyabe S, Sugiyama K, Izawa S, Inoue Y, Kimura A** (1996) Oxidative stress response in yeast: purification and characterization of glutathione reductase from *Hansenula mrakii*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **60**: 1207-1209
- Millar AH, Day DA** (1996) Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Letters* **398**: 155-158
- Miller G, Shulaev V, Mittler R** (2008) Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum* **133**: 481-489
- Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortes D, Torres MA, Shulaev V, Dangl JL, Mittler R** (2009) The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling* **2**: ra45
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R** (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant Cell and Environment* **33**: 453-467
- Minard KI, McAlister-Henn L** (2001) Antioxidant function of cytosolic sources of NADPH in yeast. *Free Radical Biology and Medicine* **31**: 832-843
- Minetti M, Forte T, Soriani M, Quaresima V, Menditto A, Ferrari M** (1992) Iron induced ascorbate oxidation in plasma as monitored by ascorbate free radical formation. No spin trapping evidence for the hydroxyl radical in iron overloaded plasma. *Biochemical Journal* **282**: 459-465
- Mishina TE, Lamb C, Zeier J** (2007) Expression of a nitric oxide degrading enzyme induces a senescence programme in *Arabidopsis*. *Plant Cell and Environment* **30**: 39-52

- Mittler R, Zilinskas BA** (1991) Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiology* **97**: 962-968
- Mittler R, Feng X, Cohen M** (1998) Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Plant Cell* **10**: 461-473
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**: 405-410
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**: 490-498
- Mittler R** (2006) Abiogenic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* **11**: 15-19
- Mittova V, Tal M, Volokita M, Guy M** (2002) Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiologia Plantarum* **115**: 393-400
- Mittova V, Theodoulou FL, Kiddle G, Gómez L, Volokita M, Tal M, Foyer CH, Guy M** (2003a) Coordinate induction of glutathione biosynthesis and glutathione-metabolizing enzymes is correlated with salt tolerance in tomato. *FEBS Letters* **554**: 417-421
- Mittova V, Tal M, Volokita M, Guy M** (2003b) Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Plant, Cell and Environment* **26**: 845-856
- Miyake C, Asada K** (1992) Thylakoid bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant and Cell Physiology* **33**: 541-553
- Miyake C, Schreiber U, Hormann H, Sano S, Asada K** (1998) The FAD-enzyme monodehydroascorbate radical reductase mediates photoproduction of superoxide radicals in spinach thylakoid membranes. *Plant and Cell Physiology* **39**: 821-829
- Møller IM, Rasmusson AG** (1998) The role of NADP in the mitochondrial matrix. *Trends in Plant Science* **3**: 21-27
- Møller IM, Kristensen BK** (2004) Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator. *Photochemical and Photobiological Sciences* **3**: 730-735
- Møller IM, Jensen PE, Hansson A** (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review Plant Biology* **58**: 459-481
- Møller IM, Sweetlove LJ** (2010) ROS signalling--specificity is required. *Trends in Plant Science* **15**: 370-374
- Moncada S** (1999) Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *Journal of the Royal Society of medicine* **92**: 164-169
- Moradas-Ferreira P, Costa V, Piper P, Mager W** (1996) The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Molecular Microbiology* **19**: 651-658

- Moreau M, Lindermayr C, Durner J, Klessig DF** (2010) NO synthesis and signaling in plants – where do we stand? *Physiology Plant* **138**: 372–383
- Mori IC, Schroeder JI** (2004) Reactive oxygen species activation of plant Ca²⁺ channels: a signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiology* **135**: 702–708
- Morimura Y, Ohya T, Ikawa T** (1996) Presence of ascorbate-peroxidizing enzymes in roots of *Brassica campestris* L cv Komatsuna. *Plant Science* **117**: 55-63
- Morot-Gaudry-Talarmain Y, Rockel P, Moureaux T, Quillere I, Leydecker MT, Kaiser WM, Morot-Gaudry JF** (2002) Nitrite accumulation and nitric oxide emission in relation to cellular signaling in nitrite reductase antisense tobacco. *Planta* **215**: 708–715
- Müller K, Linkies A, Vreeburg RAM, Fry SC, Krieger-Liszkay A, Leubner-Metzger G** (2009) In vivo cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiology* **150**: 1855-1865
- Mullineaux PM, Creissen G, Broadbent P, Reynolds H, Kular B, Wellburn A** (1994) Elucidation of the role of glutathione reductase using transgenic plants. *Biochemical Society Transactions* **22**: 931-936
- Mullineaux P, Karpinski S** (2002) Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 43-48
- Munkres KD, Rana RS, Goldstein E** (1984) Genetically determined conidial longevity is positively correlated with superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, cytochrome c peroxidase, and ascorbate free radical reductase activities in *Neurospora crassa*. *Mechanisms of Ageing and Development* **24**: 83-100
- Munns R, Tester M** (2008) Mechanisms of salinity tolerance, *Annual Review of Plant Biology* **59**: 651–681
- Murakami E, Nagata M, Shimoda Y, Kucho K, Higashi S, Abe M, Hashimoto M, Uchiumi T** (2011) Nitric oxide production induced in roots of *Lotus japonicus* by Lipopolysaccharide from *Mesorhizobium loti*. *Plant and Cell Physiology* **52**: 610-617
- Murthy SS, Zilinskas BA** (1994) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding pea monodehydroascorbate reductase. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 31129-31133
- Nakatsubo N, Kojima H, Kikuchi K, Nagoshi H, Hirata Y, Maeda D, Imai Y, Irimura T, Nagano T** (1998) Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diamino fluoresceins. *FEBS Letters* **427**: 263-266
- Naik PS, Chanemougasoundharam A, Khurana SMP, Kallo G** (2003) Genetic manipulation of carotenoid pathway in higher plants. *Current Science* **85**: 1423-1430
- Namesny A** (1996) Pimientos I. En Compendios de Horticultura. Ediciones de Horticultura S.L., Reus
- Namesny A** (2006) Pimientos II. En Compendios de Horticultura. Ediciones de Horticultura S.L., Reus
- Namiki M** (1990) Antioxidants/ antimutagens in food. *Critical Reviews in Food Science* **29**: 273-300

- Nappi AJ, Vass E** (1998) Hydroxyl radical formation resulting from the interaction of nitric oxide and hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta* **1380**: 55-63
- Nathan C** (2004) The moving frontier in nitric oxide-dependent signaling. *Science Signaling: The Signal Transduction Knowledge environment* **257**: 52
- Navari-Izzo F, Izzo R** (1994) Induction of enzymes activities and antioxidant production in barley plants as a result of SO₂ fumigation. *Plant Science* **96**: 31-40
- Navarro JM, Flores P, Garrido C, Martínez V** (2006) Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stage, as affected by salinity. *Food Chemistry* **96**: 66-73
- Naydenov NG, Khanam S, Siniauskaya M, Nakamura C** (2010) Profiling of mitochondrial transcriptome in germinating wheat embryos and seedlings subjected to cold, salinity and osmotic stresses. *Genes & Genetic Systems* **85**: 31-42
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hancock JT** (2002) Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiology* **128**: 13-16
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT** (2003) Nitric signalling in plants. *New Phytologist* **159**: 11-35
- Neill S, Barros R, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Morris P, Ribeiro D, Wilson I** (2008) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* **59**: 165-176
- Nguyen HT, Leipner J, Stamp P, Guerra-Peraza O** (2009) Low temperature stress in maize (*Zea mays* L.) induces genes involved in photosynthesis and signal transduction as studied by suppression subtractive hybridization. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**: 116-122
- Nishikimi M, Tolbert BM, Udenfriend S** (1976) Purification and characterization of L-gulonogamma-lactone oxidase from rat and goat liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **175**: 427-435
- Niyogi K.K.** (1999) Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 333-359
- Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 249-279
- Noctor G** (2006) Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant Cell and Environment* **29**: 409-425
- Noctor G, Queval G, Gakière B** (2006) NAD(P) synthesis and pyridine nucleotide cycling in plants and their potential importance in stress conditions. *Journal Experimental Botany* **57**: 1603-1620
- Obara K, Sumi K, Fukuda H** (2002) The use of multiple transcription starts causes the dual targeting of Arabidopsis putative monodehydroascorbate reductase to both mitochondria and chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* **43**: 697-705
- Ogawa K, Kanematsu S, Asada K** (1995) Attachment of CuZn-superoxide dismutase to thylakoid membranes at the site of superoxide generation (PSI) in spinach chloroplast: detection by immunogold labeling after freezing and substitution method. *Plant and Cell Physiology* **36**: 565-573

- Ogawa K, Kanematsu S, Asada K** (1996) Intra and extra-cellular localization of "cytosolic" CuZn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyl. *Plant and cell Physiology* **37**: 790-799
- Ogawa K, Kanematsu S, Asada K** (1997) Generation of superoxide anion and localization of CuZn-superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls: their association with lignification. *Plant Cell and Physiology* **38**: 1118-1126
- Ogawa K** (2005) Glutathione-associated regulation of plant growth and stress responses. *Antioxidants and Redox Signaling* **7**: 973-981
- Oidaira H, Sano S, Koshiba T, Ushimaru T** (2000) Enhancement of antioxidative enzyme activities in chilled rice seedlings. *Journal of Plant Physiology* **156**: 811-813
- Okamura M** (1980) An improved method for determination of L-ascorbic acid and L-dehydroascorbic acid in blood plasma. *Clinica Chimica Acta* **103**: 259-268
- O'Kane D, Gill V, Boyd P, Burdon R** (1996) Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. *Planta* **198**: 371-377
- Oracz K, El-Maarouf Bouteau H, Farrant JM, Cooper K, Belghazi M, Job C, Job D, Corbineau F, Bailly C** (2007) ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant Journal* **50**: 452-465
- Oracz K, El-Maarouf-Bouteau H, Kranner I, Bogatek R, Corbineau F, Bailly C** (2009) The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiology* **150**: 494-505
- Packer L, Glazer AN** (1990) Oxygen radicals in biological systems. Part B. Oxygen radicals and antioxidants. *Methods in Enzymology* **186**: Academic Press, San Diego, CA
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L** (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews* **87**: 315-424
- Pagnussat GC, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L** (2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiology* **129**: 954-956
- Palavan-Unsal N, Arisan D** (2009) Nitric oxide signalling in plants. *Botanical Review* **75**: 203-229
- Palma JM, López-Huertas E, Corpas FJ, Sandalio LM, Gómez M, del Río LA** (1998) Peroxisomal manganese superoxide dismutase: purification and properties of the isozyme from pea leaves. *Physiology Plant* **104**: 720-726
- Palma JM, Sandalio LM, Corpas FJ, Romero-Puertas MC, McCarthy I, del Río LA** (2002) Plant proteases, protein degradation and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 521-530
- Palma JM, Mateos RM, Jiménez A, Corpas FJ, Sevilla F, del Río LA** (2007) El ascorbato como molécula central en la fisiología del fruto de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *VIII Reunión del Grupo Español de Radicales Libres*, Valencia. Libro de Resúmenes del Congreso

- Palma JM, Corpas FJ, del Río LA** (2011) Proteomics as an approach to the understanding of the molecular physiology of fruit development and ripening. *Journal of Proteomics* **74**: 1230-1243
- Palma JM, Jiménez A, Corpas FJ, Mateos RM, Martí MC, Sevilla F, del Río LA** (2011) Role of ascorbate on the physiology of pepper (*Capsicum annuum* L). *Functional Plant Science Biotechnology* (en prensa)
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S** (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**: 524-526
- Palmieri MC, Lindermayr C, Bauwe H, Steinhauser C, Durner J** (2010) Regulation of plant glycine decarboxylase by S-nitrosylation and glutathionylation. *Plant Physiology* **152**: 1514-1528
- Palomo J, Gallardo F, Suarez MF, Canovas FM** (1998) Purification and characterization of NADP-linked isocitrate dehydrogenase from scots pine. Evidence for different physiological roles of the enzyme in primary development. *Plant Physiology* **118**: 617-626
- Pandolfi PP, Sonati F, Rivi R, Mason P, Grosveld F, Luzzatto L** (1995) Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *EMBO Journal* **14**: 5209–5215
- Park JW** (1988) Reaction of S-Nitrosoglutathione with Sulfhydryl Groups in Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **152**: 916-920
- Pastori GM, del Río LA** (1997) Natural senescence of pea leaves. An activated oxygen-mediated function for peroxisoms. *Plant Physiology* **113**: 411-418
- Pastori G, Foyer CH, Mullineaux P** (2000) Low temperature induces changes in the distribution of H₂O₂ and antioxidants between the bundle sheath and mesophyll cells of maize leaves. *Journal of Experimental Botany* **51**: 107-113
- Pastori GM, Kiddle G, Antoniw J, Bernard S, Veljovic-Jovanovic S, Verrier PJ, Noctor G, Foyer CH** (2003) Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes controlling development through hormone signaling. *The Plant Cell* **15**: 1212–1226
- Pateraki I, Sanmartin M, Kalamaki MS, Gerasopoulos D, Kanellis AK** (2004) Molecular characterization and expression studies during melon fruit development and ripening of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1623-1633
- Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klüsener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI** (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**: 731-734
- Pennell RI, Lamb C** (1997) Programmed Cell Death in Plants. *Plant Cell*. **9**: 1157-1168
- Perazzolli M, Dominici P, Romero-Puertas MC, Zago E, Zeier J, Sonoda M, Lamb C, Delledonne M** (2004) Arabidopsis nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell* **16**: 2785-2794
- Pergo EM, Ishii-Iwamoto EL** (2011) Changes in energy metabolism and antioxidant defense systems during seed germination of the weed species *Ipomoea triloba* L. and the responses to allelochemicals. *Journal of Chemical Ecology* **37**: 500-513

- Perl-Treves R, Perl A** (2002) Oxidative stress: an introduction. En: *Oxidative stress in plants*. Inzé D. y Van Montagu M. (Eds.). Págs.: 1-32. Taylor and Francis, London
- Pinhero RG, Rao MV, Paliyath G, Murr DP, Fletcher RA** (1997) Changes in activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiology* **114**: 695–704
- Planchet E, Gupta KJ, Sonoda M, Kaiser WM** (2005) Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *The Plant Journal* **41**: 732–743
- Potters G, Psternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MAK** (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends Plant Science* **12**: 98-105
- Prado AM, Porterfield DM, Feijo JA** (2004) Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development* **131**: 2707-2714
- Prasad TK, Anderson MD, Martin BA, Stewart CR** (1994) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *The Plant Cell* **6**: 65-74
- Prasad PVV, Pisipati SR, Ristic Z, Bukovnik U, Fritz A** (2008) Impact of high nighttime temperature on growth and yield of spring wheat. *Crop Science* **48**: 1911-1917
- Prasad PVV, Staggenborg SA, Ristic Z** (2009) Impact of drought and/or heat stress on physiological, developmental, growth and yield processes of crop plants. Pp.301-355. EN: Response of crops to limited water: understanding and modeling water stress effects on plant growth processes. Advances in agricultural systems modeling series 1. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI, USA
- Prescott SM** (1999) A thematic series on oxidation of lipids as a source of messengers. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 22901
- Proietti S, Moscatello S, Famiani F, Battistelli A** (2009) Increase of ascorbic acid content and nutritional quality in spinach leaves during physiological acclimation to low temperature. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**: 717-723
- Proteggente AR, Pannala AS, Paganga G, Van Buren L, Wagner E, Wiseman S, Van De Put F, Dacombe C, Rice-Evans CA** (2002) The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radical Research* **36**: 217-233
- Puppo A, Groten K, Bastian F, Carzaniga R, Soussi M, Lucas MM, De Felipe MR, Harrison J, Vanacker H, Foyer CH** (2005) Legume nodule senescence: roles for redox and hormonal signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytologist* **165**: 683-701
- Quan LJ, Zhang B, Shi WW, Li HY** (2008) Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**: 2-18
- Radi R** (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*. **101**: 4003-4008
- Ramanjulu S, Bartels D** (2002) Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell and Environment* **25**: 141-151

- Randall DD, Givan CV** (1981) Subcellular location of NADP⁺-isocitrate dehydrogenase in *Pisum sativum* leaves. *Plant Physiology* **68**: 70-73
- Rao MV, Davis KR** (2001) The physiology of ozone induced cell death. *Planta* **213**: 682–690
- Rascio N, Navari-Izzo F** (2011) Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science* **180**: 169-81
- Rasmusson A, Möller IM** (1990) NADP-utilizing enzymes in the matrix of plant mitochondria. *Plant Physiology* **94**: 1012-1018
- Renaut J, Hausman JF, Wisniewski ME** (2006) Proteomics and low-temperature studies: bridging the gap between gene expression and metabolism. *Physiologia Plantarum* **126**: 97–109
- Rennenberg H** (1982) Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochemistry* **21**: 2771-2781
- Requena JR, Fu MX, Ahmed MU, Jenkins AJ, Lyons TJ, Thorpe SR** (1996) Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nephrology Dialysis Transplantation* **11**: 48-53
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE** (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 707–719
- Reynaert NL** (2011) Glutathione biochemistry in asthma. *Biochimica et Biophysica Acta*. doi:10.1016/j.bbagen.2011.01.010
- Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S, Mittler R** (2004) When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology* **134**: 1683-1696
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM** (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Botany* **53**: 103-110
- Rodríguez AA, Grunberg KA, Taleisnik EL** (2002) Reactive oxygen species in the elongation zone of maize leaves are necessary for leaf extension. *Plant Physiology* **129**: 1627–1632
- Rodríguez AA, Córdoba AR, Ortega L, Taleisnik E** (2004) Decreased reactive oxygen species concentration in the elongation zone contributes to the reduction in maize leaf growth under salinity. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1383-1390
- Rodríguez A, Lascano H, Bustos L, Taleisnik E** (2007) Salinity-induced reductions in NADPH oxidase activity in the maize leaf blade elongation zone. *Journal of Plant Physiology* **164**: 223–230
- Rodríguez AA, Maiale SJ, Menéndez AB, Ruiz OA** (2009) Polyamine oxidase activity contributes to sustain maize leaf elongation under saline stress. *Journal of Experimental Botany* **60**: 4249–4262
- Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Zabalza A, Corpas FJ, Gómez M, del Río LA, Sandalio LM** (2006) Cadmium effect on the oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo*. *Plant Cell and Environment* **29**: 1532-1544

- Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Pastori GM, Corpas FJ, Sandalio LM, del Río LA, Palma JM** (2007) Peroxisomal membrane manganese superoxide dismutase: characterization of the isozyme from watermelon (*Citrullus lanatus* Schrad.) cotyledons. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2417-2427
- Romero-Puertas MC, Palma JM, Gómez M, del Río LA, Sandalio LM** (2002) Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant Cell and Environment* **25**: 677-686
- Romero-Puertas MC, McCarthy I, Mez M, Sandalio LM, Corpas FJ, del Río LA, Palma JM** (2004) Reactive oxygen species mediated enzymatic systems involved in the oxidative action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Cell and Environment* **27**: 1135-1148
- Romero-Puertas MC, Corpas FJ, Sandalio LM, Leterrier M, Rodríguez-Serrano M, del Río LA, Palma JM** (2006) Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New Phytologist* **170**: 43-52
- Romero-Puertas MC, Laxa M, Mattè A, Zaninotto F, Finkemeier I, Jones AM, Perazzolli M, Vandelle E, Dietz KJ, Delledonne M** (2007) S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell* **19**: 4120-4130
- Rouhier N, Lemaire SD, Jacquot JP** (2008) The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annual Review of Plant Biology* **59**:143-66
- Rudhe C, Clifton R, Whelan J, Glaser E** (2002) N-terminal domain of the dual-targeted pea glutathione reductase signal peptide controls organellar targeting efficiency. *Journal of Molecular Biology* **324**: 577-585
- Rudhe C, Clifton R, Chew O, Zemam K, Richter S, Lamppa G, Whelan J, Glaser E** (2004) Processing of the dual targeted precursor protein of glutathione reductase in mitochondria and chloroplasts. *Journal of Molecular Biology* **343**: 639-647
- Rümer S, Kapuganti JG, Kaiser WM** (2009) Oxidation of hydroxylamines to NO by plant cells. *Plant Signaling and Behaviour* **4**: 853–855
- Rustérucci C, Espunya MC, Díaz M, Chabannes M, Martínez MC** (2007) S-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiology* **143**: 1282-1292
- Sagi M, Fluhr R** (2001) Superoxide production by plant homologues of the gp91phox NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology* **126**: 128-1290
- Saito K, Nick JA, Loewus FA** (1990) D-glucosone and L-sorbose, putative intermediates of L-ascorbic acid biosynthesis in detached bean and spinach leaves. *Plant Physiology* **94**: 1496-1500
- Saito S, Yamamoto-Katou A, Yoshioka H, Doke N, Kawakita K** (2006) Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology* **47**: 689-697
- Sakamoto A, Ueda M, Morikawa H** (2002) *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Letters* **515**: 20-24

- Sakihama Y, Mano J, Sano S, Asada K, Yamasaki H** (2000) Reduction of phenoxyl radicals mediated by monodehydroascorbate reductase. *Biochemical and biophysical research communications* **279**: 949-954
- Salin ML** (1988) Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiologia Plantarum* **72**: 681-689
- Saltveit ME** (1977) Carbon dioxide, ethylene and color development in ripening mature green bell pepper. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **102**: 523-525
- Sandalio LM, Palma JM, del Río LA** (1987) Localization of manganese superoxide dismutase in peroxisomes isolated from *Pisum sativum* L. *Plant Science* **51**: 1-8
- Sandalio LM, del Río LA** (1988) Introrganellar distribution of superoxide dismutase in plant peroxisomes (glyoxysomes and leaf peroxisomes). *Plant Physiology* **88**: 1215-1218
- Sandalio LM, López-Huertas E, Bueno P, del Río LA** (1997) Immunocytochemical localization of copper, zinc superoxide dismutase in peroxisomes from watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.) cotyledons. *Free Radical Research* **26**: 187-194
- Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomez M, Romero-Puertas MC, del Río LA** (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany* **52**: 2115-2126
- Sang J, Jiang M, Lin F, Xu S, Zhang A, Tan M** (2008) Nitric oxide reduces hydrogen peroxide accumulation involved in water stress-induced subcellular antioxidant defense in maize plants. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**: 231-243
- Sanmartin M, Drogoudi PD, Lyons T, Pateraki I, Barnes J, Kanellis AK** (2003) Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone. *Planta* **216**: 918-928
- Sano S, Asada K** (1994) cDNA cloning of monodehydroascorbate radical reductase from cucumber: a high degree of homology in terms of amino acid sequence between this enzyme and bacterial flavoenzymes. *Plant and Cell Physiology* **35**: 425-437
- Sano S, Tao S, Endo Y, Inaba T, Hossain MA, Miyake C, Matsuo M, Aoki H, Asada K, Saito K** (2005) Purification and cDNA cloning of chloroplastic monodehydroascorbate reductase from spinach. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **69**: 762-772
- Saruyama H, Tanida M** (1995) Effect of chilling on activated oxygen-scavenging enzymes in low temperature-sensitive and -tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science* **109**: 105-113
- Sato Y, Murakami T, Funatsuki H, Matsuba S, Saruyama H, Tanida M** (2001) Heat shock mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings. *Journal Experimental Botany* **52**: 145-151
- Satoh Y** (1972) Studies on NADP-isocitrate dehydrogenase from maturing castor bean seeds. *Plant and cell Physiology* **13**: 493-503
- Sauer M, Branduardi P, Valli M, Porro D** (2004) Production of L-ascorbic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 6086-6091

- Scandalios JG** (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **38**: 995-1014
- Schaaf J, Walter MH, Hess D** (1995) Primary Metabolism in Plant Defense (Regulation of a Bean Malic Enzyme Gene Promoter in Transgenic Tobacco by Developmental and Environmental Cues). *Plant Physiology* **108**: 949-960
- Schillmiller AL, Howe GA** (2005) Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 369–377
- Schnarrenberger C, Oeser A, Tolbert NE** (1973) Two isoenzymes each of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in spinach leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **154**: 438-448
- Schopfer FJ, Baker PR, Freeman BA** (2003) NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends in Biochemical Sciences* **28**: 646-654
- Schopfer P and Liskay A** (2006) Plasma membrane-generated reactive oxygen intermediates and their role in cell growth of plants. *Biofactors* **28**: 73-81
- Schulz H, Hartling S** (2001) Biochemical parameters as biomarkers for the early recognition of environmental pollution on Scots pine trees. II. The antioxidative metabolites ascorbic acid, glutathione, alpha-tocopherol and the enzymes superoxide dismutase and glutathione reductase. *Zeitschrift für Naturforschung* **56**:767-780
- Schutzendubel A, Polle A** (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1351-1365
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K** (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* **31**: 279-292
- Seligman K, Saviani EE, Oliveira HC, Pinto-Maglio CA, Salgado I** (2008) Floral transition and nitric oxide emission during flower development in *Arabidopsis thaliana* is affected in nitrate reductase-deficient plants. *Plant Cell Physiology* **49**: 1112–1121
- Sevilla F, López-Gorgé J, del Río LA** (1982) Characterization of a manganese superoxide dismutase from the higher plant *Pisum sativum* L. *Plant Physiology* **70**: 1321-1326
- Sevilla F, López-Gorgé J, del Río LA** (1980a) Manganese superoxide dismutase from a higher plant. Purification of a new Mn-containing enzyme. *Planta* **150**: 153-157
- Sevilla F, López-Gorgé J, del Río LA** (1980b) Preliminary characterization of a Mn-containing superoxide dismutase from a higher plant (*Pisum sativum* L). In: Bennister J.V., Hill H.A.O., eds. Chemical and biochemical aspects of superoxide and superoxide dismutase. *New York: Elsevier/North-Holland* 185-195
- Shapiro AD** (2005) Nitric oxide signaling in plants. *Vitamins and Hormones* **72**: 339-398
- Sharma P, Sharma N, Deswal R** (2005) The molecular biology of the low temperature response in plants. *Bioessays* **27**: 1048–1059

- Shi FM, Li YZ** (2008) Verticillium dahliae toxins-induced nitric oxide production in Arabidopsis is major dependent on nitrate reductase. *Biochemistry and Molecular Biology Reports* **41**: 79–85
- Shigeoka S, Onishi T, Nakano Y, Kitaoka S** (1987) Characterization and physiological function of glutathione reductase in Euglena gracilis z. *Biochemical Journal* **242**: 511-515
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K** (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1305-1319
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M** (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 410–417
- Siebert G, Carsiotis M, Plaut GWE** (1957) The enzymatic properties of isocitric dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* **262**: 10422-10425
- Simontacchi M, Galatro A, Puntarulo S** (2001) El estrés oxidativo en las plantas. *Revista Ciencia Hoy* [en línea] **10**: 1-2
- Singh RJ, Hogg N, Joseph J, Kalyanaraman J** (1996) Mecanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *Journal Biochemistry* **271**: 18596-18603
- Singh RK, Gregorio GB, Jain RK** (2007) QTL mapping for salinity tolerance in rice. *Physiology and Molecular Biology of Plants* **13**: 87–99
- Slekar KH, Kosman DJ, Culotta VC** (1996) The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 28831–28836
- Smirnoff N** (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* **125**: 27-58
- Smirnoff N** (2000) Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 229-235
- Smirnoff N, Conklin PL, Loewus FA** (2001) Biosynthesis of ascorbic acid in plants: A renaissance. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology* **52**: 437-467
- Smirnoff N, Running JA, Gaztek S** (2004) Ascorbate biosynthesis: a diversity of pathways. In: Asard H, May JM, Smirnoff N (eds) *Vitamin C: functions and biochemistry in animals and plants*. BIOS Scientific Publishers, London, pp 7-29
- Smirnoff N** (2005) Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. In: N. Smirnoff (Ed.). *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in plants*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. Pp. 53-86
- Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA** (1989) Properties and functions of glutathione reductase in plants. *Physiologia Plantarum* **77**: 449-456
- Smith JN, Dasgupta TP** (2000) Kinetics and mechanism of the decomposition of S-nitrosoglutathione by l-ascorbic acid and copper ions in aqueous solution to produce nitric oxide. *Nitric Oxide* **4**: 57-66
- Squadrito GL, Pryor WA** (1998) The nature of reactive species in systems that produce peroxyxynitrite. *Chemical Research in Toxicology* **11**: 718-719

- Srivalli B, Khanna-Chopra R** (2004) The developing reproductive 'sink' induces oxidative stress to mediate nitrogen mobilization during monocarpic senescence in wheat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **325**: 198-202
- Srivastava N, Gonugunta VK, Puli MR, Raghavendra AS** (2009) Nitric oxide production occurs downstream of reactive oxygen species in guard cells during stomatal closure induced by chitosan in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. *Planta* **229**: 757–765
- Staab CA, Alander J, Brandt M, Lengqvist J, Morgenstern R, Grafström RC, Höög JO** (2008) Reduction of S-nitrosoglutathione by alcohol dehydrogenase 3 is facilitated by substrate alcohols via direct cofactor recycling and leads to GSH-controlled formation of glutathione transferase inhibitors. *Biochemical Journal* **413**: 493–504. CrossRefMedline
- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J** (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox activated forms. *Science* **258**: 1898-1902
- Stamler JS, Lamas S, Fang FC** (2001) Nitrosylation: the prototypic redox-based signalling mechanism. *Cell* **106**: 675-683
- Steffens JC, Hunt DF, Williams BG** (1986) Accumulation of nonprotein metal binding polypeptides (gamma-glutamyl-cysteinyl) N-glycine in selected cadmium resistant tomato cells. *Journal of Biological Chemistry* **261**: 3879-3882
- Steffens M, Sarkela, T. M., Gybina, A. A., Steele, T. W., Trasseth, N. J., Kuehl, D., Giulivi, C** (2001) Metabolism of S-nitrosoglutathione in intact mitochondria. *Biochemical Journal* **356**: 395–402
- Steinberg D** (1997) Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 20963-20966
- Stevens RG, Creissen GP, Mullineaux PM** (1997) Cloning and characterization of a cytosolic glutathione reductase cDNA from pea (*Pisum sativum* L.) and its expression in response to stress. *Plant Molecular Biology* **35**: 641-654
- Stevens RG, Creissen GP, Mullineaux PM** (2000) Characterisation of pea cytosolic glutathione reductase expressed in transgenic tobacco. *Planta* **211**: 537-45
- Stöhr C, Ullrich WR** (2002) Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *Journal of Experimental Botany* **53**: 2293-2303
- Streller S, Kromer S, Wingsle G** (1994) Isolation and purification of mitochondrial Mn-superoxide dismutase from the gymnosperm *Pinus sylvestris* L. *Plant Cell Physiology* **35**: 859-867
- Strittmatter P, Ball EG** (1955) Formaldehyde dehydrogenase, a glutathione dependent enzyme system. *Journal of Biological Chemistry* **213**: 445-461
- Suzuki N, Mittler R** (2006) Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum* **126**: 45–51
- Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R** (2007) Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* **6**: 662-680

Szalai G, Kellős T, Gábor Galiba G, Kocsy G (2009) glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. *Journal of Plant Growth Regulation* **28**: 66-80

Tabata K, Takaoka T, Esaka M (2002) Gene expression of ascorbic acid-related enzymes in tobacco. *Phytochemistry* **61**: 631-635

Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J, Dong X (2008) Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321**: 952-6

Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Smith FW, Blake-Kalff M, Hawkesford MJ, Saito K (2000) The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **23**: 171-182

Takahashi S, Yamasaki H (2002) Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. *FEBS Letters* **512**: 145-148

Tamaoki M, Mukai F, Asai N, Nakajima N, Kubo A, Aono M, Sagi H (2003) Light-controlled expression of a gene encoding L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase which affects ascorbate pool size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* **164**: 1111-1117

Tanaka K, Takeuchi E, Kubo A, Sakaki T, Haraguchi K, Kawamura Y (1991) 2 Immunologically different isozymes of ascorbate peroxidase from spinach leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **286**: 371-375

Tanou G, Molassiotis A, Diamantidis G (2009) Hydrogen peroxide- and nitric oxide-induced systemic antioxidant prime-like activity under NaCl-stress and stress-free conditions in citrus plants. *Journal of Plant Physiology* **166**: 1904-1913

Tanou G, Molassiotis A, Diamantis G (2010) Hydrogen peroxide- and nitric oxide-induced systemic antioxidant prime-like activity under NaCl-stress and stress-free conditions in citrus plants. *Journal of Plant Physiology* **166**: 1904-1913

Teixeira FK, Menezes-Benavente L, Galvão VC, Margis R, Margis-Pinheiro M (2006) Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta* **224**: 300-314

Thomas DD, Liu X, Kantrow SP, Lancaster JR (2001) The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **95**: 355-360

Thomashow MF (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 571-599

Thorpe GHG, Kricka LJ, Moseley SB, Whitehead TP (1985) Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase luminol hydrogen peroxide reaction. Application in luminescence monitored enzyme immunoassays. *Clinical Chemistry* **31**: 1335-1341

Tien M., Berlett B.S., Levine R.L., Chock P.B. y Stadtman E.R. (1999) Peroxynitrite-mediated modification of proteins at physiological carbon dioxide concentration: pH dependence of acryloyl formation, tyrosine nitration, and methionine oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **96**: 7809-7814

- Torel J, Cillard J, Cillard P** (1986) Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radicals. *Phytochemistry* **25**: 383-385
- Torres MA, Dangl JL, Jones JD** (2002) Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 517-522
- Torres MA, Dangl JL** (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 397-403
- Torres MA, Jones DG, Dangl J** (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology* **141**: 373-378
- Tossi V, Cassia R, Lamattina L** (2009) Apocynin-induced nitric oxide production confers antioxidant protection in maize leaves. *Journal of Plant Physiology* **166**: 1336–1341
- Tossi V, Lamattina L, Cassia R** (2009) An increase in the concentration of abscisic acid is critical for nitric oxide-mediated plant adaptive responses to UV-B irradiation. *New Phytologist* **181**: 871–879
- Tripathi RD, Srivastava S, Mishra S, Singh N, Tuli R, Gupta DK, Maathuis FJ** (2007) Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends in Biotechnology* **25**: 158-165
- Trumper S, Follmann H, Haberlein I** (1994) A novel dehydroascorbate reductase from spinach chloroplasts homologous to plant trypsin- inhibitor. *FEBS Letters* **352**: 159-162
- Tsang EWT, Bowler C, H´erouart D, Van Camp W, Villarroel R, Genetello C, Van Montagu M, Inzé D** (1991). Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *Plant Cell* **3**: 783–792
- Tsikis D, Sandmann J, Holzberg D, Pantazis P, Raida M, Frölich JC** (1999) Determination of S-nitrosoglutathione in human and rat plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection after precolumn derivatization with o-phthalaldehyde. *Analytical Biochemistry* **273**: 32-40
- Tun NN, Santa-Catarina C, Begum T, Silveira V, Handro W, Floh EI, Scherer GF** (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in Arabidopsis thaliana seedlings. *Plant and Cell Physiology* **47**: 346–354
- Urano J, Nakagawa T, Maki Y, Masumura T, Tanaka K, Murata N, Ushimaru T** (2000) Molecular cloning and characterization of a rice dehydroascorbate reductase. *FEBS Letters* **466**: 107-111
- Vaidyanathan H, Sivakumar P, Chakrabarty R, Thomas G** (2003) Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) - differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. *Plant Science* **165**: 1411-1418
- Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Gómez-Rodríguez MV, Chaki M, Pedrajas JR, Fernández-Ocaña A, del Río LA, Barroso JB** (2006) The dehydrogenase mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant Cell & Environment* **29**: 1449-1459

- Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Fernández-Ocaña A, Chaki M, Luque F, Gómez-Rodríguez MV, Colmenero-Varea P, del Río LA, Barroso JB** (2007) Nitrosative stress in plants. *FEBS Letters* **581**: 453–461
- Van Breusegem F, Bailey-Serres J, Mittler R** (2008) Unraveling the tapestry of networks involving reactive oxygen species in plants. *Plant Physiology* **147**: 978-984
- van Heerden PDR, De Villiers MF, van Staden J, Kruger GHJ** (2003) Dark chilling increases glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in soybean leaves. *Physiologia Plantarum* **119**: 221-230
- Verbruggen N, Hermans C, Schat H** (2009) Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 364-372
- Vetrovsky P, Stoclet JC, Entlicher G** (1996) Possible mechanism of nitric oxide production from N(G)-hydroxy-L-arginine or hydroxylamine by superoxide ion. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **28**: 1311–1318
- Vigil EL** (1983) Microbodies. En *Isolation of Membranes and Organelles from Plant Cell* (eds. Hall JL and Moore AL), pp. 211-236. Academic Press, London
- Villalba JM, Córdoba F, Navas P** (1995) Ascorbate and the plasma membrane: a new view of cell growth control. En *Ascorbic Acid: Biochemistry and Biomedical Cell Biology* **4** (ed. Haris JR), pp. 57-81. Plenum Press, New York
- Volkov RA, Panchuk II, Mullineaux PM, Schoffl F** (2006) Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* **61**: 733–746
- Von Caemmerer S, Furbank RT** (2003) The C(4) pathway: an efficient CO(2) pump. *Photosynthesis Research* **77**: 191–207
- Wang BL, Tang XY, Cheng LY, Zhang AZ, Zhang WH, Zhang FS, Liu JQ, Cao Y, Allan DL, Vance CP, et al.** (2010) Nitric oxide is involved in phosphorus deficiency-induced cluster-root development and citrate exudation in white lupin. *New Phytologist* **187**: 1112–1123
- Walker D.A.** (1962) Pyruvate carboxylation and plant metabolism. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **37**: 215-256
- Wakao S, Benning C** (2005) Genome-wide analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenases in Arabidopsis. *Plant Journal* **41**: 243-56
- Wang Y, Yun B.W, Kwon E, Hong JK, Yoon J, Loake GJ** (2006) S-nitrosylation: an emerging redox-based post-translational modification in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1777-1784
- Wang Y, Chen T, Zhang C, Hao H, Liu P, Zheng M, Baluška F, Samaj J, Lin J** (2009) Nitric oxide modulates the influx of extracellular Ca²⁺ and actin filament organization during cell wall construction in *Pinus bungeana* pollen tubes. *New Phytologist* **182**: 851–862
- Wang BL, Tang XY, Cheng LY, Zhang AZ, Zhang WH, Zhang FS, Liu JQ, Cao Y, Allan DL, Vance CP, Shen JB** (2010) Nitric oxide is involved in phosphorus deficiency-induced cluster-root development and citrate exudation in white lupin. *New Phytologist* **187**: 1112-1123

- Wendehenne D, Durner J, Klessig DF** (2004) Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 449-455
- Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N** (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* **393**: 365-639
- Wilhelmová N, Fuksová H, Srbová M, Miková D, Mýtinová Z, Procházková D, Vytásek R, Wilhelm J** (2006) The effect of plant cytokinin hormones on the production of ethylene, nitric oxide, and protein nitrotyrosine in ageing tobacco leaves. *Biofactors* **27**: 203-211
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W** (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *EMBO Journal* **16**: 4806-4816
- Wilson ID, Neill SJ, Hancock JT** (2008) Nitric oxide synthesis and signaling in plants. *Plant Cell and Environment* **31**: 622-631
- Winfield MO, Lu C, Wilson ID, Coghill JA, Edwards KJ** (2010) Plant responses to cold: Transcriptome analysis of wheat. *Plant Biotechnology Journal* **8**: 749-71
- Wingsle G** (1989) Purification and characterization of glutathione reductase from Scots pine needles. *Physiologia Plantarum* **76**: 24-30
- Wingsle G, Gardeström P, Hällgren JE, Karpinski S** (1991) Isolation, Purification, and Subcellular Localization of Isozymes of Superoxide Dismutase from Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) Needles. *Plant Physiology* **95**: 21-28
- Wingsle G, Karpinski S** (1996) Differential redox regulation by glutathione of glutathione reductase and CuZn-superoxide dismutase gene expression in *Pinus sylvestris* L. needles. *Planta* **198**: 151-157
- Wojtaszek P** (2000) Nitric oxide in plants: To NO or not to NO. *Phytochemistry* **54**: 1-4
- Wojtyła Ł, Garnczarska M, Zalewski T, Bednarski W, Ratajczak L, Jurga S** (2006) A comparative study of water distribution, free radical production and activation of antioxidative metabolism in germinating pea seeds. *Journal of Plant Physiology* **163**: 1207-20
- Wolucka BA, Persiau G, Van Doorselaere J, Davey MW, Demol H, Vandekerckhove J, Van Montagu M, Zabeau M, Boerjan W** (2001) Partial purification and identification of GDP-mannose 3",5"-epimerase of *Arabidopsis thaliana*, a key enzyme of the plant vitamin C pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **98**: 14843-14848
- Wolucka BA, Van Montagu M** (2003) GDP-mannose 3',5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo biosynthesis of vitamin C in plants. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 47483-47490
- Xiong J, Fu G, Tao L, Zhu C** (2010) Roles of nitric oxide in alleviating heavy metal toxicity in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **497**: 13–20
- Xu YC, Zhao BL** (2003) The main origin of endogenous NO in higher non-leguminous plants. *Plant physiology and Biochemistry* **41**: 833-838
- Yamakura F, Ikeda K** (2006) Modification of tryptophan and tryptophan residues in proteins by reactive nitrogen species. *Nitric Oxide* **14**: 152-161

- Yamamoto Y, Kobayashi Y, Matsumoto H** (2001) Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation in pea roots. *Plant Physiology* **125**: 199-208
- Yamamoto-Katou A, Katou S, Yoshioka H, Doke N, Kawakita K** (2006) Nitrate reductase is responsible for elicitor-induced nitric oxide production in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Physiology* **47**: 726–735
- Yamasaki H, Sakihama Y, Ikehara N** (1997) Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiology* **115**: 1405-1412
- Yamasaki H, Sakihama Y** (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Letters* **468**: 89–92
- Yamasaki H, Shimoji H, Ohshiro Y, Sakihama Y** (2001) Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. *Nitric Oxide* **5**: 261-270
- Yamasaki H, Cohen MF** (2006) NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends Plant Science* **11**: 522–524
- Yap LP, Sancheti H, Ybanez MD, Garcia J, Cadenas E, Han D** (2010) Determination of GSH, GSSG, and GSNO using HPLC with electrochemical detection. *Methods Enzymology* **473**: 137-147
- Yoda H, Hiroi Y, Sano H** (2006) Polyamine oxidase is one of the key elements for oxidative burst to induce programmed cell death in tobacco cultured cells. *Plant Physiology* **142**: 193-206
- Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S** (2000) Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology* **123**: 223-233
- Yu CW, Murphy TM, Lin CH** (2003) Hydrogen-peroxide induced chilling tolerance in mung beans mediated through ABA independent glutathione accumulation. *Functional Plant Biology* **30**: 955–963
- Zafra A, Rodríguez-García MI, Alché JD** (2010) Cellular localization of ROS and NO in olive reproductive tissues during flower development. *BMC Plant Biology* **10**: 36
- Zemojtel T, Frohlich A, Palmieri MC, Kolanczyk M, Mikula I, Wyrwicz LS, Wanker EE, Mundlos S, Vingron M, Martasek P, et al.** (2006) Plant nitric oxide synthase: an ever-ending story? *Trends in Plant Science* **11**: 524–525
- Zhang H, Wang J, Nickel U, Allen RD, Goodman HM** (1997) Cloning and expression of an Arabidopsis gene encoding a putative peroxisomal ascorbate peroxidase. *Plant Molecular Biology* **34**: 967-971
- Zhang W, Gruszewski HA, Chevone BI, Nessler CL** (2008) An *Arabidopsis* purple acid phosphate with phytase activity increases foliar ascorbate. *Plant Physiology* **146**: 431-440
- Zhao LQ, Zhang F, Guo JK, Yang YL, Li BB, Zhang LX** (2004) Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Physiology* **134**: 849–857
- Zhao FJ, Ma JF, Meharg AA, McGrath SP** (2009) Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist* **181**: 777-794

Zhao MG, Chen L, Zhang LL Zhang WH (2009) Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **151**: 755-767

Zhao FJ, McGrath SP, Meharg AA (2010) Arsenic as a food chain contaminant: mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 535-559

Zhao S, Liang H, Yan H, Yan Z, Chen S, Zhu X, Cheng M (2010) Online preconcentration and determination of trace levels cadmium in water samples using flow injection systems coupled with flame AAS. *CLEAN - Soil, Air, Water* **36**: 146-152

Zhu J, Dong CH, Zhu JK (2007) Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Current Opinion Plant Biology* **10**: 290-295

Zottini M, Formentin E, Scattolin M, Carimi F, LoSchiavo F, Terzi M (2002) Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality in vivo. *FEBS Letters* **515**: 75-78

Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress

MORAD AIRAKI¹, MARINA LETERRIER¹, ROSA M. MATEOS^{1*}, RAQUEL VALDERRAMA², MOUNIRA CHAKI¹, JUAN B. BARROSO², LUIS A. DEL RÍO¹, JOSÉ M. PALMA¹ & FRANCISCO J. CORPAS¹

¹Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Apartado 419, E-18080 Granada, Spain and ²Grupo de Señalización Molecular y Sistemas Antioxidantes en Plantas, Unidad Asociada al CSIC, Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Jaén, E-23071 Jaén, Spain

ABSTRACT

Low temperature is an environmental stress that affects crop production and quality and regulates the expression of many genes, and the level of a number of proteins and metabolites. Using leaves from pepper (*Capsicum annuum* L.) plants exposed to low temperature (8 °C) for different time periods (1 to 3 d), several key components of the metabolism of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS, respectively) were analysed. After 24 h of exposure at 8 °C, pepper plants exhibited visible symptoms characterized by flaccidity of stems and leaves. This was accompanied by significant changes in the metabolism of RNS and ROS with an increase of both protein tyrosine nitration (NO₂-Tyr) and lipid peroxidation, indicating that low temperature induces nitrosative and oxidative stress. During the second and third days at low temperature, pepper plants underwent cold acclimation by adjusting their antioxidant metabolism and reverting the observed nitrosative and oxidative stress. In this process, the levels of the soluble non-enzymatic antioxidants ascorbate and glutathione, and the activity of the main NADPH-generating dehydrogenases were significantly induced. This suggests that ascorbate, glutathione and the NADPH-generating dehydrogenases have a role in the process of cold acclimation through their effect on the redox state of the cell.

Key-words: antioxidants; NADP-dehydrogenases; nitric oxide; nitrotyrosine; RNS; ROS.

Abbreviations: APX, ascorbate peroxidase; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; GR, glutathione reductase; GSH, glutathione; ICDH, isocitrate dehydrogenase; MDAR, monodehydroascorbate reductase; ME, malic enzyme; NO, nitric oxide; ONOO⁻, peroxyxynitrite; PVPP,

polyvinylpolypyrrolidone; RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive oxygen species; SNOs, S-nitrosothiols; SOD, superoxide dismutase.

INTRODUCTION

The production of ROS, such as hydrogen peroxide (H₂O₂) and superoxide radicals (O₂⁻), in different cell compartments in response to environmental stress is well established (Apel & Hirt 2004; Foyer & Noctor, 2005a; Gechev *et al.* 2006; Suzuki & Mittler, 2006; del Río *et al.* 1996, 2009; Miller *et al.* 2010; McCarthy *et al.* 2011). More recently, the discovery that plant cells can generate the free radical NO has opened new ways of research since NO and other related molecules like S-nitrosoglutathione (GSNO) or ONOO⁻, collectively designated as RNS, are also involved in the mechanism of response against environmental stress (Valderrama *et al.* 2007; Corpas *et al.* 2008; Chaki *et al.* 2009a, 2011). Additionally, the involvement of enzymatic components that regulate the production of essential antioxidant molecules such as GSH and NADPH indicates that the redox state of the cell is a cornerstone in the mechanism of regulation (Noctor 2006).

Low temperature (LT) is an environmental factor that has a significant influence in plant growth affecting photosynthesis, uptake of water and nutrients, among others. Many economically significant crops, such as cotton, maize, pepper, rice, soybean, tomato, some tropical fruits (e.g. bananas, papayas and mangoes) and subtropical fruits (e.g. grapes, oranges) are LT sensitive, which affects their production and quality (Sharma, Sharma & Deswal 2005). The influence of this type of stress has been studied at different levels from whole plants to single molecules. However, depending either on the type of plants (annual, biannual, shrubs or trees) or the intensity and duration of the exposure of plants to LT, the strategies used by plants can change. Thus, it has been shown that LT regulates the expression of many genes (Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki & Seki 2003), and there are biochemical changes that affect the level of a number of proteins, lipids and metabolites. These include the

Correspondence: F. J. Corpas. Fax: +34 958 129600; e-mail: javier.corpas@eez.csic.es

*Present address: Departamento de Biología Molecular (Área de Microbiología), Universidad de León, 24071 León, Spain.

accumulation of cryoprotective peptides, synthesis of low molecular cryoprotective sugars (praline and raffinose), antifreeze proteins, dehydrins, ROS scavenging enzymes and soluble antioxidants (Thomashow 1999; Hannah, Heyer & Hinch 2005; Sharma *et al.* 2005; Renaut, Hausman & Wisniewski 2006; Lütz 2010).

Pepper (*Capsicum annuum* L.), a member of the Solanaceae family, is a very important crop, its fruits being the second worldwide consumable vegetables and excellent sources of many essential nutrients for humans, especially vitamin C, β -carotene and calcium. Additionally, some pepper cultivars contain significant quantities of capsaicinoids, a group of pungent phenolic-derived compounds with strong physiological and pharmacological properties (Topuz & Ozdemir, 2007). Thus, the growing global demand of pepper fruits implies several strategies to increase crop production and fruit quality through specific agricultural fertilization practices (Pascual *et al.* 2010) or promoting the investigation to improve the plant resistance to environmental stresses. Pepper plants are originally from tropic regions and require high temperature conditions for their development. Consequently, the optimum growth temperature is between 25 and 30 °C, in such a way that temperature changes affect a variety of physiological functions and morphological development. When temperature decreases below 15 °C, pepper growth is reduced, and bloom and fruit production stop (Mercado *et al.* 1997). LT affects pepper vegetative development and reproduction by disturbing the function of the flower female organs and the number of viable pollen grains per flower (Polowick & Sawhney 1985; Pressman *et al.* 1998, 2006; Shaked, Rosenfeld & Pressman 2004). Thus, fruits from plants that have been set under low night temperatures (14 °C or less) usually are deformed and seedless causing significant economical losses. Taking into account the important agronomical relevance of pepper (Mateos 2006), the main goal of this work was to study the antioxidant metabolism and homeostasis of ROS and RNS in this plant species under LT conditions, since this environmental stress considerably affects pepper growth. The results obtained showed that in pepper plants LT causes nitrosative and oxidative stress during the first 24 h but after this period, plants seem to recover by an acclimation of their metabolism, which involves important changes in their cellular antioxidant and redox state.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials and growth conditions

Pepper (*Capsicum annuum* L) seeds, California type, were obtained from Syngenta Seeds S.A. (El Ejido, Almería, Spain). Seeds were germinated in Petri dishes containing Murashige and Skoog medium for 5 d at 30 °C in the dark. Then, the healthiest seedlings were transferred individually into 10-cm-diameter pots containing peat soil and grown in a growth chamber at 22/18 °C and a 16 h photoperiod for

30 d. Afterwards, plants were subjected to LT treatment (8 °C) for 1 to 3 d.

Crude extracts of plant tissues

Pepper leaves were frozen in liquid N₂ and ground in a mortar. The powder was suspended in a homogenizing medium containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 5 mM dithiothreitol (DTT), 0.2% (v/v) Triton X-100, 10% (v/v) glycerol and 2% (w/v) PVPP. Homogenates were centrifuged at 27 000 g for 25 min at 4 °C and supernatants were immediately used for the assays.

Histochemical assay for lipid peroxidation

Histochemical detection of lipid peroxidation was performed with the Schiff's reagent, which detects aldehydes that originate from lipid peroxides (Yamamoto, Kobayashi & Matsumoto 2001). Leaves were incubated in the Schiff's reagent for 60 min and then were bleached by immersing in boiling ethanol until appearance of red/purple colour, which indicates the presence of lipid peroxidation.

Determination of H₂O₂, ascorbate and GSH

The concentration of H₂O₂ in pepper leaf extracts was determined spectrophotometrically by a peroxidase coupled assay using 4-amininoantipyrene and phenol as donor substrates (Frew, Jones & Scholes 1983). Soluble fractions (300–500 μ L) were added to a reaction mixture containing 25 mM phenol, 5 mM 4-aminoantipyrene, 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.9), 0.02 μ M peroxidase and 2.5 μ M H₂O₂. Quinone-imine formation was measured at 505 nm.

For the determination of ascorbate and GSH contents in whole leaves, crude extracts were prepared in 5% (w/v) meta-phosphoric acid and the methods of the bipyridyl and the reduction of 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzole) acid (DTNB), were used for ascorbate and GSH, respectively (Griffith 1980; Okamura 1980).

Enzymatic activity assays

Catalase activity (EC 1.11.1.6) was determined by measuring the disappearance of H₂O₂, as described by Aebi (1984). APX (EC 1.11.1.11) was determined by monitoring the initial ascorbate oxidation by H₂O₂ at 290 nm (Hossain & Asada, 1984). MDAR (1.6.5.4) was assayed by measuring the monodehydroascorbate-dependent NADH oxidation, with monodehydroascorbate being generated by the ascorbate/ascorbate oxidase system (Hossain, Nakano & Asada 1984). The rate of monodehydroascorbate-independent NADH oxidation (without ascorbate and ascorbate oxidase) was subtracted from the monodehydroascorbate-dependent reaction. GR (EC 1.6.4.2) was assayed by monitoring the NADPH oxidation

coupled to the reduction of GSH (Edwards, Rawsthorne & Mullineaux 1990). The reaction rate was corrected for the small, non-enzymatic oxidation of NADPH by glutathione disulfide (GSSG). GSNOR activity was assayed spectrophotometrically at 25 °C by monitoring the oxidation of NADH at 340 nm (Barroso *et al.* 2006).

G6PDH (EC 1.1.1.49) activity was determined spectrophotometrically by recording the reduction of NADP at 340 nm. Assays were performed at 25 °C in a reaction medium (1 mL) containing 50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), pH 7.6, 2 mM MgCl₂ and 0.8 mM NADP, and the reaction was initiated by the addition of 5 mM glucose-6-phosphate. For the determination of 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH; EC 1.1.1.44) activity, the reaction mixture was similar to that described for G6PDH, but the substrate was 5 mM 6-phosphogluconate (Corpas *et al.* 1998). NADP-isocitrate dehydrogenase (NADP-ICDH; EC 1.1.1.42) activity was also measured by following the NADP reduction according to Corpas *et al.* (1999). Thus, the assay was performed at 25 °C in a reaction medium (1 mL) containing 50 mM HEPES, pH 7.6, 2 mM MgCl₂ and 0.8 mM NADP, and the reaction was initiated by the addition of 10 mM 2R,3S-isocitrate. NADP-ME (EC 1.1.1.40) activity was also determined spectrophotometrically by recording the reduction of NADP at 340 nm using the same reaction mixture (1 mL) indicated earlier for other dehydrogenases, but in this case, the reaction was initiated by the addition of 1 mM L-malate (Valderrama *et al.* 2006).

SOD and NADPH oxidase isozymes

Native polyacrylamide gel electrophoresis was performed using acrylamide gels as described by Davis (1964).

SOD (EC 1.15.1.1) isozymes were separated by non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) on 10% acrylamide gels and visualized by a photochemical NBT (nitroblue tetrazolium) reduction method (Beauchamp & Fridovich, 1971). To identify the type of SOD isozymes, gels were incubated separately at 25 °C for 30–45 min in 50 mM K-phosphate, pH 7.8, in the presence or absence of either 2 mM KCN or 5 mM H₂O₂. CuZn-SOD is inhibited by CN⁻ and H₂O₂, Fe-SOD is inhibited by H₂O₂ but not by CN⁻, whereas Mn-SOD is not inhibited by either CN⁻ or H₂O₂ (Corpas *et al.* 1998).

NADPH oxidase (NOX; EC 1.6.3.1. 1) isozyme activity was assayed in gels by the NBT reduction method of López-Huertas *et al.* (1999), as modified by Sagi & Fluhr (2001). Gels were incubated in the dark for 20 min in a reaction mixture solution containing 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 0.2 mM NBT, 0.1 mM MgCl₂ and 1 mM CaCl₂. NADPH (0.2 mM) was added and the appearance of blue formazan bands was monitored. The reaction was stopped by immersion of the gels in distilled water. As control, 50 μM diphenyleneiodonium (DPI) was added as specific inhibitor of superoxide radical generation.

Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and Western blotting

SDS–PAGE was carried out according to the method of Laemmli (1970) in 10% acrylamide slab gels. For Western blot analysis, proteins were transferred to PVDF membranes with a semi-dry Trans-Blot cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After transfer, membranes were used for cross-reactivity assays with a rabbit polyclonal antibody against 3-nitrotyrosine (Corpas *et al.* 2008) diluted 1:8000. For immuno-detection, an affinity-purified goat anti-(rabbit IgG)-horseradish peroxidase conjugate (Bio-Rad) and an enhanced chemiluminescence kit (ECLPLUS, Amersham, Piscataway, NJ, USA) were used. As positive control, commercial nitrated BSA (Sigma, St Louis, MO, USA) was used.

RNA isolation and semi-quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted with Trizol according to Gibco BRL, Life Technologies (Rockville, MD, USA). Two micrograms of total RNA were used to produce cDNA by RT-PCR (Mateos *et al.* 2009). Semiquantitative reverse transcription–PCR amplification of actin cDNA from pepper was chosen as control. Catalase, SOD, GR, MDAR, APX and actin cDNAs were amplified by the PCR as follows: 1 μL of each cDNA (30 ng) was added to 250 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 1 × PCR buffer, 0.5 U of Hot Master Taq™ DNA polymerase (Eppendorf, Hauppauge, NY, USA) and 0.5 mM of each primer (Table 1) in a final volume of 20 μL. Reactions were carried out in a Hybaid thermocycler. A first step of 2 min at 95 °C was followed by 28–33 cycles (depending on the gene) of 20 s at 94 °C, 20 s at 55 °C and 30 s at 65 °C plus a final step of 10 min at 65 °C. Then, PCR products were detected by electrophoresis in 1% (w/v) agarose gels and staining with ethidium bromide. Quantification of the bands was performed using a Gel Doc system (Bio-Rad Laboratories) coupled with a high-sensitive charge-coupled device (CCD) camera.

Spectrofluorometric detection of NO

To freshly prepared crude extracts of pepper leaves 4,5-diaminofluorescein (DAF-2) was added at a 10 μM final concentration. Then, reaction mixtures were incubated at 37 °C in the dark for 2 h, and the fluorescence was measured in a QuantaMaster™ QM-4 fluorescent spectrophotometer (PTI® Photon Technology International, Lawrenceville, NJ, USA) at excitation and emission wavelengths of 485 and 515 nm, respectively (Nakatsubo *et al.*, 1998). As control reaction mixtures leaf samples were pre-incubated for 30 min with: (1) 1 mM 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide (cPTIO), a NO scavenger; (2) 1 mM N^G-nitro-L-Arg methyl ester (L-NAME), an arginine analog that inhibits mammalian NO synthase activity; (3) 2 mM aminoguanidine (AG) another inhibitor of mammalian NO synthase activity

Table 1. Oligonucleotides used for the semiquantitative reverse-transcription PCR (SQ-RT-PCR) analysis of enzymes involved in the metabolism of ROS

Name	Oligonucleotide sequence (5'–3')	Product size (bp)	Accession number
SQ-RT-PCR			
F-CAT	GATTTCTTCTCTTTCTCC		
R-CAT	CGATGTTCTTATTCAATACC	418	AF227952
F-APX	TGTGCTCCTCTTATGCTCC		
R-APX	CTCAAACCAGAACGCTCC	485	X81376
F-MnSOD	CATGCAGCTTCATCACCAGA		
R-MnSOD	ATAACAAGGCGCTTCAGCTC	314	AF036936
F-FeSOD	CATCACAGGACCTATGTCG		
R-FeSOD	GGTGTTTTTACAACACTACAAGC	352	AY173123
F-CuZnSOD	TGTTAGTGGCACCATCCTCT		
R-CuZnSOD	GGCCGATAATACCACAAGCA	459	AF009734
F-GR	TTGGTTTATGGAGCTGCC		
R-GR	CAGTGGGAGTTGCTTTCTG	509	AY547351
F-MDAR	ATGGAGAGGGTGAAGTCCG		
R-MDAR	GCCTTGACAGCCTGCTCAG	279	AY652702
F-G6PDH	ATTTGTTGGTGCTGCGTT		
R-G6PDH	CATTGATTGAAGGACCT	255	AY652703
F-6PGDH	TGTAGTTATGCTCAGGGGATG		
R-6PGDH	CTCTCATATGTGTGAGCCCC	374	AY532646
F-ICDH	TTGTGCCAGAAGGTACAGAC		
R-ICDH	CAGATTCCAGCCTCCTCGTA	418	AY572426
F-ACT	ACTCTTAATCAATCCCTCC		
R-ACT	GCAGTGTATGACTGACACC	573	AY572427

CAT, catalase; MnSOD, manganese-containing SOD; FeSOD, iron-containing SOD; CuZnSOD, copper/zinc-containing SOD; 6PGDH, 6-phosphogluconate dehydrogenase; ICDH, isocitrate dehydrogenase; ACT, actin.

(Corpas *et al.* 2009c); (4) 2 mM Na-tungstate, a nitrate reductase (NR) inhibitor (Cantrel *et al.* 2011); (5) 1 μ M rotenone, inhibitor of mitochondrial electron transport since it prevents reduction of complex I (Møller 2001); and (6) 2 mM α -difluoromethylornithine (DFMO; DL- α -difluoromethylornithine hydrochloride hydrate), inhibits polyamine biosynthesis by the selective, irreversible inhibition of ornithine decarboxylase (Yoda, Hiroi & Sano 2006).

Detection of NO, ONOO⁻ and SNOs by confocal laser scanning microscopy (CLSM)

NO was detected in pepper leaf transversal sections with 10 μ M 4-aminomethyl-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM DA, Calbiochem, San Diego, CA, USA) prepared in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) as described elsewhere (Corpas *et al.* 2008). ONOO⁻ was detected with 10 μ M 3'-(*p*-aminophenyl)-fluorescein (APF, Invitrogen) prepared in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) according to Chaki *et al.* 2009b. SNOs were detected using the fluorescent reagent Alexa fluor 488 Hg-link phenylmercury (Valderrama *et al.* 2007). In all cases, leaf transversal sections were examined with a confocal laser scanning microscope (Leica TCS SL, Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Wetzlar, Germany).

Other assays

Protein concentration was determined with the Bio-Rad Protein Assay, using bovine serum albumin as standard. To

estimate the statistical significance between means, the data were analysed by Student's *t*-test.

RESULTS

The phenotype of the 30-day-old pepper plants exposed to LT for several days (1–3 d) is shown in Fig. 1. LT caused an increase of flaccidity in both stems and leaves from the first to the third days, the most evident symptoms being observed at the first day. After 24 h shoots started to recover their original appearance.

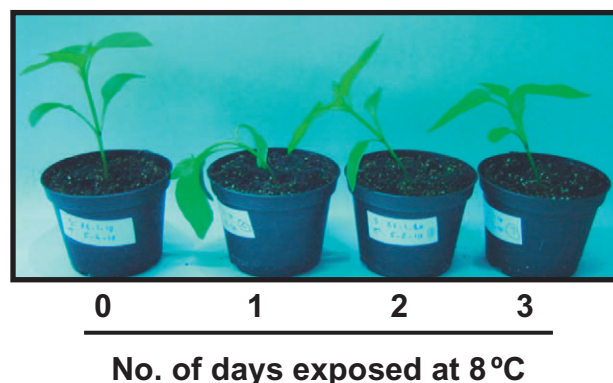


Figure 1. Phenotype of 30-day-old pepper plants exposed to low temperature (8 °C) for 0 to 3 d.

Table 2. Total ascorbate and GSH (reduced and oxidized) content in leaf extracts from pepper plants exposed to low temperature (8 °C) for 1 to 3 d. Data are the mean \pm standard error of the mean (SEM) of at least three different experiments

No. of days	Ascorbate ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW)	GSH ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW)	GSSG ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW)	GSH/GSSG ratio
0	77.28 \pm 4.13	9.19 \pm 0.56	7.20 \pm 0.56	1.3
1	104.04 \pm 1.43*	17.25 \pm 0.76*	3.59 \pm 0.34*	4.8
2	112.30 \pm 1.45*	14.19 \pm 0.65*	8.09 \pm 0.26	1.8
3	101.26 \pm 2.45*	14.29 \pm 0.18*	6.53 \pm 0.55	2.2

*Differences from control values were significant at $P < 0.05$.

Effect of LT on the metabolism of ROS

To know how LT affects the status of non-enzymatic antioxidants, the content of GSH and ascorbate in pepper leaves was studied (Table 2). Thus, the total ascorbate (reduced + oxidized) and GSH increased about 35 and 88%, respectively, in leaves exposed 1 d to LT compared with control plants, and afterwards similar levels were maintained during the second and third days of LT treatment. The content of oxidized GSH (GSSG) was reduced about 50% after 1 d exposure to LT and then no significant changes were observed in comparison with control plants. The ratio GSH/GSSG underwent an increase of 3.7-fold after 1 d of LT treatment.

The activity of catalase, a characteristic antioxidant enzyme, increased 34% to 36% during the first and second days, and then it was not significantly affected by LT (Fig. 2a). The analysis of SOD activity by native PAGE showed in all treatments the presence of four SOD isozymes that were identified as a Mn-SOD, a Fe-SOD and two CuZn-SODs, which were named as isozymes CuZn-SOD I and CuZn-SOD II according to their increasing electrophoretic mobility (Fig. 2b). No significant changes were observed in the SOD isoenzymatic pattern of plants after 3 d under LT.

On the other hand, the activity of the antioxidative ascorbate-GSH cycle enzymes, including APX, MDAR and GR was also analysed (Fig. 3). Thus, APX and MDAR activities were induced 40 and 31%, respectively, after 1 d LT treatment (Fig. 3a,b, respectively), but then no significant differences were observed in the MDAR activity. On the contrary, the GR activity was reduced 49 and 73% during the second and third days of LT stress, respectively (Fig. 3c).

The semi-quantitative reverse-transcription PCR analysis of the mRNA expression of seven antioxidant enzymes, including catalase, Mn-SOD, FeSOD, CuZnSOD, APX, MDAR and GR in pepper plants exposed to LT during several days is shown in Fig. 4. In general, none of the analysed genes showed significant changes during this period of time. Likewise, analysis of the H_2O_2 content in pepper leaves did not show significant differences during the period of treatment (Fig. 5)

The effect of LT on the activity of the main NADP-dehydrogenases is shown in Fig. 6. The activity of G6PDH increased from 32 to 44% during the three days of exposure to LT (Fig. 6a). The 6PGDH activity also increased between

30 and 33% after the first day and this increase was maintained till the end of the treatment (Fig. 6b). The NADP-ICDH activity increased 26% in the first and second day of treatment, but no significant changes were observed in the third day compared with control plants (Fig. 6c). The ME activity increased 23% during the first day, and 40 and 31% during the second and third days under LT, respectively (Fig. 6d).

Peroxidation of unsaturated lipids in biological membranes is recognized as a marker of oxidative damage by ROS. To verify the potential ROS damage in pepper plants during the LT treatment, a histochemical method with the Schiff's reagent was used to detect aldehydes that originate from lipid peroxides (Yamamoto *et al.* 2001). Pepper leaves from plants exposed to LT for several days and stained for

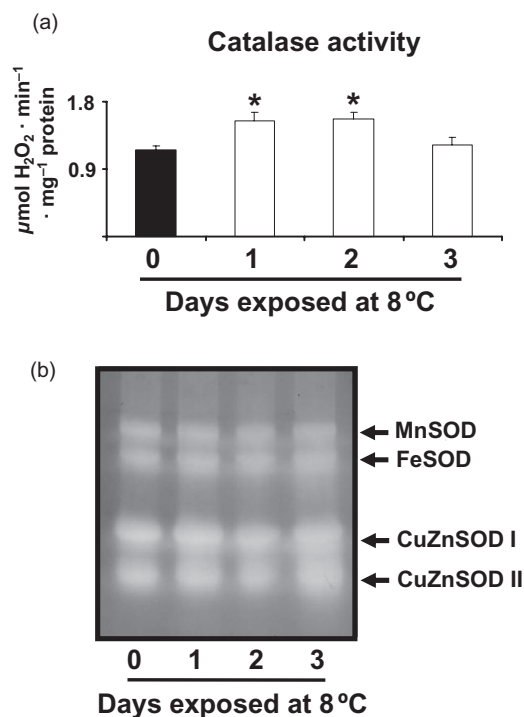


Figure 2. Catalase and SOD activities in leaf extracts of 30-day-old pepper plants exposed to low temperature (8 °C) for 0 to 3 d. (a) Catalase activity. Values are means of at least three independent experiments. *Differences from control values were significant at $P > 0.05$. (b) SOD isozymes were separated by native-PAGE (10% acrylamide) and stained by a photochemical method (20 μg protein per lane).

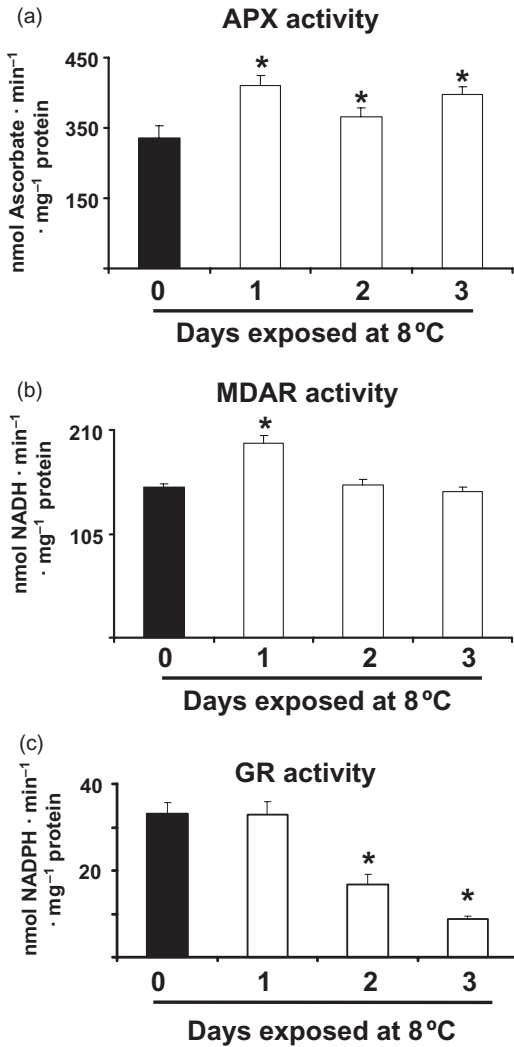


Figure 3. Activity of the ascorbate-GSH cycle enzymes in leaf extracts of 30-day-old pepper plants exposed to low temperature (8 °C) for 0 to 3 d. (a) APX activity. (b) MDAR activity. (c) GR activity. Values are means of at least three independent experiments. *Differences from control values were significant at $P > 0.05$.

lipid peroxidation are shown in Fig. 7. The red/purple colour corresponds to the presence of lipid oxidation and a clear intensification of this colour was observed throughout the main and secondary veins in leaves of plants exposed for 1 and 2 d to LT. On the contrary, in leaves from plants treated for 3 d there were no differences compared with controls.

NADPH oxidase (NOX) activity is considered an important source of superoxide radicals in plants (Sagi & Fluhr 2001; Fluhr 2009; Miller *et al.* 2009). The detection of NOX activity in pepper leaves using non-denaturing gels showed the presence of three isozymes, designated I to III in order to their increasing mobility in gels (Fig. 8). It was found that isozyme NOX III was induced in pepper leaves after 1 d of plant exposure to LT, whereas the activity of NOX I diminished after 24 h at LT.

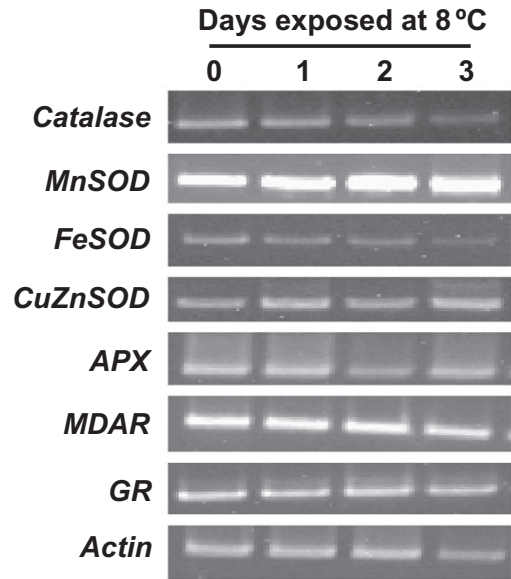


Figure 4. Analysis of the mRNA expression of the antioxidative enzymes catalase, SOD isozymes (MnSOD, FeSOD, CuZnSOD), APX, MDAR and GR in pepper leaves of plants exposed to low temperature (8 °C) for 0 to 3 d. Semiquantitative reverse transcription-PCR was performed on total RNA isolated from pepper leaves. Representative agarose electrophoresis gels of the amplification products visualized by ethidium bromide staining under UV light.

Effect of LT on the metabolism of RNS

In plants, NO biosynthesis can be mediated by different pathways including L-arginine-NO synthase activity, NR activity, mitochondrial electron transport or mediated by polyamines. To examine the relative contributions of these potential sources in pepper leaves a pharmacological approach was used. Accordingly, the effects of specific inhibitors of each pathway were studied in the NO release (Fig. 9a). As a result, leaf samples were preincubated with 1 mM L-NAME (an arginine analog that inhibits mammalian NO synthase activity), 1 mM aminoguanidine (an animal NOS inhibitors), 1 mM Na-tungstate (a NR inhibitor), 1 μ M rotenone (inhibitors of mitochondrial electron

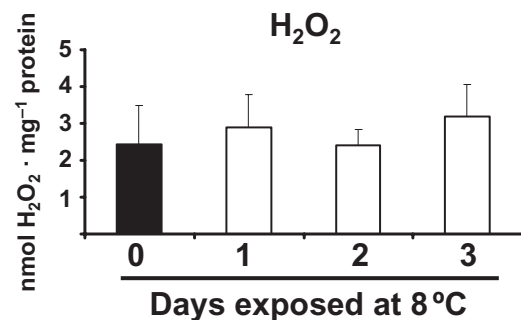


Figure 5. Hydrogen peroxide content in pepper leaves of plants exposed to low temperature (8 °C) for 0 to 3 d. Values are means of at least three independent experiments.

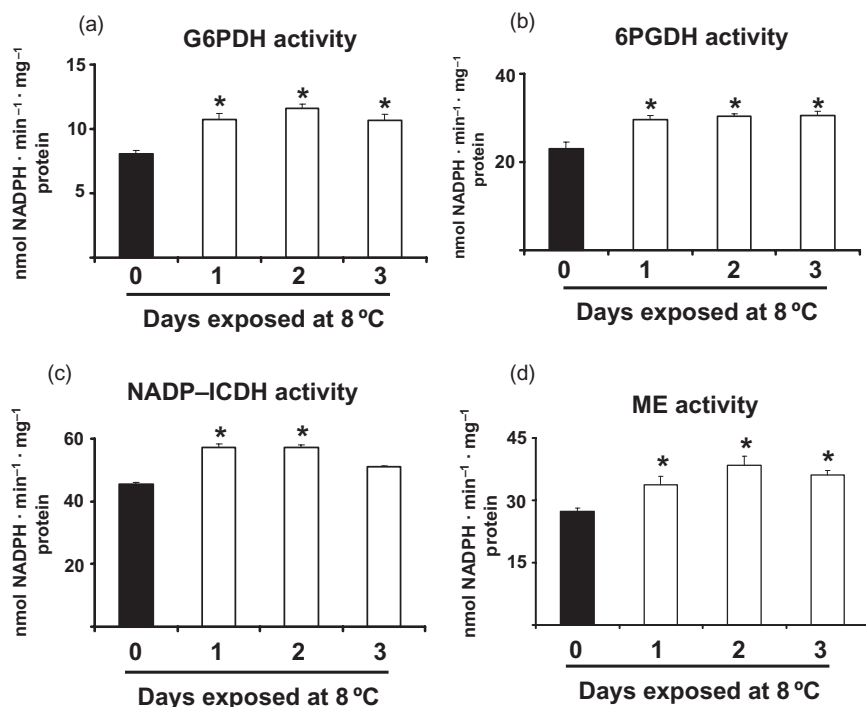


Figure 6. Activity analysis of NADP-dehydrogenases in leaves from pepper plants exposed to low temperature (8 °C) for 0 to 3 d. (a) G6PDH activity. (b) 6PGDH activity. (c) NADP-ICDH activity. (d) ME activity. Data are the mean \pm SEM of at least three different experiments. Asterisks indicate that differences from control values were statistically significant at $P < 0.05$.

transport since prevents reduction of complex I) and 2 mM DFMO (inhibits polyamine biosynthesis by the selective, irreversible inhibition of ornithine decarboxylase). Additionally, the NO scavenger cPTIO was used as negative control because it efficiently impaired the fluorescence detected with DAF-2 in comparison with control samples by 68%. Thus, NO production was strongly reduced with the tungstate (by 70%) a NR activity inhibitor, followed for the NOS inhibitors aminoguanidine (by 53%) and L-NAME (by 49%). The rotenone reduced the NO production by 19% and DFMO (inhibits polyamine biosynthesis) by 9%. Therefore, the results suggest that NR and L-arginine-dependent NO synthase activities are the major contributors of NO production in pepper leaves.

When pepper plants were exposure at 8 °C, the NO content in leaves was reduced between 52 and 64% with respect to control plants during the three days at 8 °C (Fig. 9b). The GSNO reductase activity showed a rise of 32% during the first and third days of treatment but no significant effect was observed after 2 d (Fig. 9c). The immunoblot analysis of the protein profile of tyrosine nitration in pepper leaves during the three days of exposure to LT, using an antibody against nitrotyrosine ($\text{NO}_2\text{-Tyr}$), is shown in

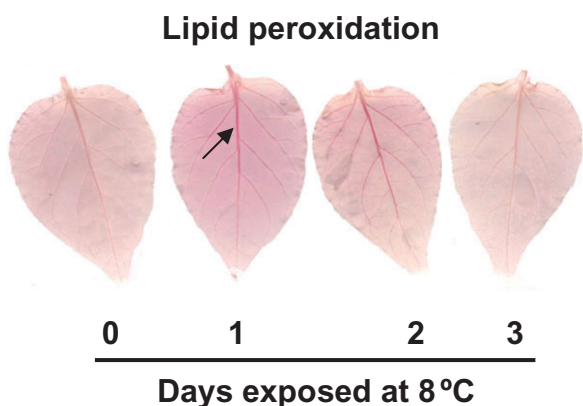


Figure 7. Histochemical detection of lipid peroxidation in leaves of 30-day-old pepper plants exposed to low temperature (8 °C) for 0 to 3 d. The red/purple colour indicates the presence of lipid peroxidation detected with the Schiff's reagent.

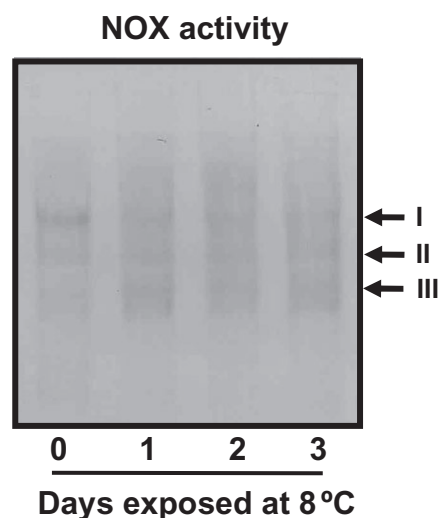


Figure 8. Detection of NOX isozymes from leaves of pepper plants exposed to low temperature (8 °C) for 0 to 3 d. Protein samples (20 μg) were separated by native PAGE (6% acrylamide), then gels were incubated with NBT and NADPH until the appearance of blue formazan bands was observed.

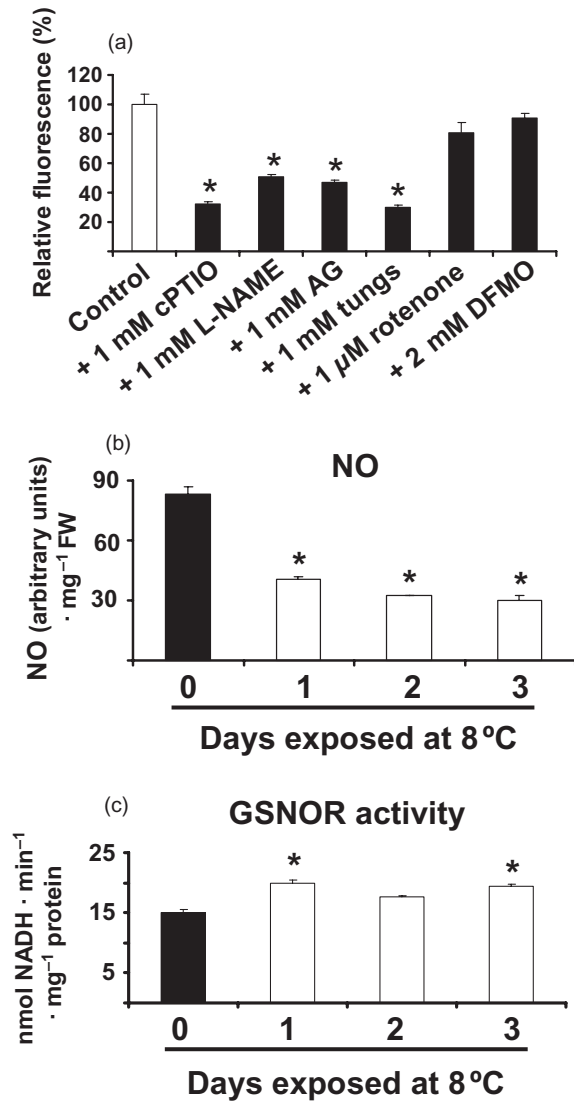


Figure 9. (a) Pharmacological characterization of NO source(s) in pepper leaves samples by spectrofluorometric assay using DAF-2 (see Material and Methods). In all cases pepper leaves samples were pre-incubated for 30 min with different inhibitors including 1 mM L-NAME (an arginine analog that inhibits mammalian NO synthase activity), 1 mM aminoguanidine (AG, an animal NOS inhibitors), 1 mM Na-tungstate (a NR inhibitor), 1 μM rotenone (inhibitor of mitochondrial electron transport which prevents reduction of complex I) and 2 mM α-difluoromethylornithine (DFMO; inhibits polyamine biosynthesis by the selective, irreversible inhibition of ornithine decarboxylase). As control, leaf samples were preincubated with cPTIO as NO scavenger. (b) Spectrofluorometric detection of NO with DAF-2 in pepper leaves of plants exposed to low temperature (8 °C) for 0 to 3 d. The fluorescence produced was expressed as arbitrary units per milligram of fresh weight (FW). (c) Spectrophotometric assay of *S*-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) activity in pepper leaves of plants exposed to low temperature (8 °C) for 0 to 3 d. Results are means ± SEM of samples from at least three different experiments. Asterisks indicate that differences from control values were statistically significant at $P < 0.05$.

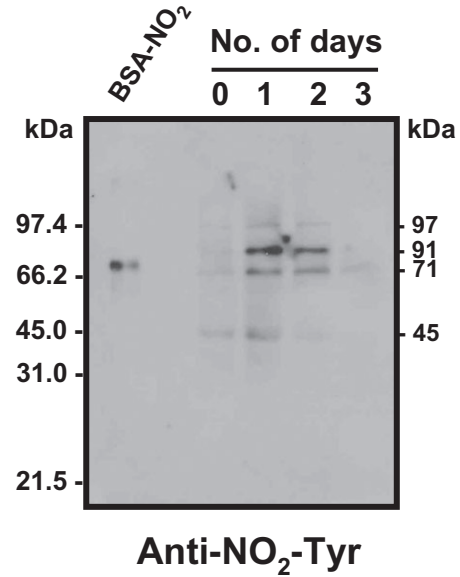


Figure 10. Representative immunoblot showing the protein tyrosine nitration in leaves from pepper plants exposed to low temperature (8 °C) for 0 to 3 d. Leaf samples (50 μg of protein per lane) were subjected to sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and Western blotting analysis using an antibody against 3-nitrotyrosine (NO₂-Tyr) (dilution 1: 8000). Commercial nitrated BSA (NO₂-BSA) (2 μg of protein) was used as positive control. The numbers on the left side of the immunoblot indicate the relative molecular masses of the protein markers.

Fig. 10. In control leaves four weak immunoreactive bands were observed, with molecular masses of approximately 45, 71, 91 and 97 kDa, the most prominent bands being those of 71 and 91 kDa. After 1 d exposure to LT an intensification of these four nitrated-protein bands took place, but after 2 d the intensity of these bands decayed, being almost undetectable at the third day.

Considering that many of the analysed parameters seem to undergo a significant modification after the first day of plant exposure to LT, this time was selected for the cellular analysis of the RNS metabolism of pepper leaves by CLSM, using specific fluorescent probes for NO, ONOO⁻ and SNOs (Fig. 11). NO was analysed using the fluorescent probe DAF-FM DA where the green fluorescence is attributable to NO. In control pepper leaves, the localization of endogenous NO showed an intense green fluorescence in palisade mesophyll, vascular tissues (xylem and phloem), and a lower intensity in the upper and lower epidermal cells (Fig. 11a). In plants exposed to LT for 1 d the green fluorescence was slightly reduced in all cell types (Fig. 11b). On the other hand, the cellular production of ONOO⁻ was analysed using the fluorescent probe 3'-(*p*-aminophenyl) fluorescein (APF). In control leaves, the green fluorescence attributable to ONOO⁻ was scarcely observed in vascular tissue (Fig. 11c). However, in plants exposed for one day to LT, green fluorescence was more intense in vascular tissue and started to be observed in palisade mesophyll (Fig. 11d). SNOs were detected using the fluorescent probe, Alexa

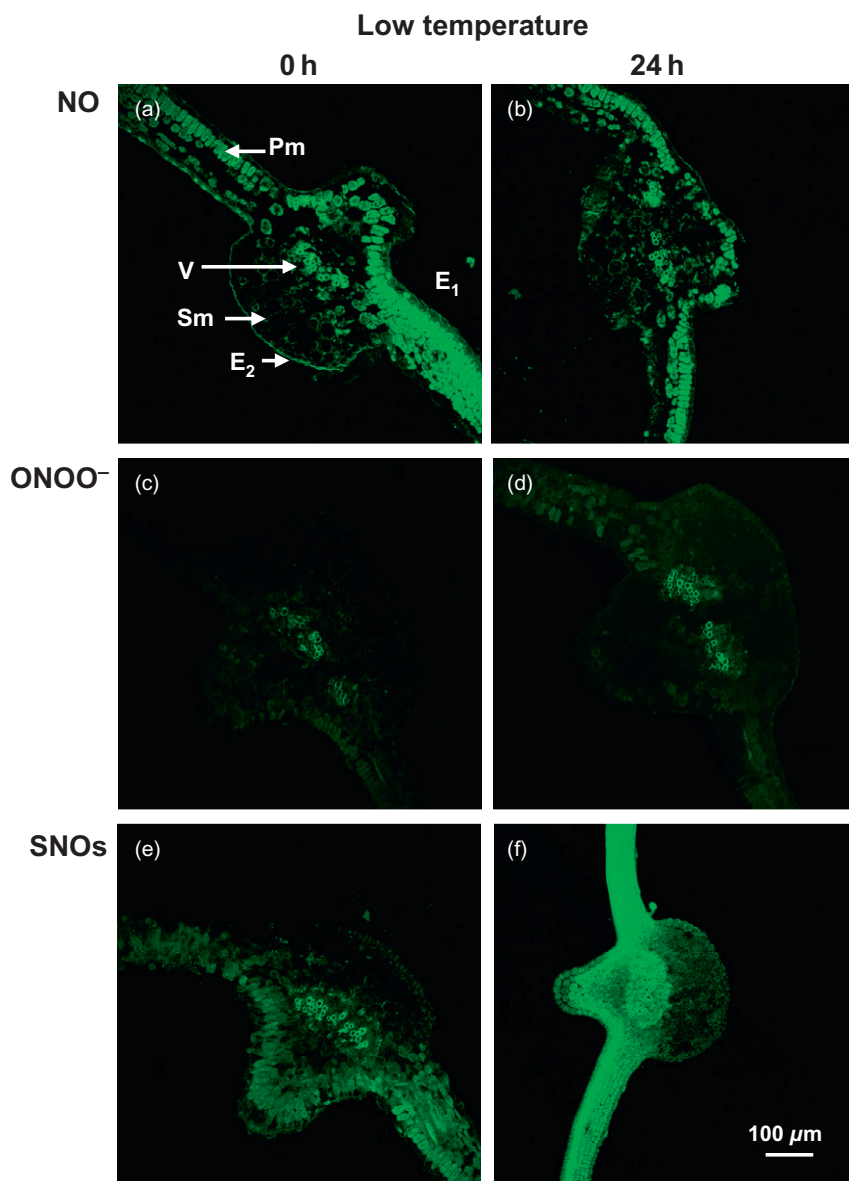


Figure 11. Representative images illustrating the CLSM detection and visualization of NO (a and b), ONOO⁻ (c and d) and SNOs (e and f) in transversal cross-sections of pepper leaves of plants exposed to low temperature (8 °C) for 0 (control) and 24 h. The bright green fluorescence corresponded to the detection of NO, ONOO⁻ and SNOs in the corresponding panels. E₁, adaxial epidermis. E₂, abaxial epidermis. Pm, palisade mesophyll. Sm, spongy mesophyll. V, main vein.

Fluor 488 Hg-link (AF) that reacts with *S*-nitrosylated thiols (SNOs) via the Saville reaction (Chaki *et al.* 2009a). In control leaves, the green fluorescence attributable to SNOs was present mainly in vascular tissue, palisade and spongy mesophyll (Fig. 11e) and after 1 d at 8 °C a general intensification of fluorescence in the same cell types was observed (Fig. 11f).

Considering that pepper plants seem to undergo a process of cold acclimation since some of the analysed parameters were recovered to normal level, it was analysed the behaviour of some of the above parameters including lipid peroxidation, NO content, catalase and NADP-ICDH activities in leaves of pepper plants exposed to several situations: (I) control pepper plants grown under optimal temperature; (II) pepper plants exposed to LT for 24 h; (III) pepper plants exposed to 8 °C for 24 h and then moved to optimal temperature for another 24 h; and (IV) pepper plants exposed to 8 °C for 24 h, moved to optimal temperature for 24 h and

moved back again to 8 °C for another 24 h (Supporting Information Fig. 1). Thus, lipid peroxidation was reduced during the treatment III being the damage less intense after treatment IV (Supporting Information Fig. S1a). Similar behaviour was observed with catalase and NADP-ICDH activities (Supporting Information Fig. S1b,c). However, in the case of NO content seems to be still significantly affected even after a period of acclimation for 24 h (treatment III) where the cold stress is alleviated.

DISCUSSION

Among the different abiotic stresses that affect plants, LT can be considered one of the most harmful (Hannah *et al.* 2005; Sharma *et al.* 2005; Janská *et al.* 2010). Thus, many studies have shown that LT induces changes in expression of hundreds of genes followed by an increase in the levels of many metabolites, some of which are known to have

protective effects against the damaging effects of cold stress (Seki *et al.* 2002; Shinozaki *et al.* 2003; Sharma *et al.* 2005; Chinnusamy, Zhu & Zhu 2007; Zhu, Dong & Zhu 2007; Winfield *et al.* 2010). Although there are some reports focused on the analysis of antioxidant response to LT, less information is available of the involvement of NO and NO-derived molecules in this process. Consequently, the main goal of this work was to study the antioxidant metabolism and homeostasis of ROS and RNS in this plant species under LT conditions, since this environmental stress considerably affects pepper growth.

LT induces antioxidative systems and disturbs the redox homeostasis in pepper leaves

During the period of time in which pepper plants were exposed to LT (3 d) an overall induction of enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems was observed. Catalase and APX, involved in the direct removal of H₂O₂, were induced after 24 h even when the content of this molecule apparently did not change. A similar increase was observed for the MDAR activity as well as for the content of ascorbate and GSH. However, GR kept its activity during the first day with a significant reduction during the second and third days of exposure to LT. In other plant species, the response of the antioxidative systems to LT stress depends of how low the temperature and how long the treatment are. For example, in tobacco plants exposed to LT under normal light conditions, chloroplastic Fe-SOD and cytosolic CuZn-SOD are induced (Tsang *et al.* 1991). In rice, LT induces a rapid increase in APX activity and then gradual increases of SOD, MDAR and GR activities what suggests differential regulations of these enzymes; conversely, catalase activity was not significantly affected (Oidaira *et al.* 2000). In rice seedling exposed to heat (42 °C for 24 h) before LT (5 °C for 7 d) an interesting behaviour of APX was observed. Plants did not develop chilling injury and a higher level of APX activity and expression was found, whereas catalase activity was decreased and no significant difference in SOD activity was observed (Sato *et al.* 2001). In pea plants exposed to LT (8 °C) for 48 h, MDAR activity did not show any significant change but the transcripts of MDAR and APX increased 2.2- and 2.6-fold, respectively (Leterrier *et al.* 2005, 2007). In addition, GR activity was increased slightly but the transcription level of both chloroplastic and cytosolic GR genes was increased four- and threefold, respectively (Romero-Puertas *et al.* 2006). In haw (*Crataegus azarolus*) leaves exposed to LT (4 °C) for 24 h, the activities of both MDAR and DHAR increased and reached a maximum after 16 h of treatment. This was accompanied by an increase in the gene expression of both enzymes (Eltelib *et al.* 2011). In the *Coffea* genus, different degrees of cold tolerance have been observed, being the genotype Icatu the best documented because it has significant activity increases of chloroplastic CuZnSOD and APX (Fortunato *et al.* 2010). In embryonic axes of lotus (*Nelumbo nucifera*) exposed to LT (4 °C) for 48 h the MnSOD gene was induced eightfold (Naydenov *et al.* 2010).

GSH is one of the major soluble low molecular weight antioxidants, as well as the major non-protein thiol in plant cells (Foyer & Noctor 2005a,b; Noctor 2006; Szalai *et al.* 2009). It contributes to keep the cellular redox homeostasis and signalling (Meyer 2008). Thus GSH exerts a protective role based on the reducing capacity of GSH and the half-cell reduction potential of the GSH/GSSG couple. In leaves of pepper plants exposed to LT a significant increase of GSH from the first to third day of LT treatment and a significant increase in the ratio GSH/GSSG were observed. In maize plants the treatment with a combination of two herbicide safeners provoked a rise of total GSH, with a concomitant protection against LT (5 °C) (Kocsy *et al.* 2001a). A similar result has been found in mung bean plants where the pretreatment of leaves with H₂O₂ provoked a rise of the GSH level and, consequently, an increase of LT tolerance (Yu, Murphy & Lin 2003).

Ascorbate is a potent ROS scavenger that reacts with H₂O₂ in a reaction catalysed by APX, and non-enzymatically with ¹O₂, O₂⁻ and lipid hydroperoxides (Foyer 2001; Asada 2006). In pepper leaves, LT induced a rise in the content of ascorbate and similar results have been described in other plant species. In spinach leaves exposed to 10 °C, the content of ascorbate increased and after 7 d it was about 41% higher than in plants grown at 25 °C (Proietti *et al.* 2009). In the microscopic algae *Dunaliella salina*, growth under LT (13 °C for 24 h) increased the total ascorbate pool by 10–50%. This was accompanied by a rise of GSH and SOD activity (Haghjou, Shariati & Smirnov 2009).

It must be kept in mind that both ROS production and antioxidative systems have multiple subcellular localizations including chloroplasts, cytosol, nuclei, mitochondria and peroxisomes, among others, and in our experimental conditions they might participate in a fine modulation of the ROS levels that could contribute either to control potential damage or be used for signalling purposes (Corpas, Barroso & del Río 2001; Mittler 2002; Møller, Jensen & Hansson 2007; Miller *et al.* 2010; Møller & Sweetlove 2010). In *Arabidopsis* subjected to LT, H₂O₂ was accumulated in the cells, and the APX enzyme activity increased (O'Kane *et al.* 1996). In maize leaves, LT induced changes in the distribution of H₂O₂ and antioxidants between the bundle sheath and mesophyll cells (Pastori, Foyer & Mullineaux 2000). In our case, the H₂O₂ content did not show any significant change by LT treatment, which could suggest a participation of this metabolite in signalling processes without inducing cell damages.

NADPH-generating dehydrogenases are involved in the mechanism of response to LT

NADPH is essential for defense against oxidative stress, since it is the coenzyme required for the reduction of oxidized GSH by GR in the ascorbate–GSH cycle, and is also necessary for the NADPH oxidase and the thioredoxin reductase activity (Noctor, Queval & Gakière 2006). The general rise in the activity of the main NADPH-generating

dehydrogenases, including G6PDH, 6PGDH, NADP-ICDH and ME, observed in pepper plants exposed to LT indicated the involvement of these enzymes in the mechanism of response to this stress. In the case of LT, an increase in G6PDH activity has been reported in alfalfa (Krasnuk, Jung & Witham 1976), ryegrass (Bredemeijer & Esselink 1995), soybean (van Heerden *et al.* 2003), banana and populus (Lin *et al.* 2005). In rice roots and pea leaves, the activity and protein expression of NADP-ICDH are also induced by LT (Saruyama & Tanida 1995; Lu *et al.* 2005; Letierrier *et al.* 2007; Lee *et al.* 2009). More recently, in leaves of maize seedlings it has been reported that ME transcripts are up-regulated in response to cold stress (Nguyen *et al.* 2009).

Taken together, these results suggest that under LT stress pepper plants seem to require increasing NADPH production since the rise of all the NADP-dehydrogenase activities is maintained throughout the 3 d treatment. This suggests that these enzymes must play an important role in the process of cold acclimation observed during the third day of LT exposure.

LT affects NO homeostasis

In pepper leaves, LT caused a decrease in the NO content and this could be correlated with the rise of GSH since both molecules can react nonenzymatically to form GSNO, which could be considered the most abundant S-nitrosothiol in plant cells and a long-distance signal molecule that can operate under certain stress conditions (Lindermayr, Saalbach & Durner 2005; Barroso *et al.* 2006; Chaki *et al.* 2009a, 2011). This behaviour is also well correlated with the increase of GSNO activity observed during the first 24 h of exposure to LT. Additionally, the analysis by CLSM allowed to observe that the leaves of pepper plants exposed to LT showed a rise of ONOO⁻, which is formed by a very quick reaction between NO and O₂⁻ ($k = 1.9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Kissner *et al.* 1998). This action could explain the increase of protein tyrosine nitration found during the first and second days of exposition to LT stress, because ONOO⁻ is a molecule that can mediate this post-translational modification (Radi 2004; Szabó, Ischiropoulos, Radi 2007). The origin of the NO necessary to form ONOO⁻ could be the increased content of SNOs. It is known that SNOs in the presence of some metals and reductants, such as GSH and ascorbate, which are augmented by LT (Table 2), can be decomposed releasing NO (Holmes & Williams 2000; Smith & Dasgupta 2000). On the other hand, in other plant species it has been reported that LT can promote an opposite effect on the NO content. In leaves of pea plants exposed to LT for 48 h, a rise of the NO content was observed, which was accompanied by an increase of SNOs, GSNO reductase activity and tyrosine-nitrated proteins (Corpas *et al.* 2008). A similar behaviour of NO was reported in *Arabidopsis thaliana* exposed to 4 °C for 1–4 h (Cantrel *et al.* 2011) or during cold acclimation (Zhao *et al.* 2009) where the NO content increased. Consequently, all these results support

the existence of a connection between NO metabolism and LT stress.

LT causes oxidative and nitrosative stress

In pepper plants, the phenotypic symptoms observed during the first and second days were accompanied by a rise of lipid peroxidation and protein tyrosine nitration (NO₂-Tyr), which are considered biochemical markers of both oxidative and nitrosative stress, respectively (Requena *et al.* 1996; Corpas, del Río & Barroso 2007). There are numerous examples where the rise of oxidized products such as lipids is a reliable parameter to evidence the damage of the cellular membranes being the chloroplast membranes the first target and also the most severely injured (Krarsch & Wise 2000). In our case, a histochemical procedure to detect lipid oxidation was used because it offers an advantage over the biochemical methods, since it allows detecting lipid peroxidation in single cells of a tissue composed of different cell populations. Thus, in leaves it was observed that LT produces lipid oxidation in vascular tissues, what is in good agreement with the leaf flaccidity observed during the first 48 h of exposure to LT. Similarly, the swelling recovery observed during the third day correlated with the slight lipid peroxidation detected in the leaves. Additionally, the rise determined in the membrane NADPH oxidase activity can also contribute to the damage produced. The oxidative stress observed by LT treatment in leaves of pepper plants during the first and second days is in agreement with previous studies reported in maize plants (Prasad *et al.* 1994; Hodges *et al.* 1997; Pinhero *et al.* 1997).

With regard to the rise of protein tyrosine nitration (NO₂-Tyr), less information is available in plant systems (Corpas *et al.* 2009a). However, an increased number of data start indicating that this parameter could be also a good marker to determine if a specific stress is accompanied by nitrosative stress. Several reports suggest that this correlation takes place because different environmental stresses, which provoke oxidative stress, also induce a rise of protein tyrosine nitration. Thus, this mechanism occurs in olive and *Arabidopsis* under salt stress conditions (Valderrama *et al.* 2007; Corpas *et al.* 2009b), in pea and sunflower seedlings by mechanical wounding (Corpas *et al.* 2008; Chaki *et al.* 2011), in tobacco BY-2 suspension cells in response to biotic stress (Saito *et al.* 2006), and in sunflower seedlings after infection by mildew (Chaki *et al.* 2009a).

Cold stress and cold acclimation involves redox state homeostasis

The results obtained in this work showed that in pepper plants exposed to LT during 24–48 h a general imbalance of the ROS and RNS metabolism was produced with the result of a rise in lipid peroxidation and protein tyrosine nitration, which strongly suggests the induction of oxidative and nitrosative stress. However, it was also observed that during the third day under LT pepper plants started to recover and

this might indicate that a mechanism of cold acclimation was taking place, with the NADPH-generating dehydrogenases contributing to obtain the optimum redox state (high levels of GSH and ascorbate) that allow pepper plants to acclimate to LT. This is supported by the recovery of the turgence of leaves of a normal phenotype and the reduction of lipid oxidation and protein tyrosine nitration. This process was corroborated when the pepper plants were exposed to optimal temperature for a period of 24 h where the cold stress was alleviated and some of the analysed parameters showed less intense changes.

According with the data reported in other plants species (Kocsy, Galiba & Brunold 2001b), the observed high content of GSH in pepper leaves could be one of the factors contributing to the cold acclimation observed. Thus, this strategy would guarantee the supply of GSH for the ascorbate–GSH cycle and other processes such as the reaction with NO to form *S*-nitrosoglutathione. From an applied viewpoint, this process of cold acclimation could be used as an agronomical strategy to improve the resistance of pepper plants to LT and perhaps also other environmental stresses.

ACKNOWLEDGMENTS

M. Airaki acknowledges a PhD fellowship from *Junta de Andalucía* (project P06-CVI-1820) and M. Leterrier a JAE-Doc contract from the CSIC, Spain. This work was supported by ERDF-cofinanced grants from the Ministry of Science and Innovation (AGL2008-00834, BIO2009-12003-C02-01 and BIO2009-12003-C02-02) and *Junta de Andalucía* (project P06-CVI-1820), Spain. The provision of pepper seeds by Mrs. Sierra Bacarizo (Syngenta Seeds S.A.) is acknowledged. The valuable technical assistance of Carmelo Ruiz and María Jesús Campos is also appreciated.

REFERENCES

- Aebi H. (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* **105**, 121–126.
- Apel K. & Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 373–399.
- Asada K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* **141**, 391–396.
- Barroso J.B., Corpas F.J., Carreras A., et al. (2006) Localization of *S*-nitrosoglutathione and expression of *S*-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1785–1793.
- Bredemeijer G.M.M. & Esselink G. (1995) Glucose 6-phosphate dehydrogenase during cold-hardening in *Lolium perenne*. *Plant Physiology* **145**, 565–569.
- Beauchamp C. & Fridovich I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**, 276–287.
- Cantrel C., Vazquez T., Puyaubert J., Rezé N., Lesch M., Kaiser W.M., Dutilleul C., Guillas I., Zachowski A. & Baudouin E. (2011) Nitric oxide participates in cold-responsive phosphosphingolipid formation and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *The New Phytologist* **189**, 415–427.
- Chaki M., Fernández-Ocaña A.M., Valderrama R., Carreras A., Esteban F.J., Luque F., Gómez-Rodríguez M.V., Begara-Morales J.C., Corpas F.J. & Barroso J.B. (2009a) Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower-mildew interaction. *Plant & Cell Physiology* **50**, 265–279.
- Chaki M., Valderrama R., Fernández-Ocaña A.M., et al. (2009b) Protein targets of tyrosine nitration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls. *Journal of Experimental Botany* **60**, 4221–4234.
- Chaki M., Valderrama R., Fernández-Ocaña A.M., et al. (2011) Mechanical wounding induces a nitrosative stress by down-regulation of GSNO reductase and a rise of *S*-nitrosothiols in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1803–1813.
- Chinnusamy V., Zhu J. & Zhu J.K. (2007) Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science* **12**, 444–451.
- Corpas F.J., Barroso J.B., Sandalio L.M., Distefano S., Palma J.M., Lupiáñez J.A. & del Río L.A. (1998) A dehydrogenase mediated recycling system of NADPH in plant peroxisomes. *The Biochemical Journal* **330**, 777–784.
- Corpas F.J., Barroso J.B., Sandalio L.M., Palma J.M., Lupiáñez J.A. & del Río L.A. (1999) Peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase. Characterization and activity regulation during natural senescence. *Plant Physiology* **121**, 921–928.
- Corpas F.J., Barroso J.B. & del Río L.A. (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science* **6**, 145–150.
- Corpas F.J., del Río L.A. & Barroso J.B. (2007) Need of biomarkers of nitrosative stress in plants. *Trends in Plant Science* **12**, 436–438.
- Corpas F.J., Chaki M., Fernández-Ocaña A., Valderrama R., Palma J.M., Carreras A., Begara-Morales J.C., Airaki M., del Río L.A. & Barroso J.B. (2008) Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant & Cell Physiology* **49**, 1711–1722.
- Corpas F.J., Chaki M., Leterrier M. & Barroso J.B. (2009a) Protein tyrosine nitration: a new challenge in plants. *Plant Signaling & Behavior* **4**, 920–923.
- Corpas F.J., Hayashi M., Mano S., Nishimura M. & Barroso J.B. (2009b) Peroxisomes are required for *in vivo* nitric oxide accumulation in the cytosol following salinity stress of *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology* **151**, 2083–2094.
- Corpas F.J., Palma J.M., del Río L.A. & Barroso J.B. (2009c) Evidence supporting the existence of L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *The New Phytologist* **184**, 9–14.
- Davis B.J. (1964) Disc gel electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* **121**, 404–427.
- Edwards E.A., Rawsthorne S. & Mullineaux P.M. (1990) Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* **180**, 278–284.
- Eltelib H.A., Badejo A.A., Fujikawa Y. & Esaka M. (2011) Gene expression of monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase during fruit ripening and in response to environmental stresses in acerola (*Malpighia glabra*). *Journal of Plant Physiology* **168**, 619–627.
- Fluhr R. (2009) Reactive oxygen-generating NADPH oxidases in plants. In *Reactive Oxygen Species in Plant Signaling* (eds L.A. del Río & A. Puppo), pp. 1–23. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Fortunato A.S., Lidon F.C., Batista-Santos P., Leitão A.E., Pais I.P., Ribeiro A.I. & Ramalho J.C. (2010) Biochemical and molecular characterization of the antioxidative system of *Coffea* sp. under

- cold conditions in genotypes with contrasting tolerance. *Journal of Plant Physiology* **167**, 333–342.
- Foyer C.H. (2001) Prospects for enhancement of the soluble antioxidants, ascorbate and glutathione. *Biofactors* **15**, 75–78.
- Foyer C.H. & Noctor G. (2005a) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell* **17**, 1866–1875.
- Foyer C.H. & Noctor G. (2005b) Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment* **28**, 1056–1071.
- Frew J.E.P., Jones P. & Scholes G. (1983) Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide and organic hydroperoxides. *Analytica Chimica Acta* **155**, 139–150.
- Gechev T.S., Van Breusegem F., Stone J.M., Denev I. & Laloi C. (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays* **28**, 1091–1101.
- Griffith O.W. (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridines. *Analytical Biochemistry* **106**, 207–212.
- Haghjoo M.M., Shariati M. & Smirnov N. (2009) The effect of acute high light and low temperature stresses on the ascorbate-glutathione cycle and superoxide dismutase activity in two *Dunaliella salina* strains. *Physiologia Plantarum* **135**, 272–280.
- Hannah M.A., Heyer A.G. & Hinch D.K. (2005) A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* **1**, 179–196.
- van Heerden P.D.R., De Villiers M.F., van Staden J. & Kruger G.H.J. (2003) Dark chilling increases glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in soybean leaves. *Physiologia Plantarum* **119**, 221–230.
- Hodges D.M., Andrews C.J., Johnson D.A. & Hamilton R.I. (1997) Antioxidant enzyme and compound responses to chilling stress and their combining abilities in differentially sensitive maize hybrids. *Crop Science* **37**, 857–863.
- Holmes A.J. & Williams D.L.H. (2000) Reaction of ascorbic acid with S-nitrosothiols: clear evidence for two distinct reaction pathways. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 2*, 1639–1644.
- Hossain M.A. & Asada K. (1984) Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: its protection by ascorbate. *Plant & Cell Physiology* **25**, 1285–1295.
- Hossain M.A., Nakano Y. & Asada K. (1984) Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplast and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging of hydrogen peroxide. *Plant & Cell Physiology* **25**, 385–395.
- Janská A., Marsík P., Zelenková S. & Ovesná J. (2010) Cold stress and acclimation – what is important for metabolic adjustment? *Plant Biology (Stuttgart, Germany)* **12**, 395–405.
- Kissner R., Nausner T., Bugnon P., Lye P.G. & Koppenol W.H. (1998) Formation and properties of peroxyxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chemical Research in Toxicology* **11**, 1285–1292.
- Kocsy G., von Ballmoos P., Rügsegger A., Szalai G., Galiba G. & Brunold C. (2001a) Increasing the glutathione content in a chilling-sensitive maize genotype using safeners increased protection against chilling-induced injury. *Plant Physiology* **127**, 1147–1156.
- Kocsy G., Galiba G. & Brunold C. (2001b) Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum* **113**, 158–164.
- Krarsch H.A. & Wise R.R. (2000) The ultrastructure of chilling stress. *Plant, Cell & Environment* **23**, 397–350.
- Krasnuk M., Jung A. & Witham F.H. (1976) Electrophoretic studies of several dehydrogenases in relation to cold tolerance of alfalfa. *Cryobiology* **13**, 375–393.
- Lee D.G., Ahsan N., Lee S.H., Lee J.J., Bahk J.D., Kang K.Y. & Lee B.H. (2009) Chilling stress-induced proteomic changes in rice roots. *Journal of Plant Physiology* **166**, 1–11.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Leterrier M., Corpas F.J., Barroso J.B., Sandalio L.M. & del Río L.A. (2005) Peroxisomal monodehydroascorbate reductase: genomic clone characterization and functional analysis under environmental stress conditions. *Plant Physiology* **138**, 2111–2123.
- Leterrier M., del Río L.A. & Corpas F.J. (2007) Cytosolic NADP-isocitrate dehydrogenase of pea plants: genomic clone characterization and functional analysis under abiotic stress conditions. *Free Radical Research* **41**, 191–199.
- Lin S.Z., Zhang Z.Y., Liu W., Lin Y.Z., Zhang Q. & Zhu B.Q. (2005) Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in freezing-induced freezing resistance of *Populus suaveolens*. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* **31**, 34–40.
- Lindermayr C., Saalbach G. & Durner J. (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **137**, 921–930.
- López-Huertas E., Corpas F.J., Sandalio L.M. & del Río L.A. (1999) Characterization of membrane polypeptides from pea leaf peroxisomes involved in superoxide radical generation. *The Biochemical Journal* **337**, 531–536.
- Lu B., Yuan Y., Zhang C., Ou J., Zhou W. & Lin Q. (2005) Modulation of key enzymes involved in ammonium assimilation and carbon metabolism by low temperature in rice (*Oryza sativa* L.) roots. *Plant Science* **169**, 295–302.
- Lütz C. (2010) Cell physiology of plants growing in cold environments. *Protoplasma* **244**, 53–73.
- Mateos R.M. (2006) *Antioxidantes de pimiento (Capsicum annum L.): estudio bioquímico y molecular de la maduración del fruto y de la respuesta a estrés abiótico*. PhD thesis, University of Granada, Granada. ISBN 84-338-3868-7.
- Mateos R.M., Bonilla-Valverde D., del Río L.A., Palma J.M. & Corpas F.J. (2009) NADP-dehydrogenases from pepper fruits: effect of maturation. *Physiologia Plantarum* **135**, 130–139.
- McCarthy I., Gómez M., del Río L.A. & Palma J.M. (2011) Role of peroxisomes in the oxidative injury induced by the auxin herbicide 2,4-D in leaves of pea plants. *Biologia Plantarum* in press.
- Mercado J.A., Reid M.S., Valpuesta V. & Quesada M.A. (1997) Metabolic changes and susceptibility to chilling stress in *Capsicum annum* plants grown at suboptimal temperature. *Australian Journal of Plant Physiology* **24**, 759–767.
- Meyer A.J. (2008) The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *Journal of Plant Physiology* **165**, 1390–1403.
- Miller G., Schlauch K., Tam R., Cortes D., Torres M.A., Shulaev V., Dangi J.L. & Mittler R. (2009) The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling* **2**, ra45.
- Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S. & Mittler R. (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment* **33**, 453–467.
- Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**, 405–410.
- Møller I.M. (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Biology* **52**, 561–591.
- Møller I.M. & Sweetlove L.J. (2010) ROS signalling – specificity is required. *Trends in Plant Science* **15**, 370–374.

- Møller I.M., Jensen P.E. & Hansson A. (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 459–481.
- Nakatsubo N., Kojima H., Kikuchi K., Nagoshi H., Hirata Y., Maeda D., Imai Y., Irimura T. & Nagano T. (1998) Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. *FEBS Letters* **427**, 263–266.
- Naydenov N.G., Khanam S., Siniauskaya M. & Nakamura C. (2010) Profiling of mitochondrial transcriptome in germinating wheat embryos and seedlings subjected to cold, salinity and osmotic stresses. *Genes & Genetic Systems* **85**, 31–42.
- Nguyen H.T., Leipner J., Stamp P. & Guerra-Peraza O. (2009) Low temperature stress in maize (*Zea mays* L.) induces genes involved in photosynthesis and signal transduction as studied by suppression subtractive hybridization. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**, 116–122.
- Noctor G. (2006) Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant, Cell & Environment* **29**, 409–425.
- Noctor G., Queval G. & Gakière B. (2006) NAD(P) synthesis and pyridine nucleotide cycling in plants and their potential importance in stress conditions. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1603–1620.
- O’Kane D., Gill V., Boyd P. & Burdon R. (1996) Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. *Planta* **198**, 371–377.
- Oidaira H., Sano S., Koshiha T. & Ushimaru T. (2000) Enhancement of antioxidative enzyme activities in chilled rice seedlings. *Journal of Plant Physiology* **156**, 811–813.
- Okamura M. (1980) An improved method for determination of L-ascorbic acid and L-dehydroascorbic acid in blood plasma. *Clinica Chimica Acta* **103**, 259–268.
- Pascual I., Azcona I., Aguirreolea J., Morales F., Corpas F.J., Palma J.M., Rellán-Alvarez R. & Sánchez-Díaz M. (2010) Growth, yield, and fruit quality of pepper plants amended with two sanitized sewage sludges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 6951–6959.
- Pastori G., Foyer C.H. & Mullineaux P. (2000) Low temperature induces changes in the distribution of H₂O₂ and antioxidants between the bundle sheath and mesophyll cells of maize leaves. *Journal of Experimental Botany* **51**, 107–113.
- Pinhero R.G., Rao M.V., Paliyath G. & Murr DP Fletcher R.A. (1997) Changes in activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiology* **114**, 695–704.
- Polowick P.L. & Sawhney V.K. (1985) Temperature effects on male fertility and flower and fruit development in *Capsicum annuum* L. *Scientia Horticulturae* **25**, 117–127.
- Prasad T.K., Anderson M.D., Martin B.A. & Stewart C.R. (1994) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *The Plant Cell* **6**, 65–74.
- Pressman E., Moshkovitch H., Rosenfeld K., Shaked R., Gamliel B. & Aloni B. (1998) Influence of low night temperatures on sweet pepper flower quality and the effect of repeated pollinations, with viable pollen, on fruit setting. *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **73**, 131–136.
- Pressman E., Shaked R. & Firon N. (2006) Exposing pepper plants to high day temperatures prevents the adverse low night temperature symptoms. *Physiologia Plantarum* **126**, 618–626.
- Proietti S., Moscatello S., Famiani F. & Battistelli A. (2009) Increase of ascorbic acid content and nutritional quality in spinach leaves during physiological acclimation to low temperature. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**, 717–723.
- Radi R. (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 4003–4008.
- Renaut J., Hausman J.F. & Wisniewski M.E. (2006) Proteomics and low-temperature studies: bridging the gap between gene expression and metabolism. *Physiologia Plantarum* **126**, 97–109.
- Requena J.R., Fu M.X., Ahmed M.U., Jenkins A.J., Lyons T.J. & Thorpe S.R. (1996) Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* **11** (Suppl 5), 48–53.
- del Río L.A., Sandalio L.M., Corpas F.J., Romero-Puertas M.C. & Palma J.M. (2009) Peroxisomes as a cellular source of ROS signal molecules. In *Reactive Oxygen Species in Plant Signaling* (eds L.A. del Río & A. Puppo), pp. 95–111. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- del Río L.A., Palma J.M., Sandalio L.M., Corpas F.J., Pastori G.M., Bueno P. & López-Huertas E. (1996) Peroxisomes as a source of superoxide and hydrogen peroxide in stressed plants. *Biochemical Society Transactions* **24**, 434–438.
- Romero-Puertas M.C., Corpas F.J., Sandalio L.M., Leterrier M., Rodríguez-Serrano M., del Río L.A. & Palma J.M. (2006) Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *The New Phytologist* **170**, 43–52.
- Sagi M. & Fluhr R. (2001) Superoxide production by plant homologues of the gp91(phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology* **126**, 1281–1298.
- Saito S., Yamamoto-Katou A., Yoshioka H., Doke N. & Kawakita K. (2006) Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco BY-2 cells. *Plant & Cell Physiology* **47**, 689–697.
- Saruyama H. & Tanida M. (1995) Effect of chilling on activated oxygen-scavenging enzymes in low temperature-sensitive and -tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science* **109**, 105–113.
- Sato Y., Murakami T., Funatsuki H., Matsuba S., Saruyama H. & Tanida M. (2001) Heat shock mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings. *Journal of Experimental Botany* **52**, 145–151.
- Seki M., Narusaka M., Ishida J., et al. (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* **31**, 279–292.
- Shaked R., Rosenfeld K. & Pressman E. (2004) The effect of low night temperatures on carbohydrates metabolism in developing pollen grains of pepper in relation to their number and functioning. *Scientia Horticulturae* **102**, 29–36.
- Sharma P., Sharma N. & Deswal R. (2005) The molecular biology of the low-temperature response in plants. *Bioessays* **27**, 1048–1059.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. & Seki M. (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 410–417.
- Smith J.N. & Dasgupta T.P. (2000) Kinetics and mechanism of the decomposition of S-nitrosoglutathione by L-ascorbic acid and copper ions in aqueous solution to produce nitric oxide. *Nitric Oxide* **4**, 57–66.
- Suzuki N. & Mittler R. (2006) Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum* **126**, 45–51.
- Szabó C., Ischiropoulos H. & Radi R. (2007) Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews. Drug Discovery* **6**, 662–680.
- Szalai G., Kellós T., Gábor Galiba G. & Kocsy G. (2009) glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. *Journal of Plant Growth Regulation* **28**, 66–80.

- Thomashow M.F. (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 571–599.
- Topuz A. & Ozdemir F. (2007) Assessment of carotenoids, capsaicinoids and ascorbic acid composition of some selected pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.) grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis* **20**, 596–602.
- Tsang E.W.T., Bowler C., H'erouart D., Van Camp W., Villarroel R., Genetello C., Van Montagu M. & Inzé D. (1991) Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *The Plant Cell* **3**, 783–792.
- Valderrama R., Corpas F.J., Carreras A., Gómez-Rodríguez M.V., Chaki M., Pedrajas J.R., Fernández-Ocaña A., del Río L.A. & Barroso J.B. (2006) The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant, Cell & Environment* **29**, 1449–1459.
- Valderrama R., Corpas F.J., Carreras A., Fernández-Ocaña A., Chaki M., Luque F., Gómez-Rodríguez M.V., Colmenero-Varea P., del Río L.A. & Barroso J.B. (2007) Nitrosative stress in plants. *FEBS Letters* **581**, 453–461.
- Winfield M.O., Lu C., Wilson I.D., Coghill J.A. & Edwards K.J. (2010) Plant responses to cold: transcriptome analysis of wheat. *Plant Biotechnology Journal* **8**, 749–771.
- Yamamoto Y., Kobayashi Y. & Matsumoto H. (2001) Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiology* **125**, 199–208.
- Yoda H., Hiroi Y. & Sano H. (2006) Polyamine oxidase is one of the key elements for oxidative burst to induce programmed cell death in tobacco cultured cells. *Plant Physiology* **142**, 193–206.
- Yu C.-W., Murphy T.M. & Lin C.-H. (2003) Hydrogen-peroxide induced chilling tolerance in mung beans mediated through ABA independent glutathione accumulation. *Functional Plant Biology* **30**, 955–963.
- Zhao M.G., Chen L., Zhang L.L. & Zhang W.H. (2009) Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **151**, 755–767.
- Zhu J., Dong C.H. & Zhu J.K. (2007) Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 290–295.

Received 9 December 2010; received in revised form 3 March 2011; accepted for publication 4 March 2011

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. (a) Histochemical detection of lipid peroxidation (b) catalase activity (c) NADP-ICDH activity, and (d) NO content in leaves of pepper plants maintained for different periods of times to low temperature (8 °C) and optimal conditions. (I) Control plants exposed to optimal temperature. (II) Plants exposed to LT for 24 h. (III) Plants exposed to LT for 24 h and then moved to optimal temperature for another 24 h. (IV) Plants exposed to LT for 24 h, moved to optimal temperature for 24 h and exposed again to LT for another 24 h.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Detection and Quantification of S-Nitrosoglutathione (GSNO) in Pepper (*Capsicum annuum* L.) Plant Organs by LC-ES/MS

Morad Airaki¹, Lourdes Sánchez-Moreno¹, Marina Leterrier¹, Juan B. Barroso², José M. Palma¹ and Francisco J. Corpas^{1,*}

¹Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Sistemas Molecular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Apartado 419, E-18080 Granada, Spain

²Grupo de Señalización Molecular y Sistemas Antioxidantes en Plantas, Unidad Asociada al CSIC (EEZ), Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Jaén, Spain

*Corresponding author: E-mail, javier.corpas@eez.csic.es; Fax: +34-958-129600.

(Received May 2, 2011; Accepted September 22, 2011)

Glutathione (GSH) is one of the major, soluble, low molecular weight antioxidants, as well as the major non-protein thiol in plant cells. However, the relevance of this molecule could be even greater considering that it can react with nitric oxide (NO) to generate S-nitrosoglutathione (GSNO) which is considered to function as a mobile reservoir of NO bioactivity in plants. Although this NO-derived molecule has an increased physiological and phytopathological relevance in plants cells, its identification and quantification in plant tissues have not been reported so far. Using liquid chromatography–electrospray/mass spectrometry (LC-ES/MS), a method was set up to detect and quantify simultaneously GSNO as well reduced and oxidized glutathione (GSH and GSSG, respectively) in different pepper plant organs including roots, stems and leaves, and in Arabidopsis leaves. The analysis of NO and GSNO reductase (GSNOR) activity in these pepper organs showed that the content of GSNO was directly related to the content of NO in each organ and oppositely related to the GSNOR activity. This approach opens up new analytical possibilities to understand the relevance of GSNO in plant cells under physiological and stress conditions.

Keywords: Glutathione • Nitric oxide • S-nitrosoglutathione.

Abbreviations: CLSM, confocal laser scanning microscopy; DTNB, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid); GR, glutathione reductase; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; GSNO, S-nitrosoglutathione; GSNOR, S-nitrosoglutathione reductase; LC-ES/MS; liquid chromatography–electrospray/mass spectrometry; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; MRM, multiple reaction monitoring; NO, nitric oxide; RNS, reactive nitrogen species; RSD, relative standard deviation.

Introduction

Nitric oxide (NO) is one of the most studied bioactive gas molecules, due to its involvement in a wide spectrum of

physiological and phytopathological processes in plants (Lamattina et al. 2003, Besson-Bard et al. 2008, Corpas et al. 2011). This molecule has some derived molecules such as nitrogen dioxide (NO₂), peroxyxynitrite (ONOO⁻), S-nitrosothiols, S-nitrosoglutathione (GSNO), among others, which are designated as reactive nitrogen species (RNS). S-Nitrosoglutathione, which is formed by the S-nitrosylation reaction of NO with glutathione (GSH, γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine), is thought to have a significant physiological relevance in animals and plants since GSNO has been reported to function as a mobile reservoir of NO bioactivity (Durner et al. 1999, Noble et al. 1999, Stamler et al. 2001, Díaz et al. 2003, Foster et al. 2009) and can mediate the signaling pathway throughout specific post-translational modification of redox-sensitive proteins by a reaction of *trans*-nitrosylation from GSNO to Cys-NO. This molecule could have more relevance than would be expected considering that GSH is one of the major low molecular weight soluble antioxidants of plants.

Reduced glutathione (GSH) is the most important intracellular non-protein thiol compound, and plays a major role in the protection of cell and tissue structures from oxidative injury (Foyer and Noctor 2005, Foyer and Noctor 2009, Foyer and Noctor 2011). It is involved in the ascorbate–glutathione cycle (Noctor and Foyer 1998, Romero-Puertas et al. 2006) and detoxification of xenobiotics (Edwards et al. 2000). Within cells, free glutathione is present mainly in its reduced form (GSH) which could be oxidized to glutathione disulfide (GSSG) in normal conditions but also under oxidative stress. GSSG can be reduced back to GSH by glutathione reductase (GR). Thus, the cellular redox status depends on the relative amounts of the reduced and oxidized forms of glutathione, i.e. on the GSH:GSSG molar ratio (Noctor 2006). In mammalian cells under physiological conditions, the GSH redox couple is known to be present in the concentration range of 1–10 mM with a GSH:GSSG molar ratio of 100:1. However, under oxidative stress, this ratio has been shown to decrease to values

Plant Cell Physiol. 52(11): 2006–2015 (2011) doi:10.1093/pcp/pcr133, available online at www.pcp.oxfordjournals.org

© The Author 2011. Published by Oxford University Press on behalf of Japanese Society of Plant Physiologists.

All rights reserved. For permissions, please email: journals.permissions@oup.com

between 10:1 and even 1:1 (Chai et al., 1994). However, the interaction of GSH with NO opens up new perspectives in the metabolism of these two relevant molecules in plants under physiological and stress conditions since both molecules participate in redox state and signaling processes.

To our knowledge the detection and quantification of GSNO in plant materials has not been reported so far. In this work, a very sensitive and simple method by liquid chromatography/tandem mass spectrometry is set up which allows the simultaneous detection and quantification of GSNO, GSH and GSSG in different pepper plant organs. This provides a powerful tool to measure the redox status in plant cells and tissues which are, at the same time, biomarkers of cell functionality under physiological and stress conditions.

Results

LC-ES/MS analysis and validation of the method

With the purpose of identifying and quantifying GSNO and to develop a method to discriminate among this RNS and the reduced and oxidized glutathione forms (GSH and GSSG, respectively) in plants, a liquid chromatography–electrospray/mass spectrometry (LC-ES/MS) procedure was set up using a mixture of the three standards which are commercially available. **Fig. 1** shows the LC-ES/MS chromatogram of the main product ions obtained after molecular fragmentation of the mixture. For the quantification, standards of each compound were prepared separately. The linearity of this procedure was tested by analyzing the calibration curves. Five standards ranging in concentration from 1 to 10 p.p.m. for GSH and GSSG, and from 0.1 to 10 p.p.m. for GSNO were used. The calibration curves indicated a linear behavior in the selected concentration ranges, with R^2 values usually close to 0.999 and always higher than 0.986 (**Table 1**). On the other hand, based on the statistical analysis of linear regression of the calibration curves for each compounds (Cuadros et al. 1993), the sensibility, the limit of quantification (LOQ) and the limit of detection (LOD) were estimated (**Table 1**). In consequence, LOD and LOQ were calculated as three and 10 times, respectively the signal/noise relationship, giving lower values (10 times) than the real detection. Therefore, the data were presented using the calculated values of the analysis of the calibration curves. Each standard sample (30 μ l) was injected at 5°C to prevent potential degradation. Stability of the standard samples during the analysis was tested by comparing their concentrations at the beginning and the end of each batch during the analysis (6–7 h d⁻¹). The critical parameters affecting LC-ES/MS, namely cone voltage and collision energy, were investigated. In order to establish the optimum cone voltage and collision energy for the detection of GSH, GSSG and GSNO, the signals of m/z 307.76, 612.90 and 337.00 precursor ions vs. cone voltage were evaluated, respectively. **Table 2** shows the optimized multiple reaction monitoring (MRM) for each compound including cone voltage, collision energy, precursor ion and transition.

Under these conditions, the typical standard retention times were 3.36 min for GSH, 7.30 min for GSSG and 9.05 min for GSNO. **Fig. 2** shows the fragmentation patterns of each compound where the precursor and product ions for GSH (**Fig. 2A**), GSSG (**Fig. 2B**) and GSNO (**Fig. 2C**) are shown.

The LC-ES/MS method was validated by preparing solutions of available standards in extraction solution and adding them to plant samples. **Table 3** shows the percentage recovery of GSH, GSSG and GSNO standards added to pepper leaf extracts and analyzed on the same day (intra-day) and during three consecutive days (inter-days). The precision of the method was evaluated by the relative standard deviation (RSD) of the injection of four replicates, at two concentrations, and the accuracy was calculated by the mean recovery of the four replicates. Thus, intra-day and inter-day accuracy and precision provided acceptable values, with recoveries of around 70% of GSH and GSSG, and an RSD of $\leq 10\%$, with the exception of GSSG spiked with 10 μ g. However, the percentage recovery for GSNO was 100%.

LC-ES/MS analysis of plant organs

Once the mass spectrometric method was optimized, it was possible to analyze these compounds in the different organs of healthy pepper plants. **Fig. 3** shows representative LC-ES/MS chromatograms of the main product ions obtained after molecular fragmentation of GSH (**Fig. 3A**), GSSG (**Fig. 3B**) and GSNO (**Fig. 3C**) in pepper leaves. Although the obtained retention time of each compound in pepper leaves was a bit shorter compared with the retention times of the corresponding standards, the transition (m/z) for each molecule was identical, which corroborates the identity of these compounds in leaf samples. Similar chromatograms and retention times as in leaves were obtained for roots and stems (data not shown).

Table 4 shows the quantification of GSH, GSSG and GSNO in leaves, stems and roots of healthy pepper plants. In leaves, the GSH content was about 1.5- and 1.9-fold higher than in roots and stem, respectively; however, the GSSG and GSNO content was 1.4- to 1.8-fold higher in roots than in stem and leaves, respectively. Thus, pepper leaves rendered higher GSH/GSSG and GSH/GSNO ratios.

To corroborate that this method could be applied to other plant species, the quantification of GSH, GSSG and GSNO was also performed in leaves of Arabidopsis plants (**Table 5**). Additionally, the content of GSH and GSSG was also analyzed by a spectrophotometric method (Griffith 1980). As a result, the data showed that the GSH content determined by LC-ES/MS was 1.6-fold higher than that determined by the spectrophotometric method; however, the GSSG content was 17-fold lower.

GSNO metabolism in pepper organs

To obtain more in-depth knowledge of GSNO metabolism in pepper plants, the activity of GSNO reductase (GSNOR), which metabolizes GSNO to GSSG and NH₃, was analyzed, as well as

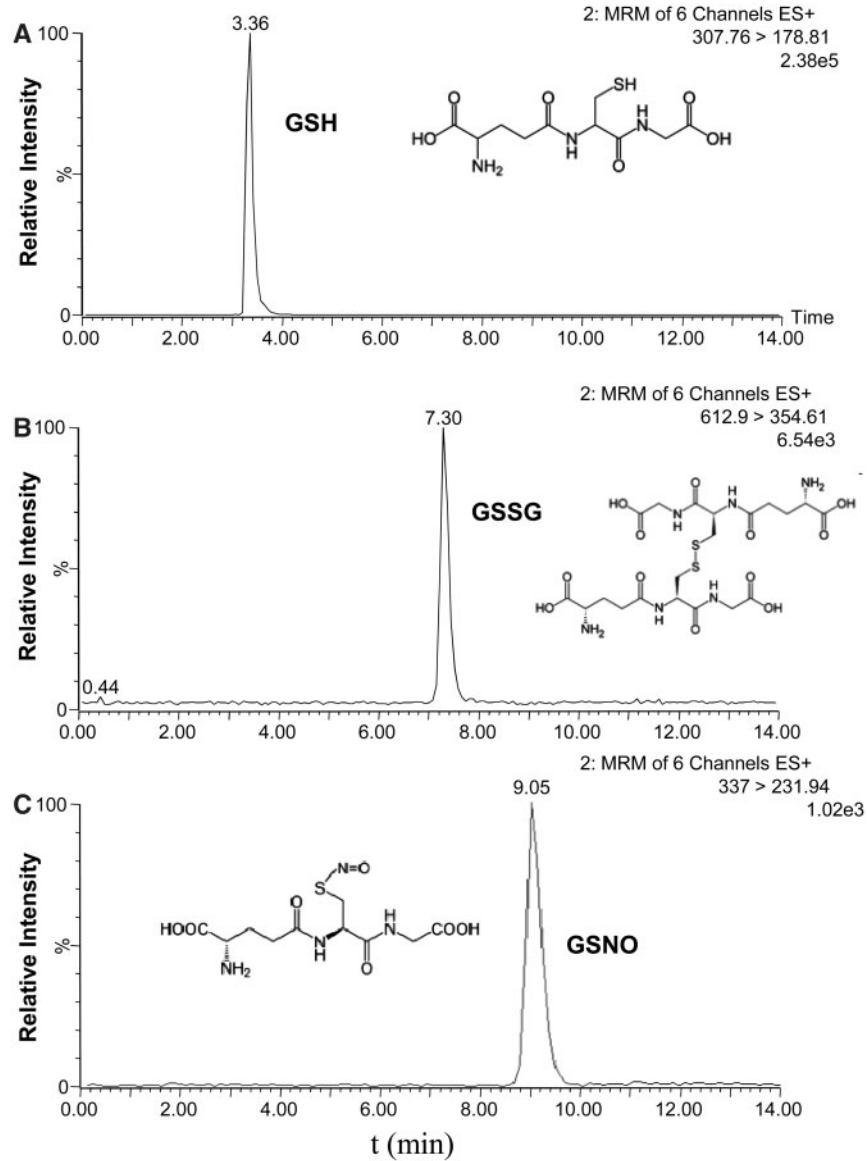


Fig. 1 LC-ES/MS chromatogram of a mixture of the three standards: GSH, GSSG and GSNO prepared in 0.1 M HCl (3 p.p.m.). The chromatograms show the transitions of (A) GSH (307.76→178.81), (B) GSSG (612.90→354.61) and (C) GSNO (337.00→231.94).

Table 1 Parameters of the linear regression ($y = b + mx$) obtained for the calibration curves of the standards of GSH, GSSG and GSNO where b is the y intercept, m is the slope, r is the correlation coefficient and r^2 is the squared correlation coefficient

Compound	r	r^2	b	m	Linearity	Sensitivity (mg l^{-1})	LOD (mg l^{-1})	LOQ (mg l^{-1})
GSH	0.994964	0.989954	5122.7	1635.1	0.94414	0.44	1.17	3.90
GSSG	0.993242	0.986529	2127.2	1604.4	0.88314	0.75	1.58	5.27
GSNO	0.999685	0.999371	1838.6	246.1	0.98225	0.13	0.31	1.03

Linearity, sensitivity, limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD) were assayed by analyzing the calibration curves (Cuadros et al. 1993).

the NO content in these pepper organs (Fig. 4A). Leaves and stems showed similar GSNOR activity, which was 2.5-fold higher than in roots. Comparing the data of GSNO content from Table 2 with those of GSNOR activity, it could be observed that these results were opposite to those found for

GSNO reported in Table 4 (and represented again in Fig. 4B). On the other hand, the NO content in the different organs of pepper plants showed that leaves and shoots had similar levels but the content of NO in roots was 2.7-fold higher (Fig. 4C).

Table 2 Optimized MRM conditions for the analysis of reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG) and S-nitrosoglutathione (GSNO)

Compound	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	Precursor ion (m/z)	Transition (m/z)
GSH	20	15	307.76	307.76→178.81
GSSG	25	20	612.90	612.90→354.61
GSNO	15	15	337.00	337.00→231.94

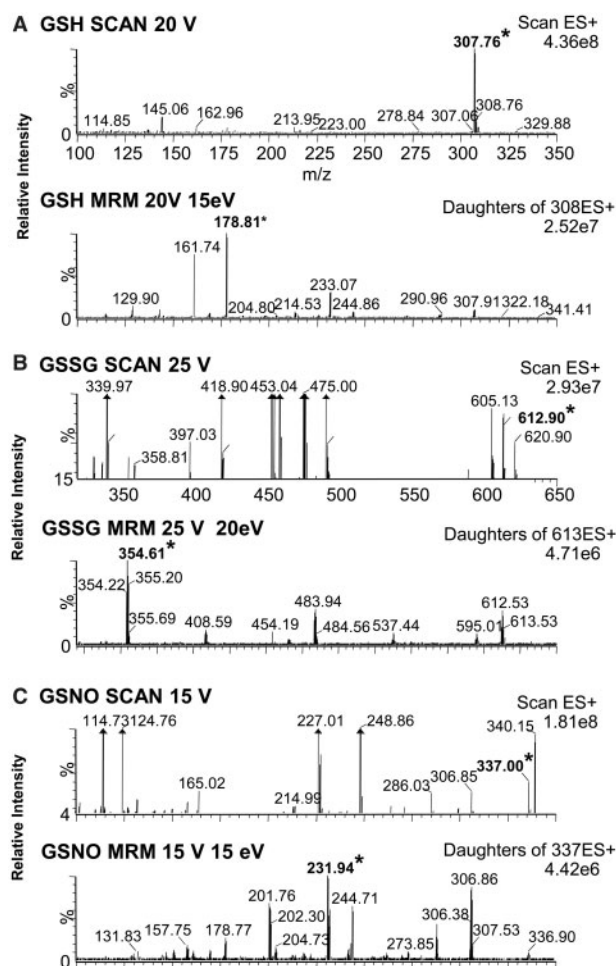


Fig. 2 Fragmentations patterns of the analyzed compounds GSH, GSSG and GSNO. (A) Precursor (m/z 307.76, upper part) and product (m/z 178.81, lower part) ions for the GSH standard analyzed in positive mode. (B) Precursor (m/z 612.90, upper part) and product (m/z 354.61, lower part) ions for the GSSG standard analyzed in positive mode. (C) Precursor (m/z 337.00, upper part) and product (m/z 231.94, lower part) ions for the GSNO standard analyzed in positive mode. An asterisk indicates the corresponding ions for each compounds.

Fig. 5 shows the cellular localization of NO in cross-sections of the different pepper organs. In roots, NO was found mainly in xylem, epidermal cells and in the root hairs formed from these cells. In stem, the NO is distributed in all cell types, and, in

leaves, the NO was most prominent in epidermal cells and in vascular tissue.

Discussion

The physiological and phytopathological significance of low molecular mass thiol compounds including GSH and its corresponding disulfide form, GSSG, is well documented in animal (Ault and Lawrence 2003, Biswas and Rahman 2009, Reynart 2011) and plant cells (Rouhier et al. 2008, Foyer and Noctor 2011). The relevance of these compounds increases considering their interaction with the free radical NO to form GSNO which is metabolized by the enzyme GSNOR (Leterrier et al. 2011). Even though there are well established methods to determine GSH and GSSG, as indicators of the cellular redox state (Gucek et al. 2002, Maruyama-Nakashita et al. 2006, Rellán-Alvarez et al. 2006, Iwasaki et al. 2009), to our knowledge there is neither any method nor data reporting the GSNO content in plant cells. Liquid chromatography combined with mass spectrometry has been demonstrated to be one of the most effective tools in biological research, particularly for the analysis of very low amounts of compounds in complex biological matrices. This technique is generally characterized by high specificity, sensitivity and high-throughput potential. Consequently, the main goal of this study was to establish a sensitive and reproducible method based on liquid chromatography coupled with mass spectrometry to detect and quantify GSNO in plant samples.

GSNO is moderately stable since it decomposes with a second order rate constant of $3 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at 37°C and pH 7.4 (Park 1988). However, this stability is relative depending on the presence of other compounds in the medium. For example, GSNO in the presence of reductants, such as glutathione or ascorbate, and Cu^+ can be decomposed to produce NO and GSSG (Gorren et al. 1996, Holmes and Williams 2000, Smith and Dasgupta 2000). In plant research, GSNO is considered as a NO donor since under physiological conditions it spontaneously releases NO (Lindermayr et al. 2005, Tada et al. 2008, Palmieri et al. 2010). In animal tissues, GSNO has been measured using different techniques such as HPLC with UV detection (Park 1988, Tsikas et al. 1999, Steffen et al. 2001) or HPLC with electrochemical detection (Yap et al. 2010). However, the experimental evidence available on the presence of GSNO in plant cells is scarce. To our knowledge, there are few reports that have studied the presence and relative GSNO content in several plants species under environmental stress conditions by immunohistochemical analysis using a commercial antibody against GSNO. Thus, in pea leaf sections, the immunohistochemical analysis showed the presence of GSNO in collenchyma cells which was drastically reduced when plants were grown in a toxic cadmium concentration (50 μM) (Barroso et al. 2006). However, in olive leaves, by confocal laser scanning microscopy (CLSM), GSNO was localized in vascular tissues and spongy mesophyll cells, and under salt stress its intensity was diminished in vascular tissues and was stronger in spongy

Table 3 Percentage recoveries obtained for different amounts of standards (GSH, GSSG and GSNO) after they were added to pepper leaf extracts and analyzed by the optimized LC-ES/MS method

Compound	μg	Intra-day variation, n = 4		Inter-day variation, n = 4 per 3 days	
		Recovery (%)	RSD	Recovery (%)	RSD
GSH	50	73	8.9	70	9.3
	100	60	1.3	67	8.4
GSSG	10	38	8.0	37	11.6
	20	68	14.4	69	10.6
GSNO	1	100	7.3	100	12.3
	2	100	9.8	100	9.0

Four replicates were spiked at two different levels of concentration and the samples were extracted on the same day (intra-day) and on three consecutive days (inter-day). RSD, relative standard deviation.

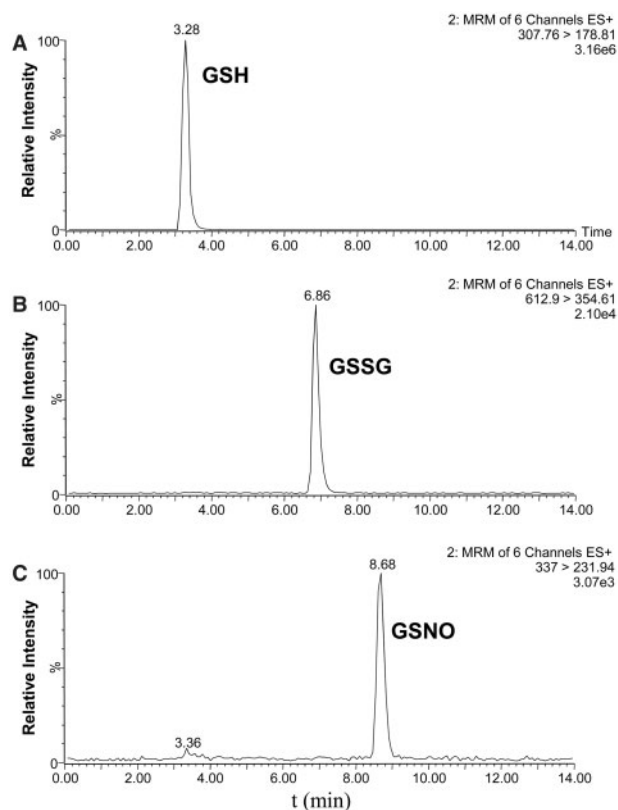


Fig. 3 LC-ES/MS chromatograms of pepper leaf samples. The chromatograms show the transitions of (A) GSH (307.76→178.81), (B) GSSG (612.90→354.61) and (C) GSNO (337.00→231.94).

mesophyll cells (Valderrama et al. 2007). Similar behavior was observed in sunflower hypocotyls after infections with the pathogen *Plasmopara halstedii* (Chaki et al. 2009). More recently, it has been also reported by immunohistochemical analysis that GSNO content increased in sunflower hypocotyls after mechanical wounding and heat stress (Chaki et al. 2011a, Chaki et al. 2011b).

Table 4 Content of reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG) and S-nitrosoglutathione (GSNO) in pepper plants organs identified and quantified by LC-ES/MS

Organs	GSH (nmol g ⁻¹ FW)	GSSG (nmol g ⁻¹ FW)	GSNO (nmol g ⁻¹ FW)	GSH/GSSG	GSH/GSNO
Root	583.5 ± 7.6	6.2 ± 0.3	7.9 ± 1.9	73	74
Stem	437.3 ± 65.6	5.8 ± 0.5	4.2 ± 0.4	75	104
Leaf	867.8 ± 14.6	3.5 ± 0.5	5.5 ± 1.0	248	158

Table 5 Comparative analysis of the content of reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG) and S-nitrosoglutathione (GSNO) in leaves of 4-week-old Arabidopsis plants quantified by a spectrophotometric method (Griffith 1980) and by LC-ES/MS

Method	GSH (nmol g ⁻¹ FW)	GSSG (nmol g ⁻¹ FW)	GSNO (nmol g ⁻¹ FW)
Spectrophotometric	165.5 ± 4.2	32.8 ± 5.1	ND
LC-ES/MS	226.3 ± 14.6	1.9 ± 0.04	3.7 ± 0.2

ND, not determined.

When this LC-ES/MS method was applied to leaves of the model plant *A. thaliana*, it was also possible to detect and quantify these compounds, demonstrating that this approach may be useful for other plant species. For comparative purposes, GSH and GSSG content were also determined by a spectrophotometric method (Griffith 1980). Thus, it was found that GSH content determined by both methods (LC-ES/MS and enzymatic recycling assay) was very similar and in the range of previous works reported for Arabidopsis, which fluctuated between 50 and 700 nmol g⁻¹ FW depending of the Arabidopsis developmental stage, the analyzed organs and the techniques used (Meyer et al. 2001). For example, in leaves of 5-week-old Arabidopsis plants grown in a short-day regime, the GSH content, quantified by reverse-phase HPLC after derivatization with monobromobimane, was 345 nmol g⁻¹ FW (Ball et al. 2004), and in leaves of Arabidopsis grown in soil under long-day conditions the GSH content was 256.7 nmol g⁻¹ FW (Bermúdez et al. 2010). On the other hand, in Arabidopsis whole seedlings the GSH content quantified by a spectrophotometric method was 390 nmol g⁻¹ FW (DeRidder et al. 2002, Lee et al. 2003). Similarly, in roots of 3-week-old Arabidopsis plants the GSH content was 247 nmol g⁻¹ FW (Takahashi et al. 2000), but in shoots of plants grown on MS medium it was 480 nmol g⁻¹ FW. However, the GSH content was 50 nmol g⁻¹ FW in Arabidopsis cell suspension determined by a spectrophotometric assay (May and Leaver 1993). In the case of GSSG, which is less abundant than GSH, there is a significant difference for both methods, the GSSG content determined by the spectrophotometric assay being higher, and this could be due to the GSH oxidation during the extraction process and the required time to derivatize GSH with 2-vinylpyridine. However, these data are difficult

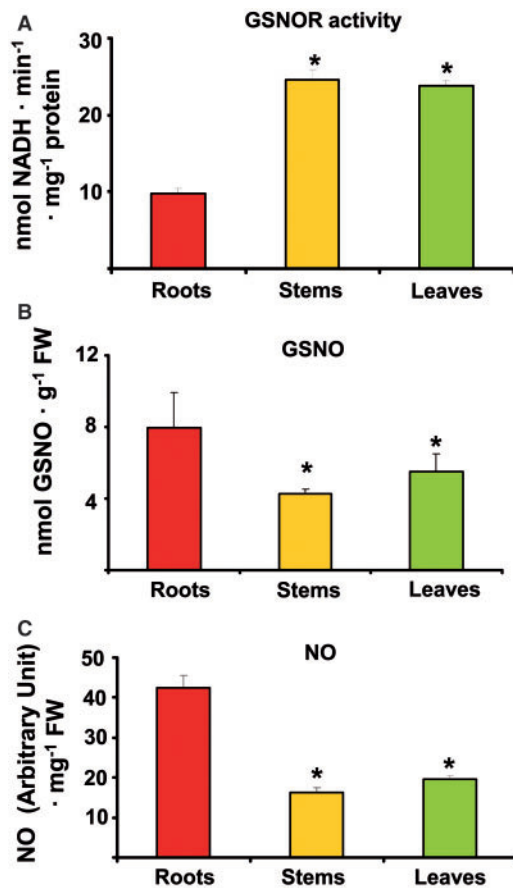


Fig. 4 GSNOR activity, and GSNO and NO content in the different organs of pepper plants. (A) GSNOR activity. (B) GSNO content detected and quantified by LC/MS (data from Table 2). (C) Spectrofluorometric detection of NO with DAF-2 in roots, stems and leaves of pepper plants. The fluorescence produced was expressed as arbitrary units per mg FW. Results are the mean of three different experiments. *Differences in comparison with roots values were significant at $P < 0.05$.

to compare since many published data are reported as the total glutathione pool (GSH + GSSG).

Considering this background, the analytical method reported here to detect and quantify GSNO, GSH and GSSG simultaneously in different pepper organs provides a very useful and powerful research tool to understand the metabolism of NO and its interaction with other molecules in plant tissues. The identification of each compound in each plant sample was clear and unambiguous based on both its retention time and its exact m/z ratio. Key points in the success of the detection procedure of GSNO in plant samples were (i) a simple extraction method without reduction or derivatization steps; (ii) an assay performed under controlled conditions (acidic pH, low temperature and not bright light); (iii) a very short period of time between extraction and measurement by LC-ES/MS; and (iv) the short analysis time required for each sample. All these factors allowed a precise and reliable analysis

of the GSNO, GSH and GSSG in the different plant species and pepper organs.

At present, it is well established that GSNO is the preferred physiological substrate for the enzyme glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase (for a review, see Leterrier et al. 2011) because it catalyzes the NADH-dependent reduction of GSNO to GSSG and NH_3 , for that reason being renamed as GSNO reductase (GSNOR). This enzyme appears to be necessary for normal development and fertility under optimal growth conditions of plants (Lee et al. 2008). In Arabidopsis, the analysis of GSNOR protein expression and activity by immunolocalization and histochemical methods showed that this protein is differentially expressed, being highest in roots and leaves from the first developmental stages (Espunya et al. 2006). Moreover, both overexpressing and knock-down GSNOR transgenic Arabidopsis plants had a short-root phenotype that was correlated with a lower intracellular GSH level and an alteration in its spatial distribution in the roots (Espunya et al. 2006), thus suggesting that GSNOR and consequently GSNO might be involved in the regulation of the organ redox state.

In the present study, it must be pointed out that among the three analysed pepper organs, the roots showed the highest content of GSNO that seems to be related to the highest NO content and the lowest GSNOR activity, and this suggests an opposite correlation between GSNO content and GSNOR activity. The GSNOR is also involved in the mechanism of response against different biotic (Feechan et al. 2005, Rustérucchi et al. 2007, Chaki et al. 2009) and abiotic stresses including heavy metal (Barroso et al. 2006), mechanical wounding (Chaki et al. 2011b), and low and high temperature (Corpas et al. 2008, Lee et al. 2008, Airaki et al. 2011, Chaki et al. 2011a). In this context, the analysis of this activity in the different pepper organs with the concomitant quantification of NO showed that in unstressed pepper plants, there is equilibrium between these compounds. Thus, higher GSNOR activity provoked a lower content of GSNO which also rendered a lower NO content. This behavior was observed in stems and leaves. However, roots showed a totally opposite behavior.

In summary, this new analytical method allows the direct and simultaneous identification and quantification of GSNO, GSH and GSSG in plant samples, and for that reason is a valuable new tool to advance the research into NO metabolism in plants and its interaction with non-enzymatic antioxidants, specifically with GSH.

Materials and Methods

Chemical reagents

All solvents were of HPLC-gradient grade (Panreac Química). Water was of $18 \text{ M}\Omega$ quality obtained with a Milli-Q Integral Water Purification System (Millipore). GSH and GSSG were purchased from Fluka Chemical Corp. GSNO was purchased from Calbiochem. The rest of the chemicals such as trifluoroacetic acid (TFA) or HCl were of the highest purity available.

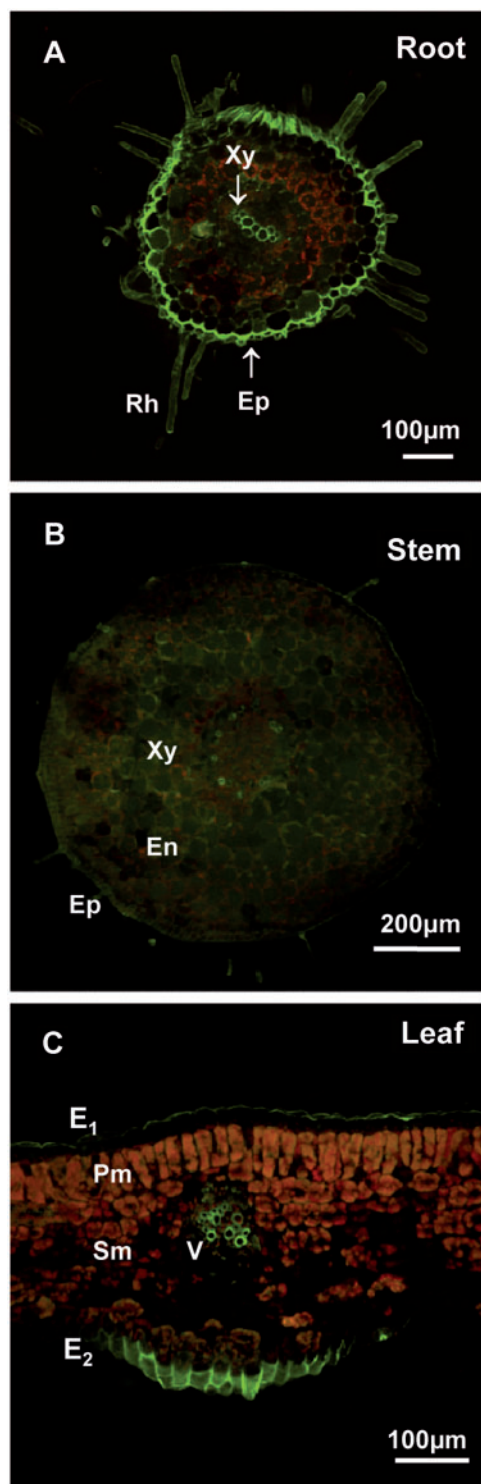


Fig. 5 Representative images illustrating the CLSM detection of endogenous NO in pepper plants using 10 μM DAF-FM DA as fluorescent probe. (A) Cross-sections of roots. (B) Cross-sections of stems. (C) Cross-sections of leaves. The orange–yellow color corresponds to the autofluorescence. Each picture was prepared from 35–40 cross-sections which were analyzed by CLSM. E₁, adaxial epidermis; E₂, abaxial epidermis; En, endodermis; Ep, epidermis; Pm, palisade mesophyll; Rh, root hair; Sm, spongy mesophyll; V, main vein; Xy, xylem.

Plant materials and growth conditions

Pepper (*Capsicum annuum* L) seeds, California type, were obtained from Syngenta Seeds S.A. (El Ejido, Almería, Spain). Seeds were germinated in Petri dishes containing Murashige and Skoog medium for 5 d at 30°C in the dark. Then they were transferred to a growth chamber at 22/18°C and a 16 h photoperiod for 10 d. The healthiest pepper seedlings were selected and grown in aerated optimum nutrient solutions for an additional 15 d under the same conditions (Airaki et al. 2011). *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia seeds were germinated and grown on soil plus vermiculite (1:3) in a growth chamber at 22°C, under a 16 h photoperiod and a light intensity of 100–120 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for a period of 4 weeks.

Tissue extraction

For chromatographic analysis, organs (roots, stems and leaves) of pepper and leaves of *Arabidopsis* plants (0.3 g) were ground with a mortar and pestle in the presence of 1 ml of 0.1 M HCl. Homogenates were filtered and centrifuged at 21,000 $\times g$ for 20 min at 4°C and the supernatants were collected, filtered through 0.45 μm nylon filters, and immediately analyzed by LC-ES/MS. All procedures were done at 4°C and protected from light to avoid potential degradation of the analytes.

For biochemical assays, pepper organs were frozen in liquid N₂ and ground in a mortar. The powder was suspended in a homogenizing medium containing 50 mM Tris–HCl, pH 7.8, 0.1 mM EDTA, 5 mM dithiothreitol (DTT), 0.2% (v/v) Triton X-100, 10% (v/v) glycerol and 2% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVPP). Homogenates were centrifuged at 27,000 $\times g$ for 25 min at 4°C and supernatants were immediately used for the assays.

Liquid chromatography–electrospray/mass spectrometry (LC-ES/MS)

Samples were assayed by LC-MS using an Allience 2695 Separation module connected to a Quattro Micro triple quadrupole mass spectrometer detector (Waters). Instrument control, data collection, analysis and management were controlled by the MassLynx 4.1 software package.

Separation was performed using an Atlantis T3 column (3 \times 150 mm, 3 μm , Waters). GSH, GSSG and GSNO were separated using isocratic conditions with a mixture of acetonitrile:H₂O (5:95) with TFA (0.1%) during 14 min at 0.6 ml min⁻¹. Using an orthogonal Z-spray electrospray interface (Micromass) the effluents from the HPLC were introduced into the mass spectrometer. The ionization source temperature was 120°C and the desolvation gas temperature 350°C. The cone gas and desolvation gas flow rates were 600 and 01 h⁻¹, respectively. The capillary voltage was 3.0 kV and the cone voltage was 15 V. Argon gas (2.83×10^{-3} mbar) was in the collision cell. Mass spectrometric parameters were optimized by continuous infusion of 10 p.p.m. of GSH, GSSG and GSNO in 0.1 M HCl. Detection of all the compounds was performed in the positive ionization mode. The quantification of the

compounds was based on appropriate MRM of ion pairs, using the following transitions: GSH 307.76 > GSH 178.81, GSNO 337.0 > GSNO 231.94, GSSG 612.90 > GSSG 354.61.

Spectrophotometric determination of glutathione

The concentration of reduced and oxidized glutathione forms (GSH and GSSG, respectively) was determined by an enzymatic recycling method (Griffith 1980). The assay is based on sequential oxidation of glutathione by 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and reduction by NADPH in the presence of a known amount of GR. To quantify GSSG content, 2-vinylpyridine is added to the plant samples. Standard curves were generated with reduced and oxidized glutathione. Briefly, Arabidopsis leaves (0.5 g FW) were ground with a mortar and pestle in the presence of 1.67 ml of 5% (w/v) meta-phosphoric acid. Homogenates were centrifuged at $21,000 \times g$ for 20 min at 4°C and the supernatants were collected, filtered through 0.45 µm nylon filters and used immediately. Glutathione (as GSH + GSSG) was measured using 1 ml of assay mixture containing 143 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.5) plus 6.3 mM EDTA, 200 µM NADPH, 6 mM DTNB, 25 µl of plant sample and 266 U ml^{-1} GR. The change in absorbance at 412 nm was recorded for 3 min. Glutathione concentrations were calculated from a standard curve constructed using commercial GSH over the range 0–0.1 mM. To determine the content of GSSG, 100 µl of the samples were incubated with 2 µl of pure 2-vinylpyridine and 6 µl of 1.5 M triethanolamine for 1 h at 25°C. GSSG concentrations were calculated from a standard curve constructed using commercial GSSG over the range 0–0.01 mM.

Spectrofluorometric detection of nitric oxide

NO was assayed using a spectrofluorometric method (Airaki et al. 2011). Briefly, to freshly crude extracts of pepper organs 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2) was added at 10 µM final concentration. Then, the reaction mixtures were incubated at 37°C in the dark for 2 h, and the fluorescence was measured in QuantaMaster™ QM-4 fluorescent spectrophotometer (PTI® Photon Technology International) at excitation and emission wavelengths of 485 and 515 nm, respectively.

Enzymatic activity assays

GSNOR activity was assayed spectrophotometrically at 25°C by monitoring the oxidation of NADH at 340 nm (Corpas et al. 2008).

Detection of NO by confocal laser scanning microscopy

NO was detected in pepper organ (root, stem and leaf) transversal sections with 10 µM 4-aminomethyl-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM DA, Calbiochem) prepared in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) as described elsewhere (Corpas et al. 2006).

Funding

This work was supported by the European Regional Development Fund [co-financed grants from the Ministry of Science and Innovation (BIO2009-12003-C02-01 and BIO2009-12003-C02-02) and Junta de Andalucía (group BIO 286 and BIO 192)]; Junta de Andalucía, Spain [PhD fellowship to M.A.]; the Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Spain [a JAE-Doc contract to M.L.].

Acknowledgments

The provision of pepper seeds by Mrs. Sierra Bacarizo (Syngenta Seeds S.A.) is acknowledged. The valuable technical help of Mr. Carmelo Ruíz-Torres and Miss Tamara Molina-Márquez is also appreciated. Confocal laser scanning microscopy analyses were carried out at the Technical Services of the University of Jaén. LC-ES/MS analyses were carried out at the Instrumental Technical Services of the Estación Experimental del Zaidín (CSIC).

References

- Airaki, M., Leterrier, M., Mateos, R.M., Valderrama, R., Chaki, M., Barroso, J.B. et al. (2011) Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. *Plant Cell Environ.* 34 doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02310.x.
- Ault, J.G. and Lawrence, D.A. (2003) Glutathione distribution in normal and oxidatively stressed cells. *Exp. Cell Res.* 285: 9–14.
- Ball, L., Accotto, G.P., Bechtold, U., Creissen, G., Funck, D., Jimenez, A. et al. (2004) Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 2448–2462.
- Barroso, J.B., Corpas, F.J., Carreras, A., Rodríguez-Serrano, M., Esteban, F.J., Fernández-Ocaña, A. et al. (2006) Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *J. Exp. Bot.* 57: 1785–1793.
- Bermúdez, M.A., Páez-Ochoa, M.A., Gotor, C. and Romero, L.C. (2010) Arabidopsis S-sulfocysteine synthase activity is essential for chloroplast function and long-day light-dependent redox control. *Plant Cell* 22: 403–416.
- Besson-Bard, A., Pugin, A. and Wendehenne, D. (2008) New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 21–39.
- Biswas, S.K. and Rahman, I. (2009) Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Mol. Aspects Med.* 30: 60–76.
- Chai, Y.C., Ashraf, S.S., Rokutan, K., Johnston, R.B. Jr and Thomas, J.A. (1994) S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch. Biochem. Biophys.* 310: 273–281.
- Chaki, M., Fernández-Ocaña, A.M., Valderrama, R., Carreras, A., Esteban, F.J., Luque, F. et al. (2009) Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower–mildew interaction. *Plant Cell Physiol.* 50: 265–279.
- Chaki, M., Valderrama, R., Fernández-Ocaña, A.M., Carreras, A., Gómez-Rodríguez, M.V., López-Jaramillo, J. et al. (2011a) High

- temperature triggers the metabolism of S-nitrosothiols in sunflower mediating a process of nitrosative stress which provokes the inhibition of ferredoxin-NADP reductase by tyrosine nitration. *Plant Cell Environ.* 34: 1803–1818.
- Chaki, M., Valderrama, R., Fernández-Ocaña, A.M., Carreras, A., Gómez-Rodríguez, M.V., Pedrajas, J.R. et al. (2011b) Mechanical wounding induces a nitrosative stress by down-regulation of GSNO reductase and an increase in S-nitrosothiols in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *J. Exp. Bot.* 62: 1803–1813.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., Carreras, A., Valderrama, R., Palma, J.M., León, A.M. et al. (2006) Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta* 224: 246–254.
- Corpas, F.J., Chaki, M., Fernández-Ocaña, A., Valderrama, R., Palma, J.M., Carreras, A. et al. (2008) Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant Cell Physiol.* 49: 1711–1722.
- Corpas, F.J., Leterrier, M., Valderrama, R., Airaki, M., Chaki, M., Palma, J.M. et al. (2011) Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. *Plant Sci.* 181: 604–611.
- Cuadros, L., García, A.M., Jiménez, C. and Román, M. (1993) Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment. *Anal. Lett.* 26: 1243–1258.
- DeRidder, B.P., Dixon, D.P., Beussman, D.J., Edwards, R. and Goldsbrough, P.B. (2002) Induction of glutathione S-transferases in Arabidopsis by herbicide safeners. *Plant Physiol.* 130: 1497–1505.
- Díaz, M., Achkor, H., Titarenko, E. and Martínez, M.C. (2003) The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. *FEBS Lett.* 543: 136–139.
- Durner, J. and Klessig, D.F. (1999) Nitric oxide as a signal in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 369–374.
- Edwards, R., Dixon, D.P. and Walbot, V. (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* 5: 193–198.
- Espunya, M.C., Díaz, M., Moreno-Romero, J. and Martínez, M.C. (2006) Modification of intracellular levels of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase alters glutathione homeostasis and root development. *Plant Cell Environ.* 29: 1002–1011.
- Feechan, A., Kwon, E., Yun, B.W., Wang, Y., Pallas, J.A. and Loake, G.J. (2005) A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102: 8054–8059.
- Foster, M.W., Hess, D.T. and Stamler, J.S. (2009) Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends Mol. Med.* 15: 391–404.
- Foyer, C.H. and Noctor, G. (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866–1875.
- Foyer, C.H. and Noctor, G. (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid. Redox Signal.* 11: 861–905.
- Foyer, C.H. and Noctor, G. (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol.* 155: 2–18.
- Horren, A.C.F., Schrammel, A., Schmidt, K. and Mayer, B. (1996) Decomposition of S-nitrosoglutathione in the presence of copper ions and glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* 330: 219–228.
- Griffith, O.W. (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106: 207–212.
- Gucek, M., Makuc, S., Mlakar, A., Bericnik-Vrbovsek, J. and Marsel, J. (2002) Determination of glutathione in spruce needles by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16: 1186–1191.
- Holmes, A.J. and Williams, D.L.H. (2000) Reaction of ascorbic acid with S-nitrosothiols: clear evidence for two distinct reaction pathways. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*: 1639–1644.
- Iwasaki, Y., Saito, Y., Nakano, Y., Mochizuki, K., Sakata, O., Ito, R. et al. (2009) Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples. *J. Chromatogr. B* 877: 3309–3317.
- Lamattina, L., García-Mata, C., Graziano, M. and Pagnussat, G. (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 109–136.
- Lee, S., Moon, J.S., Ko, T.S., Petros, D., Goldsbrough, P.B. and Korban, S.S. (2003) Overexpression of Arabidopsis phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress. *Plant Physiol.* 131: 656–663.
- Lee, U., Wie, C., Fernandez, B.O., Feelisch, M. and Vierling, E. (2008) Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in Arabidopsis. *Plant Cell* 20: 786–802.
- Leterrier, M., Chaki, M., Airaki, M., Valderrama, R., Palma, J.M., Barroso, J.B. et al. (2011) Function of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signal. Behav.* 6: 789–793.
- Lindermayr, C., Saalbach, G. and Durner, J. (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 137: 921–930.
- Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Tohge, T., Saito, K. and Takahashi, H. (2006) Arabidopsis SLIM1 is a central transcriptional regulator of plant sulfur response and metabolism. *Plant Cell* 18: 3235–3251.
- May, M.J. and Leaver, C.J. (1993) Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant Physiol.* 103: 621–627.
- Meyer, A.J., May, M.J. and Fricker, M. (2001) Quantitative in vivo measurement of glutathione in Arabidopsis cells. *Plant J.* 27: 67–78.
- Monostori, P., Wittmann, G., Karg, E. and Túri, S. (2009) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: an in-depth review. *J. Chromatogr. B* 877: 3331–3346.
- Noble, D.R., Swift, H.R. and Williams, D.L.H. (1999) Nitric oxide release from S-nitrosoglutathione (GSNO). *Chem. Commun.* 18: 2317–2318.
- Noctor, G. (2006) Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant Cell Environ.* 29: 409–425.
- Noctor, G. and Foyer, C.H. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 49: 249–279.
- Palmieri, M.C., Lindermayr, C., Bauwe, H., Steinhauser, C. and Durner, J. (2010) Regulation of plant glycine decarboxylase by S-nitrosylation and glutathionylation. *Plant Physiol.* 152: 1514–1528.
- Park, J.-W. (1988) Reaction of S-nitrosoglutathione with sulfhydryl groups in protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152: 916–920.
- Reynaert, N.L. (2011) Glutathione biochemistry in asthma. *Biochim. Biophys. Acta* (in press).
- Rellán-Alvarez, R., Hernández, L.E., Abadía, J. and Alvarez-Fernández, A. (2006) Direct and simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione and homoglutathione by liquid

- chromatography–electrospray/mass spectrometry in plant tissue extracts. *Anal. Biochem.* 356: 254–264.
- Romero-Puertas, M.C., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Leterrier, M., Rodríguez-Serrano, M., del Río, L.A. et al. (2006) Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New Phytol.* 170: 43–52.
- Rouhier, N., Lemaire, S.D. and Jacquot, J.P. (2008) The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 143–166.
- Rustérucci, C., Espunya, M.C., Díaz, M., Chabannes, M. and Martínez, M.C. (2007) S-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in Arabidopsis, both locally and systemically. *Plant Physiol.* 143: 1282–1292.
- Smith, J.N. and Dasgupta, T.P. (2000) Kinetics and mechanism of the decomposition of S-nitrosoglutathione by L-ascorbic acid and copper ions in aqueous solution to produce nitric oxide. *Nitric Oxide* 4: 57–66.
- Stamler, J.S., Lamas, S. and Fang, F.C. (2001) Nitrosylation the prototypic redox based signaling mechanism. *Cell* 106: 675–683.
- Steffen, M., Sarkela, T.M., Gybina, A.A., Steele, T.W., Trasseth, N.J., Kuehl, D. et al. (2001) Metabolism of S-nitrosoglutathione in intact mitochondria. *Biochem. J.* 356: 395–402.
- Tada, Y., Spoel, S.H., Pajeroska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C. et al. (2008) Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* 321: 952–956.
- Takahashi, H., Watanabe-Takahashi, A., Smith, F.W., Blake-Kalff, M., Hawkesford, M.J. and Saito, K. (2000) The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 23: 171–182.
- Tsikas, D., Sandmann, J., Holzberg, D., Pantazis, P., Raida, M. and Frölich, J.C. (1999) Determination of S-nitrosoglutathione in human and rat plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection after precolumn derivatization with o-phthalaldehyde. *Anal. Biochem.* 273: 32–40.
- Valderrama, R., Corpas, F.J., Carreras, A., Fernández-Ocaña, A., Chaki, M., Luque, F. et al. (2007) H Nitrosative stress in plants. *FEBS Lett.* 581: 453–461.
- Yap, L.P., Sancheti, H., Ybanez, M.D., Garcia, J., Cadenas, E. and Han, D. (2010) Determination of GSH, GSSG, and GSNO using HPLC with electrochemical detection. *Methods Enzymol.* 473: 137–147.