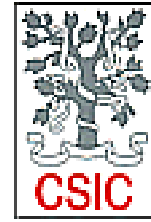




Universidad de Granada



Estación Experimental  
del Zaidín

# Infecciones virales como factor de estrés en fotosíntesis

Carlota Sajnani Pérez

Tesis Doctoral

Granada, 2005



# Infecciones virales como factor de estrés en fotosíntesis

Memoria presentada para optar al grado de Doctora por la  
Licenciada en Bioquímica Carlota Sajnani Pérez

Fdo.: Carlota Sajnani Pérez

Con el Vº Bº de la directora del trabajo:

Fdo.: Matilde Barón Ayala

Dra. en Ciencias Biológicas

Científico Titular del CSIC

EEZ (Granada)

Granada, Octubre 2005



El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica, Biología Celular y molecular de Plantas de la Estación Experimental del Zaidín de Granada (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) con la ayuda de dos becas predoctorales del CSIC para la formación y especialización en líneas de investigación de interés para el sector industrial y por una beca predoctoral del CSIC con la colaboración de Huelva de la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía. Éste ha sido financiado por los proyectos del Programa Nacional de Biotecnología BIO98-0860-CO2-02 y BIO2001-1937-CO2-02 y ayudas de la Junta de Andalucía (grupo CVI 269), así como por el proyecto del CSIC-Junta de Andalucía AMB1999-1778E.

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

- XIIth FESPP Congress. Budapest (Hungria). 2000.
- Curso de Bioenergética: Proteínas de Membrana. Sevilla. 2000.
- - Seminars in Proteomics UCO-2003. Córdoba (Spain). 2003.
- XXVI Congreso de la SEBBM, La Coruña, Septiembre 2003.
- Congreso Satélite: PHOTOSYNTHESIS and POST-GENOMIC ERA:"From Biophysics to Molecular Biology, a Path in the Research of Photosystem II". (Trois-Rivières, Québec). Canada. 2004.
- 13th International Congress of Photosynthesis. Montreal (Canada) 2004.
- XXVII Congreso de la SEBBM. Lleida, 2004.
- XII Congreso de la SEF. Lloret de Mar, Gerona. 2004.

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

- M. L. Pérez-Bueno, J. Rahoutei, C. Sajjani, I. García- Luque and M.Barón. "*Proteomic analysis of the oxygen-evolving-complex of Photosystem II under biotic stress. Studies on Nicotiana benthamiana infected with tobamoviruses*". Proteomics 2004,4,418-425.
  
- C. Sajjani, M.L. Pérez-Bueno, M. Pineda, I. García- Luque, L Nedbal, Z Benedikty, M. Roncel, J. M. Ortega, J M Ducruet, S Römer, M. Barón. *The chloroplast as target of biotic stress: damage and defence during viral pathogenesis*. En Photosynthesis: Fundamental aspects to global perspective. A van der Est and D Bruce, eds. ACG Publishing, Lawrence, KS, 610-611, 2005, P.

Abreviaturas	
Resumen	
Summary	
1. Introducción	1
1.1 La interacción planta-virus como modelo de estrés biótico en el cloroplasto.	2
1.2 Proteómica del cloroplasto	7
1.3 Técnicas biofísicas aplicadas al estudio de la fisiología vegetal.	
Detección temprana de estrés y búsqueda de nuevos indicadores ecofisiológicos.	19
1.4 Fluorescencia roja de imagen	23
1.5 Fluorescencia inducida por UV: fluorescencia verde-azul.	32
1.6 Termoluminiscencia en disco de hoja	38
1.6.1 HTL en disco de hoja	47
Objetivos	50
Objectives	51
2. Material y métodos	53
2.1 Material biológico. Hospedadores experimentales y virus.	54
2.2 Preparación de muestras para electroforesis	57
2.2.1 Obtención de membranas tilacoidales	57
2.2.2 Preparación de cloroplastos íntegros	57
2.2.2.1 Determinación de clorofila.	58
2.3 Análisis electroforético de proteínas	59
2.3.1 Análisis electroforético monodimensional	59
2.3.2 Análisis electroforético bidimensional	60
2.3.2.1 Preparación de la muestra	60
2.3.2.2 Primera dimensión (IEF) en geles de disco.	61
2.3.2.3 Primera dimensión (IEF) en tiras con gradiente de pH inmovilizado.	61
2.3.2.4 Segunda dimensión	62
2.3.3 Detección de proteínas en gel	62
2.3.3.1 Detección de proteínas mediante tinción de plata	63
2.3.3.2 Detección de proteínas mediante tinción de plata modificada para MALDI	63
2.3.3.3 Detección de proteínas mediante tinción azul Coomassie	64
2.3.3.4 Detección de proteínas mediante tinción SYPRO® Rubí	64
2.3.4 Transferencia electroforética de proteínas a membrana de nitrocelulosa (Western blotting). Inmunorrelavado	64
2.3.5 Espectrometría de masas MALDI-TOF. Identificación de proteínas mediante huella peptídica	65
2.3.5.1 Digestión en gel de proteínas y preparación de muestra para el análisis mediante espectrometría de masas	65
2.3.5.2 Huella peptídica MALDI, espectros LIFT TOF/TOF y búsqueda en bases de datos	66

2.4	Análisis del perfil de pigmentos, clorofilas y carotenoides, mediante HPLC.	66
2.4.1	Extracción de pigmentos	66
2.4.2	Determinación de clorofilas y carotenoides mediante espectrofotómetro.	67
2.4.3	Análisis de pigmentos mediante HPLC.	67
2.5	Técnicas biofísicas de diagnóstico de estrés en hoja	68
2.5.1	Fluorescencia de Imagen	68
2.5.1.1	Aparato de medida de la fluorescencia de imagen	68
2.5.1.2	Protocolo de medida	71
2.5.2	Termoluminiscencia en disco de hoja	74
2.5.2.1	Aparato de medida de termoluminiscencia	74
2.5.2.2	Protocolo de medida	76
2.5.3	Fluorescencia verde-azul en hoja	77
2.5.3.1	Aparato de medida de la fluorescencia Verde-Azul	77
2.5.3.2	Protocolo de medida	78
3.	Resultados	81
3.1	Sintomatología	62
3.1.1	Infección de <i>Nicotiana benthamiana</i> con PMMoV-S y PMMoV-I	82
3.1.2	Infección de <i>Nicotiana tabacum</i> con TMV	84
3.2	Análisis de los cambios en el contenido pigmentario de plantas de <i>N. benthamiana</i> infectadas con PMMoV y de plantas de <i>N. tabacum</i> infectadas con TMV	88
3.2.1	Contenidos totales y perfiles pigmentarios de hoja SIN y ASIN de plantas de <i>N. benthamiana</i> infectadas por PMMoV-S y PMMoV-I	89
3.2.2	Contenidos totales y perfiles de la distribución de pigmentos en hoja SIN de plantas de <i>N. tabacum</i> infectadas por TMV bajo distintos regímenes lumínicos	93
3.3	Estudio de la interacción <i>Nicotiana tabacum</i> -TMV mediante FI. Análisis del efecto de la sobreexpresión de la $\beta$ -carotínhidroxilasa en la planta.	99
3.3.1	Estudio mediante FI de la hoja ASIN	99
3.3.2	Estudio mediante FI de la hoja SIN	105
3.4	Caracterización de las bandas de TL en hoja de <i>Nicotiana benthamiana</i> . Evolución según la edad de la hoja.	112
3.4.1	Análisis de la interacción de <i>Nicotiana benthamiana</i> con PMMoV mediante TL.	116
3.4.1.1	Análisis mediante TL de la hoja ASIN	116
3.4.1.2	Análisis mediante TL de la hoja SIN	124
3.4.2	Análisis mediante HTL de la hoja ASIN y SIN	127
3.5	Medidas de BGF y compuestos que absorben en el UV en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> infectadas por PMMoV.	129
3.5.1	Caracterización de plantas de <i>N. benthamiana</i>	129
3.5.2	Estudio de la interacción de plantas de <i>N. benthamiana</i> y el PMMoV mediante BGF y análisis de compuestos que absorben en el UV	133

3.6	Análisis del proteoma cloroplastídico de <i>Nicotiana benthamiana</i> .	139
3.6.1	Expresión diferencial de proteínas en cloroplastos de planta sana e infectada por PMMoV	149
4.	Discusión	154
	Conclusiones	177
	Concluding remarks	179
5.	Bibliografía	181



## Abreviaturas

0F: cero flashes

1F: un flash

2F: dos flashes

3F: tres flashes

AB: abaxial

Ac: anticuerpo

AD: adaxial

AG/B: cociente o proporción de banda AG respecto de la banda B

ALL: alta intensidad lumínica

Antera: anteraxantina

APS: persulfato amónico

Azyg: línea de tabaco transgénica azygota

$\beta$ -car:  $\beta$ -caroteno

Banda AG: banda afterglow, resultado de la recombinación  $S_2/S_3 Q_B X^-$

Banda B: resultado de la recombinación  $S_2/S_3 Q_B^-$

Banda B<sub>1</sub>: resultado de la recombinación  $S_3 Q_B^-$

Banda B<sub>2</sub>: resultado de la recombinación  $S_2 Q_B^-$

Banda C: resultado de la recombinación  $Tyr_Z^+ Q_A^-$

BSA: albúmina sérica bovina

BGF: fluorescencia verde-azul (blue-green fluorescence)

BIL: baja intensidad lumínica

BNG: geles azules nativos blue-native gel

Cab: unión a Chl a y b (chl a-chl b binding)

Car: carotenos

Chl: clorofila

CHAPS: 3-[3-colamidopropil-dimetilamonio]-1-propanosulfonato

Cl: cloroplastos íntegros

CL: cloroplastos lisados

crtZ: línea de tabaco transgénica transformada con el gen heterólogo crtZ, que sobreexpresa la enzima  $\beta$ -carotínhidroxilasa.

D1: proteína del CR del PSII, también denominada PsbaA

DCMU: 3-(3,4-diclorofenil)-1,1 dimetilurea (diuron)

DMSO: dimetilsulfóxido

DHAP: dihidroxiacetona fosfato  
DL: descenso de luminiscencia o medida de luminiscencia isotérmica (decayed luminiscence)  
DTT: ditiotreitól  
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético  
dpi: días post-infección  
F<sub>0</sub>: fluorescencia inicial  
FI: fluorescencia de imagen  
F<sub>M</sub>: fluorescencia máxima  
FNR: Ferredoxin-NADP+-Reductasa  
FR: rojo lejano, (far-red)  
FRF: fluorescencia en el rojo lejano (far red fluorescence)  
F<sub>v</sub>/ F<sub>M</sub>: eficiencia fotosintética máxima potencial  
G3P: gliceraldehído 3 fosfato  
HPLC: high pressure liquid chromatography  
Hsp 70: proteínas chaperonas pertenecientes a la familia *heat shock* de 70kDa.  
HTL: bandas de termoluminiscencia a altas temperaturas  
IEF: isoelectroenfoque, 1ª dimensión de la técnica de geles 2D.  
IPG: inmobilized pH gradient  
LHC II: proteínas del complejo principal de antena del PSII  
log FER: logaritmo del cociente de los espectros de excitación de la fluorescencia  
Lut: luteína  
M y M: Material y Métodos  
MALDI-TOF  
MIL: moderada intensidad lumínica  
Mn: manganeso  
mRNA: RNA mensajero  
MS/MS: espectrometría de masas en tándem  
MS: espectrometría de masas  
MT: membranas tilacoidales  
NP-40 nonilfenoxipolietoxietanol  
Neo: neoxantina  
OEC: complejo de lisis/oxidación del agua (oxygen evolving complex)  
PGK: fosfoglicerato quinasa  
PMMoV-I: virus del moteado suave del pimiento, cepa italiana  
PMMoV-S: virus del moteado suave del pimiento, cepa española

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo  
PRK: fosforibulo-quinasa  
Prx: peroxirredoxina  
QA: quinona A, aceptor primario del PSII  
QB: quinona B, aceptor secundario del PSII  
Rca: rubisco activasa  
RbcL: subunidad mayor (large) de la Rubisco  
RbcS: subunidad menor (small) de la Rubisco  
RF: fluorescencia roja (red fluorescence)  
RNA: Ácido Ribonucleico  
Rubisco: ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa  
ROS: especies reactivas de oxígeno  
S<sub>0</sub>-S<sub>4</sub>: estados S de oxidación del complejo de Mn del OEC  
SBPasa: pseudoheptulosa, 1,7 bifosfatasa  
SDS: dodecilsulfato sódico  
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS  
SFBA: aldolasa pseudoheptulosa /fructosa bifosfato plastídica  
TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina  
TL: Termoluminiscencia  
T<sub>m</sub>: temperatura a la que se sitúa el máximo del pico de las curvas de inducción de TL.  
TMV: virus del mosaico del tabaco  
QSEU: unidades equivalentes de sulfato de quinina  
VAZ: pool de pigmentos del ciclo de las xantofilas, Viol + Antera + Zea.  
Viol: violaxantina  
WB: inmunodetección o Western-blot  
WT: wild type  
Zea: zeaxantina

# Resumen

En trabajos previos del grupo se ha demostrado que la infección por el virus del moteado suave del pimiento (PMMoV) induce un descenso en los niveles de diversas proteínas del PSII, así como un cambios en la expresión de diversos genes de proteínas cloroplastídicas, tanto de codificación nuclear como cloroplastídica. Asimismo las técnicas de imagen de fluorescencia emitida por la clorofila (Chl FI) demostraron ser de gran utilidad para realizar un seguimiento de la infección viral y de los mecanismos de defensa que el cloroplasto desarrolla durante ésta.

Los sistemas huésped-patógeno utilizados en este estudio ha sido *Nicotiana benthamiana* infectada por las cepas españolas e italiana del virus del moteado suave del pimiento (PMMoV-S, PMMoV-I) y *Nicotiana tabacum* infectada por el virus del mosaico del tabaco (TMV). Adicionalmente se ha empleado una línea de tabaco transgénica (crtZ) que sobreexpresa la  $\beta$ -carotínhidroxilasa.

Para el estudio del estrés por virus en plantas de *N. benthamiana* hemos empleado dos técnicas biofísicas que permiten realizar (al igual que la Chl FI) las medidas en hoja: la termoluminiscencia (TL) y la fluorescencia verde-azul (BGF), también denominada fluorescencia de la Chl inducida por UV. La TL reveló cambios en la Banda B, banda C y de forma significativa en la banda AG. También se midió la TL de alta temperatura (HTL) en hoja infectada con la que detectamos bandas (HTL2), indicativas de estrés oxidativo. Sin embargo estos cambios afectaron de forma diferente a la hoja joven sintomática que a la hoja madura que no muestra síntomas (hoja asintomática) de planta infectada. Las medidas de BGF nos permitieron detectar un incremento de dicha fluorescencia en la cara adaxial y sobre todo en la abaxial de la hoja joven y de la madura tras dos semanas de inoculación. Además, estas medidas mostraron que en la cara adaxial de la hoja infectada, comparada con la sana, se acumulan compuestos que absorben en la región del UV. Este fenómeno se detectó en la hoja joven antes incluso de que los síntomas de la infección fueran visibles.

La Chl FI se ha empleado en este trabajo para el estudio de un segundo sistema huésped-patógeno, plantas de *Nicotiana tabacum* infectadas por TMV. En este caso se analizaron, bajo

diferentes regímenes lumínicos, plantas sanas e infectadas de la línea salvaje de tabaco (WT) y de una línea transgénica (crtZ), que sobreexpresa la enzima  $\beta$ -carotínhidroxilasa que le permite fabricar mayores cantidades de zeaxantina (Zea). Las imágenes de NPQ (quenching no fotoquímico) que mide la energía disipada en forma de calor y no empleada en fotosíntesis, y las de  $\Phi$ PSII (rendimiento cuántico del PSII) apuntan a que la línea de tabaco crtZ sometida simultáneamente a ambos factores de estrés (lumínico e infección viral) no presenta ventajas frente a la WT. Ello estaría de acuerdo con los datos de los perfiles pigmentarios de estas plantas obtenidos mediante HPLC, que tampoco presentaron diferencias significativas.

Por último, en esta Tesis Doctoral nos hemos planteado un primer acercamiento al proteoma del cloroplasto de *N. benthamiana*, comparando también las diferencias en los niveles de expresión de las proteínas cloroplastídicas entre muestras infectada por *tobamovirus* y muestras de planta sana. Se han identificado positivamente un total de 55 manchas proteicas en geles 2D de muestra de cloroplastos, de las cuales 26 disminuían en muestra infectada. Las proteínas afectadas por la infección aquí descritas, pertenecen principalmente a la CTE y al Ciclo de Calvin.

# Summary

Our research group has shown in previous works that the infection of *N. benthamiana* plants with the pepper mild mottle virus induces a decrease of the levels of some chloroplastidic proteins and their encoding mRNAs. Additionally, the chlorophyll fluorescence imaging (Chl-FI) appeared as a useful tool to follow plant virus infection, as well as to analyse the protective mechanisms developed by the chloroplast against biotic stress.

The two host-pathogen systems used in our studies were *Nicotiana benthamiana* infected with the Spanish and Italian strains of pepper mild mottle virus (PMMoV-S, PMMoV-I), and *Nicotiana tabacum* infected with the tobacco mosaic virus (TMV). In addition, we have worked with a tobacco transgenic line (crtZ), which overexpress the  $\beta$ -carotinhydroxylase.

To study biotic stress induced by the virus in *N. benthamiana* plants, we have used two biophysical techniques: thermoluminescence (TL) and blue-green fluorescence (BGF), also called UV-induced chlorophyll fluorescence. TL shows changes in the B band, C band and largely in the AG band. We have also measured high temperatures TL bands (HTL2) in infected leaves, indicative of oxidative stress. The changes observed depend on the type of leaf: mature asymptomatic leaves (ASIN) or young symptomatic leaves (SIN). After two weeks of inoculation, we have detected BGF increase in the adaxial side and even stronger in the abaxial side of both young and mature leaves. These experiments also show a high accumulation of UV-absorbing compounds in the adaxial side of young leaves from infected plants before the symptoms appearance.

Chl-FI was used in this work to study the second host-pathogen system, *N. tabacum* plants infected with TMV. In this case, controls and infected wild type (WT) and transgenic (crtZ) tobacco plants were analyzed under different growing light conditions. NPQ (non-photochemical quenching) images and  $\Phi$ PSII (PSII quantum yield) images do not show any significant differences. NPQ indicates the part of the absorbing energy non used in photosynthesis and dissipated as heat. These data provide evidence that the crtZ tobacco do not present advantages compared with the WT tobacco against the stress combination used (light and virus infection).

In addition, we have carried out in this work a first approach to the chloroplast proteome of *N. benthamiana*, analysing also the viral-induced changes. We could identify 55 spots corresponding to 29 proteins in 2D gels of chloroplastidic samples. 26 of these spots, corresponding to 13 different proteins, exhibit decreased levels in samples from infected plants; most of them belong to the Calvin cycle and the electron transport chain.





# 1 Introducción

## 1.1 La interacción planta-virus como modelo de estrés biótico en el cloroplasto.

A pesar de la dificultad que plantean los estudios de estrés biótico en plantas por la variabilidad de sus consecuencias fisiológicas y el control de su aplicación (Balachandran y col. 1997), un fenómeno muy bien documentado es la disminución de la fotosíntesis del huésped durante la infección (Goodmann, 1986). Así ocurre en el caso de ácaros (Lin y col. 1999), hongos (Chou y col. 2000, Scholes y col. 1994; Scholes y Rolfe 1996) y virus (Balachandran y Osmond, 1994; Balachandran y col. 1994; 1997b ; Lohaus y col. 2000; Osmond y col. 1998; Rahoutei y col. 2000).

Los mecanismos concretos a través de los cuales los virus inhiben la fotosíntesis en la planta huésped son en gran parte desconocidos. Algunos estudios se han centrado en el efecto del patógeno sobre las reacciones fotosintéticas primarias, especialmente en el PSII (Naidu y col., 1984a y b; Goodman y col., 1986; Hodgson y col., 1989; Gunasinghe y Berger, 1991; Reinero y Beachy, 1986 y 1989; Banerjee y col., 1995). Tema que también ha ocupado a nuestro grupo en trabajos de colaboración con el de la Dra. García Luque (CIB,CSIC) (Barón y col., 1995; Rahoutei y col., 1998, 1999 y 2000; Rahoutei, 2000; Pérez Bueno, 2003; Pérez Bueno y col , 2004). La inhibición del transporte electrónico fotosintético observada en plantas infectadas ha sido atribuida bien a la interacción de algún componente viral, como la proteína de cubierta (CP), con el PSII (Reinero y Beachy, 1986, 1989; Banerjee y col., 1995) o alternativamente, a un descenso en los niveles de proteínas constituyentes del PSII (Lehto y col. 2003), principalmente las relacionadas con el OEC (Naidu y col, 1986; Takahashi y col., 1991; Takahashi y Ehara, 1992; Rahoutei y col. 2000; Rahoutei, 2000; Pérez-Bueno, 2003; Pérez-Bueno y col. 2004).

Los trabajos de nuestro grupo en colaboración con el del CIB realizados con *N. benthamiana* infectada por distintos tobamovirus (PMMoV, PaMMV) señalan que el OEC, es uno de los principales puntos de acción en la CTE de la infección viral (Rahoutei y col., 1999 y 2000; Rahoutei 2000) y que la infección viral induce un descenso en los niveles de sus proteínas constituyentes – preferentemente PsbP y PsbQ- y de sus correspondientes transcritos durante el desarrollo de los síntomas (Rahoutei y col., 1998; Rahoutei, 2000). Para algunos autores (Takahashi y col., 1991; Takahashi y Ehara, 1992)

la inhibición parcial de la actividad oxigénica por un descenso diferencial en los polipéptidos OEC podría estar asociada a los procesos moleculares primarios de expresión de síntomas en algunas combinaciones huésped-parásito. También fueron detectados cambios en la acumulación de las proteínas OEC en plantas sometidas a estrés abiótico (Barón y col., 1995). Abbink y col. 2002, han demostrado un descenso en los niveles de transcrito de la proteína PsbO del PSII por la infección con TMV, presentando asimismo la helicasa de TMV una gran afinidad por esta proteína del OEC. Bertamini y Nedunchezian (2004) apoyan nuestras conclusiones de un daño en el lado donador del PSII debido a la infección viral en experimentos realizados con vid infectada con el virus del enrollado de la vid (grapevine leafroll virus, GLRV).

Nuestros estudios revelan también la existencia de familias proteicas en *N. benthamiana* para las proteínas OEC y que las isoformas de las proteínas PsbP se ven influidas de forma diferencial por la infección viral (Rahoutei y col., 1998; Pérez-Bueno, 2003; Pérez Bueno y col, 2004). Asimismo, se mostró que la regulación de las tres proteínas pertenecientes al OEC ocurre a nivel transcripcional durante la patogénesis (Pérez-Bueno, 2003; Pérez-Bueno y col. 2003). Un fenómeno similar ha sido descrito en plantas de tabaco infectadas con cucumovirus (Takahashi y Ehara, 1992), indicando la existencia de mecanismos reguladores de la expresión de estas proteínas durante la patogénesis. El análisis adicional de los niveles de expresión de diversas proteínas cloroplásticas durante la patogénesis permite afirmar que la inhibición de los genes cloroplásticos es posterior a la de los genes nucleares en plantas de *N. benthamiana* infectadas por PMMoV.

Para algunos autores (Lindbeck y col., 1991; Dawson, 1992) la interferencia de ciertos componentes virales con procesos tales como la síntesis o el transporte al cloroplasto de proteínas del PSII y/o del ciclo de Benson-Calvin codificadas en el núcleo, podría ser el mecanismo responsable de las alteraciones en el cloroplasto durante el proceso de infección viral.

Otros grupos de investigación han estudiado preferentemente la acción de los virus vegetales más allá de las etapas lumínicas en procesos como el ciclo de Calvin y enzimas implicadas, la síntesis de almidón y el transporte de fotoasimilado (rev Balachandran 1997a, Hull, 2002). Se ha detectado que en las plantas infectadas se producen graves alteraciones en el metabolismo de carbohidratos (acumulación de almidón y azúcares solubles en hoja), y en su transporte a través del floema. Ello

podría afectar la expresión génica y rutas metabólicas del huésped, y llevar a una síntesis deficiente de complejos, enzimas y pigmentos fotosintéticos en la planta infectada (Balachandran y col., 1997a ; Havelda and Maule, 2000; Herbers y col., 2000; Scholes y col., 1994; Wright y col., 1995).

La retroinhibición de la fotosíntesis (Krapp and Stitt, 1995), la regulación de la expresión génica (Herbers *et al.*, 2000. *ibid*) e incluso la represión transcripcional de genes fotosintéticos (Sheen,1990) por azúcares –directa o indirectamente- ha sido documentada por diversos grupos. Es también conocido que la iluminación de tejidos con alto contenido en carbohidratos puede llevar a una sobre-reducción de la cadena de transporte electrónico y desorganización del aparato fotosintético a través de efectos selectivos sobre la expresión génica de proteínas de membrana y estromáticas (Maxwell y col., 1995; Berger y col. 2004; Oswald y col.2001 y referencias incluidas). Para Osmond y col.. (1998, 2000) es todavía una incógnita si el control de la expresión génica en las plantas infectadas se realiza por señales redox o por los niveles de carbohidratos. Herbers *et al.* (2000) muestran en infección con potyvirus una regulación transcripcional de genes *cab* (LHCII) y *rbcS* de la RuBisCo, ya en las fases tempranas de la infección.

También se ha visto que la infección viral puede afectar procesos como los de apertura estomática o difusión en el mesófilo, que controlan la asimilación de CO<sub>2</sub>, (Sampol y col.2003 ).

Por su parte, Hofius y col (2001) establecen una relación entre la cantidad de proteína de movimiento (MP17) del virus PLRV (phloem-restricted potato leafroll virus o virus del enrollado de la patata) y el contenido de azúcares en hoja madura o *fuelle* en plantas de tabaco, fenómeno que no estaría únicamente vinculado a la asociación de la misma con los plasmodios, sino como resultado de efectos pleiotrópicos que MP17 causa en la célula. Para algunos autores, el continuo aporte de nutrientes al patógeno, que emplea la maquinaria celular del huésped para replicarse, lleva a una alteración en la distribución del fotoasimilado dentro de la planta (Lucas y col., 1993). Adicionalmente, la demanda del tejido infectado se incrementa debido a la activación de los mecanismos de defensa y síntesis de proteínas inducidas por el estrés (Ayres, 1992; Balachandran y col., 1997a y b).

Suele ser habitual en la naturaleza que la infección por patógenos vaya acompañada de la acción de otros factores de estrés abiótico sobre la planta, lo que lleva a un sinergismo negativo sobre el proceso fotosintético (Lichtenthaler, 1996; Balachandran y Osmond, 1994; Balachandran y col.

1997; Osmond y col. 1990; Funayama y col., 2001). Algunos autores encuentran que la infección viral impide la aclimatación de las plantas a condiciones lumínicas más extremas, acelera el desarrollo de síntomas y predispone a sufrir fenómenos de fotoinhibición (Osmond y col. 1990). Sin embargo, Funayama y col.(2001) comprueban que en plantas de *Eupatorium makinoi* infectadas con geminivirus que crecen en ambientes sombreados se aceleran los efectos de la infección viral sobre la floración y supervivencia, ya que existe una reducida capacidad fotosintética.

Desde la perspectiva del proceso fotosintético, la respuesta del cloroplasto a la infección por patógenos tiene algunos patrones comunes con la que presenta frente a factores de estrés abiótico como el exceso de luz, ya que los procesos fotoprotectores y fotoinhibitorios juegan un papel fundamental en las alteraciones que los patógenos inducen en las plantas, así como en su interacción con otros factores abióticos (Goodman y col., 1986; Barón y col., 1995; Balachandran y col., 1997a; Rahoutei y col., 2000).

En otro aspecto, destacan los estudios realizados sobre factores de transcripción vinculados a las respuestas a estrés de la planta que confirman el solapamiento de las respuestas a diferentes factores de estrés en la compleja red de señales de regulación (Escaler y col. 2000; Pastori y Foyer, 2002; Singh y col. 2002 y referencias incluidas; Chen y col. 2002; Glombitza y col. 2004). Como ejemplo, tenemos la identificación del gen *Tsi1*, en tabaco, que codifica un factor de transcripción que induce resistencia a ataque por patógeno (bacteria) y a estrés salino (Park y col. 2001).

El proceso de infección por patógenos va a estar modulado específicamente por las condiciones lumínicas de crecimiento del vegetal (Karpinski y col. 2003). Durante el fotoperiodo, en condiciones naturales, el cloroplasto ha de adaptarse a las altas y bajas intensidades lumínicas para optimizar el uso de la luz absorbida en fotosíntesis, mantener un estado energético óptimo, balance NADPH/ATP, y minimizar la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que se derivan de estos procesos. Esto implica, a su vez el establecimiento de un equilibrio entre los llamados mecanismos fotoprotectores, que tratan de disipar la energía de excitación en exceso no utilizable en fotosíntesis y los mecanismos fotoinhibitorios, cuando se excede la capacidad de fotoprotección y antioxidante de la planta (van Kooten y col., 1990; Balachandran y Osmond., 1994; Balachandran y col. 1997 Rahoutei y col., 2000; Chow y col. 2002).

Hay que señalar, que los ROS, además del daño que potencialmente pueden causar, son necesarios para inducir las respuestas defensivas del vegetal, como es la propia inhibición de la actividad del PSII para su protección (Fryer y col. 2003; Mullineaux y Karpinsky, 2002; Karpinski y col. 2003) e incluso lo que Karpinsky y col. (1999), denomina una “respuesta sistémica de aclimatación adquirida”. Los ROS se proponen como uno de los vínculos entre estrés biótico y abiótico (Dat y col.2000).

Al aparato fotosintético puede asignársele actualmente una función dual, fijando la energía solar y actuando como un sensor ambiental mediante la generación de las señales redox que pueden actuar en conexión con las de otros compartimentos celulares para regular la expresión de los genes fotosintéticos cloroplastícos e incluso nucleares como respuesta a distintos factores de estrés (Pfannschmidt, 2003) Existen estudios que proponen un modelo muy interesante de señalización, a partir de la detección del exceso de luz por parte del cloroplasto, que implica a componentes de la CTE como las plastoquinonas, los ROS, proteínquinasas, enzimas reguladas via grupos tiol (por ejemplo, tiorredoxinas), precursores de la clorofila y a la cubierta del cloroplasto (Mullineaux y Karpinski, 2002). También hay autores que estudian la activación bajo estrés biótico de toda una cadena de kinasas que conforman una compleja red celular, cuya identificación y comprensión se está realizando a través de la fosfoproteómica (Peck ,S. 2003 y referencias incluidas).

En la compleja red de interacciones virus -huésped, en la que el cloroplasto juega un importante papel, existen efectos de la infección viral que se describieron tempranamente, como son los cambios en la ultraestructura cloroplastídica y el contenido de pigmentos fotosintéticos (Goodmann et al. 1986).

La clorosis es uno de los síntomas más habituales de la infección viral y puede ir asociada a una disminución de la síntesis de clorofila o a un aumento de la degradación de la misma (Bailliss, 1970; Balachandran y col., 1997b; Almási y col., 2000; Balachandran y col. 1997). También se ha propuesto que en hojas jóvenes exista un bloqueo del desarrollo cloroplastídico durante la infección viral, que conduzca a un descenso en el contenido de pigmentos (cita Asti con Bela, quizás). La disminución en el contenido de clorofilas en plantas infectadas puede regular a la baja la formación de complejos pigmento-proteína de ambos fotosistemas (White y Brakke, 1983; Koiwa y col., 1992;

Funayama y col., 1997a y b Almási y col., 2001). Lehto y col. 2003 proponen a partir de experimentos realizados en plantas de tabaco infectadas con la cepa *flavum* de TMV, que la degradación de los pigmentos fotosintéticos durante la infección es una consecuencia del descenso del contenido de determinadas proteínas del PSII, que impedirían la adecuada formación de nuevos complejos de membrana.

En cuanto a los cambios más evidentes en la estructura de cloroplasto durante el desarrollo de los síntomas de la infección viral son: variaciones en el contenido de pigmentos, fragmentación del orgánulo, aparición de grandes vesículas y disminución del tamaño de los *grana*, aumento del tamaño y número de plastoglobulos, invaginaciones citoplasmáticas y acumulación de fitoferritina y almidón (Conti y col., 1972; Russo y Martelli, 1981; Koiwa y col., 1989; Almási y col., 1996 y 2001).

## 1.2 Proteómica del cloroplasto

### *Proteómica vegetal*

El término *proteómica*, acuñado originalmente en el meeting de Electroforesis 2D de Siena (1994) (William y Hochstrasser, 1997), hacía referencia a proteínas expresadas por un genoma. Actualmente comprende una amplia área de investigación que no está centrada únicamente en la expresión de proteínas y que incluye disciplinas complementarias muy variadas como el screening o rastreo de mutantes, estudios de niveles de expresión de RNA, análisis de la interacción proteína-proteína, estudios de las modificaciones postraduccionales y la determinación de la estructura de proteínas.

La proteómica puede emplearse hoy para conocer la expresión diferencial de un conjunto de proteínas en diferentes estados fisiológicos de un organismo (“differential display”), para conocer su localización subcelular, así como las posibles modificaciones postraduccionales y/o postranscripcionales. Puede utilizarse para la identificación de proteínas a gran escala o para la determinación de subproteomas de orgánulos o complejos proteicos concretos (Schröder and Kieselbach, 2003).

Por todo ello, surgió la necesidad de redefinir el término proteómica en la que se ha denominado era de la postgenómica, sugiriéndose que “*la proteómica representa el esfuerzo para*

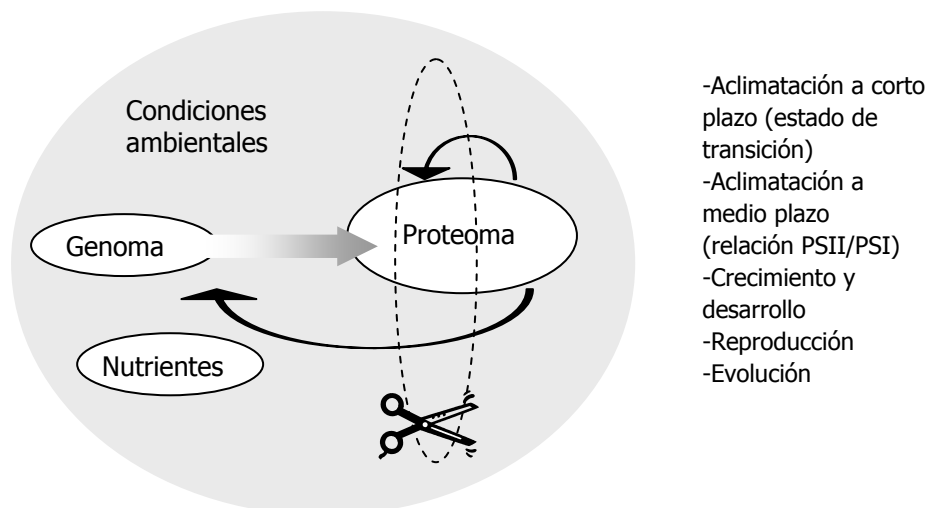


Fig 1: El flujo de nutrientes y energía a través de la transcripción, la traducción y la degradación de proteínas está controlado por el código genético y numerosos factores que influyen en la expresión.

La estrategia de la proteómica actual toma de forma destructiva una parte de todo el proteoma completo, un punto de referencia en un momento concreto (representado por la elipse vertical y la tijera), lo que apunta a las múltiples posibilidades de esta técnica en cuanto a la separación espacial de miles de moléculas diferentes. (Figura extraída de Whitelegge, 2003)

establecer las identidades, cantidades, estructuras y funciones bioquímicas y celulares de todas las proteínas pertenecientes a un organismo, órgano u orgánulo y cómo estas propiedades varían en el espacio, el tiempo y en las distintas condiciones fisiológicas.” (Kenyon y col., 2002).

Siendo ésta una disciplina emergente, genera un elevado número de publicaciones; pero llama la atención que en los últimos años sólo aproximadamente un 5% de éstas, se refieren a la proteómica vegetal (Schröder and Kieselbach, 2003). Para obtener más información con estos estudios se ha iniciado el análisis de los subproteomas de orgánulos vegetales como el cloroplasto, responsable del proceso fotosintético, y en el que nos centraremos en este apartado

Evidentemente las técnicas de espectrometría de masas han sido fundamentales en el desarrollo de la disciplina proteómica (revisiones: Tyers y Mann, 2003; Aebersold y Mann, 2003), como también lo han sido las bioinformáticas, ya que las predicciones en la identidad de las proteínas



se apoyan en la información disponible en las distintas bases de datos de secuencias, tales como: NCBI (National Institute for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), EBI European Bioinformatics Institute: <http://www.ebi.ac.uk/Databases/proteomic.html>).

La proteómica vegetal ha recibido un impulso notable con la secuenciación del genoma completo de plantas como *Arabidopsis thaliana*, como modelo de dicotiledónea, (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), cuya información se encuentra disponible en la web de The Arabidopsis Information Resource (TAIR) (<http://www.arabidopsis.org>) (Huala y col. 2001). Ello ha permitido realizar análisis globales del conjunto de proteínas predecibles para dicha planta y su comparación con las de otros organismos. También existe un borrador del genoma de arroz (*Oryza sativa*), como modelo de monocotiledónea (Goff y col., 2002; Yu y col., 2002) y se espera que a finales del 2005 se complete este estudio (TIGR genome rice annotation: <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/index.shtml>). En las mismas fechas podría finalizar también la secuenciación del genoma de *Populus trichocarpa*, como modelo de planta arbórea (<http://genome.jgi-psf.org/Poptr1/Poptr1.home.html>).

Algunos ejemplos de bases de datos específicas de plantas son: PPdb (Plastid proteome database, <http://ppdb.tc.cornell.edu/>; Sahnoun y col. 2000), Plastid Protein DB (PL\_prot, <http://www.pb.ipw.biol.ethz.ch/>) u otras más recientes como la PROTICdb (<http://moulon.inra.fr/~bioinfo/PROTICdb>; Ferry-Dumazet y col. 2005), entre otras.

Las predicciones *in silico* de las secuencias génicas, cuya elaboración es muy compleja, en ocasiones han de ser corregidas y revisadas manualmente, como por ejemplo a partir de secuencias RNAm (Haas y col., 2002). La proteómica también puede emplearse para esta tarea, así como identificar proteínas para las que no se había descrito ningún gen (Schubert y col., 2002).

La técnica más usada inicialmente para el análisis del proteoma cloroplastídico fue la basada en geles 2D, donde se realiza un isoelectroenfoco (IEF) para la primera dimensión, seguido de geles SDS-PAGE, y que se ha aplicado con éxito, entre otros, para las proteínas periféricas del tilacoide y las solubles del estroma y el lumen (Kieselbach y col. 1998, Peltier y col. 2000, 2002). Para obviar los problemas de solubilización que presentan las membranas cloroplastídicas por su abundancia en proteínas hidrofóbicas, diversos autores han investigado protocolos alternativos como la extracción selectiva en disolventes orgánicos para estudiar las proteínas de la cubierta del cloroplasto (Ferro y

col. 2002) o membranas tilacoidales o el método de partición en TTP para estas últimas preparaciones (Friso et al. 2004); Peltier y col. 2004b). Una revisión práctica sobre diversos protocolos y recomendaciones para solubilización de la muestra, aunque no específico de plantas, ha sido publicada por Shaw y Riederer (2003).

Una opción muy atractiva para mejorar la primera dimensión es sustituir el IEF por los blue-native gels (BNG) (Schagger y col. 1994; Ciambella y col. 2005; Aro et al. 2005), mediante el que se solubilizan las membranas con detergentes no desnaturizantes y mantienen por ello la integridad de los complejos fotosintéticos. Preservar el estado oligomérico de los distintos complejos proteicos ayuda a obtener información acerca de las interacciones proteína-proteína (Whitelegge y col., 2003).

También se está empleando la llamada proteómica sin geles con técnicas de separación cromatográfica como la cromatografía bidimensional (SCX/RP) o tridimensional (SCX/avidina/RP) (Aebersold y Mann, 2003), de mezclas de péptidos procedentes de digestiones tripticas, para su posterior identificación mediante MS. Recientemente se ha publicado un análisis multidimensional para la identificación de proteínas integrales de membrana, altamente hidrofóbicas, pertenecientes al PSI y PSII gracias a un cálculo muy preciso del Pm de las proteínas intactas y posterior comparación con el Pm teórico deducido de su DNA o su secuencia proteica conocida (Huber y col. 2004). Tal vez una de las principales desventajas de estas últimas técnicas sea su alto coste.

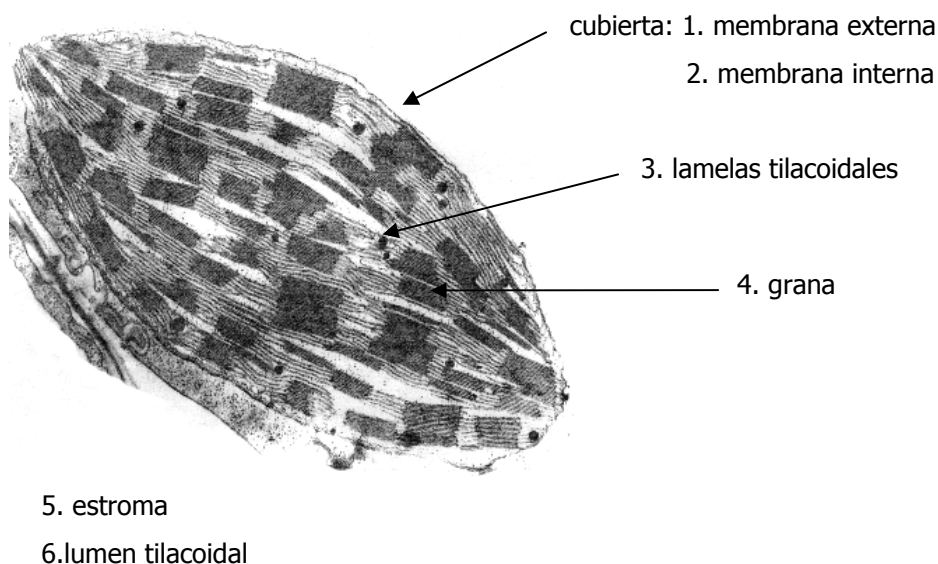
Tanto para la proteómica basada en geles como para la que no los utiliza, el análisis cuantitativo significa un problema, resuelto sólo en parte mediante microcapilaridad (m-LC) y MS/MS (Zhou y col. 2004). Nuevas perspectivas se abren con el desarrollo de la 2-D-DIGE (2-D difference electrophoresis) que utiliza fluoróforos con distintas características espectrales para diferenciar dos tipos de muestras en un único gel 2D. Una revisión acerca del tema la encontramos en Marouga y col. 2005. Una alternativa sin geles es la cuantificación por MS usando marcaje isotópico diferencial ICATS (isotope-coded affinity tags), en la que se marcan los residuos cisteína de las proteínas con cantidades determinadas de las formas ligeras y pesada de un determinado isótopo, para posteriormente aislar los péptidos marcados por cromatografía de afinidad y analizarlos por LC-MS/MS.

En el último año se han publicado diversas revisiones sobre proteómica de plantas (Rose y col. 2004, Newton y col. 2004, Park 2004, Baginsky y Gruijsem 2004, van Wijk 2004), en las que se coincide en la gran dificultad que conlleva esta tarea, pero se muestra optimismo de cara al futuro por los más recientes avances tecnológicos.

#### *Proteoma y subproteomas del cloroplasto*

Al orgánulo fotosintético puede asignársele actualmente una función dual, fijando la energía solar y actuando como un sensor ambiental mediante la generación de señales redox que pueden actuar en conexión con las de otros compartimentos celulares, para regular la expresión de los genes fotosintéticos cloroplastídicos e incluso nucleares como respuesta a distintos factores de estrés (Pfannschmidt, 2003). Por lo tanto, el conocimiento del proteoma cloroplastídico constituye un excelente punto de partida para analizar su modulación por distintos factores ambientales de estrés.

Pero en la estructura cloroplastídica distinguimos 3 tipos de membranas (tilacoidal y envelope



*Fig 2: El cloroplasto fotografiado mediante m.e. y sus distintos compartimentos susceptibles de ser estudiados por separado mediante la proteómica.*

externo e interno) y un total de 6 compartimentos diferentes (ver Fig 2), lo que dificulta el análisis proteómico; de modo que en los últimos años se ha abordado el estudio de subproteomas de compartimentos cloroplastídicos o de grupos de proteínas. Así encontramos en la literatura distintas aproximaciones al proteoma del envolope cloroplastídico, la membrana tilacoidal, el lumen y las proteínas periféricas. Un buen ejemplo son una serie de publicaciones en las que el grupo de van Wijk, analizan sistemáticamente el proteoma del tilacoide de *A. thaliana* (van de Wijk 2004 y referencias incluidas). Van Wijk (2004) en esta revisión resume y compara gran parte de los trabajos más destacados (mencionados a lo largo de este apartado) realizados sobre proteoma del cloroplasto.

Con todos esos datos que se han obtenido, él realiza una estimación (ver Fig 3) de la información disponible sobre las funciones de las proteínas cloroplastídicas.

El envolope del cloroplasto lo conecta con el citoplasma (Rolland y col. 2003; van Wijk, 2004), controlando el transporte de iones, metabolitos y proteínas en ambos sentidos. Está formado por una membrana externa, una membrana interna y el espacio intermembranal. Aquí se localiza la maquinaria biosintética de los lípidos polares (galactolípidos, sulfolípidos, fosfolípidos), pigmentos (carotenoides y clorofilas) y prenilquinonas (plastoquinonas y tocoferol) ( Rolland y col. 2003); también está implicado en la replicación del ADN y la transcripción del genoma cloroplastídico, así como en el transporte de proteínas cloroplastídicas de codificación nuclear. La formación de un cloroplasto requiere de la expresión de genes nucleares y plastídicos, y en la coordinación de esta expresión va a jugar también un papel fundamental la cubierta del cloroplasto (Rolland y col. 2003; van Wijk, 2004).

La membrana tilacoidal, recorre el cloroplasto, y se organiza formando estructuras apiladas o grana y no apiladas (tilacoides del estroma). En ésta se integran los 4 macrocomplejos proteicos que llevan a cabo el transporte electrónico fotosintético: fotosistema II (PSII), citocromo  $b_6/f$  (Cit  $b_6/f$ ), fotosistema I (PSI) y ATP-asa (ver Fig 4). Asimismo, se encuentran presentes otras proteínas responsables de la biogénesis y regulación de estos complejos. La cadena de transporte electrónico fotosintético lleva a cabo la producción de ATP y NADPH, que serán posteriormente utilizados en la síntesis de carbohidratos mediante el Ciclo de Benson-Calvin y otras rutas metabólicas que tienen lugar en el estroma.

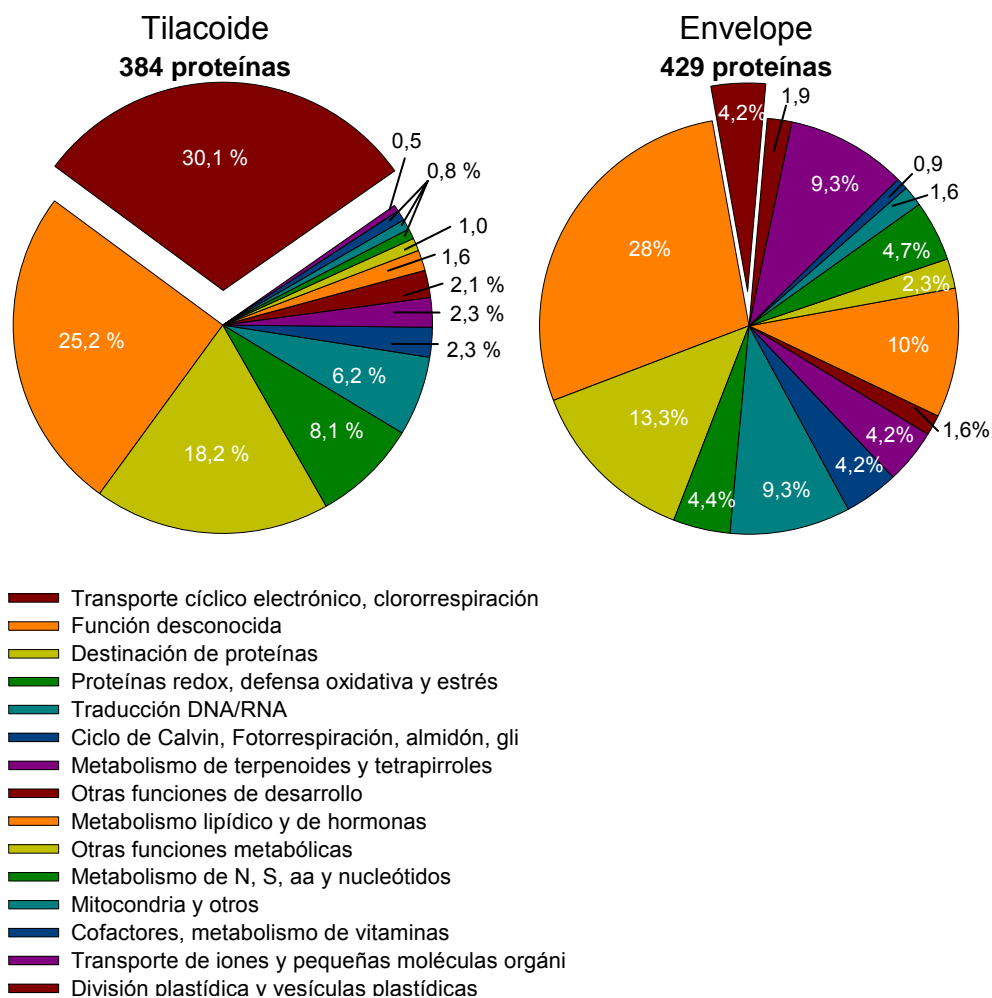


Fig 3: Clasificación funcional del proteoma del tilacoide y el envelope, expresado en porcentaje respecto al total. Los diagramas se leen en sentido contrario a las agujas del reloj, empezando por el sector que sobresale. Datos tomados de la revisión de van Wijk, (2004b) el cual realiza una estimación a partir de los trabajos más sobresalientes que se han realizado sobre estos dos subproteomas.

El estroma es un compartimento cloroplastídico con alto contenido proteico bien conocido por su implicación en la asimilación de C, N y S. Aparte de su papel en fotosíntesis, resulta esencial en la

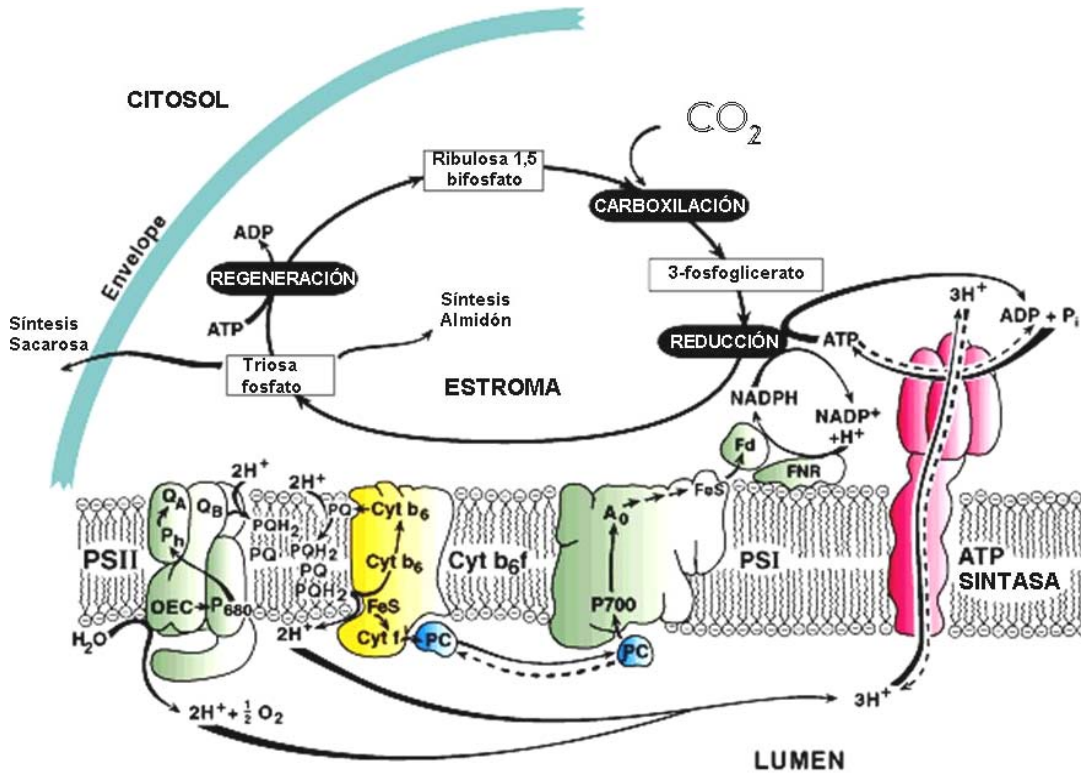


Fig 4: La cadena del transporte electrónica formada por los 4 macrocomplejos proteicos embebidos en la membrana tilacoidal del cloroplasto: PSII, PSI, Cyt<sub>b</sub>/f y la ATPsintetasa. Ésta produce el ATP y el NADPH que serán posteriormente utilizados por el Ciclo de Benson-Calvin. (Figura extraída de <http://www.life.uiuc.edu/pru/labs/ort.html>, autor: Donald Ort)

síntesis de hormonas, ácidos grasos y lípidos, aminoácidos, vitaminas (B1, K1 y E), nucleótidos, y metabolitos secundarios como alcaloides e isoprenoides. Además de todas las enzimas necesarias para llevar a cabo los anteriores procesos biosintéticos, el estroma contiene la maquinaria transcripcional y traduccional del orgánulo (Schröder y Kieselbach, 2003; van Wijk, 2004 y referencias incluidas).

Hay que recordar que una de las características principales de los cloroplastos, es su semiautonomía, colaborando en su desarrollo y función el genoma nuclear y el propio del orgánulo de forma coordinada.

Un porcentaje importante de los estudios realizados y publicados sobre el proteoma y subproteomas del cloroplasto, están realizados en *Arabidopsis*. A continuación se detalla la información existente sobre los subproteomas de distintos compartimentos cloroplastídicos, cubierta o envelope, lumen y membrana tilacoidal; también se discuten trabajos con un abordaje más global considerando hoja y cloroplasto íntegro.

#### *Proteómica de hoja y de cloroplasto*

El análisis de hoja completa o cloroplastos íntegros, es una forma teórica ideal de abordar la proteómica del aparato fotosintético, pero resulta de una gran complejidad por su alto contenido en proteínas de membrana. Según diferentes predicciones realizadas en *A.thaliana*, más de unos 4000 genes estarían implicados en el desarrollo y función del cloroplasto, un 15% de un total de 27.000 genes aproximadamente. El correspondiente número de proteínas a analizar, excede claramente la capacidad de un gel 2D. El alto contenido en Rubisco y LHC II en la muestra, dificulta además la detección de proteínas que se encuentran en pequeñas cantidades.

No obstante, existen trabajos en los que se ha abordado la hoja completa. Bahrman y col. (2004) y Donelly y col. (2004) han contribuido con sendos trabajos a la caracterización del proteoma de la hoja de trigo (*Triticum aestivum* L.) y Wilson y col. (2002) ha estudiado los cambios en la expresión de proteínas en hoja durante la senescencia.

Utilizando también geles 2D y un posterior análisis mediante MALDI-TOF-MS, se han analizado, las variaciones en el patrón proteico de la hoja de arroz afectada por una infección fúngica (Kim y col., 2004), o de plántulas de *Arabidopsis* bajo deficiencia de K<sup>+</sup> (Kang y col., 2004). Respecto al análisis del proteoma cloroplastídico completo, se han realizado estudios en *Arabidopsis* sometida a estrés lumínico (Phee y col., 2004).

Kleffmann y col., (2004) examinan el proteoma del cloroplasto de *Arabidopsis* mediante técnicas proteómicas no basadas en geles 2D, lo que también se ha denominado proteómica "shotgun" Partiendo de cloroplastos purificados y mediante cromatografía multidimensional y espectrometría de masas en tandem (MS/MS), llegan a identificar hasta 690 proteínas cloroplastídicas, el 70% de las cuales tiene una función conocida y la mayoría de ellas está relacionadas con el proceso fotosintético. Paralelamente analizan los niveles de transcrito (RNA

profiling) de numerosas proteínas y lo emplean para predecir la actividad e importancia de distintas rutas metabólicas del cloroplasto. Este estudio ha merecido duras críticas en van Wijk (2004).

*Proteómica de la cubierta del cloroplasto*

Los mecanismos de transporte que residen en esta estructura son complejos y de vital importancia. Para profundizar en ellos y caracterizarlos mediante técnicas proteómicas, se han empleado métodos de extracción diferencial mediante disolventes orgánicos para obtener proteínas de membrana (Seigneurin-Berny y col. 1999). Así se llegaron a determinar hasta 53 proteínas del envolepe del cloroplasto de espinaca las cuales se identificaron por LC-MS/MS. (Ferro y col. 2002). Sin embargo, los datos sobre el genoma de espinaca de los que se disponían limitaban la identificación de proteínas, por lo que la aplicación del método a Arabidopsis (Ferro y col. 2003), permitió incrementar el número de proteínas caracterizadas a 112. Aplicando la misma metodología hubo proteínas que tan sólo se detectaron en espinaca o en Arabidopsis, pero no en ambas. Como apuntan en una revisión Rolland y col. (2003) más del 50% de las proteínas identificadas tienen una función conocida, responsables del transporte iónico y de otros metabolitos, del metabolismo lipídico o son proteínas implicadas en la importación de la cubierta/envolepe.

El número de proteínas del envolepe identificadas en Arabidopsis se incrementó hasta 392 con el estudio de Froehlich y col. (2003). Para ello emplearon dos metodologías alternativas: Off line-MUDPIT (multidimensional protein identification technology) y fraccionamiento en gel 1D SDS-PAGE con posterior digestión proteolítica de la muestra en solución, seguida de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (Gel-C\_MS/MS). La digestión en solución fue más efectiva que la realizada en gel para la detección de proteínas de muy alto o muy bajo peso molecular.

El resultado de este trabajo, con un mayor número de proteínas identificadas respecto a los anteriores, podría apuntar hacia la mayor sensibilidad del método empleado o bien a la alta pureza de las fracciones del método de extracción utilizado por Ferro y col. Este grado de pureza de las preparaciones, implica por un lado identificar menos proteínas pero es lo que ha permitido proponer la asociación de diversas proteínas solubles (aisladas en la misma fracción) a la cubierta del cloroplasto, donde se cree podrían ser activas (Rolland y col. 2003).



Algunas predicciones mediante estudios computacionales del genoma de *Arabidopsis*, apuntan a que alrededor de 500 proteínas (Koo y Ohlrogge, 2002) podrían estar formando parte del envelope interno. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en esta ocasión los estudios *in silico* se enfrentan a dificultades adicionales como que muchas de las proteínas de la membrana externa carecen del péptido señal cloroplastídico.

Schleiff y col (2003) en un análisis computacional aún más complejo del genoma de *Arabidopsis* llegan a proponer hasta 891 proteínas candidatas para el envelope externo.

#### *Proteómica del estroma*

Aunque el estroma cloroplastídico es más conocido como el compartimento en que se llevan a cabo las reacciones del ciclo de Benson-Calvin, ya comentamos anteriormente que es también el lugar donde operan otras importantes rutas metabólicas. Por su gran complejidad, sólo algunos de los complejos proteicos aquí presentes han sido caracterizados (para rev: van Wijk, 2004). Un campo de estudio concreto de gran interés ha sido el de señalización mediada por tiorredoxina y su papel en la regulación de otras rutas cloroplastídicas. Mediante un abordaje innovador que combina tiorredoxinas mutadas y técnicas proteómicas se han llegado a proponer hasta 15 posibles proteínas diana de las diversas tiorredoxinas plastídicas (Motohashi col. 2001, Balmer y col. 2003).

Yamaguchi y col. (2000) y Yamaguchi y Subramanian (2000) han identificado además en el estroma proteínas de las subunidades ribosomales 50S y 30S.

#### *Proteómica del tilacoide*

El tilacoide es el lugar de la fotosíntesis oxigénica y en su proteoma destacan las proteínas del transporte electrónico fotosintético así como las responsables de la biosíntesis, regulación y reparación de los distintos complejos fotosintéticos. Estudios proteómicos de los cambios de expresión de las proteínas de tilacoide bajo diferentes condiciones fisiológicas, probablemente permita obtener más información acerca de la regulación de la fotosíntesis, que los abordajes empleados hasta el momento (Schröder y Kieselbach, 2003).

Gómez y col. (2002, 2003) examinan el subproteoma de partículas de PSII (BBY), utilizando cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC-MS). Huber y col. (2001) y Zolla y col. (2003) realizan un estudio proteómico de las antenas de este fotosistema y del PSI (LHC II y LHC I ,

respectivamente) en diferentes plantas. La regulación de los niveles de las proteínas de ambas antenas se muestra como un factor importante en la adaptación de la planta a diferentes factores de estrés de origen abiótico (Ganeteg y col. 2004).

El primer acercamiento al estudio proteómico de la estructura del cit b6/f y sus subunidades lo realizó Whitelegge y col. (2002),

Un análisis muy completo del proteoma tilacoidal de *A. thaliana* incluyendo proteínas integrales y periféricas, ha sido realizado por Peltier y col. (2000, 2002; Friso y col. 2004). Para ello se llevó a cabo una extracción secuencial de proteínas con distintas sales, detergentes y disolventes orgánicos, seguida de separación por HPLC en fase reversa, electroforesis 1D ó 2D, diferentes técnicas de ruptura proteolítica, espectrometría de masas y tratamiento bioinformático. Así fueron identificadas 154 proteínas, la mitad de las cuales eran proteínas integrales de membrana; aunque una gran parte de ellas eran proteínas de la CTE con función conocida, también se determinaron nuevas proteínas con variadas funciones. Se puede destacar el hallazgo de un nuevo complejo proteasa Clp situado en la cara estromática de dicha membrana (Peltier y col. 2001). Esto les llevó posteriormente, a publicar un análisis más profundo de los complejos Clp tanto en plastos como en mitocondrias (Peltier y col. 2004a).

Para incrementar la detección de proteínas hidrofóbicas del tilacoide, el mismo grupo desarrolló otro protocolo basado en un fraccionamiento por partición en tres fases con butanol (TTP) (Dennison y Lovrien, 1997; Peltier y col. 2004b) en combinación con digestiones en gel o en solución de las distintas fracciones. Estas fueron finalmente analizadas por (RP)-nano-LC-ESI-MS/MS. Esta nueva estrategia permitió describir 242 proteínas, de las que al menos un 40% eran integrales de membrana, un 50% no habían sido identificadas en el estudio anterior y la mayoría no tenían todavía una función asignada.

El empleo de estos mismos datos obtenidos para un estudio clásico gen a gen, dio lugar a la identificación de 384 proteínas, de las cuales el mayor porcentaje, 30 %, está implicado en la CTE y la clororespiración.

Un enfoque alternativo al estudio proteómico de la membrana tilacoidal, es el basado en el uso de geles nativos azules (blue native gels, BNG) para la primera dimensión, seguidos de una

segunda dimensión en SDS-PAGE, con lo que mejora el aislamiento y separación de proteínas muy hidrofóbicas. Ha sido llevado a cabo por Herranen y col. (2004) en cianobacterias o Ciambella y col. (2005) en plantas superiores; los puntos proteicos fueron posteriormente analizados por ESI-MS/MS (nano electrospray ionization-tandem mass spectrometry) y MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight). Este método se ha empleado para comparar los cambios en los complejos proteicos de lamelas estromáticas y de los grana, en cloroplastos sometidos a estrés lumínico (Aro y col. 2005).

#### *Proteómica del lumen*

Tras el primer estudio sistemático de las proteínas del lumen del cloroplasto realizado por Kieselbach y col. (1998), algunos más se sucedieron (Kieselbach y col. 2000, Peltier y col. 2000) hasta la obtención del genoma de *Arabidopsis*, que significó un gran avance en la identificación de dichas proteínas (Schubert y col. 2002, Peltier y col. 2002, Friso y col. 2004). Tras esto se establece que este compartimento subcelular posee un proteoma específico, que podría comprender desde 80 (Schubert y col. 2002) hasta 200 proteínas (Peltier y col. 2002) y del que se han identificado al menos 40 en *Arabidopsis*. A pesar de que el nuevo proteoma del lumen aporta nueva y abundante información, arroja también muchas dudas acerca de la función o funciones fisiológicas de las nuevas proteínas identificadas (ver revisión: Kieselbach y Schröder 2003). Uno de los descubrimientos más destacables, es el gran número de proteínas FKBP peptidil-prolil-cis-trans isomerasas presentes, así como la gran familia de proteínas con dominio Psb P, cuya función es aún desconocida.

### **1.3 Técnicas biofísicas aplicadas al estudio de la fisiología vegetal. Detección temprana de estrés y búsqueda de nuevos indicadores ecofisiológicos.**

Históricamente, los cambios inducidos en las plantas por los distintos factores ambientales de estrés, tanto bióticos como abióticos, eran detectados mediante técnicas bioquímicas y moleculares que llevaban a la destrucción de la muestra. Pero en las últimas décadas se han venido desarrollando numerosas técnicas biofísicas, que permiten monitorizar cambios en el estado fisiológico de la planta de forma no invasiva en la mayoría de los casos. Así pueden medirse además de la eficiencia

fotosintética, el intercambio de gases, el estado hídrico del tejido vegetal o la acumulación de diversos compuestos derivados del metabolismo secundario, por poner algunos ejemplos. Estas técnicas han resultado ser una herramienta fundamental para el estudio de la fisiología de la planta bajo distintas condiciones ambientales. Aunque no todas, un gran número de ellas están basadas en la *emisión de fluorescencia roja por la clorofila* (Kautsky y Hirsch, 1931; Govindjee 1995), que nos proporciona información acerca de la eficiencia fotosintética y de los procesos que con ella compiten. La *fluorescencia multispectral inducida por luz ultravioleta* (UV) detecta cambios en ciertos metabolitos secundarios de la célula (Chapelle 1985; Morales y col. 1994); también se la ha empleado para la determinación del estado redox del cloroplasto (monitorización de NADH y NADPH) en cloroplastos aislados (Cerovic y col. 1993) e incluso en hoja (Cerovic y col. 1998, 1999). Otra técnica biofísica de interés en diagnóstico de estrés es la *termoluminiscencia* (TL) en hoja (Ducruet 2003), que aporta información muy precisa acerca de la operatividad del PSII, la activación del flujo cíclico de electrones en torno al PSI y el potencial asimilatorio [NADPH+ATP] de la hoja. La TL de alta temperatura (HTL) puede detectar asimismo peroxidación lipídica por estrés oxidativo (Ducruet y Vavilin, 1999; Ducruet 2003).

Uno de los principales problemas que plantean los estudios de estrés, especialmente los de tipo biótico, es que no hay una alteración uniforme del metabolismo foliar, ni de la actividad fotosintética, como tampoco lo es el desarrollo de los síntomas inducidos por los patógenos vegetales.

La integración de la captación de imágenes en algunas de las técnicas biofísicas mencionadas, como la fluorescencia de imagen, ha supuesto una revolución en el campo de la ecofisiología vegetal (ver revisión Chaerle y van der Straeten, 2001). También son de aplicación la *resonancia magnética de imagen*, que detecta la distribución del agua y su transporte en la planta, la *reflectancia de imagen*, que indica cambios estructurales tanto internos como superficiales de las células o la *termografía*, que mide la temperatura de la hoja reflejando así la transpiración de la misma a través de los estomas. Estas nuevas metodologías abordan de forma más adecuada el estudio de sistemas heterogéneos como pueden ser hojas infectadas, cuya complejidad metabólica ha sido documentada en diversos trabajos (Técsi y col. 1996, Havelda y Maule, 2000).

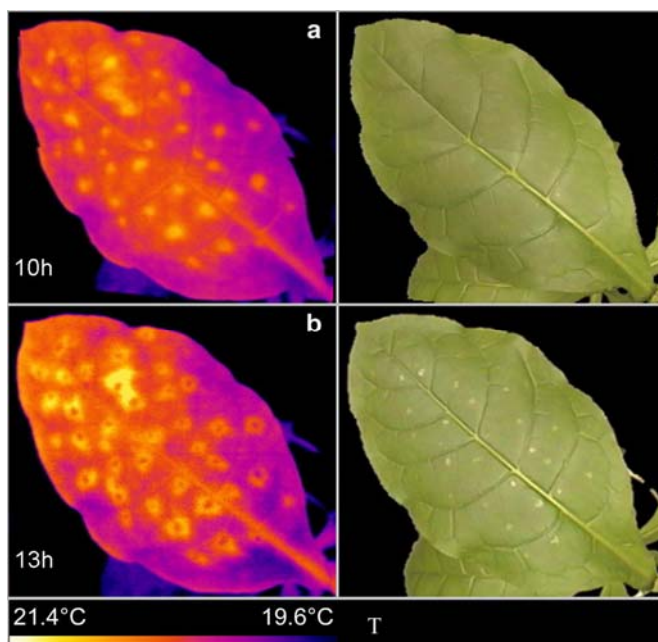


Fig 5: Visualización mediante termografía de la respuesta local de resistencia (reacción hipersensible, HR) de la hoja de tabaco a la infección del virus del mosaico del tabaco (TMV), que aparece como manchas de alta temperatura (ver barra de colores). La HR se da en interacciones huésped-patógeno no compatibles. Imágenes tomadas de Chaerle L. y col. (1999).

Las técnicas de imagen se están empleando desde una escala microscópica (cloroplastos) hasta una escala macroscópica, que abarca órganos de una planta (hoja, tallo, raíz), planta completa o cultivos enteros (Chaerle y van der Straeten, 2001; Baker y Rosenqvist, 2004). Su automatización y el desarrollo de sistemas portátiles e incluso controlados por control remoto (Nilsson, 1995; Cerovic, 1999; Chaerle y van de Straeten, 2001) ofrece nuevas posibilidades en el rastreo de subpoblaciones: identificación de plantas invadidas por patógenos o afectadas por algún estrés abiótico, selección de individuos resistentes o de mutantes, etc. Ante la gran expansión que ha sufrido la genómica, por ejemplo de *Arabidopsis*, existe la creciente necesidad de disponer de técnicas que aceleren y permitan la selección a gran escala de individuos mutantes que posean modificaciones genéticas de potencial interés porque perjudiquen reacciones metabólicas específicas o el crecimiento del vegetal (genómica funcional) (Barbagallo y col. 2003) .

Actualmente ya no se cuestiona la capacidad de técnicas como la fluorescencia roja de imagen o la termografía para la detección de diversos tipos de estrés en planta de forma temprana; es

decir, antes de que los síntomas visuales aparezcan en la hoja (Balachandran y col. 1994, Chaerle y van der Straeten. 2000, 2001, Chaerle y col 2004) o en la superficie del fruto (Abbot, 1999; Nedbal y col 2000b, Ciscato y col. 2000, Valcke, 2003). La detección prematura de estrés ha permitido la inducción local de mecanismos de resistencia en el vegetal, con resultados exitosos (Chaerle y van der Straeten, 2000; Chaerle y van de Straeten, 2001; Valcke, 2003).

La fluorescencia inducida por UV (Lichtenthaler y Miehe, 1997), la reflectancia (Peñuelas y Filella, 1998) y otras técnicas adicionales (Nilsson, 1995) también han probado su eficiencia en el diagnóstico precoz.

Resulta fundamental en esta área la identificación de parámetros que proporcionen el mayor contraste entre planta estresada y control (Soukupová y col. 2003), así como de aquellos que sirvan de indicadores ecofisiológicos concretos. Ante la gran complejidad que suponen todas las interacciones posibles entre la planta y su entorno, se deben quizás buscar *señales* que definan la interacción de cada especie de planta con un factor de estrés concreto (o combinación de algunos de ellos). Así, por ejemplo, se ha propuesto para plantas trigo un cálculo sencillo que proporciona el índice de nutrición de nitrógeno de la planta, basándose en medidas de fluorescencia a dos longitudes de onda diferentes (Cartelat, 2004),

Otra de las opciones que se consideran en el futuro para la monitorización y diagnóstico de estrés en plantas (Chaerle y van der Straeten 2001), es la combinación de diferentes técnicas biofísicas para poder discriminar el agente causante del estrés. Así para infecciones por patógenos podría utilizarse la microscopía confocal con virus marcados con la proteína verde fluorescente (GFP), (Balachandran y col. 1997) junto con la termografía y la fluorescencia de imagen (Chaerle y col. 2004). Así se obtendría en paralelo información sobre la localización viral y acerca de los procesos metabólicos afectados por el patógeno.

Grandes esperanzas se han depositado también en las técnicas de imagen multiespectrales aplicadas por control remoto, que podrían contribuir a consolidar una agricultura de precisión con un menor impacto medioambiental. Mediante ellas podrán seleccionarse individuos en viveros con mejor índice de vitalidad para su posterior utilización en cultivos, o detectar sólo aquellos que afectados por

infecciones o factores adversos necesitaran de técnicas paliativas o de remediación (que suelen tener efectos secundarios).

A continuación, nos centraremos más en detalle en el fundamento y aplicación de tres técnicas biofísicas que han sido empleadas durante el desarrollo de este trabajo: la fluorescencia de imagen (FI), la fluorescencia inducida por UV también denominada fluorescencia verde-azul (BGF) y la termoluminiscencia.

## 1.4 Fluorescencia roja de imagen

La medida de la emisión de la fluorescencia de la clorofila en organismos fotosintéticos ha sido en la última década la técnica estrella para determinar la eficiencia fotosintética y diagnosticar la presencia de factores de estrés que llevan a un descenso notable de aquélla. Ofrece además las ventajas de ser una técnica no destructiva, precisa y de gran rapidez en las medidas (Lichtenthaler, 1996).

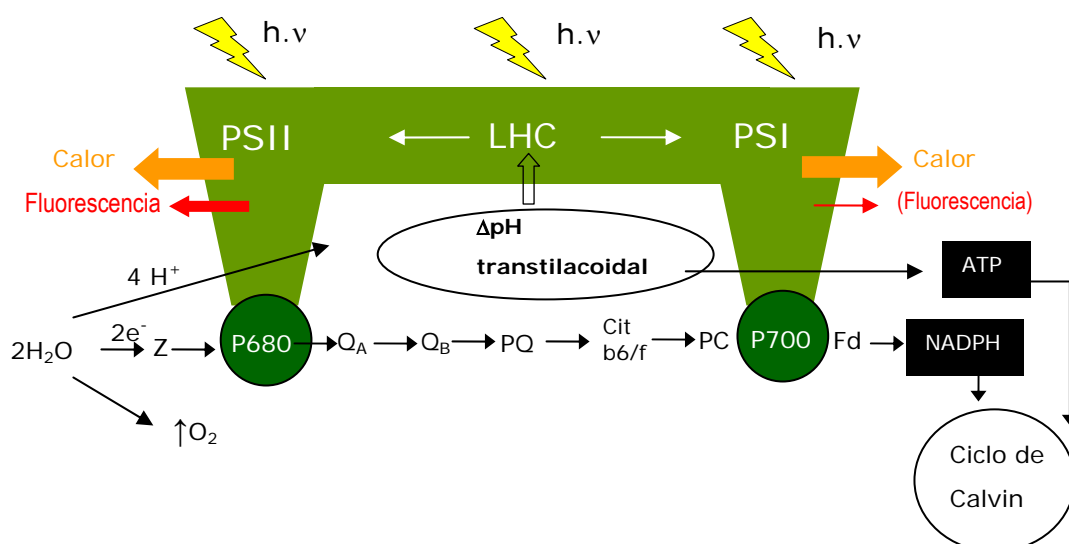


Fig 6: Representación esquemática de la transformación de la luz absorbida por las antenas del PSII y PSI en los distintos tipos de energía que compiten con la emisión de fluorescencia.

*Fundamento básico*

En una hoja verde fotosintéticamente activa la luz es absorbida por los pigmentos de los complejos mayores de antena del PSII y el PSI (LHC II y LHC I, respectivamente), migrando a continuación a los correspondientes centros de reacción P680 y P700 donde la energía se emplea para la separación de cargas. En el proceso de captación de luz participan las clorofilas a y b y los denominados carotenoides primarios (Lichtenthaler, 1988) (Fig 6).

Se acepta de forma general que a temperatura ambiente la emisión de fluorescencia procede

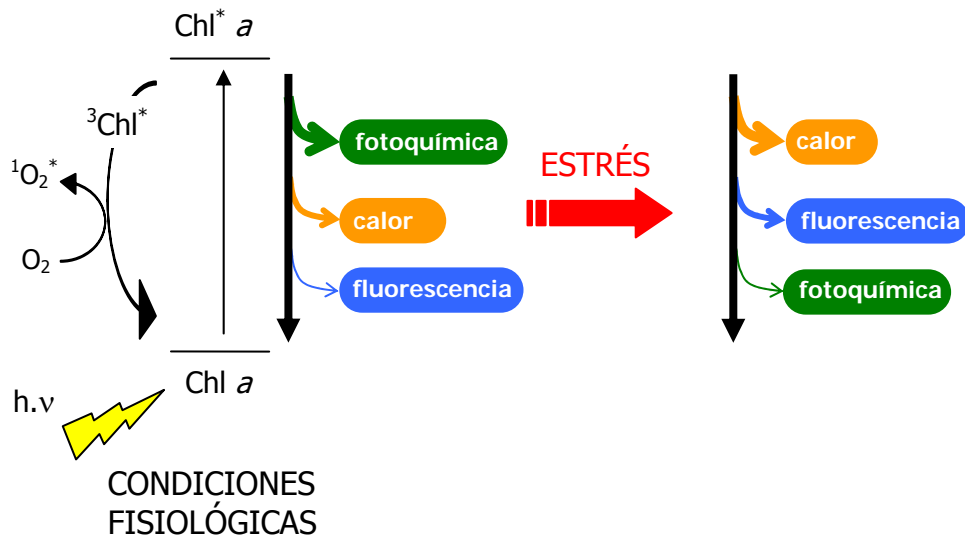


Fig 7: La Chl tras absorber la luz, pasa de un estado basal al estado excitado singlete,  $^1\text{Chl}$ . A partir de aquí dispone de distintas vías de relajación para alcanzar de nuevo el estado basal. Puede relajarse emitiendo fluorescencia. También su excitación puede invertirse en procesos fotoquímicos o puede desexcitarse emitiendo calor; ambos mecanismos reducen la emisión de fluorescencia, por ello también se les denomina qP y NPQ, respectivamente. Por último, la  $^1\text{Chl}$  puede convertirse en  $^3\text{Chl}$ , la cual a su vez es capaz de producir  $^1\text{O}_2$ , una especie altamente reactiva. En condiciones de estrés la disipación en forma de calor y la fluorescencia aumentan, a la vez que las tasas de fotosíntesis disminuyen. (Basado en una figura de Müller y col. 2001)



de la clorofila a del PSII (Papageorgiou, 1975; Lavorel y Etienne, 1977) y que la contribución del PSI es muy pequeña (Kyle y col. 1983). El PSII parece tener un papel dominante en el control y la distribución equilibrada de la energía captada entre los dos fotosistemas (Lichtenthaler y Rinderle, 1988).

En condiciones fisiológicas óptimas la mayor parte de la energía absorbida es empleada en las reacciones fotoquímicas y sólo una pequeña proporción se pierde en forma de calor y en forma de fluorescencia roja. Se ha estimado que la emisión de fluorescencia del PSII *in vivo*, en condiciones normales, representa entre 2-5% de la energía captada ( Fig 7).

Sin embargo, según la intensidad de la luz incidente, la presencia de condiciones de estrés, senescencia, etc, la emisión de fluorescencia por desexcitación de la clorofila y la de calor, aumentan. Debido a la relación inversa que existe entre la emisión de fluorescencia de la clorofila a y los procesos fotoquímicos, ésta puede ser utilizada como indicador de la eficiencia fotosintética, así como de estrés en la planta ( Fig 7).

Kautsky y Hirsch describieron en 1931 la curva de inducción rápida de la fluorescencia si una planta adaptada a la oscuridad, con todos sus centros de reacción del PSII *abiertos* ( $Q_A$  completamente oxidada), es iluminada (ver Fig 8). En estas condiciones, la fluorescencia incrementa rápidamente desde un nivel mínimo ( $F_0$ ), hasta un nivel máximo  $F_p$ , si la luz empleada es actínica o  $F_m$ , si ésta llega a niveles saturantes es decir, provoca el *cierre* de todos los centros de reacción ( $Q_A$  completamente reducida). La diferencia entre  $F_m$  y  $F_0$  recibe el nombre de fluorescencia variable,  $F_v$ , a partir del cual se puede obtener  $F_v/F_m$ . Generalmente, una planta sana tiene un valor  $F_v/F_m$  cercano a 0,8 independientemente de la especie (Björkman y Demming, 1987). Sin embargo, cuando está sometida a algún tipo de estrés, tanto biótico como abiótico, que dañe al PSII este valor disminuye.

A continuación la señal de fluorescencia desciende gracias a los fenómenos de *quenching* que la amortiguan, hasta alcanzar el denominado estado estacionario. Se distingue entre *quenching fotoquímico* (qP) debido a que gran parte de la energía absorbida se utiliza en la CTE y posterior asimilación del  $CO_2$  y *quenching no fotoquímico* (NPQ) atribuido a mecanismos de disipación energética, como es la emisión de calor.

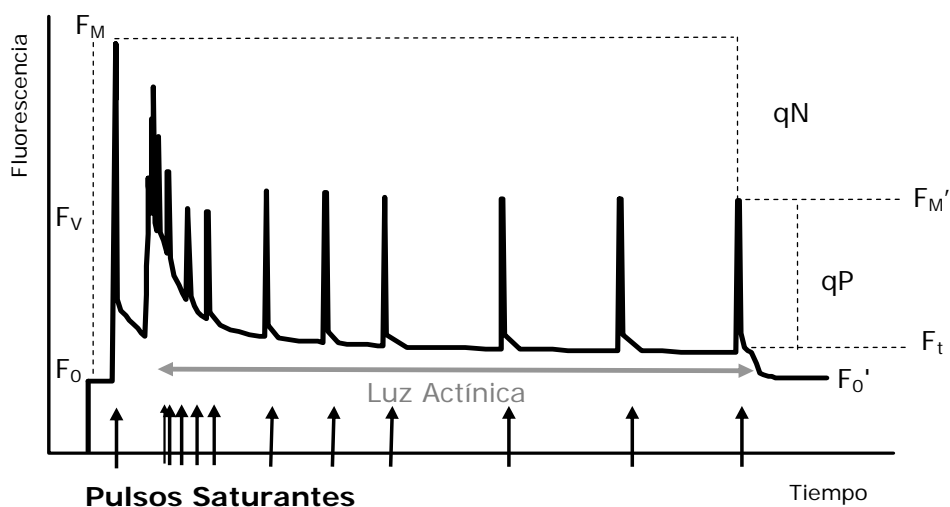


Fig 8: Cinética de inducción de la fluorescencia por el método de los pulsos saturantes.

Si durante la generación de la curva de Kautsky mediante luz actínica, se aplican pulsos de luz saturante, la fluorescencia máxima obtenida en estas condiciones ( $F_m'$ ), no alcanzará el valor de  $F_m$ , lo que indica que los mecanismos de NPQ, disipación por calor, están actuando. Luego se puede expresar NPQ (Bilger y Björkman, 1990) como:

$$NPQ = \frac{F_m - F_m'}{F_m'} = \frac{\Delta F_m}{F_m'}$$

Asimismo, este método permite medir la eficiencia con que la energía absorbida por la antena es utilizada para los procesos fotoquímicos (reducción de  $Q_A$ ), el llamado rendimiento cuántico del PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) (Genty y col. 1989):

$$\Phi_{PSII} = \frac{F_m' - F_t}{F_m'} = \frac{\Delta F}{F_m'}$$

### *Quenching no fotoquímico (NPQ)*

Vamos a analizar con más detalle NPQ, que mide la disipación de la energía no utilizada en fotosíntesis porque, como veremos en capítulos posteriores, será un proceso fundamental en plantas infectadas.

NPQ podría definirse de forma general, como todo aquel proceso de *quenching* de la fluorescencia que no está relacionado directamente con la separación de cargas. Es un fenómeno complejo que a su vez se puede subdividir en tres componentes (Holt y col. 2004): *quenching* energético (qE), fotoinhibitorio (qI) y el ligado a las *transiciones de estado* (qT), cada uno de los cuales tiene una cinética de inducción y relajación característica (Horton y Hague, 1988). qE es el único componente que se le relaciona con cambios inducidos por rápidas fluctuaciones de la luz incidente, en el orden de segundos a minutos. El qT está relacionado con la fosforilación de las proteínas de las antenas (van Wijk y col., 1993; Schreiber y col., 1994) y a qI se le puede vincular con la presencia de centros de PSII no funcionales denominados *centros disipativos* (van Wijk y col., 1993), normalmente centros con el lado donador del PSII dañado.

qE es dependiente del *gradiente de pH* ( $\Delta pH$ ) *transmembrana* en el tilacoide y del ciclo de las xantofilas. En condiciones de iluminación, el lumen se acidifica y cuando la energía luminosa sobrepasa la capacidad fotosintética, se activa la enzima violaxantín-deepoxidasa (VDE) la cual lleva a cabo la transformación de violaxantina (Viol), vía anteraxantina (Antera), en *zeaxantina* (Zea), en el denominado ciclo de las xantofilas, ya que las reacciones anteriores son reversibles. Diversos autores (Demmig-Adams 1990; Demmig-Adams y Adams, 1996; Gilmore y col. 1995) han asociado qE a los niveles de Zea en la antena. Asimismo, se ha demostrado que para el normal desarrollo de qE, es necesaria la presencia de la proteína *Psb S* activa (Li y col. 2000). *Psb S* es una proteína capaz de unirse a clorofila a/b (CAB) del PSII, que sin embargo no es esencial para una absorción de luz eficiente. Esta apoproteína es, a diferencia de las restantes, estable en ausencia de Chl y además posee la capacidad de unirse a Zea (Holt y col. 2004).

A qE se le correlaciona con los mecanismos de fotoprotección, y éste no es más que la manifestación por la cual las plantas (y las algas) disipan el exceso de energía. Un descenso en la duración de la emisión de fluorescencia de la Chl indica que un proceso de desactivación no radiativa

de la Chl singlete ( $^1\text{Chl}^*$ ) (formada tras la absorción de luz) se ha puesto en marcha. Mediante éste el exceso de energía absorbida es emitida de forma inocua como calor. En ausencia de este proceso aumenta de forma considerable la probabilidad de que la  $^1\text{Chl}^*$  forme moléculas de clorofila triplete ( $^3\text{Chl}^*$ ), una especie altamente reactiva capaz de reaccionar con el  $\text{O}_2$  y dar lugar al oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2^*$ ), entre otras especies de oxígeno altamente reactivas (ROS) (ver Fig 6). Se ha visto que en plantas y algas el qE es capaz de amortiguar hasta el 80% de  $^1\text{Chl}^*$  (Demmig-Adams y col., 1996; Li y col. 2000).

El lugar del PSII en el que la energía es disipada ha sido objeto de largo debate (Bukhov y col., 2001), proponiéndose que ocurra en el centro de reacción RC (Schreiber y Neubauer, 1990; Krieger y Weiss, 1993) o en las antenas (Ruban y Horton, 1995; Oja y Laisk, 2000). En este último caso, el papel de los carotenoides es básico y sobre su forma de actuación se manejan dos hipótesis. Una sugiere que la Zea en su primer estado electrónico singlete de excitación ( $S_1$ ), y en menor grado la Antera y la luteína (Lut), pueden desactivar de forma no radiativa la  $^1\text{Chl}^*$ , por transferencia de energía y/o electrones. La segunda propone que la Zea induce cambios conformacionales en los complejos pigmento-proteína que conducen a la interacción de las moléculas de Chl excitadas entre sí, que serán las responsables del quenching observado. Este fenómeno no ocurre cuando la Viol está presente (Holt y col. 2004 y referencias incluidas).

*La fluorescencia de imagen (FI) aplicada al estudio de interacción huésped-patógeno y su diagnóstico precoz.*

Los precedentes de las técnicas de FI podemos encontrarlos en la obtención de imágenes fotográficas mediante la técnica de *fitoluminografía* (Sundböm y Björn, 1977). Pero ha sido la llegada al mercado de las cámaras de vídeo CCD (Charge-Coupled Device) y las nuevas técnicas de digitalización de imágenes las que han hecho posible el análisis en dos dimensiones de la emisión de fluorescencia en vegetales.

Actualmente, existen en el mercado tres FIS: el Fluorcam de PSI (Photon System Instruments, Brno, República Checa; <http://www.psi.cz/>), el Imaging PAM. de Walz (Effeltrich, Alemania; <http://www.walz.com>) y el FluorImager de Qubit Systems Inc

(<http://www.qubitsystems.com>). Pero muchos de los trabajos que a continuación mencionaremos han sido realizados con prototipos diseñados por los propios grupos de investigación.

La Chl-FIS ha permitido el análisis del patrón espacial y temporal de la eficiencia fotosintética de la hoja completa (Daley et al., 1989; Fenton and Crofts, 1990; Genty and Meyer, 1994; Ning et al., 1995; Rolfe and Scholes, 1995; Lichtenthaler, 1996; Lichtenthaler et al., 1997; Oxborough and Baker, 1997; Lichtenthaler and Babani, 2000; Leipner, 2001; Fryer et al., 2002, 2003; Lawson, 2002). También se han demostrado sus amplias posibilidades en la predicción de desórdenes fisiológicos en

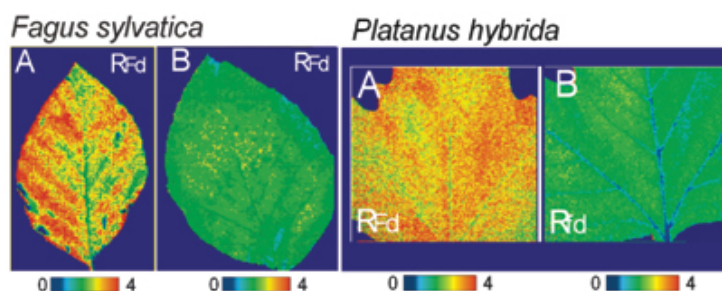


Fig 9: Imágenes que muestran el descenso del parámetro de fluorescencia roja  $R_{Fd}$  ( $R_{Fd} = (F_p - F_s)/F_s$ ), indicador de la actividad fotosintética, en hojas de sombra (B) comparado con las de sol (A) tomadas en hojas de haya y arce (Babani y col. 2005).

el vegetal y senescencia, así como en el control de calidad de frutos y en experimentos de biorremediación (Valcke et al., 1999; Ciscato et al., 2000; Nedbal, 2000; Codrea, 2002; Chaerle et al., 2003; Huybrechts et al., 2003). Esta técnica es de especial utilidad en caso de estrés biótico, ya que éste suele llevar a una alteración no uniforme del metabolismo foliar, que en ocasiones se corresponde con la distribución de los síntomas.

Una revisión de Nilson ya en 1995 resume las primeras aplicaciones de las técnicas de imagen y de teledetección en fitopatología. Rolfe y Scholes (1995) tras el diseño de su propio prototipo de Chl-FI, han investigado el efecto de infecciones fúngicas en el aparato fotosintético (Scholes y Rolfe, 1996; Chou y col., 2000). Ellos relacionan cambios locales en NPQ con alteraciones del ciclo de Benson-Calvin, cambios en el metabolismo de carbohidratos y regulación de genes fotosintéticos. Ning y col. (1995) y Peterson y Aylor (1995) obtuvieron imágenes de vídeo de plantas de judía y nuez moscada infectadas por hongos, y demostraron que los cambios en las imágenes de

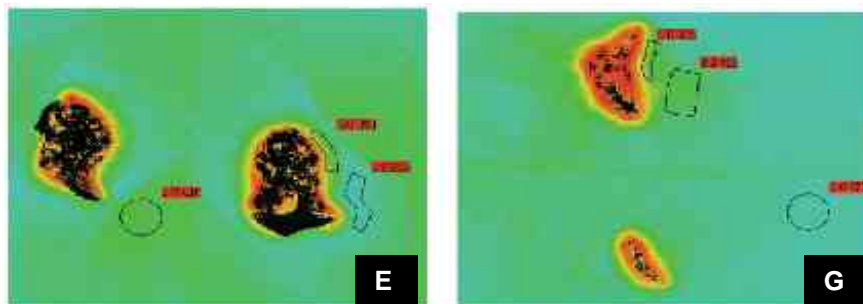


Fig 10: Imágenes de correspondientes al  $\Phi$  PSII de una hoja de tomate 24h después de ser infectada con *Botrytis cinerea* (E) o únicamente afectada por herida (G). Las áreas consideradas de interés delimitadas en negro en zonas no afectadas, mostraron que en la hoja infectada (E), las más próximas a la lesión presentaron un incremento en  $\Phi$  PSII, indicativo de una estimulación local de la CTE, que no se observó en el control (G)(Berger y col.2004).

distintos parámetros de fluorescencia inducidos por las toxinas fúngicas preceden al desarrollo de síntomas. Todos estos autores demuestran también que la fotosíntesis puede estar inhibida en áreas aparentemente sanas.

Meyer y col. (2001) investigaron la apertura estomática y la inhibición metabólica de la fotosíntesis en plantas de judía infectadas por *Colletotrichum lindemuthianum* mediante Chl-FI. Finalmente, propusieron un modelo teórico que relaciona la tasa fotosintética con la intensidad de los síntomas.

Balachandran y col. 1994) usaron la Chl-FI para el diagnóstico de las fases tempranas de la interacción TMV-*Nicotiana tabacum*. Detectaron cambios en la emisión de la fluorescencia, variable en el espacio y en el tiempo, antes incluso de que los síntomas aparecieran, el FIS empleado, sin embargo, no permitía el análisis de los coeficientes de quenching.

Balachandran y col. resumen en una revisión (1997) las posibles respuestas del aparato fotosintético frente a patógenos; proponen que el equilibrio entre procesos fotoinhibitorios y fotoprotectores contribuyen a daños locales en el aparato fotosintético y a la extensión de los síntomas; por otro lado, la acumulación local de carbohidratos y el desequilibrio en la relación fuente-

sumidero pueden inhibir la expresión génica, alterar los complejos fotosintéticos y las enzimas del metabolismo fotosintético, lo que lleva también a la aparición de síntomas.

Osmond y col (1998) y Lohaus y col. (2000) obtuvieron imágenes de la infección de *Abutilon striatum* con el *Abutilon* mosaic virus usando un sistema portátil. Concluyen que los cambios en NPQ se corresponden con distintos estadios en el desarrollo de los síntomas.

Soukupova et al. (2003) visualizan con el FluorCam las respuestas de *Brassica napus* y *Sinapis alba* a las toxinas fúngicas (Fig 9). Asimismo, presentan un algoritmo experimental que identifica la combinación de parámetros de fluorescencia que ofrecen un máximo contraste entre plantas sanas e infectadas o entre áreas de estas últimas.

Recientemente Chaerle et al. (2004) han logrado distinguir combinando las técnicas de Chl-FI y termografía una interacción planta-virus de otra planta-hongo y proponen la búsqueda de señales o firmas identificativas de una enfermedad concreta (*disease signatures*) que podrían facilitar un diagnóstico presintomático.

En nuestro grupo hemos realizado investigaciones con plantas de *N. benthamiana* infectadas por la cepa italiana del virus del moteado suave del pimiento (PMMoV-I) (Pérez-Bueno y col. 2001,

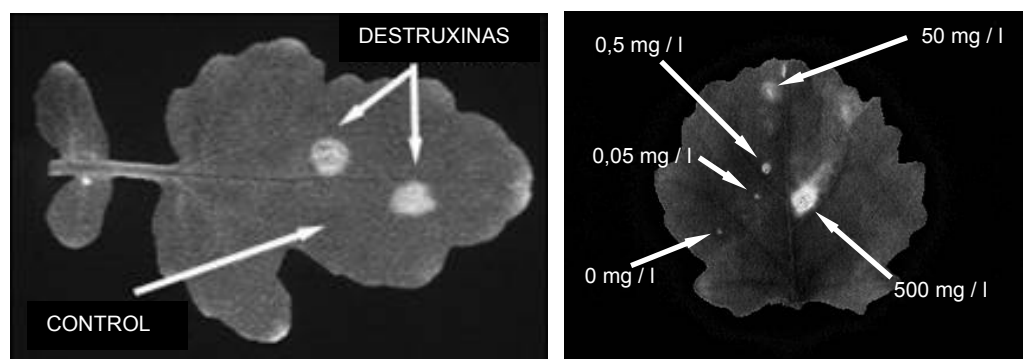


Fig11: Las destruxinas son sustancias que producen muchos hongos y que causan clorosis y necrosis foliar. A la izquierda se muestra la imagen del parámetro  $F_0/F_M$  de fluorescencia de una hoja de "Sinapis alba" expuesta 60 horas a una gota de 10ml de 1% dimetilulfóxido (DMSO) sin destruxinas (control) y con 2000 mg/l de destruxinas. A la derecha, se muestra la imagen de  $F_0/F_M$  de una hoja de "Brassica oleracea" incubada también 60 horas con diferentes concentraciones de destruxinas en una solución al 1% DMSO.

Pérez-Bueno, 2003) y medimos distintos parámetros de fluorescencia con el Chl-FIS del grupo de R. Valcke (Valcke et al., 1999, Ciscato, 2000). Demostramos que hojas que permanecían asintomáticas durante toda infección, presentaban sin embargo cambios espacio-temporales muy característicos en el patrón de eficiencia fotosintética y mecanismos disipativos foliares. NPQ demostró ser el parámetro más útil para diferenciar plantas sanas de infectadas (Fig 12). El patrón de NPQ de hojas asintomáticas de plantas infectadas se correspondía con el de distribución del virus en este tipo de hojas determinado por tissue-print.

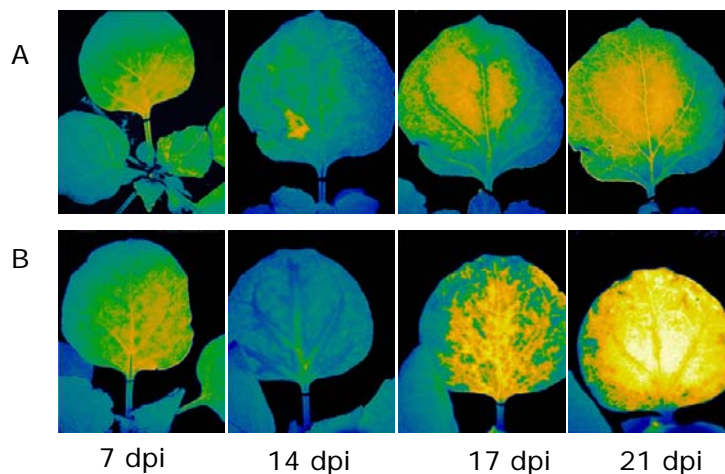


Fig 12 :Imágenes de NPQ en el estado estacionario de hojas AS de plantas de *N. benthamiana* inoculadas con PMMoV-I (B) y de equivalentes de planta control (A) a distintos tiempos post-infección. (Pérez-Bueno, 2003).

## 1.5 Fluorescencia inducida por UV: fluorescencia verde-azul.

La excitación de hojas verdes por luz UV induce dos tipos de fluorescencia, de diferente origen, aunque en cierto modo complementarios: una fluorescencia verde- azul (BGF) en el rango de



400-630 nm y la fluorescencia de la clorofila a (ChlF) en el rojo y en el rojo lejano (FR), entre 630-800nm. La intensidad relativa entre estos dos tipos de fluorescencia es altamente sensible a las propiedades intrínsecas de la hoja y a los factores medioambientales.

La fluorescencia en el rojo y en el FR es emitida únicamente por la Chl a, mientras que la fluorescencia azul y verde es emitida por ácidos cinámicos (ácido ferúlico como compuesto mayoritario) y otros compuestos fenólicos de la célula vegetal unidos covalentemente a su pared.

La fluorescencia inducida por UV puede proporcionar información, no sólo acerca de los procesos fotoquímicos de la hoja, y su contenido en Chl, sino también de la presencia y acumulación de productos del metabolismo secundario. También es posible mediante medidas de BGF con fluorímetros altamente sensibles del tipo PAM (Pulse amplitud method, de Walz, Effeltrich, Alemania), obtener información acerca del estado redox del cloroplasto; para ello se monitorizan las variaciones en concentración y estado redox de NADH y NADPH.

Esta especificidad de las señales de fluorescencia es una de las razones por las que se considera a esta técnica, de especial interés, para su aplicación por control remoto, aunque aún presenta ciertas limitaciones que están por resolver (Buschmann y col 2000).

#### *Fundamento básico*

El espectro de emisión de fluorescencia característico de una hoja verde, inducido por UV-A, posee tres máximos y un hombro que podrán aparecer de forma más o menos pronunciada aproximadamente a: 440nm (azul), 520nm (verde), 690nm (rojo) y 740nm (rojo lejano) (Lichtenthaler y col. 1992; Buschmann y col. 2000). Se suele hablar de fluorescencia verde-azul (BGF) porque el máximo correspondiente a 520nm rara vez está bien definido. Es frecuente encontrar en la bibliografía la nomenclatura F440, F520, F690 y F740, que solía estar asociada a medidas procedentes de aparatos de alta resolución. Sin embargo, hoy en día también se acepta BF (fluorescencia azul), GF (fluor. verde), BGF (fluor verde-azul), RF (fluor. roja) y FRF (fluor. rojo lejano), que por otro lado es más adecuada puesto que los máximos de emisión de la fluorescencia en hoja pueden variar por muchos motivos. Van a cambiar básicamente en función del origen de la hoja (Lang y col. 1991; Johnson y col. 2000), especie, edad, tamaño, cara (adaxial o abaxial), condiciones medioambientales a la que ha sido expuesta, etc... Por ejemplo, las hojas de guisantes (*Pisum sativum*), cuyas paredes

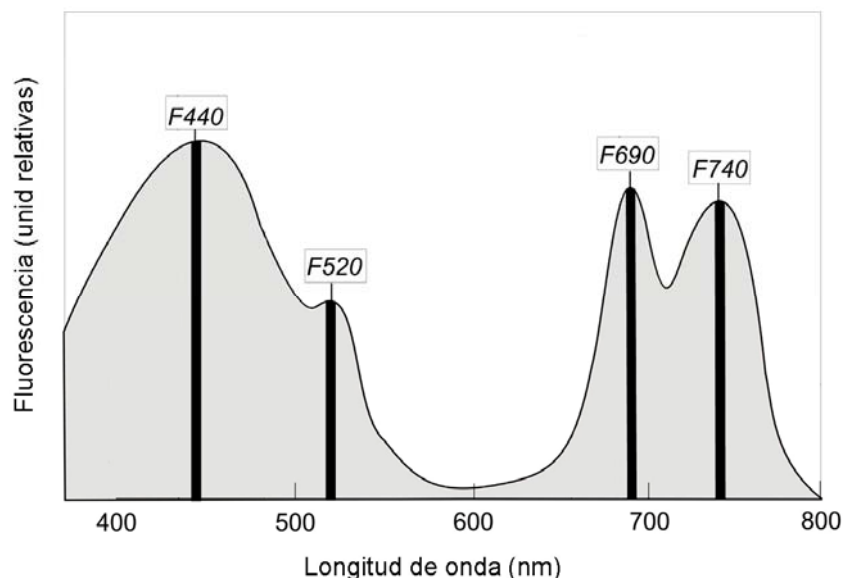


Fig 13: Espectro de emisión típico de una hoja verde excitada por luz UV

celulares no son fluorescentes, emiten bastante menos BGF que las hojas de remolacha (*Beta vulgaris* L.) en las que se ha descrito la presencia de ácido ferúlico esterificado (Hartley y Harris, 1981).

Existen dos diferencias fundamentales entre ChIF y la BGF. En primer lugar, ésta última es independiente de la luz ambiental y prácticamente constante en escalas cortas de tiempo (minutos) (Stober y Lichtenthaler 1993, sin embargo sí puede variar a lo largo de períodos más largos (horas, días). La segunda diferencia estriba en los compuestos responsables de la emisión de fluorescencia. Mientras que la ChIF procede únicamente de la Chl, muchos son los compuestos que pueden contribuir a la BGF. Se ha descrito como principal responsable al ácido ferúlico, un ácido hidroxicinámico que está unido covalentemente por enlaces éster a los polisacáridos de la pared celular de la epidermis de la hoja y de las venas de la hoja (Harris y Hartley, 1976; Lichtenthaler y Schweiger, 1998; Morales y col. 1996). Los ácidos cinámicos y fenoles solubles no contribuyen a la emisión de BGF (Lichtenthaler y Schweiger, 1998). Una larga lista de compuestos, procedentes del metabolismo secundario de las plantas, que también pueden contribuir a esta emisión la encontramos

en la revisión de Wolfbeis (1985). Todos ellos están relacionados por la ruta de síntesis del corismato (también ruta del shikimato) necesario para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y son fundamentalmente fenoles vegetales (polifenoles) o fenilpropanoides. Los ácidos hidroxicinámicos y los flavonoles van a proteger a la hoja de forma eficiente de la radiación UV solar, puesto que muestran capacidad de absorción en todo el rango del UV. En una sección transversal de una hoja, la distribución de las sustancias que emiten fluorescencia no es homogénea. La fluorescencia inducida por UV de imagen ha permitido ver que, si bien la ChIF procede mayoritariamente del mesófilo de la hoja, la BGF procede principalmente de las venas principales y secundarias (Lang y col. 1994).

La *cutícula* es la primera estructura que recibe la luz y su contribución a la BGF es muy relevante ya que contiene fluoróforos azules y la emisión procede de la cera epicuticular (Stober y Lichtenthaler 1993; y Saito y col. 1997). En la *epidermis* la BF y GF de las paredes celulares es muy fuerte, gracias en parte a la ausencia de Chls y Cars (excepto en las células guarda de los estomas) que la enmascararían. En el *mesófilo* de la hoja, las células del parénquima en empalizada y esponjoso (en el caso de dicotiledóneas) con gran número de cloroplastos, emiten mayoritariamente RF y FRF, es decir ChIF. La BGF que pueda provenir de las paredes de estas células es muy baja debido al fenómeno de reabsorción por parte de las Chls y Cars.

La asimetría estructural del haz y envés foliar de plantas dicotiledóneas (Fig 14), con una epidermis más gruesa en la cara adaxial de la hoja (normalmente expuesta al sol), explica por qué en general la emisión de fluorescencia en el azul, verde y rojo inducida por UV es menor en el haz que en la cara abaxial (inferior) (103 Lichtenthaler y col. 1997; Cerovic, 1999). Buschmann y Lichtenthaler (1998) afirman que el mayor empaquetamiento de las células en empalizada de la cara adaxial, aumenta el fenómeno de reabsorción de la Chl a, BF y RF.

El espectro de emisión de fluorescencia puede sufrir cambios drásticos durante el desarrollo de la hoja, dependiendo de la concentración del fluoróforo y también de las propiedades ópticas de la hoja que determinan los fenómenos de reabsorción, difracción, etc. (Buschmann y col., 2000). Igualmente, se producen cambios notables asociados al crecimiento de la planta, como la acumulación progresiva de compuestos que absorben la radiación UV en plantas de sol y a la vez actuarían como filtro de ésta, con lo que existiría una menor excitación de la Chl y de la

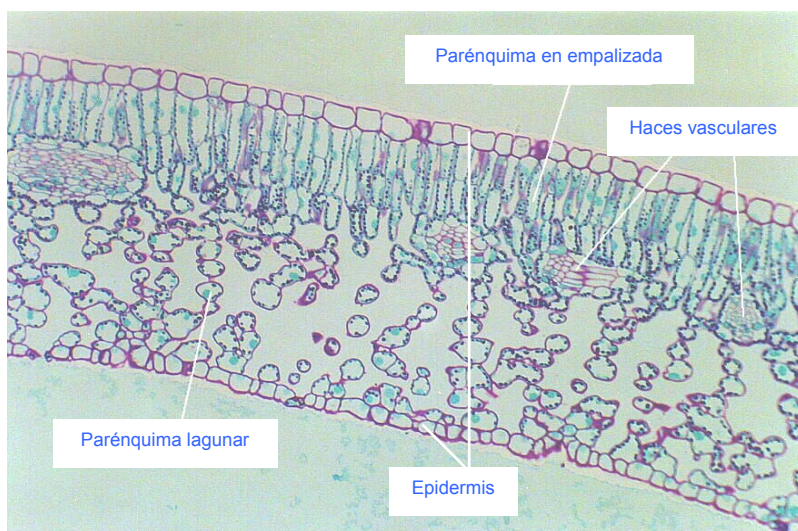


Fig14: Corte típico transversal de una hoja de planta dicotiledónea.

correspondiente emisión de fluorescencia. El fenómeno contrario se observaría en plantas crecidas a menores intensidades lumínicas en cámara de cultivo. Por su parte, la Chl si se encuentra en altas concentraciones, reduce el pico de RF (alrededor de 690nm) debido al solapamiento de esta banda con el pico de absorción en el rojo de la Chl *in vivo* (670-680nm); sin embargo, el máximo de la FRF se ve mínimamente afectado. Este fenómeno de reabsorción puede ser empleado para deducir el contenido de Chl según el cociente RF/FRF, el cual está inversamente correlacionado con el contenido de dicho pigmento en la muestra (Lichtenthaler y Rinderle, 1998).

*Aplicaciones de la fluorescencia inducida por UV en el estudio de las plantas.*

Al poseer orígenes diferentes, la BGF y ChlF, pueden alterarse de forma independiente en respuesta a distintos factores fisiológicos y ambientales. Estos cambios pueden registrarse en variaciones de los cocientes de fluorescencia RF/FRF, BF/RF, BF/FRF y BF/GF. Para la interpretación de estos cocientes ha de tenerse en cuenta las causas anteriormente mencionadas de alteración de las señales de fluorescencia (Buschmann y col. 2000). Las señales de la BGF pueden proporcionar información muy valiosa para la investigación en plantas, acerca de su crecimiento y desarrollo, y por

lo tanto también para la agricultura (Cerovic y col. 1999). Trabajos como los de Babani y col. (2005) en los que se emplea aparatos que permiten obtener imágenes correspondientes a la emisión de la fluorescencia a 440, 520, 690 y 740 nm, en ocasiones, estas directamente ofrecen diferencias entre la planta tratada y la control (a parte de los mencionados cocientes)(Fig 15). Ellos han podido comprobar como el rendimiento de la fluorescencia en la hoja de sol en general es menor a la de sombra; la presencia de compuestos que absorben en el UV y de flavonoides (muchos de ellos solubles en la vacuola, luego fluorescen poco o no fluorescen en el azul y el verde) y un mayor contenido de Chl en la hoja (favorece los fenómenos de reabsorción), contribuyen a este fenómeno.

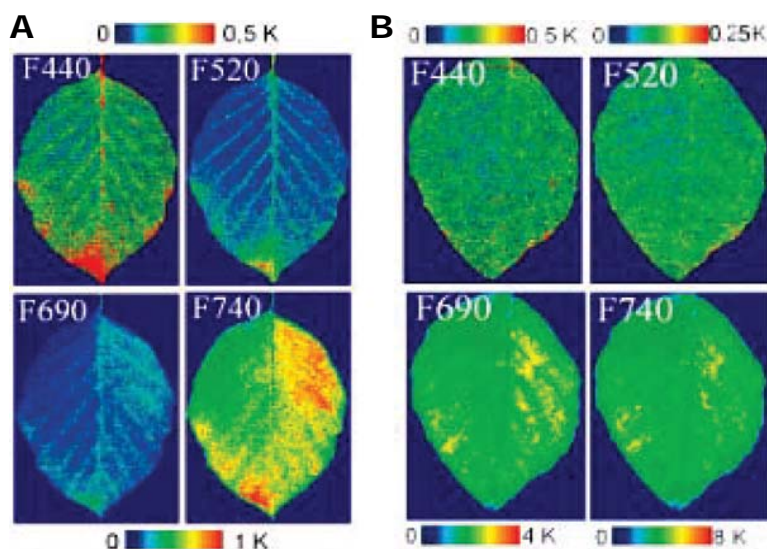


Fig 15: Imágenes de fluorescencia inducida por luz UV en el azul (F440), el verde (F520) el rojo (F690) y el rojo lejano (F740) en hoja de arce de sol (A) y de sombra (B).

Muchos de los compuestos responsables de la absorción del UV, y de la BGF, se utilizan también como marcadores quimiotaxonómicos. El espectro de estos compuestos en muchas ocasiones suele ser similar, sin embargo sí puede emplearse como criterio de clasificación general el cociente BF/RF (Chapelle y col. 1985); se sabe que la BGF en monocotiledóneas en general, especialmente las herbáceas, es mayor que en las dicotiledóneas.

El efecto de la radiación UV-A y UV-B se ha estudiado a través de este fenómeno (Burchard y col. 2000), observándose un incremento en el BGF/ChIF en plantas tratadas (Middleton y col. 1996; Schweiger y col. 1996). Numerosos trabajos avalan también, la utilidad de esta técnica para la detección de distintos tipos de estrés nutricionales en planta, por ejemplo deficiencias en hierro (Morales y col. 1994) o N, que dan lugar generalmente a incrementos del BF/ChIF en comparación con el registrado en plantas no estresadas (Heisel y col. 1996; Corp y col. 1997; Cartelat, 2004; Mercure y col. 2004). Muchos otros factores de estrés abiótico (estrés hídrico, altas o bajas temperaturas) pueden ser también analizados mediante la BGF (Cerovic y col. 1999 y referencias incluidas); sin embargo existe un menor número de estudios acerca de la respuesta de la planta a patógenos. Lüdeker y col. (1996) comprobaron que el incremento en BF/FRF era un fenómeno común a plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas infectadas por hongos, que atribuyeron al hongo que emite GF, aunque la respuesta de la propia planta al patógeno también podría contribuir a este hecho. Muchos son los ejemplos que ya apoyan ésta última hipótesis, que implica la producción por parte de la planta de diversas sustancias de tipo fenólico, conocidas como fitoalexinas (Benhamou y Bélanger, 1998; Dixon y Paiva, 1995). Estudios de ultraestructurales y citoquímicos han demostrado asimismo que la acumulación de los compuestos fenólicos se da en las células de la epidermis en íntimo contacto con el hongo (Dai y col. 1995; Benhamou y Bélanger, 1998).

Buschmann y Lichtenthaler (1998), se ocuparon del efecto de los insectos en la BGF de la hoja. Las heridas de mosca blanca en hojas de tabaco provocaron incremento en la BGF, resultante de un acúmulo de fitoalexinas. Sin embargo, la infección por ácaros de plantas de judía, inducía el aumento muy pronunciado de BF/RF y discreto de RF/FRF; esto ocurría como consecuencia de la eliminación (por succión) de los cloroplastos por parte de los ácaros y la consiguiente pérdida de Chl en la cara abaxial de la hoja.

## 1.6 Termoluminiscencia en disco de hoja

La luminiscencia emitida por la clorofila de una hoja previamente sometida a iluminación tiene su origen en el PSII debido a la recombinación de pares de cargas formados. Esta emisión presenta una mejor resolución de sus bandas si se somete la muestra a un calentamiento gradual,

obteniéndose entonces lo que se denomina termoluminiscencia (TL). Las diversas bandas de emisión de TL poseen máximos a temperaturas características. La asignación de los pares de cargas responsables de dichas bandas, permiten utilizar esta técnica para obtener información sobre los cambios producidos a nivel molecular en el PSII por diferentes tipos de estrés ambiental. Adicionalmente, la TL en el rango de  $T^a$  de 0-60°C va a ofrecer información acerca del estado energético del cloroplasto: gradiente transmembrana tilacoidal, potencial asimilatorio [ATP+NADPH] de la muestra e inducción del flujo cíclico/clororespiración en torno al PSI.

Calentando la muestra por encima de los 60°C, se obtienen las denominadas bandas de alta temperatura de TL (HTL), causadas por un fenómeno de quimioluminiscencia, que indican presencia de estrés oxidativo en la hoja.

La TL es una técnica destructiva, pero no invasiva, que en comparación con otras técnicas biofísicas, resulta de bajo coste, fácil manejo y alto rendimiento.

#### *Fundamento básico*

La TL es una emisión de luz inducida por calor de una muestra que ha sido previamente iluminada. Esta emisión refleja la recombinación de cargas entre un compuesto cargado positivamente, “hueco” y un electrón *atrapado* en un transportador de la CTE, ambos originados en dicha iluminación previa.

En el proceso de la fotosíntesis, la energía lumínica absorbida se transfiere a la *Chl a* del RC donde es convertida en energía redox: cargas positivas y negativas son separadas y consecutivamente almacenadas en distintos componentes de la CTE.

La absorción de un fotón por parte de la Chl del PSII lleva a la excitación del donador primario de electrones P680, que provoca una rápida separación de cargas (picosegundos), entre P680 y la feofitina (Pheo), el aceptor primario. A continuación la separación de cargas se estabiliza hasta unos 300ps por una rápida transferencia electrónica de Pheo $^-$  a  $Q_A$ , la primera quinona aceptora de un solo electrón del PSII, que a su vez se lo transfiere a  $Q_B$ , aceptor secundario de dos electrones del PSII.  $Q_B$  reducido ( $Q_B^-$ ) puede estabilizarse desde decenas de segundos (s) hasta horas, a  $T^a$  ambiente, y representa el principal *secuestrador* de cargas negativas en el fenómeno de la TL, frente a  $Q_A^-$  cuya vida media es muy corta. Esto ocurre salvo que el transporte de  $Q_A^-$  a  $Q_B$  esté bloqueado

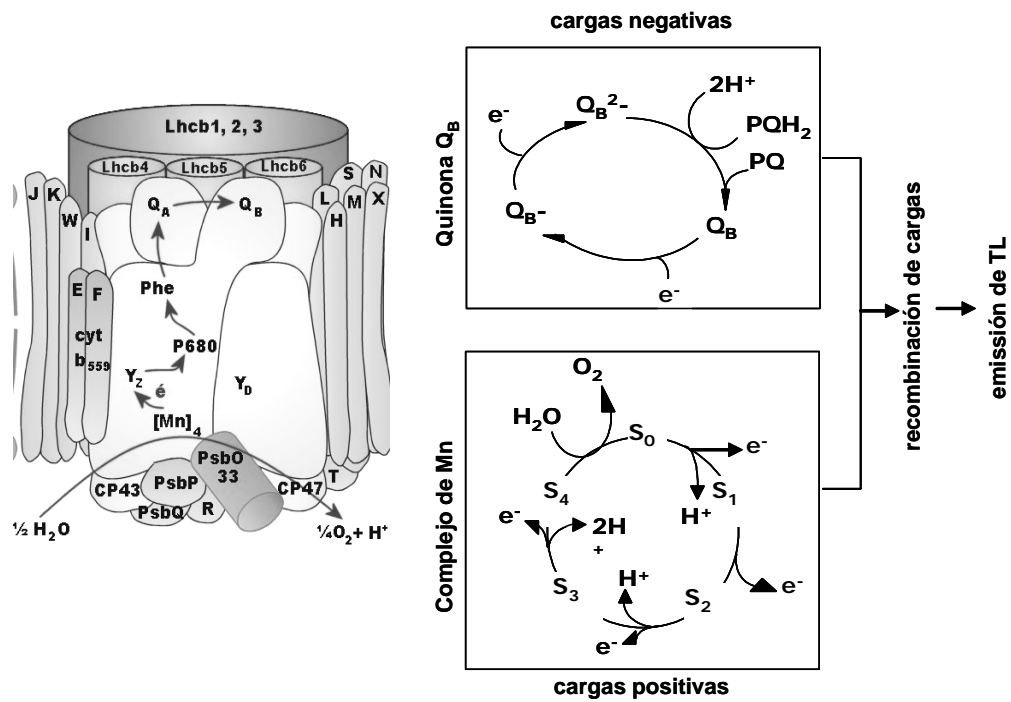


Fig 16 : El transporte electrónico en el PSII inducido por la luz genera la formación de las cargas negativas (Q<sub>B</sub><sup>•-</sup>) en su lado aceptor y las positivas (estados S del complejo de Mn) en su lado donador. Las bandas de TL fotosintética están causadas por la recombinación de especies cargadas positiva- y negativamente. (Ynoue, 1996)

por cualquier motivo, como puede ser por ejemplo por la acción de algunos herbicidas. Tras una segunda separación de cargas en el RC, Q<sub>B</sub><sup>•-</sup> es nuevamente reducido a Q<sub>B</sub><sup>2-</sup>, pero esta especie es reemplazada por otra plastoquinona (PQ) del pool y no participa en condiciones normales en la TL fotosintética.

La estabilización de cargas también tiene lugar en el lado donador del PSII. Tras formarse P680 → P680<sup>+</sup>, éste es reducido por Y<sub>z</sub>, el residuo de Tyr 161 de la proteína D1 del RC del PSII, que a su vez recibirá un electrón del complejo de 4 átomos de Mn manganeso que conforma el complejo



de lisis/oxidación del agua (OEC). Se asume que este complejo puede adoptar 5 estados diferentes redox, denominados  $S_n$ , donde  $n=0, 1, 2, 3$  y  $4$ , siendo  $S_0$  y  $S_4$  los estados de menor y mayor grado de oxidación, respectivamente. En el proceso fotosintético se van sucediendo los distintos estados  $S$ , donde paso a paso, se extraen 4 electrones de dos moléculas  $H_2O$ , que finalmente resulta en la liberación de una molécula de  $O_2$ . De los 5 estados  $S$  posibles,  $S_0$  y  $S_1$  son estables en condiciones adaptadas a la oscuridad, pero no participan en la emisión de bandas de TL porque no portan ninguna carga positiva, sin embargo  $S_2$  y  $S_3$ , estables decenas de segundos a  $T^a$  ambiente, son la mayor fuente de cargas positivas para generar TL.

Se ha postulado, aunque existe cierta controversia, que el mecanismo del ciclo de los estados  $S$  o Ciclo de Kok, responde a la fórmula 1-0-1-2, en la liberación de  $H^+$ . Este patrón explicaría el fenómeno de la oscilación de bandas en la TL fotosintética.

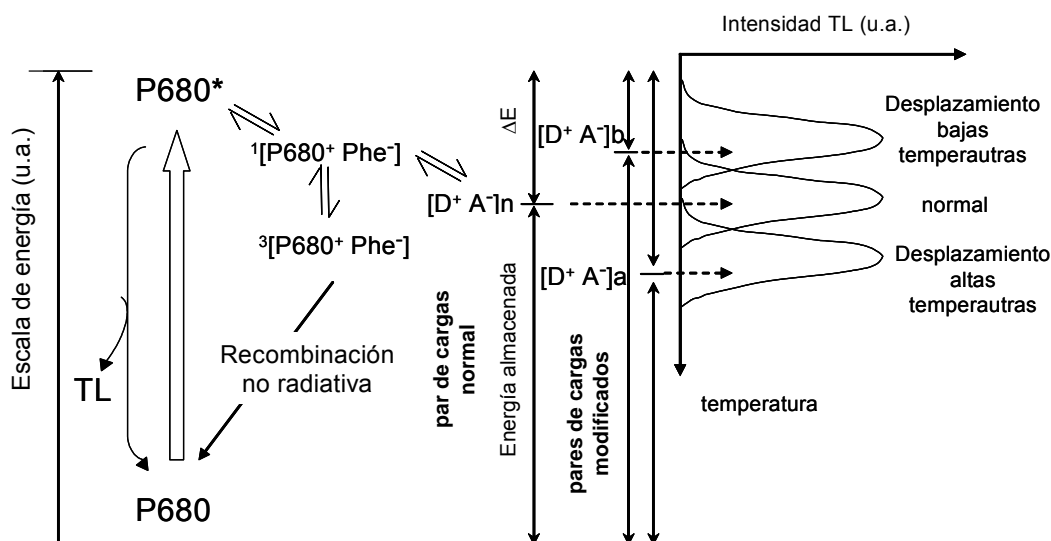


Fig 17: Esquema energético de la TL fotosintética, en relación a los cambios en la temperatura de los picos de las bandas de TL.  $[D^+ A^-]b$  y  $[D^+ A^-]a$ , indican pares de cargas estabilizados a con más baja o más alta capacidad de "secuestro" de cargas negativas; ello ocurre ante cambios en el ambiente molecular de dichos pares debido a mutaciones, ausencia de cofactores, desnaturalizaciones, etc... (Ynoue, 1996)

El primer producto de la separación de cargas inducida por la luz es el par singlete  $^1[P680^+ \text{Pheo}^-]$ , que rápidamente pasa a estabilizar las cargas positivas y negativas con la formación de un donador oxidado ( $D^+$ ) y un aceptor reducido ( $A^-$ ), devolviendo el RC al nivel basal de energía. La mayor parte de la energía absorbida es almacenada en el sistema en forma de una diferencia de potencial redox, mientras que otra parte (energía de estabilización), es empleada en mantener los pares de cargas separados, lo que implica una barrera de energía de activación frente a la recombinación. Así mediante esta técnica, si incrementamos la  $T^a$  de la muestra, suplementaremos esta pérdida de energía libre y el par de cargas  $[D^+ A^-]$  será capaz de recombinar y re-excitar a P680, dando lugar a una emisión fotosintética de TL procedente de P680\* y de las moléculas de Chl adyacentes. La recombinación de  $[D^+ A^-]$  puede generar al par  $[P680^+ \text{Pheo}^-]$  en estado triplete, el cual recombina y mediante una transición no radiativa (en forma de calor) devuelve a P680 a un nivel basal o en el estado singlete, el cual es capaz de generar  $^1P680^*$  que contribuirá a la señal de TL.

*Aplicación de la TL a estudios ecofisiológicos. Bandas de TL "in vivo".*

Arnold y Scherwood (1957) descubrieron el fenómeno de la TL en plantas superiores y posteriormente se comprobó que era común a todos los organismos fotosintéticos y podía además registrarse en hojas, cloroplastos y fragmentos cloroplastídicos. Durante la treintena siguiente se afianza la fenomenología básica y concepto fundamental de la TL (Rubin y Venediktov, 1969; Desai y col. 1975; Arnold y Azzi 1968; Sane y col. 1977), seguida sobre todo del establecimiento del origen de muchas de las bandas de TL (Ichikawa y col. 1975; Inoue y col. 1976, Inoue 1976, 1981, 1983; Rutherford y col. 1982, 1984; Remeter y col. 1982; Demeter y Vass 1984). Posteriormente y hasta hoy se abrió una nueva etapa en la que se estudia las diferentes posibilidades de TL en la caracterización del PSII y la CTE, y su aplicación. Un buen resumen de todo ello viene recogido en la revisión de Vass (2003).

Hasta ahora ha aportado una valiosa información sobre la estructura y función del PSII en experimentos con preparaciones cloroplastídicas (ver revisión Vass, 2003 y referencias incluidas). Cabe mencionar los datos aportados acerca de la función de los polipéptidos asociados al OEC (Ono e Inoue, 1985; Vass y col. 1987; Homann y Madabusi, 1993), del papel de los cofactores inorgánicos en el ciclo de los estados S (Krieger y col. 1998b; Homann, 1993; Homann y col, 1993; Ono e Inoue,

1985, 1989), así como del sitio  $Q_B$  de unión de herbicidas (Horváth, 1986, 1996), el modo de acción de diferentes inhibidores del transporte electrónico (Vass y Demeter, 1982) y la búsqueda de variedades resistentes a herbicidas (Demeter y col. 1985b).

También ha sido utilizada la TL para el estudio del aparato fotosintético sometido a diferentes factores de estrés, como el térmico (Govindjee y col 1985) y fotoinhibición (Vass y col. 1988; Farineau, 1993), toxicidad por metales (Horváth y col. 1998) o la radiación UV-B (Hideg y col. 1993).

Escasos son sin embargo los experimentos de TL con plantas sometidas a estrés biótico. Nuestro grupo en colaboración con el del Dr. Horváth demostró en cloroplastos de plantas infectadas con tobamovirus, un desplazamiento de la banda B hacia temperaturas más altas (recombinación  $S_2 Q_B$ ) que en los respectivos controles; ello apuntaba a una inhibición en la formación de los estados S más oxidados en el OEC.

Respecto a la aplicación de la TL a hoja completa ha sido escasa debido, por un lado, a las grandes limitaciones que aún poseía la técnica y por otro, a los inconvenientes de la interpretación de las diferentes bandas *in vivo*. Una revisión de los avances y exposición del estado actual de la TL en hoja, junto con la descripción de un aparato de medida actualizado la encontramos en Ducruet, 2003.

Las propiedades de las bandas de TL (Sane y Rutherford, 1986; Vass e Inoue, 1992; Misra y col. 2001; Tyysjärvi y Vass, 2003) que han sido caracterizadas en tilacoides o subfracciones cloroplásticas se ven modificadas *in vivo* por el ambiente celular que le rodea, particularmente si se mide en condiciones donde se enfría, pero no se congela, la muestra. Distintos tipos de estrés van a modificar también la forma y la intensidad de dichas bandas o incluso a inducir otras que en condiciones normales son muy minoritarias.

#### *Bandas clásicas de TL*

En hoja sana adaptada a la oscuridad, iluminada posteriormente con uno o varios flashes (con una duración de  $5\mu s$  para inducir una sola separación de cargas), la más prominente es la banda B. Junto a ella también pueden ser detectadas otras bandas minoritarias, como la banda Q, a temperaturas inferiores respecto a la de B y las bandas AG y C a temperaturas superiores.

La banda B ( $S_2/S_3 Q_B$ ) va a variar según el número de flashes que se apliquen a la muestra, a diferencia de la registrada en muestras congeladas, cuya banda B tiene una  $T_m \sim 35^\circ C$ . Tras la

aplicación de un flas aparece la banda  $B_2$  con un máximo en torno a los  $32^\circ\text{C}$  generada por la recombinación  $S_2 Q_{B^-}$ ; tras 3 flases, aparece  $B_1$  a unos  $28^\circ\text{C}$  como consecuencia de la recombinación  $S_3 Q_{B^-}$ . Con dos flases,  $B_2$  es la banda más prominente con una  $T_m < 35^\circ\text{C}$  y  $B_1$  surge como un hombro y a una temperatura superior que  $B_2$ . Este desplazamiento de temperatura según el número de flases aplicados, se atribuye a una mayor inestabilidad de los estados  $S_3$  frente a  $S_2$ , cuanto mayor

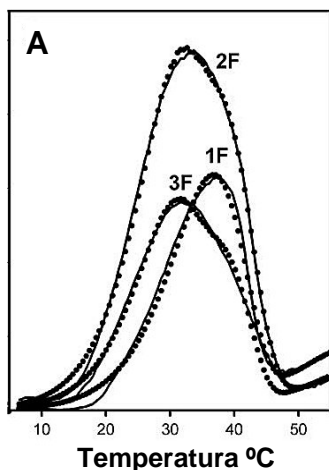


Fig 18: Banda B generada con 1, 2 y 3F en hoja de guisante. (Extraído de Ducruet, 2003)

es la acidez en el lumen (Rutherford y co. 1984b, Miranda y Ducruet, 1995b, Ducruet, 2003).

Si bien las intensidades de las bandas de TL no pueden compararse directamente, la banda B inducida con 2 flases es claramente la de mayor intensidad, seguida de la de 1F y 3F. Este efecto se debe al fenómeno de oscilación que muestra la banda B. Si antes de la medida de TL se aplican de 1-10 flases a una muestra adaptada a la oscuridad, la banda B emergente oscila con un periodo de 4, con un máximo tras 2 y 6F, que se corresponden a las situaciones en las que todos los estados S están en forma  $S_2 + S_3$  (recordemos que son los capaces de recombinar con  $Q_{B^-}$  ó  $Q_{A^-}$ ). Se considera que una muestra adaptada a la luz presenta una proporción similar de sus estados  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$  y  $S_3$  ( $S_4$  con una vida media muy corta pasa rápidamente a  $S_0$ ). Tras un periodo suficiente en oscuridad  $S_0$  y  $S_1$  permanecen estables, mientras que  $S_2$  y  $S_3$  se convierten en  $S_1$ , lo que resulta en una distribución de un 25% de  $S_0$  y un 75% de  $S_1$  antes de la aplicación de los flases e inicio de la medida. En cuanto a  $Q_{B^-}$ , está reducida en un 40% en condiciones fisiológicas y  $Q_{B^-}/Q_{B^-}$  oscila aproximadamente con un periodo de dos (Rutherford y col. 1984a).

El estudio de esta banda ha suministrado información de interés en estudios de fotoinhibición (Farineau, 1993) donde se ha visto que su intensidad disminuye en paralelo con  $F_v/F_m$ , lo que refleja daño en el PSII (Ducruet, 2003) o de estrés por frío (Briantais y col. 1992; Glémin y col. 1992.) Asimismo, Gilbert y col. (2002, 2004) han analizado la utilidad del estudio de la banda B en diversas especies de cultivo sometidas a factores de estrés como UV-B, ozono y herbicidas,

La banda A ( $\text{Tyr}_z^+ \text{Q}_B^-$ ), con una  $T_m \sim -15^\circ\text{C}$ , aparece cuando el complejo OEC está dañado, pero sólo puede registrarse en medidas que implican congelación de la muestra, lo que a veces se desaconseja porque puede inducir la aparición tanto de bandas A como Q a modo de artefactos (Ducruet, 2003).

La banda Q, resultado de la recombinación  $\text{S}_2\text{Q}_A^-$  y con una  $T_m \sim 5^\circ\text{C}$ , había sido ampliamente estudiada en cloroplastos aislados, comprobándose su inducción por DCMU al bloquearse el paso electrónico de  $\text{Q}_A$  a  $\text{Q}_B$  (Demeter y Govindjee, 1989; Vass e Inoue, 1992) Su aparición suele ir asociada al incremento de la banda C ( $\text{Tyr}_D^+ \text{Q}_A^-$ ) con una  $T_m \sim 55^\circ\text{C}$ , que también refleja un daño en el lado aceptor de electrones del PSII, por ejemplo ante fenómenos de fotoinhibición (Janda y col 1992). Al impedirse el paso del electrón de  $\text{Q}_A$  a  $\text{Q}_B$ , éste queda atrapado en  $\text{Q}_A^-$ , es decir menos estabilizado (la energía de activación es menor) que en  $\text{Q}_B^-$  y por ello da lugar a la banda Q con un pico a menor temperatura que el de la banda B. La banda C está generada en parte por  $\text{Tyr}_D^+$  de la proteína  $\text{D}_2$  del PSII que, en condiciones fisiológicas, es un elemento inactivo en el proceso de la fotosíntesis (Vermaas y col. 1988)

#### *Banda afterglow*

A la emisión de luminiscencia de una muestra sana se le superpone otra banda/hombro, con una  $T_m \sim 40^\circ\text{C}$ , según describieron Bertsch y Azzi (1965), denominada banda afterglow (AG). Aparecía fundamentalmente tras una iluminación con luz en el rojo lejano (FR;  $\lambda > 700\text{nm}$ ) y Björn (1971), mostró además que su emisión estaba relacionada con el flujo cíclico entorno al PSI y que la temperatura favorecía su emisión.

Estudios más recientes afirman que una de las formas adecuadas para inducir una emisión AG es calentando la muestra de forma gradual, tras iluminarla con luz FR, donde se evidencia una clara banda entorno a los  $45^\circ\text{C}$  (Miranda y Ducruet, 1995a). Si la iluminación empleada son los flashes,

la emisión AG se caracteriza por tener un máximo banda AG / banda B (AG/B) tras tres fases (Miranda y Ducruet, 1995). Otra propiedad de la banda AG es verse afectada por determinados compuestos que también afectan a la banda B. Congelar la muestra por debajo de  $-5^{\circ}\text{C}$  o la adición de un desacoplante de la CTE, no sólo evita el desplazamiento hacia bajas temperaturas de la banda B, sino que suprime la banda AG, dando como resultado una sola banda a  $35^{\circ}\text{C}$ . Además, la banda AG, sólo se observa en sistemas intactos: cloroplastos íntegros o discos de hoja. Es característica la inhibición de AG por antimicina A (Björn, 1971), la cual inhibe específicamente la ruta ferredoxín-plastoquinol-reductasa (FQR), pero no la NADPH-plastoquinol-oxidoreductasa (NDH) (Ducruet, 2003 y referencias incluidas).

La aparición de esta banda refleja un retorno de electrones desde especies reductoras aún desconocidas ( $X^{\cdot-}$ ), presentes en el estroma cloroplastídico, hacia el pool de plastoquinonas del PSII, permitiendo su recombinación con los estados  $S_2$  y  $S_3$  (Sunblad y col. 1986, 1988). Si los centros  $S_2 Q_B^-$  y  $S_3 Q_B^-$ , como se ha dicho, producen una banda B,  $S_2 Q_B$  y  $S_3 Q_B$  no dan lugar a ninguna emisión, salvo que un flujo de electrones procedente del estroma reduzca a  $Q_B$ , dando lugar entonces a una banda AG. Aunque esa banda generalmente es inducida por luz FR que excita preferentemente al PSI, esta emisión procede del PSII, como lo demuestran su oscilación con un periodo de 4 (Ducruet, 2003).

Asimismo se ha comprobado que la reducción del pool de plastoquinonas en la oscuridad es producto también del proceso de la cloro respiración (Bennoun, 1982; Garab y col. 1989).

Havaux (1996) demostró, mediante espectroscopia fotoacústica, que a temperaturas superiores a  $30^{\circ}\text{C}$  se activa el flujo cíclico de electrones entorno al PSI y dirige electrones al lado aceptor del PSII. Se sabe que calentando por encima de los  $30^{\circ}\text{C}$  se induce el desafilamiento de los grana (donde se localiza mayormente el PSII) y ciertos cambios estructurales. Todo ello estaría de acuerdo con el papel del estado de transición en la activación de este flujo según Finazzi y col. (2002) (ver revisión de Ducruet, 2003 y referencias incluidas).

Roman y Ducruet, (2000) proponen que la banda AG inducida por 2 fases refleja el estado energético del cloroplasto, en hojas de guisante. También hay varios trabajos que han reflejado los cambios en la emisión AG inducida por FR, bajo diferentes condiciones de estrés: deficiencia de P ó

CO<sub>2</sub> (Mellvig y Tillberg, 1986; Palmqvist y col. 1986), estrés por frío en variedades tolerantes de guisante (Roman y Ducruet, 2000) y de maíz (Ducruet y col. 2005,) o estrés salino en plantas de arroz (Zurita y col. 2004,). También se ha comprobado su presencia en plantas CAM (Krieger y col. 1998). Con todo ello, se demuestra que la banda AG en hoja, es un indicador de estrés muy sensible y una herramienta de gran utilidad en estudios ecofisiológicos (Ducruet, 2003; Roncel y Ortega, 2004), aunque su emisión va a depender de las condiciones de crecimiento del vegetal: iluminación, temperatura, edad, etc.

### 1.6.1 HTL en disco de hoja

Durante el calentamiento de la muestra fotosintética para la generación de las diferentes bandas de TL, el PSII queda totalmente destruido a partir de los 60°C; sin embargo, por encima de esta misma temperatura pueden aparecer unas bandas de emisión a altas temperaturas (HTL). Son producto de la quimioluminiscencia de especies moleculares generadas por ROS, como son los peróxidos lipídicos que se acumulan en condiciones de estrés.

El oxígeno es esencial para el metabolismo de los organismos aeróbicos, sin embargo su utilización implica inevitablemente la formación de especies parcialmente reducidas del oxígeno: superóxidos, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo... Las ROS son potencialmente tóxicas pudiendo reaccionar con los distintos componentes de la célula como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, pigmentos y otros, provocando su degradación. Muchos factores de estrés, tanto bióticos como abióticos, inducen la formación de estas ROS y el daño oxidativo, lo que puede llegar a provocar incluso la muerte celular y necrosis del tejido.

#### *Fundamento*

La peroxidación lipídica es uno de las principales consecuencias del estrés oxidativo y es particularmente activa en las membranas del cloroplasto ricas en ácidos grasos poliinsaturados. La peroxidación lipídica, una vez iniciada, da lugar a una reacción en cadena de radicales libres. Algunos compuestos de los que se forman durante la peroxidación lipídica, especialmente <sup>1</sup>O<sub>2</sub> y carbonilos excitados, son especies quimioluminiscentes por sí mismas, es decir, emiten luz al volver a su estado

basal de energía. La emisión del  $^1\text{O}_2$  tienen un pico en el rojo (634-703 nm) y los carbonilos tripletes, en la región azul-verde (450-550 nm) del espectro (Havaux, 2003).

Las plantas, al igual que todos los organismos vivos, emite de forma espontánea una luz extremadamente débil, procedente de cloroplastos y mitocondrias (Havaux, 2003 y referencias incluidas). En los cloroplastos sin embargo ocurre que los carbonilos triplete pueden transferir su energía a las moléculas de Chl cercanas, cuya desactivación resultan en una emisión de fotones entorno a los 730nm (Hideg y Vass, 1993). Esta señal de luminiscencia de origen no fotosintético se ve fuertemente inducida por un incremento en la temperatura. Su detección se basa en este fenómeno, por ello la técnica experimental empleada es la TL.

#### *Bandas de HTL "in vivo"*

Arnold y Sherwood (1957), fueron los primeros en describir una emisión de TL a altas temperaturas, pero no lo asociaron a fenómenos de peroxidación lipídica. Más tarde, Venediktov y col. (1989), mostraron la presencia de bandas de TL por encima de los 60°C, con una banda principal entorno a los 130°C, en algas u hojas sometidas a estrés oxidativo. Por su parte, Hideg y Vass (1993), encontraron una banda con un máximo a 75°C, con tratamientos oxidativos de la muestra; una banda similar se detectó en hojas de tabaco tratadas con criptogenina, sustancia de origen fúngico, (Stallaert y col. 1995) o en muestras de tilacoide de cebada durante el desarrollo (Marder y col. 1998). Ya en las condiciones de trabajo empleadas por Vavilin y Ducruet (1998), muestra seca, se vuelve a hablar de la banda alrededor de los 130°C, en muestra que presentaba peroxidación lipídica.

A partir de los últimos trabajos (ver revisión de Ducruet, 2003 y referencias incluidas) podemos decir que en una muestra verde con capacidad fotosintética que haya sufrido estrés oxidativo (estrés medioambiental, senescencia, etc.), si calentamos por encima de los 60°C y hasta los 160°C, pueden aparecer 2 bandas denominadas HTL1 y HTL2, con un máximo de temperatura entre 65-85°C y 120-140°C, respectivamente. Ambas bandas son atribuidas al  $^1\text{O}_2$  y los carbonilos triplete que se forman a partir de la peroxidación lipídica y/o durante la termólisis de hidroperóxidos lipídicos.

En trabajos relativamente recientes (Vavilin y Ducruet, 1998; Ducruet y Vavilin 1999) se demuestra que el tipo de banda emitida (HTL1 ó HTL2) depende del contenido de agua de de la



muestra. HTL1 se observa únicamente si se mide en solución (cloroplastos, algas) o en discos de hoja sobre una fina lámina de agua (como se mide en el caso de las bandas de TL fotosintéticas entre 0-60°C, ver aptdo. 2.5.2.2 M y M). La presencia de agua hace desaparecer a la banda HTL2, lo que apunta a que los peróxidos lipídicos se han hidrolizado durante el proceso de calentamiento antes de que la termolisis radiativa haya tenido lugar. Por lo tanto se ha concluido que la banda HTL1, obtenida en presencia de agua en la muestra, es una pseudo-banda producto de la competencia entre dos fenómenos: la termolisis radiativa y la hidrólisis no radiativa inducida por calor (Ducruet y Vavilin, 1999). Asimismo la banda HTL2, obtenida de medidas realizadas en seco, con y sin corriente de N<sub>2</sub>, no varía en intensidad, lo que demuestra que los peróxidos no se han formado durante el calentamiento de la muestra, sino que estaban ya presentes (Ducruet, 2003).

No obstante otras bandas entre 60-90°C con otros supuestos orígenes han sido descritas por ejemplo, en plantas de *Arabidopsis thaliana*, donde se detecta una banda prominente entorno a 70°C incluso en los controles (Havaux y Niyogi 2003). Ello podría ser atribuible a derivados del glucosinolato (Ducruet, 2003).

Por lo tanto, si bien la banda HTL1 sólo emerge en unas condiciones determinadas, la banda HTL2 medida en las condiciones adecuadas, puede emplearse como indicador general de estrés oxidativo (Havaux y Niyogi, 1999; Baroli y col. 2004, Ducruet, 2003;).

También puede aparecer una tercera banda en las medidas de HTL a temperaturas superiores a los 160°C (Ducruet y Vavilin, 1999) inducida por una oxidación de la muestra durante el calentamiento, siendo su aparición dependiente de la presencia de O<sub>2</sub>.

Actualmente se trabaja en la aplicación de las técnicas de imagen a la TL (Flor-Henry y col. 2004).

# Objetivos

1. Seguimiento de la infección viral en el sistema *Nicotiana tabacum* –PMMoV mediante técnicas biofísicas como la termoluminiscencia (TL) y la fluorescencia verde-azul (BGF), para comprobar su utilidad en el diagnóstico y detección temprana de estrés biótico.
2. Estudio del proteoma del cloroplasto de *Nicotiana benthamiana* y de los cambios generados por la infección con PMMoV.
3. Seguimiento de la infección viral, bajo diferentes regímenes lumínicos, en el sistema *Nicotiana tabacum* –TMV utilizando plantas de dos líneas de tabaco, WT y una línea transgénica (crtZ), que sobreexpresa la enzima  $\beta$ -carotínhidroxilasa. Análisis de la composición pigmentaria y de la eficiencia fotosintética mediante fluorescencia de imagen emitida por la clorofila (Chl-FI).

# Objectives

1. Study of the viral infection in the host-pathogen system *Nicotiana benthamiana*-PMMoV by mean of biophysical techniques such as thermoluminescence (TL) and blue-green fluorescence (BGF), to test applications in the diagnosis and early stress detection.
2. First approach to the *Nicotiana benthamiana* chloroplast proteome and analysis of the changes induced by PMMoV.
3. Analysis of the viral infection, under different growing light conditions, in the host-pathogen system *Nicotiana tabacum*-TMV, using plants of two different lines of tobacco, WT and a transgenic line (crtZ) which overexpress the  $\beta$ -carotinhydroxylase. Analysis by chlorophyll fluorescence imaging (Chl-FI) of the pigment composition as well as photosynthetic activity and dissipative mechanisms.



## 2 Material y métodos

## 2.1 Material biológico. Hospedadores experimentales y virus.

Se emplearon plantas de *Nicotiana benthamiana* y los tobamovirus del moteado suave del pimiento, el aislado en Sicilia (Italia) denominado PMMoV-I, y el aislado en Almería (España), llamado PMMoV-S, descritos por Wetter y col. (1984) y Alonso y col. (1989), respectivamente, y plantas de *Nicotiana tabacum* con el virus del mosaico del tabaco, denominado TMV, principal representante del género de los tobamovirus. En este último sistema, distinguimos la línea silvestre o wild type (WT) de plantas de *N. tabacum* que se cultivó en paralelo con una línea de tabaco transgénica, que denominamos crtZ, y su correspondiente línea azygota (Azyg), (semillas cedidas gentilmente por la Dra.S. Römer, Universidad de Konstanz, Alemania). Se emplearon las distintas líneas de tabaco con objeto de avanzar en el estudio del papel de los carotenoides, concretamente los pigmentos pertenecientes al ciclo de las xantofilas: violaxantina (viol), anteraxantina (antera) y zeaxantina (zea), en la protección del aparato fotosintético (Fig 19).

La línea crtZ son plantas homocigóticas transformadas con el gen heterólogo *crtZ* de *Erwinia uredovora*, controlado por un promotor constitutivo (CaMV-35S), que codifica la  $\beta$ -carotínhidroxilasa y que son capaces de incrementar la tasa y velocidad de síntesis de zea en condiciones de alta intensidad lumínica. (Götz y col., *Plant Mol.Biol.*: 50, 129, 2002). En condiciones fisiológicas de cultivo el contenido total de pigmentos en estas plantas es similar al de las plantas control (WT y Azyg). Los controles Azyg, son plantas que habiendo sido sometidas a la misma transformación que las plantas crtZ, han perdido el gen heterólogo en generaciones posteriores y a su vez la propiedad que éste le otorgaba. Se emplean por tanto, para testar y demostrar la ausencia de posibles modificaciones no deseadas en el fenotipo de la planta, que podrían aparecer derivadas de su manipulación génica.

Las plantas se mantuvieron en cámaras de cultivo tipo ASL Microclimat, a una temperatura de 25°C / 20°C (día / noche) con una humedad relativa del 60-80%, un fotoperiodo de 16 h y una intensidad lumínica de 150  $\mu\text{mol}$  (de fotones)  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Las plantas de *N. benthamiana* fueron inoculadas de forma mecánica en sus tres primeras hojas, cuando tenían 5 ó 6 completamente formadas, con 25  $\mu$ l/hoja de una suspensión de 50  $\mu$ g/ml de virus purificado (PMMoV-S e -I) en tampón de inoculación (fosfato sódico 20 mM

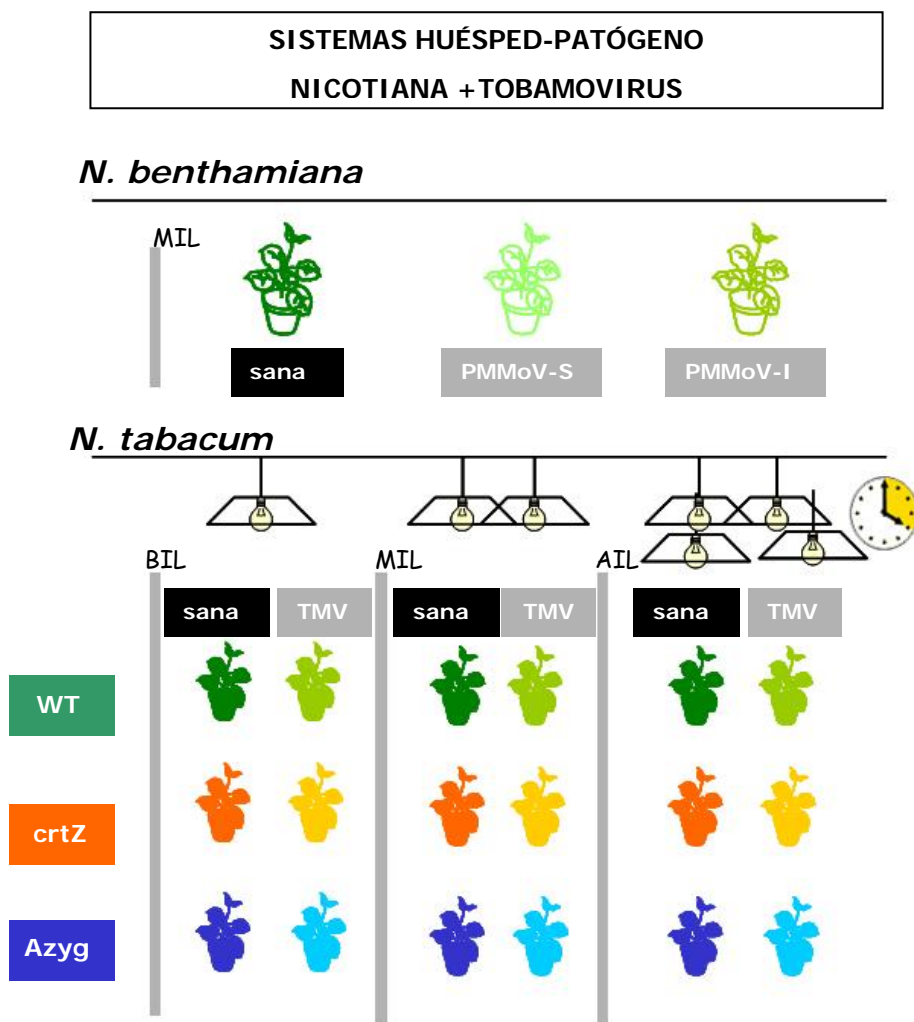


Fig 19. Esquema de los distintos sistemas huésped-patógeno empleados (ver texto).

a pH 7.0). Para facilitar la entrada del virus en la hoja, se utilizó como abrasivo carborundo (Csi 600, Carlo Erba). En el caso de plantas de tabaco la inoculación se llevó a cabo de forma análoga en sus dos primeras hojas cuando éstas tenían 7-8 hojas bien desarrolladas y con una solución de virus (TMV) en este caso, de 10  $\mu\text{g/ml}$ . Como control de los experimentos se utilizaron siempre plantas sanas tratadas en paralelo con tampón de inoculación.

Cuando se llevó a cabo la inoculación de *N. tabacum* con TMV, se establecieron 3 grupos de plantas, cada uno de los cuales estuvieron siempre representados por las tres líneas de *N. tabacum*, WT, crtZ y Azyg, en función de la intensidad lumínica a la que estos fueron sometidos: un primer grupo que fue cultivado en condiciones de baja intensidad lumínica (BIL) y de forma constante durante todo el día, un segundo grupo cuyas condiciones fueron moderadas (MIL), 50 y 130  $\mu\text{mol}(\text{fotones}) \text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  respectivamente, y un tercer grupo que creció con 130  $\mu\text{mol} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , excepto durante 4 horas al día (tras 5 horas de iniciarse la iluminación en la cámara), en las que se sometió a las plantas a intensidades de 1000  $\mu\text{mol} \text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , que consideramos como condiciones de alta intensidad lumínica (AIL) (Fig 19).

Para los distintos ensayos distinguimos entre hojas asintomáticas (ASIN) y sintomáticas

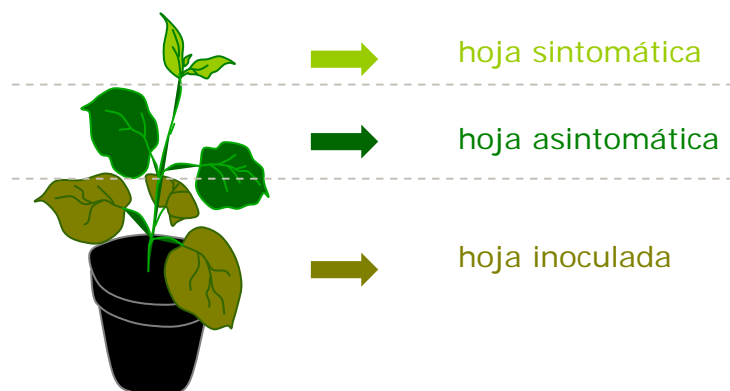


Fig 20. Representación esquemática de los distintos tipos de hoja de *Nicotiana* a lo largo de la infección.



(SIN) (Fig. 20). Las primeras, ya formadas en el momento de la infección, no desarrollan síntomas visuales, mientras que las hojas jóvenes que aparecen posteriormente, en *N. benthamiana* presentan un enrollamiento muy acusado a partir de 5 ó 7 días después de la inoculación. En las hojas SIN de *N. tabacum* infectada con TMV, aparece lo que se conoce como “clareamiento de venas”, siendo en estadios más avanzados de la infección cuando es visible el mosaico característico. Los controles en plantas sanas corresponden a hojas de edad y posición equivalente a las anteriores. Para un adecuado seguimiento del desarrollo de la infección, se tomaron muestras y realizaron medidas a distintos tiempos post-infección (dpi), que variaron en función del sistema huésped-patógeno elegido, el tipo de hoja y la técnica empleada.

## 2.2 Preparación de muestras para electroforésis

### 2.2.1 Obtención de membranas tilacoidales

Se siguió el procedimiento de Ford y Evans (1983) con algunas modificaciones. El tejido vegetal se homogenizó en un tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.4, sacarosa 300 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM en una proporción 1/4 (p/v). La mezcla se filtró a través de dos capas de gasa de nylon para eliminar los restos de tejido y se centrifugó 15 min a 3000 g en centrífuga Sorvall refrigerada a 4°C. Se lavó el sedimento con el mismo tampón y se suspendió en una solución hipotónica,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, a la que se añadió igual volumen de un tampón MES-NaOH 5 mM a pH 6.5, NaCl 15 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM, para después centrifugar a 3000 g durante 10 min. El sedimento de membranas tilacoidales se conservó en tampón MES-NaOH 50 mM pH 6,5, sacarosa 400 mM, NaCl 15 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM. Para determinar el rendimiento del fraccionamiento se tomaron alícuotas para medir la concentración de clorofila de la muestra (ver aptdo.2.2.2.1).

### 2.2.2 Preparación de cloroplastos íntegros

Para aislar los cloroplastos íntegros se trocearon 8g de peso fresco de hoja para homogenizarse con un Polytron® durante 4 sg a 10.000rpm en 35 ml de tampón de homogenización semicongelado (Sorbitol 0.33 M, 50 mM HEPES-KOH a pH 7.5, 0.1% BSA, 2 mM

EDTA y 1 mM Cl<sub>2</sub>Mg). Se filtró el homogenado con 4 capas de gasa de nylon, se dividió el volumen a partes iguales en dos tubos y se depositó en el fondo de cada uno, empleando una pipeta de cristal, una capa de Percoll (Percoll al 40% en tampón de homogenización) de 14 ml de solución de Percoll por cada 17 ml de homogenado. Se centrifugaron ambos tubos a 7.000 g (Centrifuga Sorvall RC5C, rotor SS-34) y a 4°C durante 1 min, tras alcanzar la velocidad máxima, retirándose a continuación y muy rápidamente el sobrenadante. El sedimento, los cloroplastos ya aislados, de uno de los tubos, se suspendió con suavidad en 200 µl de tampón de suspensión (Sorbitol 0.33 M, 50 mM Hepes-KOH a pH 7.5), se tomaron alícuotas para la determinación de clorofila (ver aptdo. 2.2.1.1.) y se conservó a -80°C hasta el momento de su empleo. Los cloroplastos del sedimento restante fueron lisados mediante 400 µl de solución de lisis (Cl<sub>2</sub>Mg 5mM) y se centrifugaron 13.000 g (Centrifuga Sorvall RC5C, rotor SS-34), a 4°C y durante 10 min. Como resultado se obtuvo la fracción estromática (sobrenadante) y los cloroplastos lisados (sedimento). Se suspendió el sedimento en 200 µl de tampón de suspensión, se tomaron alícuotas para la determinación de clorofila y se conservó a - 80°C, al igual que la fracción estromática, para su posterior utilización. En todo momento se mantuvieron las muestras, el material y las soluciones a 4°C.

### 2.2.2.1 Determinación de clorofila.

Para medir la concentración de Chl en muestras cloroplastídicas, se realizó una extracción en acetona al 80% y se midió espectrofotométricamente la absorbancia de la solución a 652 nm. Los cálculos se realizaron según Lichtenthaler (1987):

$$\text{Chl (mg/ml)} = \frac{27,8 \cdot \text{DO}_{652} \cdot \text{volumen}}{\text{factor de dilución}}$$

## 2.3 Análisis electroforético de proteínas

Para el análisis electroforético de preparaciones cloroplastídicas, hemos utilizado básicamente la electroforesis monodimensional en geles de poli(acrilamida) en presencia de SDS según Laemmli (1970) y la electroforesis bidimensional (2DE) siguiendo el protocolo de O'Farrell y col.(1977), Rabilloud y col. (1997) y Molloy (1998).

### 2.3.1 Análisis electroforético monodimensional

Esta técnica se ha utilizado para una primera aproximación al análisis del patrón polipeptídico, para el desarrollo de la segunda dimensión en la electroforesis 2D y como apoyo y referencia en la transferencia de proteínas a PVDF o nitrocelulosa.

Se utilizaron los equipos Mini-Protean y Protean X 2i ambos de Bio-Rad con dimensiones de gel de 6cm x 8cm x 0.75mm y 14cm x 16cm x 1.5 mm, respectivamente. La composición del gel es idéntica en ambos casos. Para el gel separador, acrilamida 15%, bisacrilamida 0,4%, SDS 0,1%, urea 4 M, Tris-HCl 375 mM a pH 8,8, TEMED 0,05% y APS 0,1% y para el gel concentrador, acrilamida 5%, bisacrilamida 0,13%, Tris-HCl 125 mM a pH 6,8, SDS 0,1%, TEMED 0,05% y APS 0,1%. El tampón de desarrollo de la electroforesis es Tris 25 mM, glicina 190 mM y SDS 0,1%.

Las muestras se solubilizan incubándolas 5 min a 95°C y 20 min a 37°C en tampón de carga Tris-HCl 62.5 mM a pH 6.8, SDS 4%,  $\beta$ -mercaptoetanol 2% y glicerol 20%. En el caso de preparaciones cloroplastídicas se suele cargar en gel pequeño el equivalente a 8  $\mu$ g de Chl y 20-30  $\mu$ g de Chl en gel grande, para su detección con tinción de azul Coomassie y la mitad de estas cantidades como máximo, si se emplea tinción de plata.

La electroforesis se desarrolló en el caso de los geles pequeños aplicando primero un voltaje de 75 V durante 30 min. para facilitar la entrada de la muestra y a continuación 150 V de forma constante, durante aproximadamente hora y media. Para los geles grandes se emplea, además de un sistema de refrigeración adicional, un amperaje constante de 17 mA/gel durante unas 14 horas y la mitad de amperaje durante la primera media para facilitar la entrada de la muestra.

## 2.3.2 Análisis electroforético bidimensional

La electroforesis bidimensional consiste en una separación secuencial de los polipéptidos según su punto isoeléctrico mediante un isoelectroenfoque (IEF) y posteriormente por su masa molecular mediante una electroforesis en gel (SDS-PAGE).

### 2.3.2.1 Preparación de la muestra

La solubilización de la muestra se realizó siguiendo esencialmente el protocolo de Schuster y Davies (1983) con modificaciones según Bauw y Montagu (1997) como se detalla a continuación. Se partió como mínimo del equivalente a 200  $\mu\text{g}$  totales de Chl de una muestra de cloroplastos íntegros o lisados y se llevaron a una concentración final de  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de Chl. Se le añadió tampón de extracción 2x (sacarosa 0,7 M, Tris 0,5 M, 30 mM HCl, EDTA 50 mM, KCl 0,1, 2-mercaptoetanol) en una proporción 1:1 (v/v) en el que se dejó incubar la muestra durante 20 min., a 4°C y agitando repetidas veces, teniéndola así en las condiciones adecuadas para llevar a cabo la extracción fenólica propiamente dicha. A continuación se añadió igual volumen de fenol saturado en Tris-HCl 1 M a pH 6.6 (Amresco) y se incubó con agitación vigorosa durante 10 min, a 4°C,. Se separó la fase acuosa de la fase fenólica centrifugando a 4°C, a 13500 rpm durante 10 min en una centrífuga Eppendorf de mesa refrigerada. Se separó y lavó la fase fenólica unas dos veces más, hasta que desapareció la interfase, añadiéndole igual volumen de tampón de extracción, agitando con Vortex y posterior centrifugación a 13.500 rpm 10 min, a 4°C. Por último, las proteínas se precipitaron de la fase fenólica a - 20°C con 5-6 volúmenes de acetato amónico 0,1 M en metanol grado HPLC durante 12 horas. Tras centrifugar 10 min a 13500 rpm, el sedimento sufrió tres lavados con acetato amónico 0,1 M en metanol grado HPLC, eliminando así completamente el fenol y los pigmentos. En un paso posterior, se realiza un último lavado con acetona fría para eliminar restos de acetato amónico dejando incubar la muestra 4h a-20°C, tras las que se centrifugó la muestra en las condiciones anteriores. El sedimento de proteínas se deja secar en el tubo hasta evaporar totalmente la acetona, quedando de esta forma la muestra libre de sustancias que interfieran con el IEF. Finalmente se solubilizaron las proteínas durante 2 h a 35°C en el tampón de carga para IEF urea 9,2 M, CHAPS 3,5% (p/v), NP-40 1%, PMSF 2 mM,  $\beta$ -

mercaptoetanol 2%, y anfolitos (Bio-Rad) al 5% (2,5% rango de pH 3-10, 1,5% pH 4-6 y 1% pH 5-7), si la 1ª dimensión se corrió en geles de disco. Cuando la 1ª dimensión se realizó con tiras con gradiente de pH inmovilizado (IPG) de Bio-Rad la solubilización de las proteínas se realizó durante 2h a Tª ambiente con el Reactivo 2 del "ReadyPrep Protein extraction kit" (Bio-Rad 163-2088) En ambos casos una vez finalizada la solubilización, se centrifugó la muestra 10 min., a 13.500 rpm y a temperatura ambiente para eliminar el material insoluble.

### **2.3.2.2 Primera dimensión (IEF) en geles de disco.**

El protocolo original es de O'Farrell y col. (1977). La primera dimensión se desarrolló en geles de poliacrilamida de disco que polimerizaron en tubos de cristal con un diámetro interno de 2,5 mm ,10 cm de longitud y en los que se estableció un gradiente de pH.4-7. La composición de estos geles era de acrilamida 5%, bisacrilamida 0.13%, urea 9.2 M, CHAPS 3,5%, NP-40 1 %, anfolitos 5% (2,5% anfolitos 3-10, 1,5% anfolitos 4-6 y 1% anfolitos 5-7 de Bio-Rad), APS 0,1 % y TEMED 0,01%. Una vez cargadas, las muestras se cubren con una solución de sellado 4 M de urea. El IEF se desarrolla siguiendo un programa de tres fases de voltaje constante: 30 min a 200V, 30 min a 300 V, 15 h a 400 V y 1 h a 800 V. La solución del ánodo es NaOH 50 mM y la del cátodo es H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM. Finalizado el IEF, los geles se incuban a temperatura ambiente durante 30 min, en una solución de equilibrado de la muestra o tampón de carga de la segunda dimensión (Tris-HCl 50 mM a pH 6,8, urea 6 M, glicerol 30%, SDS 4%, DTT 1% y azul de bromofenol 0,02%), dos veces. Tras este paso, los geles de disco pueden ser utilizados inmediatamente para la segunda dimensión o congelarse a – 20°C inmersos en el mismo tampón de equilibrado hasta el momento de se uso. En ambos casos antes de cargarlo en el SDS-PAGE se incubó a temperatura ambiente durante 1 h con el mismo tampón, el cual se renovó cada 30 min.

### **2.3.2.3 Primera dimensión (IEF) en tiras con gradiente de pH inmovilizado.**

Se emplearon tiras IPG pH 4-7 de 11cm de Bio-Rad, que fueron rehidratadas activamente en la bandeja de IEF, a 50v y 20°C durante un mínimo de 14h y tras cargarlas con

185 µl de muestra. Para proteger la muestra y evitar su evaporación se cubre la tira con un aceite mineral que no interfiere en el proceso. Previo al enfoque se colocaron los pequeños trozos de papel de filtro entre el electrodo y la tira y en los dos extremos de la misma. El IEF se llevó a cabo con un programa de tres pasos: 1º) 15 min. a 250 V, 2º) 2h para alcanzar a partir de los 250 los 8000 V, de forma lineal (rampa rápida) y 3º) el tiempo requerido para aplicarle a la muestra a 8000 V/h un total de 35.000 V. En condiciones ideales la primera dimensión se desarrolló, en un total de 7h. Una vez finalizada, se extrajo la tira y se incubó 2 veces 20 min. en tampón de equilibración (Tris-HCl 50 mM a pH 8,8, urea 6 M, glicerol 30%, SDS 4%, DTT 2% y azul de bromofenol 0,02%)(añadiendo tampón fresco cada vez) y se puso la segunda dimensión . Si la tira IPG no se utilizaba se extrajo de la bandeja, retirándose los restos de aceite mineral, para conservarla en seco a -20°C.

#### **2.3.2.4 Segunda dimensión**

Se preparó un gel SDS-PAGE separador con gel concentrador sin pocillos de 14x16 cm , en el caso de los geles de disco y únicamente un gel separador si lo que se iba a cargar era una tira IPG, según las condiciones descritas en el aptdo. 2.2.3.1. En el caso de geles en los que algunas proteínas se identificarían posteriormente mediante MALDI-TOF, fueron de un 12% de acrilamida y 1mm de grosor. Se depositó el gel de disco/tira IPG en la parte superior de su gel SDS-PAGE correspondiente, cubriéndose con una capa fina de agarosa al 0,8% en tampón de desarrollo de electroforesis, para facilitar su adhesión e inmovilizarlo. Las condiciones de desarrollo de la electroforesis son las descritas para geles grandes en el aptdo. 2.2.3.1.

#### **2.3.3 Detección de proteínas en gel**

Se necesitaron distintos tipos de tinciones en función no sólo de la cantidad de muestra cargada sino también de la compatibilidad de las mismas con la espectrometría de masas (MS). La tinción de plata de Blum y col. (1987) ha sido una de las tinciones más empleadas a lo largo de este trabajo pero sólo el protocolo modificado de la misma es compatible con la técnica de

MALDI-TOF. La tinción con azul Coomassie y con SYPRO® Rubí de Bio-Rad también se emplearon ya que ambas son compatibles con la MS.

### 2.3.3.1 Detección de proteínas mediante tinción de plata

La detección de las proteínas se realiza según Blum y col. (1987) con pequeñas modificaciones. Los geles se fijan 1 h en una solución de metanol 50%, ácido acético 12% y formaldehído 0,0185%, seguido de tres lavados de 20 min, dos con etanol al 50% y uno con etanol al 30%. Tras una incubación de 1 min en una solución de tiosulfato sódico 0,02% (p/v), se lavan 3 veces 20 sg con agua destilada para eliminar el exceso de esta sal (renovando la solución cada vez). Finalmente, se incuban 30 min en oscuridad en  $\text{AgNO}_3$  12 mM y formaldehído 0,03%, para lavar 2 veces 20 sg con agua destilada y revelar con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,6 M, formaldehído 0,0185% y tiosulfato sódico 0,0004 %. La reacción se detiene con una solución de metanol 50% y ácido acético 12% (v/v). Se necesitan, para cada paso, 100ml/gel pequeño y 250ml/gel grande.

### 2.3.3.2 Detección de proteínas mediante tinción de plata modificada para MALDI

Esta tinción se realiza siguiendo las recomendaciones de Yan (2000). En primer lugar se fijaron los geles con una solución de etanol al 40% y ácido acético glacial al 10%, durante 30 min. A continuación se introdujeron los geles otros 30 min. en una solución de sensibilización (etanol 30%, acetato sódico al 6.8% p/v y de tiosulfato sódico al 0.2% p/v). Tras 3 lavados con agua destilada de 5 min. cada uno, se añadió la solución para la reacción de la plata (nitrato de plata al 0.25% p/v) que se dejó actuar 20 min., después de la cual se realizaron 2 nuevos lavados de agua destilada de 1min.cada uno. Se añadió entonces la solución de revelado (carbonato sódico al 2.5% p/v y formaldehído al 0.04% v/v, procedente de formaldehído comercial embotellado al 37% p/v), que se deja actuar hasta que aparezcan las proteínas de interés tras lo que se para la reacción durante 10min. con la solución de parada ( $\text{EDTA-Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  al 46% p/v). Finalmente los geles se lavaron 3x5 min. con agua destilada.

### **2.3.3.3 Detección de proteínas mediante tinción azul Coomassie**

Las proteínas se fijaron y tiñeron en una solución de azul Coomassie (Brilliant Blue R 250, Sigma) al 0.01% en metanol:ácido acético:agua (40:10:50) durante 15 min., a continuación se realizó la destinción una solución de metanol:ácido acético:agua (40:10:50).

### **2.3.3.4 Detección de proteínas mediante tinción SYPRO<sup>®</sup> Rubí**

Esta tinción se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del proveedor. Se fijaron las proteínas, 30min., en una solución de etanol al 50% y ácido acético al 3%, a continuación se incubaron los geles durante 12-14h con la solución de SYPRO<sup>®</sup> Rubí y finalmente se les introdujo en una solución al 10% de etanol y 7% de ácido acético durante 1h. Éste último paso elimina el exceso de solución de tinción y la señal de fondo que éste pueda provocar. Las proteínas se visualizaron mediante un transiluminador UV Bio-Rad Gel Doc<sup>™</sup> 2000 con cámara CCD.

## **2.3.4 Transferencia electroforética de proteínas a membrana de nitrocelulosa (Western blotting). Inmunorrevelado**

La transferencia de las proteínas separadas por electroforesis mono o bidimensional a membranas de nitrocelulosa de 0,45  $\mu$ m de diámetro de poro (Millipore) y cuando se consideró necesario a PVDF se llevó a cabo para la posterior inmunodetección de las proteínas de interés. Se siguió el método original de Towbin y col. (1979). Una vez desarrollada la electroforesis, el gel correspondiente y la membrana de nitrocelulosa se equilibran en el tampón de transferencia Tris 25 mM, glicina 190 mM y metanol 20%, en el caso de las membranas de PVDF hay que sumergirlas previamente en metanol para activarlas. La transferencia se realizó en un equipo Bio-Rad (Trans Blot Cell, Munich) en cubeta refrigerada a 4°C a intensidad de corriente constante de 250 mA durante 1,5 h.

Para el inmunorrevelado se incubó la membrana de nitrocelulosa en PBSA durante 30 min., posteriormente se realizó una incubación con el anticuerpo primario deseado, diluído en PBSA a la concentración adecuada, de 16 h a 4°C. Tras tres lavados de 15 min. de la membrana



en PBS, se incubó 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario preparado en PBSA, a 1:1000 si se trató del anticuerpo secundario de SIGMA anti-rabbit IgG ó 1:5000 si fue GARPO (goat-antisera to rabbit IgG, Pharmacia), ambos conjugados a peroxidasa. Antes del revelado, se lavó de nuevo la membrana tres veces durante 15 min. con PBST. Con el primer anticuerpo secundario el inmunorrevelado se llevó a cabo mediante una reacción coloreada, para lo que el revelado se realizó sumergiendo la membrana en una solución en PBS de 2-propanol al 20%, 4-cloro-1-naftol al 0,08% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,0003%. Cuando la señal tiene suficiente intensidad se para la reacción con agua. Cuando se utilizó el segundo anticuerpo secundario el revelado se realizó por una reacción de quimioluminiscencia con el preparado ECL de Pharmacia, siguiendo las instrucciones del proveedor. En este caso la reacción enzimática produce un compuesto luminiscente detectado mediante películas sensibles a rayos X (Hyperfilm, Pharmacia).

### **2.3.5 Espectrometría de masas MALDI-TOF. Identificación de proteínas mediante huella peptídica**

#### **2.3.5.1 Digestión en gel de proteínas y preparación de muestra para el análisis mediante espectrometría de masas**

Las manchas de proteína fueron escindidas manualmente y enviadas al Servicio de Proteómica del CNIC donde se llevó a cabo la identificación de las mismas como se detalla a continuación. Las proteínas fueron digeridas de forma automática en un robot digestor Proteineer DP (Bruker-Daltonics, Bremen, Alemania). Se empleó el protocolo de digestión de Schevchenko *et al.* con ligeras variaciones (Schevchenko y col. 1996). Para la obtención de la huella dactilar peptídica y de los espectros LIFT TOF/TOF (Suckau y col. 2003) se mezcló una alícuota de ácido a-ciano-4-hidroxicinámico (Bruker-Daltonics) en acetonitrilo acuoso al 33% y 0,1% de ácidotrifluoroacético con una alícuota del digerido arriba indicado y la mezcla se depositó en un portamuestras MALDI AnchorChip (Bruker-Daltonics).

### **2.3.5.2 Huella peptídica MALDI, espectros LIFT TOF/TOF y búsqueda en bases de datos**

Los espectros de huella peptídica se obtuvieron en un espectrómetro de masas MALDI Bruker Ultraflex TOF/TOF (Bruker-Daltonics) (Suckau y col. 2003) en modo reflector positivo. Cuando fue posible, las medidas de masa se llevaron a cabo de forma automática mediante un programa basado en lógica difusa. Cada espectro fue calibrado internamente empleando como referencia señales de masa de iones provenientes de la autólisis de la tripsina, obteniéndose una precisión típica para la medida de masa de  $\pm 25$  ppm. Las masas de los péptidos trípticos así obtenidas fueron transferidas mediante el programa MS BioTools (Bruker-Daltonics) al programa Mascot (Matrix Science, Londres, Reino Unido) para llevar a cabo la búsqueda en la base de datos NCBI nr. Cuando estaban disponibles, los datos de MS/MS procedentes de los espectros LIFT TOF/TOF fueron combinados con los datos de MS de las huellas peptídicas para llevar a cabo las búsquedas en bases de datos.

## **2.4 Análisis del perfil de pigmentos, clorofilas y carotenoides, mediante HPLC.**

### **2.4.1 Extracción de pigmentos**

Las muestras tomadas para analizar pigmentos fotosintéticos consistieron en trozos de hoja, 30 mg de peso fresco, procedentes de hojas equivalentes de tres individuos distintos con un duplicado de cada, conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la extracción. Se homogenizaron en mortero con 0.5 ml de acetona fría 100 % grado HPLC y en presencia de una pequeña cantidad de carbonato sódico ( $\text{NaCO}_3$ ), para evitar la formación de feofitinas. Se recoge el contenido del mortero tras la extracción en tubo Eppendorf de 1.5 ml y se centrifuga a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 min a 16.000g en centrífuga de mesa. El sobrenadante se pasa a un tubo de 2 ml que se conserva a  $4^{\circ}\text{C}$  y se lava el pellet añadiendo 0,4 ml de acetona HPLC al 100 % e incubándolo durante 10 min en oscuridad y a  $4^{\circ}\text{C}$  con agitación vigorosa. Se centrifuga nuevamente a  $4^{\circ}\text{C}$

durante 10 min a 16.000g y se unen el sobrenadante del lavado con el anterior. Se repite este paso, al menos dos veces, hasta dejar el pellet blanco-amarillento, a continuación se ajusta el volumen final a 2ml (agregando acetona o evaporando en corriente de N<sub>2</sub>) y se centrifuga una vez más a 4°C durante 10 min a 16.000g. De aquí se toman 2 alícuotas de 0.5 ml, se evaporan totalmente en corriente de N<sub>2</sub>, para posteriormente ser suspendidas en 60µl, y analizado su perfil pigmentario en el HPLC. El volumen restante se emplea para la determinación de clorofilas y carotenoides espectrofotométricamente.

### 2.4.2 Determinación de clorofilas y carotenoides mediante espectrofotómetro.

Para medir la concentración de clorofilas y carotenoides se realizó la extracción acetónica explicada en el apartado anterior, y se midió espectrofotométricamente a 470, 645 y 662 nm. Se realiza una cuarta medición a 720 nm para eliminar interferencias. Los cálculos se realizan según Lichtenthaler y Wellburn (1983). Las fórmulas empleadas en el cálculo de la clorofila *a* y *b* y los carotenoides en acetona al 100%, fueron las siguientes:

$$\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g /ml extracto)} = 11,75 \cdot A_{662} - 2,35 \cdot A_{645}$$

$$\text{Chl } b \text{ (}\mu\text{g /ml extracto)} = 18,61 \cdot A_{645} - 3,96 \cdot A_{662}$$

$$\text{Car (}\mu\text{g/ml extracto)} = (1000 \cdot A_{470} - 2,27 \cdot \text{Chl } a - 81,4 \cdot \text{Chl } b) / 227$$

### 2.4.3 Análisis de pigmentos mediante HPLC.

Se empleó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la separación y análisis de los pigmentos fotosintéticos, especialmente los carotenoides. Se separaron mediante una columna Spherisorb de fase reversa ODS 1, 5µRP18 (Dr Maisch, Ammerbuch, Alemania). El detector fue un PDA-UV (Photodiode Array Detector, Waters 994, Eschborn, Alemania) que se empleó a 470 y a 450nm. Se trabajó con un flujo constante de 1,2 ml por minuto y un volumen de muestra de 20 µl. Para la detección de los distintos pigmentos, se emplean los tiempos de

retención, así como la comparación de los espectros con patrones o con referencias bibliográficas. La separación de los pigmentos se lleva a cabo mediante un gradiente Acetonitrilo : Metanol : 0,1 M Tris-HCl pH 7,5, (74:16:4, v/v) (solución A) y Metanol : Hexano, (4:1,v/v) (Solución B). La elución comienza con la solución A que a partir de los 4 min va a ser sustituida progresivamente por la solución B. En el minuto 7 y hasta los 25 min se eluye mediante la solución B. Desde el minuto 25 hasta el 35 la solución B será sustituida progresivamente por la solución A. Finalmente se emplean 15 min más, para equilibrar la columna solamente con la solución A.

El almacenamiento de datos y el cálculo de las áreas de los picos de los distintos perfiles obtenidos, se realizó mediante un software diseñado por el departamento de informática de la Universidad de Constanza (Alemania).

Para este trabajo se analizó el perfil pigmentario de ambos sistemas huésped-parásito descritos en el aptdo. 2.1 . En el caso del sistema de *N. tabacum*, incluimos los 3 grupos de plantas cultivados en condiciones BIL, MIL y AIL

## **2.5 Técnicas biofísicas de diagnóstico de estrés en hoja**

### **2.5.1 Fluorescencia de Imagen**

#### **2.5.1.1 Aparato de medida de la fluorescencia de imagen**

El sistema con el que se detectó la emisión de fluorescencia roja de la clorofila es un fluorímetro comercial de imagen (FluorCam,P.S. Instruments, Brno, Czech Republic, <http://www.psi.cz>) descrito en Nedbal y col. (2000a) y Nedbal y Březina,(2002) que se compone básicamente de un sistema para iluminar la muestra junto a su unidad de control y de alimentación y una cámara CCD para recoger la señal de fluorescencia, la cual al igual que el resto de los componentes, van conectadas a un PC desde el que se puede controlar todo el aparato, las condiciones de medida y se recogen y procesan los datos obtenidos. El software necesario para ello, lo proporciona la casa comercial. Este modelo es el denominado "Open FluorCam", que difiere del sistema clásico cerrado, por la flexibilidad de los paneles emisores de

luz que permite variar el ángulo y la distancia a la muestra, y la movilidad de la lámpara de luz halógena y la cámara, cuya posición respecto a la muestra también puede ser modificada.

#### Excitación mediante luz modulada y luz actínica

La muestra se irradia con luz modulada mediante flashes de  $10\mu\text{s}$  de duración que tienen un efecto actínico mínimo (flashes de medida), procedente de 2 paneles de diodos emisores de luz (LEDs) naranja brillante con un pico máximo a  $620\text{nm}$ . Cada panel está formado por 345 LEDs (HLMP-EH08, Agilent Technologies, Palo Alto, CA). La luz actínica, responsable de las reacciones fotoquímicas, se genera en lo mismos paneles y permite una iluminación continua ajustable que suele ir de segundos a minutos. La intensidad de los flashes de medida y de la luz actínica es de unos  $350\mu\text{mol}(\text{fotones})\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  sobre un área de  $8\text{cm}$  de diámetro. Adicionalmente el sistema dispone de una lámpara halógena de tungsteno de  $250\text{W}$  con un obturador, provista de un filtro para disipar el calor (KG2, Schott, Mainz, Germany, <http://www.schott.de>), que permite generar pulsos de luz actínica saturante (superpulsos) de hasta  $2000\mu\text{mol}(\text{fotones})\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y de una duración típica de 1-2 sg.

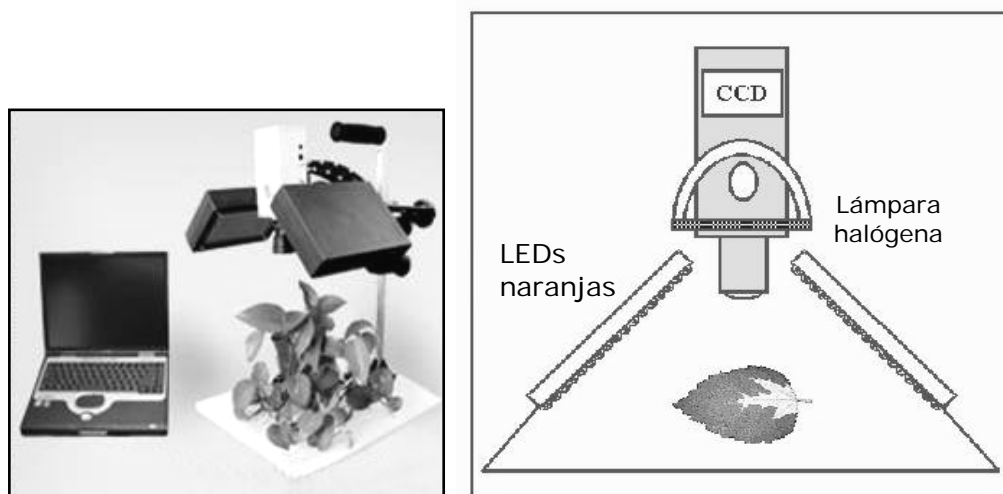


Fig 21: Foto (izq) y esquema (dra) del FluorCam.

### Detección de la señal de fluorescencia

La fluorescencia emitida por la clorofila de la muestra se detecta mediante una cámara CCD (charge-coupling device), equipada con un objetivo F1.2/2.8-6 mm, capaz de producir imágenes de 512 x 512 píxeles en una escala de grises de 12-14 componentes/tonos (bits) y una frecuencia máxima de 50 fotogramas/s. La luz captada pasa por un filtro con un pico a 700nm (FWHM 30nm) y un segundo filtro rojo de bloqueo (RG697, Corion, Franklin, MA, USA, <http://www.corion.com>). De esta forma el rango de longitud de onda de detección de fluorescencia no se solapa con el de la luz de excitación emitida por el propio aparato. Las imágenes se graban de forma sincronizada con los flashes de medida de 10 $\mu$ s de duración gracias a un obturador electrónico presente en la cámara y que permite minimizar las interferencias de señales no moduladas como es la fluorescencia provocada por la luz actínica o cualquier otra luz ambiental. Por lo tanto, el sistema del FluorCam permite en su conjunto captar en paralelo las señales de fluorescencia y las correspondientes al "ruido de fondo" en imágenes separadas. Éstas posteriormente son restadas para generar una imagen de la fluorescencia real emitida por la muestra como resultado de la iluminación aplicada. Igualmente esta técnica permite un cálculo muy exacto de la fluorescencia inicial en estado adaptado a la oscuridad ( $F_0$ ) y la fluorescencia máxima en estado adaptado a la oscuridad ( $F_M$ ) y a la luz ( $F_M'$ ).

### Procesamiento de datos

Todos los datos son transferidos a un PC, a través de un puerto USB 2.0, mediante el cual con el software FluorCam 5.1, compatible con Windows2000/XP, se almacenan y procesan los datos. Cada uno de los píxel que componen una imagen de fluorescencia tiene un valor que representa la intensidad de fluorescencia emitida por la zona de muestra correspondiente. Mediante el programa se pueden combinar estas imágenes de fluorescencia real tomadas en distintos momentos de la medida y realizar operaciones aritméticas píxel a píxel: suma, resta y división, obteniendo una nueva imagen virtual para representar los distintos parámetros de fluorescencia. Estos datos se pueden guardar en archivos de imagen tipo bmp o exportar los datos en forma numérica en archivos tipo txt. El software además proporciona una gráfica con la cinética de fluorescencia del área medida que también es exportable de forma numérica en

archivos tipo txt. Cualquiera de estas aplicaciones se puede realizar del total del área medida o de una o varias zonas que queramos seleccionar porque sean de especial interés.

### 2.5.1.2 Protocolo de medida

Las medidas se realizaron siguiendo el método de análisis de coeficientes de *quenching*, en el que se somete a la muestra vegetal previamente adaptada a la oscuridad, situación en la cual los procesos fotoquímicos y no fotoquímicos están inactivos, a un pulso de luz saturante con el que se consigue que  $Q_A$  que estaba totalmente oxidada se reduzca por completo, alcanzando la fluorescencia su valor máximo,  $F_M$ . Segundos después se ilumina la muestra con una luz actínica y se la somete a sucesivos superpulsos obteniendo una gráfica como la de la Fig. 22 La diferencia entre los valores de fluorescencia máxima,  $F_M$  y  $F_M'$ , se debe a la disipación de energía en forma de calor o *quenching* no fotoquímico (NPQ), mientras que la diferencia entre  $F_M'$  y el valor de fluorescencia en el estado estacionario ( $F_S$ ) se debe a la conversión de la energía absorbida en energía química, *quenching* fotoquímicos (qP). Por tanto se pueden determinar los correspondientes valores de *quenching* fotoquímico y no fotoquímico respectivamente como:

$$qP = \frac{F_M' - F_t}{F_M' - F_0'} \quad qN = 1 - \frac{F_M' - F_0'}{F_M - F_0}$$

Dado que la inducción de la fluorescencia tiene lugar en unos pocos milisegundos, sólo con aparatos muy precisos y suficientemente rápidos puede medirse  $F_0$ . En el caso de  $F_0'$  su medida exacta se obtiene iluminando la muestra con luz del rojo lejano. Si bien el FluorCam permite el cálculo de  $F_0$  el modelo que fue empleado para este trabajo no disponía del dispositivo necesario para el cálculo de  $F_0'$ . Así se puede calcular una aproximación de los parámetros de fluorescencia, considerando que la  $F_t$  en el estado estacionario ( $F_S$ ) es prácticamente igual a  $F_0$ .

El rendimiento cuántico del PSII (Genty y col., 1989), que cuantifica la proporción de energía absorbida por el PSII que es utilizada en el transporte electrónico fotosintético y suele ser directamente proporcional a la tasa de fijación de  $CO_2$ , así como el *quenching* no fotoquímico (Bilger y Björkman, 1990) se expresarían como:

$$\Phi \text{ PSII} = \frac{F_M' - F_t}{F_M'} \quad \text{NPQ} = \frac{F_M - F_M'}{F_M'}$$

Además existe el denominado rendimiento cuántico potencial, expresado como  $F_v/F_M$ , un parámetro muy estable entre las distintas especies vegetales, cuyo valor es  $0.823 \pm 0.03$  en una planta que crece en condiciones fisiológicas óptimas. Un descenso en este parámetro es indicativo de fotoinhibición.

En nuestro caso las medidas de la fluorescencia se realizaron en hoja previamente adaptada a la oscuridad durante 30 min., en la que tras calcularse el parámetro de  $F_0$  se aplicó un pulso de luz saturante de  $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para obtener la imagen correspondiente a  $F_M$ .

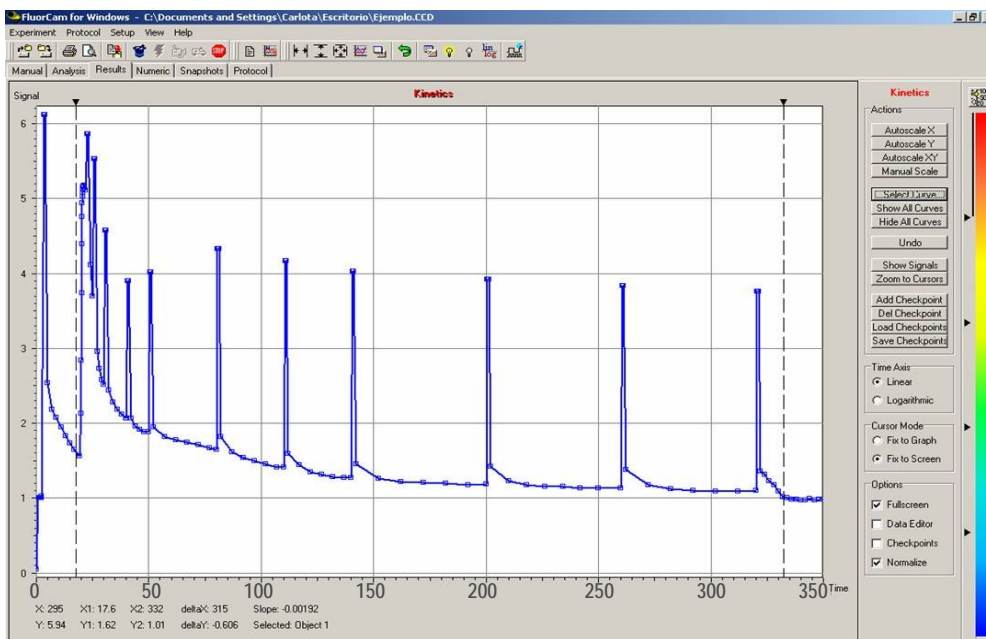


Fig 22: Cinética de inducción de la fluorescencia empleada, programada mediante el software, de 11 pulsos saturantes y 350s de duración. A la derecha la escala de falsos colores empleada.



Símbolo	Forma de Cálculo	Significado fisiológico
$F_0$		<b>Fluorescencia mínima</b> , medida en un estado adaptado a oscuridad: • todos los centros de reacción abiertos ( $qP=1$ ) • todos los procesos no fotoquímicos de la membrana tilacoidal minimizados ( $qN=0$ )
$F_M$		<b>Fluorescencia máxima</b> , medida en un estado adaptado a la oscuridad: • todos los centros de reacción cerrados ( $qP=0$ ) • todos los procesos no fotoquímicos de la membrana tilacoidal minimizados ( $qN=0$ )
$F_s$		<b>Fluorescencia en el estado estacionario</b> , que se mantiene constante durante la iluminación con radiación actínica mientras las circunstancias externas no cambien ( $qP>1$ , $qN>1$ )
$F_M'$		<b>Fluorescencia máxima, medida en un estado adaptado a la luz</b> : • todos los centros de reacción cerrados ( $qP=0$ ) • todos los procesos no fotoquímicos de la membrana tilacoidal activos ( $qN>0$ )
$F_t$		Fluorescencia en cualquier tiempo de la inducción por radiación actínica. Para el cálculo de los parámetros donde aparezca $F_t$ , éste toma el valor de la fluorescencia inmediatamente antes del pulso de luz saturante.
$F_v$	$F_v = F_M - F_0$	Fluorescencia variable, medida en un estado adaptado a la oscuridad.
$\Phi_{m\acute{a}x}$	$F_v/F_M = (F_M - F_0)/F_M$	Máximo rendimiento cuántico del PSII: mide la eficiencia de los procesos fotoquímicos del PSII. $0 < \Phi_{m\acute{a}x} < 1$
$F_v/F_0$	$F_v/F_0$	$0 < F_v/F_0 < +\infty$
$F_M/F_0$	$F_M/F_0$	$0 < F_M/F_0 < +\infty$
$\Phi_{PSII}$	$\Phi_{PSII} = (F_M' - F_t)/F_M'$	Rendimiento cuántico del PSII: indica la proporción de la energía absorbida que está siendo usada en procesos fotoquímicos. $0 < \Phi_{PSII} < 1$
$\Phi_2$	$\Phi_2 = (F_M' - F_s)/F_M'$	Rendimiento cuántico efectivo de la conversión de la energía fotoquímica en el PSII: relaciona el rendimiento cuántico del PSII con la fracción de centros de reacción abiertos. $0 < \Phi_2 < 1$
<b>NPQ</b>	$NPQ = (F_M - F_M')/F_M'$	Quenching no fotoquímico: indica la proporción de energía recibida que es disipada en forma de calor. Se correlaciona con la formación zeaxantina. $0 < NPQ < \infty$
<b>qCN</b>	$qCN = (F_M - F_M')/F_M$	Quenching no fotoquímico completo: cuantifica los procesos de disipación de la energía conectados con $qN$ y $q0$ . $0 < qCN < 1$
<b>qTQ</b>	$qTQ = (F_M - F_s)/F_M$	Quenching total: integra la co-acción de $qP$ , $qN$ y $q0$ , y mide el consumo de energía de procesos fotoquímicos y no fotoquímicos en luz. $0 < qTQ < 1$
	$F_v'/F_M'$	$0 < F_v'/F_M' < \infty$

Tabla 1: resumen de los parámetros de fluorescencia analizados, junto a su forma de cálculo y significado. Basada en Maxwell y Johnson (2000); Roháček y Bartak (1999); Schreiber (1986)

Tras unos 15s se encendió la luz actínica de  $100 \mu\text{mol}(\text{fotones}) \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y se sometió la muestra a una serie de pulsos saturantes a los 2, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240, y 300 segundos, a partir del encendido de dicha luz. Para el análisis de los coeficientes de quenching se toman imágenes sucesivas antes y durante cada uno de los pulsos de luz (Scholes y Rolfe, 1996) correspondientes a los parámetros  $F_t$  y  $F_M'$ . De esta forma se consiguen una serie de 23 imágenes para cada muestra, la correspondiente a  $F_M$  más dos por cada uno de los pulsos de luz saturante, que serán procesadas para el cálculo de NPQ y  $\Phi\text{PSII}$ . La iluminación era homogénea para un área de hoja de 10 x 12 cm aproximadamente. Se obtuvieron imágenes para los parámetros  $F_v/F_M$ ,  $\Phi\text{PSII}$  y NPQ de hojas SIN y ASIN de planta de *N. tabacum* WT, Azyg y crtZ, infectada con TMV y de sus correspondientes plantas control, a distintos dpi., de plantas cultivadas en condiciones AIL y MIL.

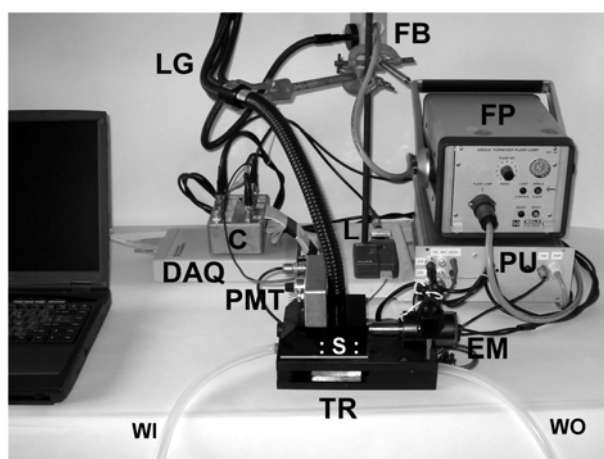
Para hacer apreciables pequeñas diferencias espaciales a lo largo de la hoja, la escala de grises (16 tonos de gris) de las imágenes que representan los distintos parámetros calculados, no resulta adecuada. Por ello, de las distintas escalas de falsos colores disponibles en el FluorCam 5.1, se seleccionó la denominada Spectrum. En la Fig. 22 se comparan la escala de grises con la de falsos colores.

## 2.5.2 Termoluminiscencia en disco de hoja

### 2.5.2.1 Aparato de medida de termoluminiscencia

Las medidas de termoluminiscencia de la clorofila se realizaron mediante un aparato diseñado y fabricado por el Dr. Ducruet, en el Servicio de Bioenergética del CEA, Saclay (París) y descrito en Ducruet, JM. (2003). Para medir TL en hoja se requiere la detección de una emisión débil en el rojo lejano en torno 730nm, (existe otro pico máximo de emisión a 685nm cuya intensidad se ve fuertemente disminuida debido a fenómenos de reabsorción de la clorofila) y de un sistema flexible para regular la temperatura de la muestra que permita un rápido enfriamiento y un calentamiento gradual y lineal de la misma.

La regulación de la temperatura se lleva a cabo mediante una placa termoelectrica Peltier de 40x40mm (Duratec de Marlow, o Thermatec de Melcor para medidas de HTL donde se alcanzan los 160°C). En el centro de la misma se ubica el termopar cubierto por una lámina de cobre o aluminio de 1mm de grosor. Todo esto se encuentra formando parte del suelo de la caja/celda de muestra, la cual está formada por un plástico negro resistente al calor, cuyo centro presenta un orificio de unos 25mm de diámetro, donde se coloca la muestra y posteriormente, cubriéndolo, un brazo con haces de fibra óptica del PAM (Walz, Germany). Dispone además de una entrada y una salida para la circulación del agua de un baño que contribuye a regular la temperatura. A la hora de medir se añade una gota de 100  $\mu$ l de agua destilada, sobre la cual se coloca un disco de hoja de 1cm de diámetro que es presionado contra el suelo de la celda con una arandela de 20mm de diámetro interno. El agua optimiza la transmisión de la temperatura a la muestra y la arandela además de presionar la hoja, garantiza que el diámetro del área medida



*Fig 23: Foto del aparato de termoluminiscencia. Esta versión consta de un detector/fotomultiplicador (PMT), un brazo/guía de luz común del PAM de WALZ (LG), un bloque de regulación de la temperatura (TR), que contiene la placa Peltier y su soporte que se mantiene a temperatura constante gracias a la circulación de agua (WI y WO señalan entrada y salida de agua), un electroimán (EM), un termopar (L), la caja conectora (C), un DAQ-Pad1200 (DAQ), una fuente de alimentación (PU), el bulbo de flashes cortos del PAM (FB), y su propia fuente de alimentación (FP) (ver texto).*

siempre sea el mismo. Para evitar pérdidas de agua durante el calentamiento de la muestra se coloca un pequeño cristal Pyrex entre el trozo de hoja y la arandela (excepto en medidas de HTL).

La emisión de luminiscencia es detectada por un fotomultiplicador (PMT), sensible al rojo (Hamamatsu H5701-50 o H7711-50) con un amplificador y una fuente de alimentación +15/-15 V, incorporados. Un obturador protege al PMT durante los periodos de iluminación de la muestra. La luminiscencia emitida por la misma es transportada hasta el PMT a través de un brazo de haces fibra óptica del PAM que se sitúa a 1.5cm de la muestra. Otros brazos adicionales son empleados para iluminar la porción de hoja alternativamente con luz del rojo lejano, con una LED débil azul (480nm) para excitar el material fotosintético y obtener  $F_0$ , o con flashes de luz saturante generados, estos últimos, mediante el módulo "single turn-over flash" del PAM. Este módulo posee una lámpara de xenón capaz de generar flashes de luz blanca de unos  $3000\mu\text{mol}(\text{fotones})\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  y  $5\mu\text{s}$  de duración, que inducen (cada flash) una sola separación de cargas por cada centro/unidad de PSII presente en el cloroplasto, dando lugar, por lo tanto, a pares de cargas con un estado redox perfectamente definido que es una pieza clave en la identificación de las bandas de TL (Rutherford *et al.*, 1982, 1984).

Un obturador eléctrico permite programar ciclos de iluminación (muestra)/adquisición (datos) de hasta 10/15 min. de duración.

El aparato de TL se controla mediante PC con un software diseñado al efecto, "TLT-auto" que funciona bajo MS-DOS. Conectada a un puerto del mismo en paralelo hay una interfaz (National Instruments DAQ-Pad 1200) que dispone al menos de: 2 puertos A/D (analogue-to-digital) para la entrada de las señales de temperatura y TL respectivamente, un puerto D/A (digital-to-analogue) que convierte una cifra en tensión, de 0 a +5 V, regulando así la temperatura de la placa Peltier y cinco puertos TTL capaces de suministrar +5 V para activar las distintas fuentes de iluminación y los obturadores.

### 2.5.2.2 Protocolo de medida

*Medidas de TL*

Discos de hoja de planta previamente adaptada a la oscuridad 12h ó de plantas que tras ser iluminadas unas 4h fueron adaptadas a la oscuridad 10 min., fueron escindidos justo antes de realizar la medida e incubados en la celda de muestra durante 2 min. a 20°C, seguido de 1 min. a 0°C e iluminados al final de este periodo con 0, 1, 2, ó 3 flashes o bien con luz en del rojo lejano durante 30s. A continuación se grabó la luminiscencia emitida por la muestra como consecuencia de someterla a un calentamiento gradual de 0° a 70°C, a un ritmo de 0.5°C/s.

*Medidas de HTL*

En el caso de las medidas de HTL, la muestra pasó de 0°C a 160°C a una velocidad de 0.1°C/s. Estas medidas se realizaron en seco, mediante corriente de N<sub>2</sub>, para evitar fenómenos de autoperoxidación de la muestra. Las muestras se adaptaron 10 min. a oscuridad y se les aplicó 2F, para registrar también entre 0 y 70°C las bandas de TL.

Ambos tipos de medida se tomaron en disco de hoja SIN y ASIN, de plantas de *Nicotiana benthamiana* control e infectada con ambas cepas del PMMoV a 7 y 14 dpi. Con la metodología descrita, por tanto, se pudieron analizar las bandas B, AG, C-oscuridad y HTL 2 en hoja, en condiciones de estrés biótico. Las curvas de TL inducidas con 2 flashes son el resultado de una combinación y solapamiento de banda B, AG e incluso C, recurriéndose por lo tanto para su descomposición y mejor análisis al software TLT-auto, desarrollado también por el Dr. Ducruet.

Todas las curvas de TL, con las que obtuvimos las distintas bandas, se han inducido en condiciones que no requerían de la congelación (0-80°C). Por este motivo no mostramos otra de la bandas clásicas de TL, la banda A, fruto de la recombinación de los pares Z<sup>+</sup> Q<sub>B</sub> - (S<sub>3</sub> Q<sub>A</sub><sup>-</sup>), cuya T<sub>m</sub> está entorno a los -15°C (Ducruet, 2003).

## 2.5.3 Fluorescencia verde-azul en hoja

### 2.5.3.1 Aparato de medida de la fluorescencia Verde-Azul

Los espectros de excitación y emisión se obtuvieron con un fluorímetro denominado FLU3, fabricado al efecto, instalado en la salida de un anillo imán de flexión (SA4 beam-line del Super-ACO sincrotron de Orsay, Francia), descrito con detalle en Cerovic y col. 1994. Este aparato va conectado

a un PC desde el que se controla a través del software Cary Eclipse Scan Application, versión 1.0 (78), mediante el cual también además de la adquisición, permite el procesamiento de los datos.

El aparato cuenta con una fuente de luz denominada pulso de radiación de sincrotrón, que posee una alta sensibilidad y una alta eficiencia en la captura de la señal (un monocromador de emisión con un radio de apertura de  $f / 2$ ), lo que le permite a su vez emplear muy bajas intensidades para la luz de medida ( $> 0,2 \mu\text{mol}(\text{fotones}) \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , evitando así una excitación actínica.

La geometría de excitación-detección adaptada a medidas frontales (excitación a  $50^\circ$  y detección de la emisión a  $0^\circ$ ) ayuda a minimizar la contribución de la dispersión de la luz.

Se emplea un monocromador doble de excitación, para seleccionar la  $\lambda$  de excitación, y un filtro de pase largo (RG665, 3mm; Schott, Clichy, France) para recoger la emisión, que elimina los fenómenos de difracción de las rejillas. Adicionalmente, para medir los espectros de emisión se añade un filtro transmisor de UV (DUG11, Schott, Clichy, France) a la parte de excitación del aparato.

Las medidas proceden de un diámetro de 5 mm de la superficie de la hoja.

### 2.5.3.2 Protocolo de medida

#### *Espectros de Emisión*

Los espectros de emisión se adquirieron barriendo el espectro de 400-800 nm, con una  $\lambda$  de excitación de 350nm (UV), y con un ancho de banda de excitación de 10nm y uno de emisión de 5nm.

La velocidad de escaneado es de 9600,00 nm/min, con un promedio de tiempo 0,0125 s y un intervalo de los datos de 2nm.

#### *Espectros de Excitación*

Los espectros de excitación se adquirieron barriendo el espectro de 220-600 nm, con una  $\lambda$  de emisión de 685nm y con un ancho de banda de excitación de 5nm y uno de emisión de 10nm.

La velocidad de escaneado es de 60 nm/min, con un promedio de tiempo de 2 s y un intervalo de los datos de 2nm.

En ambos casos los espectros se grabaron con un voltaje del fotomultiplicador de entre los 950-850 voltios, según el tipo de muestra, utilizando en cada caso el máximo posible. A continuación se llevó a cabo la corrección de los espectros a la fuente y al detector: multiplicando cada uno de los

espectros por un “factor de corrección de excitación/emisión” (según el caso). Adicionalmente hemos expresado los espectros en unidades equivalentes de sulfato de quinina (UESQ) (Cerovic y col. 1999). El empleo de un standard de fluorescencia común a todas las medidas permite la comparación cuantitativa entre unas muestras y otras.

De forma alternativa y tan sólo en el caso de los espectros de excitación, se realizó el logaritmo del cociente entre dos espectros de excitación de la fluorescencia (logFER) que se deseaban comparar: comparamos así las dos caras de una misma hoja, logFER AB/AD y la cara de una hoja infectada –por PMMoV-S ó-I- con la misma de la hoja control, logFER ADi/ADc y log FER ABi/ABc. El log FER nos permite analizar/visualizar mejor los compuestos que absorben en el UV,

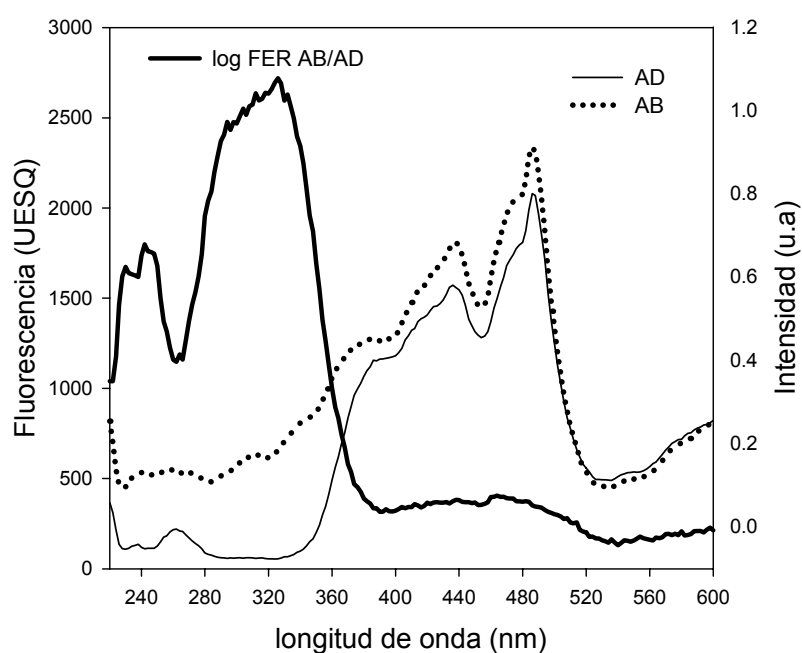


Fig 24 Ejemplo de espectros de excitación de la cara AD y AB de una hoja SIN sana de *N. benthamiana* expresado en UESQ, y el logFER resultante de ambos, en unidades arbitrarias

1000 UESQ (unidades equivalentes de sulfato de quinina) =  $1\mu\text{M}$  de dihidrato de sulfato de quinina, en una capa 1cm de  $0.105\text{mol/L}$ , excitado a 347.5 nm y emitido a 450 nm.

presentes en la epidermis de la hoja (Ounis y col. 2001; Cerovic y col. 2002), ya que este cociente coincide con el espectro de absorción de aquellos compuestos que absorben en la región del UV, presentes en la muestra. Es un método de gran interés y utilidad, puesto que han demostrado que mediante el logFER, la cantidad, pero no la clase de compuestos, presentes en la epidermis de la hoja y responsables de la absorción/protección de la radiación UV, se ve afectada según la cara (adaxial o abaxial) y la edad de la hoja (Cerovic y col. 2002; Meyer y col. 2003). El logFER en la región del UV, es independiente de la longitud de onda ( $\lambda$ ) de emisión con la que se mida y se puede emplear para medidas cuantitativas (Cerovic y col. 2002).

Se tomaron los espectros de excitación de la cara AD o superior y AB o inferior de hojas de planta de *N. benthamiana* control e infectada con ambas cepas del PMMoV, a 4, 7 y 14 dpi en el caso de hoja SIN y a 7 y 14 dpi en el caso de hoja ASIN. De igual forma se obtuvieron los espectros de emisión pero únicamente a los 14dpi.



## 3 Resultados

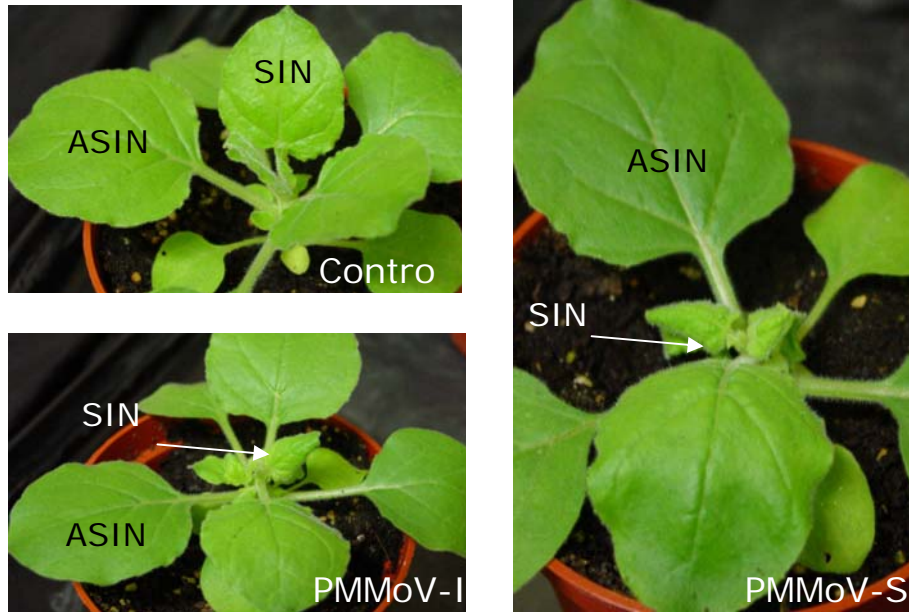
### 3.1 Sintomatología

Para la realización de este trabajo hemos utilizado en algunos experimentos dos modelos experimentales *Nicotiana-tobamovirus*: *Nicotiana benthamiana* se inoculó con dos cepas de PMMoV (PMMoV-S y PMMoV-I) y *Nicotiana tabacum* con TMV, tal como se describe en el apartado 2.1 de M. y M, desarrollando como consecuencia la sintomatología que se describe en los siguientes apartados.

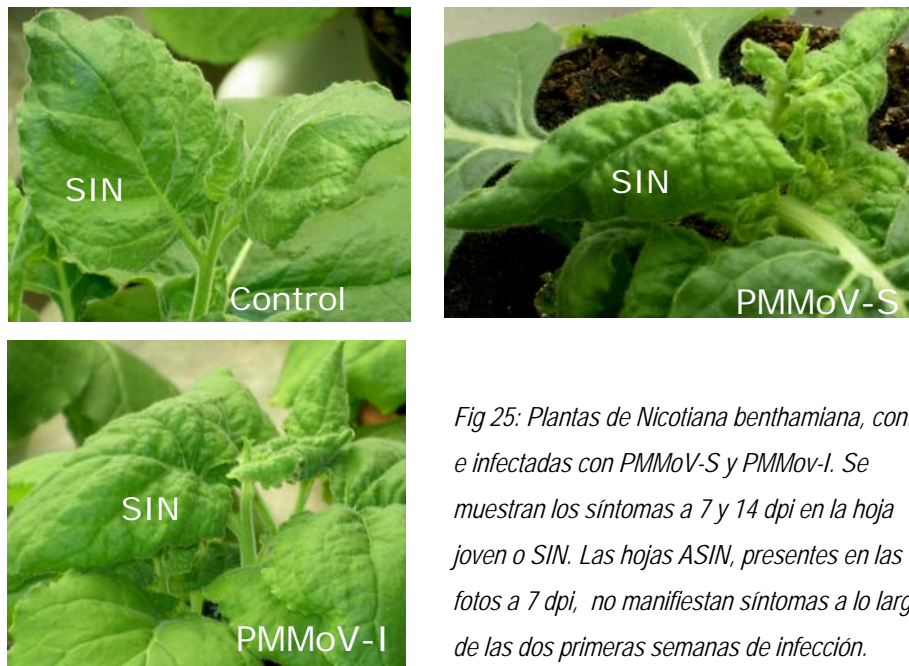
#### 3.1.1 Infección de *Nicotiana benthamiana* con PMMoV-S y PMMoV-I

Las plantas de *Nicotiana benthamiana* se inocularon con PMMoV-S y PMMoV-I cuando presentan de 5 a 6 hojas completamente formadas y desarrollan los primeros síntomas tras los primeros 6 u 8 días. Éstos consisten en un fuerte enrollamiento hacia abajo de las hojas jóvenes que se desarrollan con posterioridad a la inoculación (llamadas hojas SIN). Por el contrario, las hojas que estaban desarrolladas en ese momento, no presentan síntomas en el periodo de infección estudiado (denominadas hojas ASIN) (Fig. 25). Además, las plantas infectadas muestran una inhibición del crecimiento de los entrenudos así como del tamaño de las hojas jóvenes. Este efecto es muy acusado a partir de los 14 dpi, y más evidente en el caso de la infección por PMMoV-S. En los estadios finales de la infección, las plantas inoculadas con PMMoV-S desarrollan progresivamente una clorosis generalizada (Fig. 26). Por el contrario, las plantas inoculadas con PMMoV-I comienzan a desarrollar un proceso de recuperación de los síntomas en la zona apical a partir de los 22 - 24 dpi, coincidiendo con la aparición de los escapos florales. Esta recuperación, claramente visible a los 28 dpi, consiste en un crecimiento normal de los entrenudos, de forma que las plantas llegan a alcanzar a veces la altura de las plantas control. Además, las hojas desarrolladas en este periodo no presentan enrollamiento, y su tamaño es algo menor que las correspondientes hojas de las plantas sanas. En algunos casos muestran síntomas de mosaico muy atenuado (Fig. 26). Basándonos en la gravedad de los síntomas, podemos considerar, por tanto, que PMMoV-S es más virulento que PMMoV-I.

7 dpi



14 dpi



*Fig 25: Plantas de Nicotiana benthamiana, control e infectadas con PMMoV-S y PMMoV-I. Se muestran los síntomas a 7 y 14 dpi en la hoja joven o SIN. Las hojas ASIN, presentes en las fotos a 7 dpi, no manifiestan síntomas a lo largo de las dos primeras semanas de infección.*

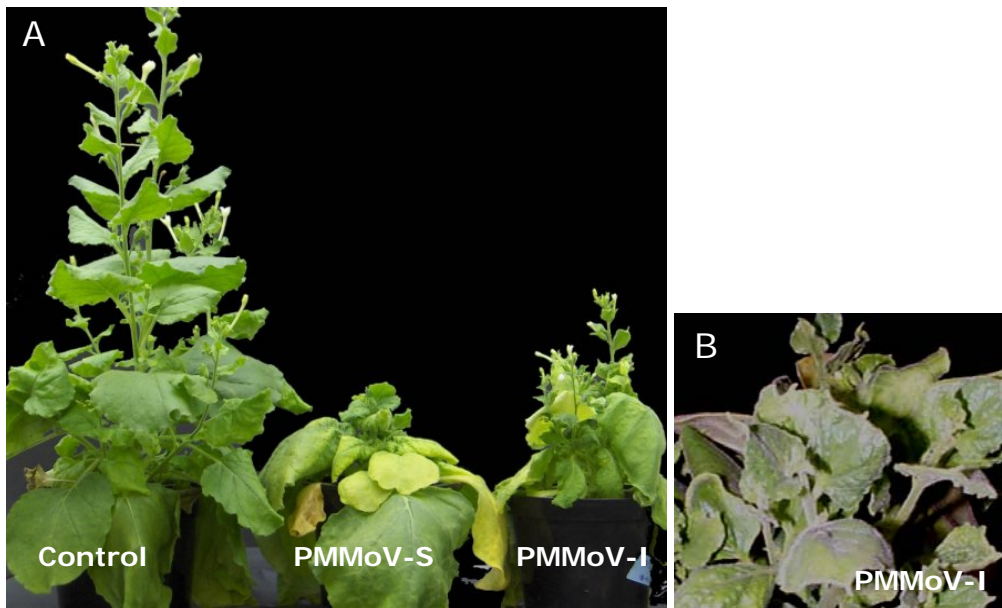


Fig:26: (A) Plantas de *Nicotiana benthamiana* control e infectadas por PMMoV-S y PMMoV-I a 28 dpi. Se observa la recuperación de la planta infectada con PMMoV-I. (B) Detalle de hojas SIN infectadas por PMMoV-I a 28 dpi

### 3.1.2 Infección de *Nicotiana tabacum* con TMV

El sistema huésped-parásito *Nicotiana tabacum* -TMV lo empleamos, junto con el anterior, como modelo experimental para el estudio del efecto de la infección viral en la fotosíntesis. Adicionalmente, la línea de tabaco transgénica crtZ, se estudió para comprobar posibles implicaciones de los pigmentos del ciclo de las xantofilas en la defensa del aparato fotosintético frente a estrés biótico (infección viral) y estrés lumínico. Para ello, se infectaron con TMV las diferentes líneas de tabaco, la crt Z y sus controles, la Azyg y el WT; las plantas infectadas y sus correspondientes controles sanos se cultivaron además bajo diferentes regímenes lumínicos (ver aptdo.2.1 de M y M), BIL, MIL y AIL. El aspecto y desarrollo de síntomas que presentaron como consecuencia, se describe a continuación.

*Cultivo en condiciones de MIL*

Las plantas que crecieron a MIL ( $130 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), son consideradas los controles para comparar con las crecidas en condiciones BIL y AIL.

Las plantas infectadas del tipo WT de *N. tabacum* presentaron los primeros síntomas de la infección con TMV a los 7 dpi (figura 27) Estos consistieron en el “clareamiento de venas” de las hojas jóvenes desarrolladas después de la inoculación, (hojas SIN). A los 14 dpi, un mosaico, resultante de la combinación de zonas con distintos grados de clorosis, se hizo evidente en las hojas S, con la aparición de dos zonas claramente diferenciadas por su tonalidad. A los 21 dpi., se evidenciaba en las hojas más jóvenes una clorosis generalizada con zonas verdes oscuras, los llamados *islotes verdes*, restringidos a los bordes de las venas terciarias y cuaternarias.

En las hojas maduras, ya desarrolladas en el momento de la inoculación (hojas ASIN), se apreció una clorosis generalizada hacia la cuarta semana de infección. Este tipo de hojas pueden además presentar, en estadios avanzados de la infección, necrosis (Fig 28).

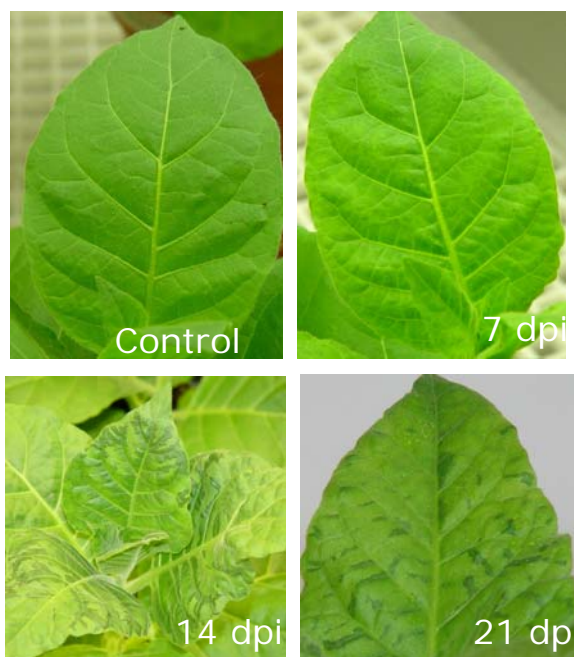


Fig:27. Hoja SIN de tabaco WT , control e infectada con TMV a 7, 14 y 21 dpi.



Fig:28.: Hoja ASIN de tabaco WT infectada con TMV a 21dpi, con inicio de necrosis (A), y a 28 dpi ya

Las línea de de tabaco crtZ y Azyg infectadas con TMV y cultivadas en condiciones MIL presentaron la misma sintomatología y aspecto que el WT.

*Cultivo en condiciones de BIL*

La intensidad de luz empleada para este tipo de experimentos, fue de  $50 \mu\text{moles. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Esto produjo en los controles sanos de las tres líneas de tabaco un crecimiento más lento y hojas

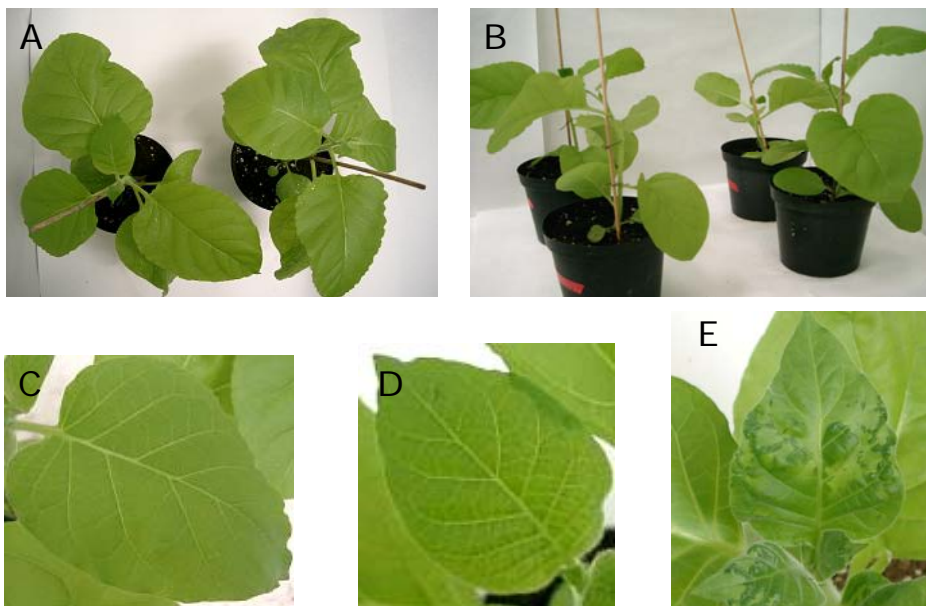


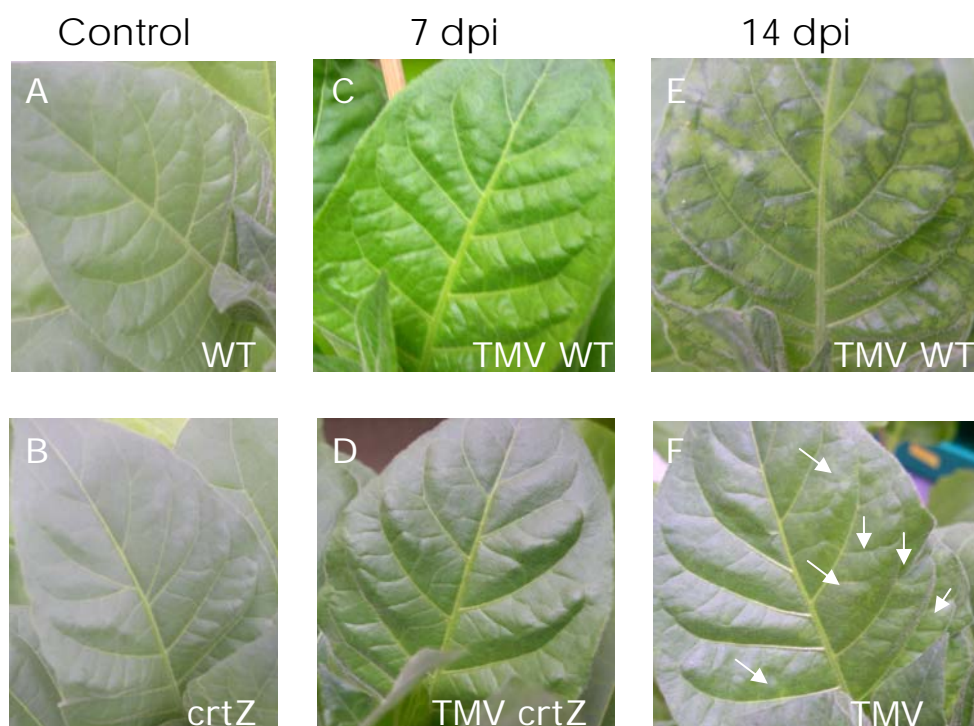
Fig 29: Plantas de *N.tabacum* cultivadas en condiciones BIL (A y B). Hoja SIN control del WT de tabaco



menos verde y más delgadas (fig 29 a y b), que cuando crecieron en condiciones MIL. Sin embargo, la aparición de síntomas como consecuencia de la inoculación con TMV, fue análoga a la anteriormente descrita, a lo largo de las dos primeras semanas de infección. A los 7 dpi apareció el clareamiento de venas y a 14 dpi el mosaico característico (fig 29 c, d y e). Al igual que en el caso anterior, las tres líneas de tabaco ante la BIL tuvieron un aspecto similar, no pudiendo distinguirse unas de otras.

*Cultivo en condiciones de AIL*

Se sometió a las tres líneas de plantas de tabaco, sanas e infectadas, a períodos diarios de 4 horas de AIL ( $1000 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), y sus hojas, principalmente las superiores o más jóvenes, representaron una coloración verde más intensa y mayor grosor que las cultivadas en condiciones



*Fig 30: Hoja SIN de tabaco crtZ y WT control e infectadas con TMV a 7 y 14 dpi, en un experimento en condiciones AIL. En la hoja SIN infectada de la línea crt Z, se señala parte del moteado que invade la hoja a 14 dpi.*

MIL.

Las plantas WT infectadas presentaron el típico “clareamiento de venas”, tras la primera semana de infección, en sus hojas SIN. Sin embargo, las plantas *crt Z* infectadas mostraron diferencias con respecto a las WT a 7 dpi: la hoja SIN de planta *crt Z* inoculada por TMV sometida a AIL, no presentó síntomas en la mayoría de las plantas cultivadas. Mostraba en su lugar un color verde muy intenso, similar al que presentaban todas las hojas jóvenes y sanas crecidas bajo estas condiciones experimentales (Fig 30 a, b, c y d), lo que representaba una notable diferencia con respecto a la sintomatología desarrollada por las mismas plantas cuando se cultivaban en condiciones MIL y BIL. A 14 dpi la hoja SIN del WT infectada con TMV mostró el mosaico característico de este punto de la infección (Fig 30 e y f). En el caso de la hoja SIN de las plantas *crtZ* infectadas, sólo se podía apreciar un suave moteado en una hoja de color verde intenso. A partir de la segunda semana de infección, en el transcurso de los 14 a los 21 dpi, todas las plantas *crt Z* fueron desarrollando los síntomas característicos de la infección por TMV a 14 dpi y eran indistinguibles de las plantas WT infectadas.

### **3.2 Análisis de los cambios en el contenido pigmentario de plantas de *N. benthamiana* infectadas con PMMoV y de plantas de *N. tabacum* infectadas con TMV**

En interacciones planta-virus compatibles, como las que se presentan en este trabajo uno de los síntomas más habituales es la clorosis. La clorosis es el fenómeno con el que se denomina a la disminución del contenido de Chl de la hoja. La determinación del contenido de clorofila, es una práctica habitual en nuestro laboratorio, ya que es requerida como referencia para la mayoría de nuestros experimentos.

En este apartado presentamos los datos de las medidas espectrofotométricas del contenido total de Chl a, b y Car (aptdo. 2.4.2. de M y M), así como los resultados del análisis mediante HPLC (aptdo. 2.4.3. de M y M) de los extractos de pigmentos de hoja de las distintas plantas, enfocado principalmente a la detección de los diferentes carotenoides presentes y sus proporciones.



### 3.2.1 Contenidos totales y perfiles pigmentarios de hoja SIN y ASIN de plantas de *N. benthamiana* infectadas por PMMoV-S y PMMoV-I

En la fig 31, se muestran las gráficas correspondientes al contenido total de Chl a, b y Car de hojas ASIN y SIN de plantas de *N. benthamiana* inoculadas con las dos cepas de PMMoV, a lo largo del tiempo de infección analizado. Partiendo de una planta sana de 5 semanas (edad aproximada que poseen las plantas a 7 dpi) el contenido de pigmentos fotosintéticos (Chl y Car) se va incrementando tanto en hoja joven (SIN) como madura (ASIN) durante las cuatro semanas analizadas.

Sin embargo, en plantas inoculadas con PMMoV-S, el contenido de pigmentos en hoja –tanto Chls como Car- disminuye gradualmente ya en la segunda semana de infección en la hoja SIN, y a partir de los 14dpi en la hoja ASIN. Se alcanzan valores excepcionalmente bajos para ambos tipo de hojas y de pigmentos a 28 dpi, coincidiendo con el agravamiento de la sintomatología.

En el caso de plantas infectadas con PMMoV-I, el descenso en el contenido de Chls y Car es análogo en la hoja ASIN y menor en la SIN entre la segunda y tercera semana post-infección. Pero existe una radical diferencia con la infección con PMMoV-S a 28 dpi, cuando el contenido pigmentario sufre un incremento, paralelo a la fase de recuperación que se aprecia en las plantas de *N. benthamiana*, inoculadas con este virus.

En la tabla 2 mostramos, basándonos en el contenido de pigmentos total en hoja, las proporciones Chl a/ Chl b y Car/Chl. Podemos observar que la relación Chl a/ Chl b está en torno a 3,5 y el de Car/Chl a 0,19, en plantas de *N. benthamiana* sanas, tanto en hoja SIN como ASIN. La presencia del virus sólo va a modificar estos valores en estadios muy avanzados de la infección. Las hojas SIN y ASIN con PMMoV-S mostraron un descenso en el cociente Chl a/ b a partir de los 21 dpi; sin embargo en la infección con PMMoV-I sólo se registra un descenso en este cociente a 21 dpi y en la hoja ASIN. Allí donde el cociente entre ambas Chls desciende en muchos de los casos se acompaña de un incremento del Car/ Chls, a excepción de la hoja SIN infectada por PMMoV-S a 21 dpi. En la infección con PMMoV-I este incremento se manifiesta sólo en hojas ASIN a 21 y 28 dpi.

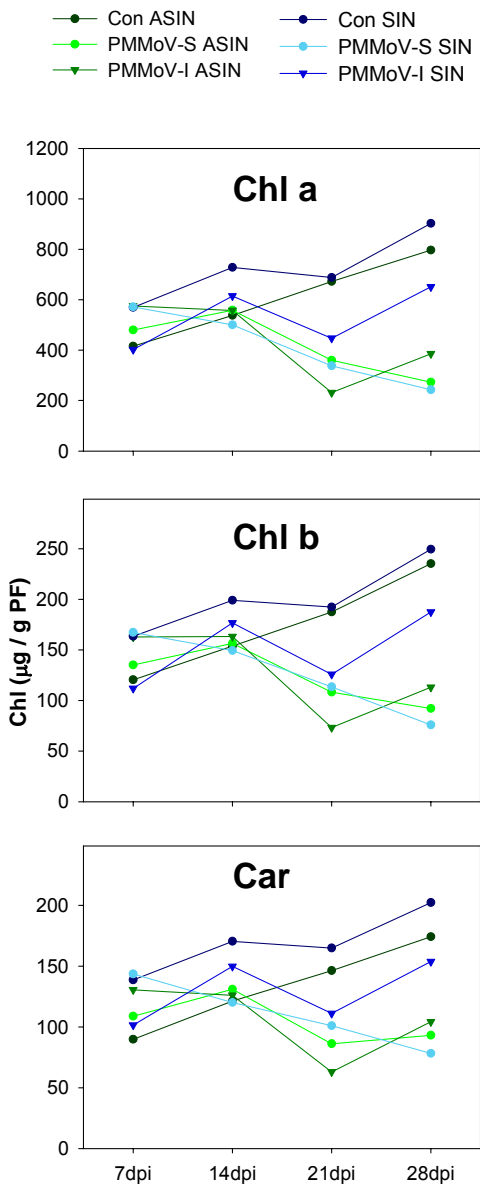


Tabla 2:

		Car/Chl	Chl a / b	
<b>7 dpi</b>	<b>Control</b>	<b>SIN</b>	0,19	3,48
		<b>ASIN</b>	0,17	3,45
	<b>PMMoV-S</b>	<b>SIN</b>	0,19	3,42
		<b>ASIN</b>	0,18	3,55
<b>14 dpi</b>	<b>PMMoV-I</b>	<b>SIN</b>	0,20	3,60
		<b>ASIN</b>	0,18	3,53
	<b>Control</b>	<b>SIN</b>	0,18	3,66
		<b>ASIN</b>	0,18	3,50
<b>21 dpi</b>	<b>PMMoV-S</b>	<b>SIN</b>	0,18	3,35
		<b>ASIN</b>	0,18	3,56
	<b>PMMoV-I</b>	<b>SIN</b>	0,19	3,48
		<b>ASIN</b>	0,17	3,41
<b>28 dpi</b>	<b>Control</b>	<b>SIN</b>	0,19	3,58
		<b>ASIN</b>	0,17	3,59
	<b>PMMoV-S</b>	<b>SIN</b>	0,22	2,98
		<b>ASIN</b>	0,18	3,32
<b>28 dpi</b>	<b>PMMoV-I</b>	<b>SIN</b>	0,19	3,56
		<b>ASIN</b>	0,21	3,17
	<b>Control</b>	<b>SIN</b>	0,18	3,62
		<b>ASIN</b>	0,17	3,39
<b>28 dpi</b>	<b>PMMoV-S</b>	<b>SIN</b>	0,25	3,20
		<b>ASIN</b>	0,26	2,96
	<b>PMMoV-I</b>	<b>SIN</b>	0,18	3,47
		<b>ASIN</b>	0,21	3,41

Fig 31: Contenido total (µg/g peso fresco) de Chl a, Chl b y Car en hoja ASIN y SIN de planta sana e infectada por PMMoV-S e -I a 7, 14, 21 y 28 dpi.

Tabla 2: Relaciones Car/Chl y Chl a/b de las plantas anteriores.

		%	neo	VAZ	lut	$\beta$ -car	Chl a+ Chl b
7 dpi	Control	SIN	4,56	6,08	26,36	20,53	42,46
		ASIN	4,40	6,16	26,98	17,60	44,87
	PMMoV-S	SIN	4,10	8,20	24,52	17,03	46,15
		ASIN	4,63	6,39	22,36	17,41	49,20
	PMMoV-I	SIN	4,36	8,72	24,21	16,71	46,00
		ASIN	6,62	9,26	21,23	23,14	39,75
14 dpi	Control	SIN	6,23	11,96	20,27	20,85	40,70
		ASIN	6,71	9,72	20,94	22,61	40,02
	PMMoV-S	SIN	6,90	7,62	21,32	20,60	43,56
		ASIN	6,15	7,33	22,70	22,22	41,61
	PMMoV-I	SIN	7,59	10,35	18,91	21,22	41,92
		ASIN	7,25	8,99	21,47	24,13	38,17
21 dpi	Control	SIN	6,58	10,91	20,38	19,75	42,38
		ASIN	6,89	9,10	23,49	18,57	41,94
	PMMoV-S	SIN	6,69	7,89	23,79	19,30	42,32
		ASIN	5,30	6,03	25,05	18,10	45,52
	PMMoV-I	SIN	5,50	6,82	22,61	19,62	45,45
		ASIN	4,81	6,25	25,48	18,75	44,71
28 dpi	Control	SIN	6,68	9,61	17,38	24,40	41,92
		ASIN	7,29	8,70	18,35	24,56	41,09
	PMMoV-S	SIN	5,61	9,35	30,84	14,95	39,25
		ASIN	5,04	7,99	30,78	15,67	40,53
	PMMoV-I	SIN	5,42	8,62	23,97	16,26	45,73
		ASIN	5,21	6,94	26,79	16,70	44,36

Tabla 3: Proporción de los diferentes pigmentos, analizados mediante HPLC, presentes en extractos de hojas ASIN y SIN de plantas de *N. benthamiana* sana e infectada por ambas cepas del PMMoV a 7, 14, 21 y 28 dpi. Se ha considerado la suma de todos ellos como el 100%.

Los datos del perfil pigmentario obtenido por HPLC de los dos tipos de hojas de plantas infectadas por ambos virus, se recogen en la tabla 3; más concretamente, las proporciones: neo, viol+antera+zea (VAZ) o pool de las xantofilas, lut,  $\beta$ -car y Chl a+b. Los resultados son complejos y varían considerablemente en ocasiones con cada uno de los virus. Aun así, se pueden observar ciertas tendencias comunes, que describimos a continuación.

*Hoja SIN sana e infectada por PMMoV*

En hoja SIN a 7dpi el pool VAZ aumenta respecto a los valores de plantas control y de forma análoga en ambos virus, a costa principalmente de un descenso en el contenido de  $\beta$ -car, lut y en menor medida de neo; a esto le acompaña una subida del porcentaje de Chl (chl a + b). A 14 dpi, VAZ disminuye por la infección en ambos tipos de hojas, y en mayor medida en el caso de la infección con PMMoV-S; en esta ocasión, ese descenso no va unido a cambios importantes en el contenido de  $\beta$ -car, pero sí suben los niveles de neo y lut, con PMMoV-S, y principalmente neo, con PMMoV-I; también es mayor la proporción de Chls respecto al total de pigmentos. A 21 dpi, ambos virus provocan una bajada del pool de las xantofilas unido a un aumento de la lut. El porcentaje de Chl a + b sólo aumenta esta vez con PMMoV-I. Por último, tras 4 semanas de infección, la hoja SIN de planta inoculada con PMMoV-S, no muestra diferencias en sus valores de VAZ comparado con el control, pero sí presenta una notoria subida de la lut acompañada de una significativa bajada del  $\beta$ -car y leve bajada de neo. Por primera vez, los valores de chl a + b, disminuyen respecto a los del control. Si ahora miramos el perfil pigmentario de plantas infectadas con PMMoV-I, VAZ baja discretamente, al igual que neo; de nuevo, lut sube y  $\beta$ -car baja, ambos de forma notable, pero en menor grado que con el virus español. Otra diferencia entre ambos virus son los valores de la chl a + b, los cuales con la cepa italiana, siguen siendo superiores a los de la hoja SIN control.

*Hoja ASIN sana e infectada por PMMoV*

Los datos correspondientes a la hoja madura o ASIN infectada por cada virus difieren bastante entre sí las dos primeras semanas de infección, mientras que las dos últimas se igualan los cambios en ambas y sus diferencias respecto de la hoja sana.

A 7 dpi, el contenido pigmentario de la hoja ASIN de planta inoculada con PMMoV-S, varía comparado con el control, solamente en sus proporciones de lut que baja, y de chl a + b que sube. Sin

embargo en el caso del PMMoV-I, varían todos los porcentajes con respecto a los de hoja sana: bajan los de la lut, suben los de neo, VAZ, y más notoriamente los del  $\beta$ -car, y disminuye la proporción de chl a + b.

En la segunda semana de infección con PMMoV-S destaca el descenso del pool VAZ, y el incremento de lut. PMMoV-I, causa estos mismos efectos aunque más discretos y además van acompañados de la subida de la proporción de neo y del  $\beta$ -car. La proporción chl a + b también bajan comparados con el control.

A 21 dpi, ambos virus generan en la hoja ASIN los mismos cambios respecto a los valores de plantas control: neo y VAZ bajan,  $\beta$ -car no cambia, lut y chl a+ b suben.

A 28 dpi, ambos virus causan en la hoja ASIN el descenso de la proporciones de neo, del pool de VAZ aunque ligeramente y de forma notable del  $\beta$ -car; a cambio hay un notable incremento de la proporción de lut (PMMoV-S la duplica). Sin embargo, los porcentajes de chl a + b son mayores que los controles por la infección con PMMoV-I y menores con PMMoV-S.

Hay que señalar que en las muestras analizadas los niveles de Zea no fueron detectables, si bien algunas muestras presentaron pequeñas cantidades de Antera.

### **3.2.2 Contenidos totales y perfiles de la distribución de pigmentos en hoja SIN de plantas de *N. tabacum* infectadas por TMV bajo distintos regímenes lumínicos**

Las plantas de las distintas líneas de tabaco WT, Azyg, crtZ, tanto sanas como infectadas, se sometieron a condiciones de BIL, MIL y AIL. Para cada una de estas situaciones se presentan, sin embargo, los datos de las líneas WT y crtZ para mayor claridad; puesto que, como cabía esperar, la línea Azyg se comportó como el WT. Uno de los objetivos principales en esta ocasión fue el de detectar aquellas situaciones que pudieran inducir diferencias en el comportamiento fotosintético entre la línea crtZ y la WT. En función de ello, se escogió el tipo de hoja y los días de muestreo; por ello, presentamos datos de hoja SIN a 7 y 14 dpi.

*Experimentos en condiciones de BIL*

En la fig 32 se muestran los datos del contenido total de pigmentos (Chl a, b y Car) en hoja SIN de plantas crt Z y WT y sus correspondientes controles, sometidas a dos factores de estrés, infección por TMV y BIL. A 7 dpi podemos ver cómo el efecto de la luz en condiciones limitantes

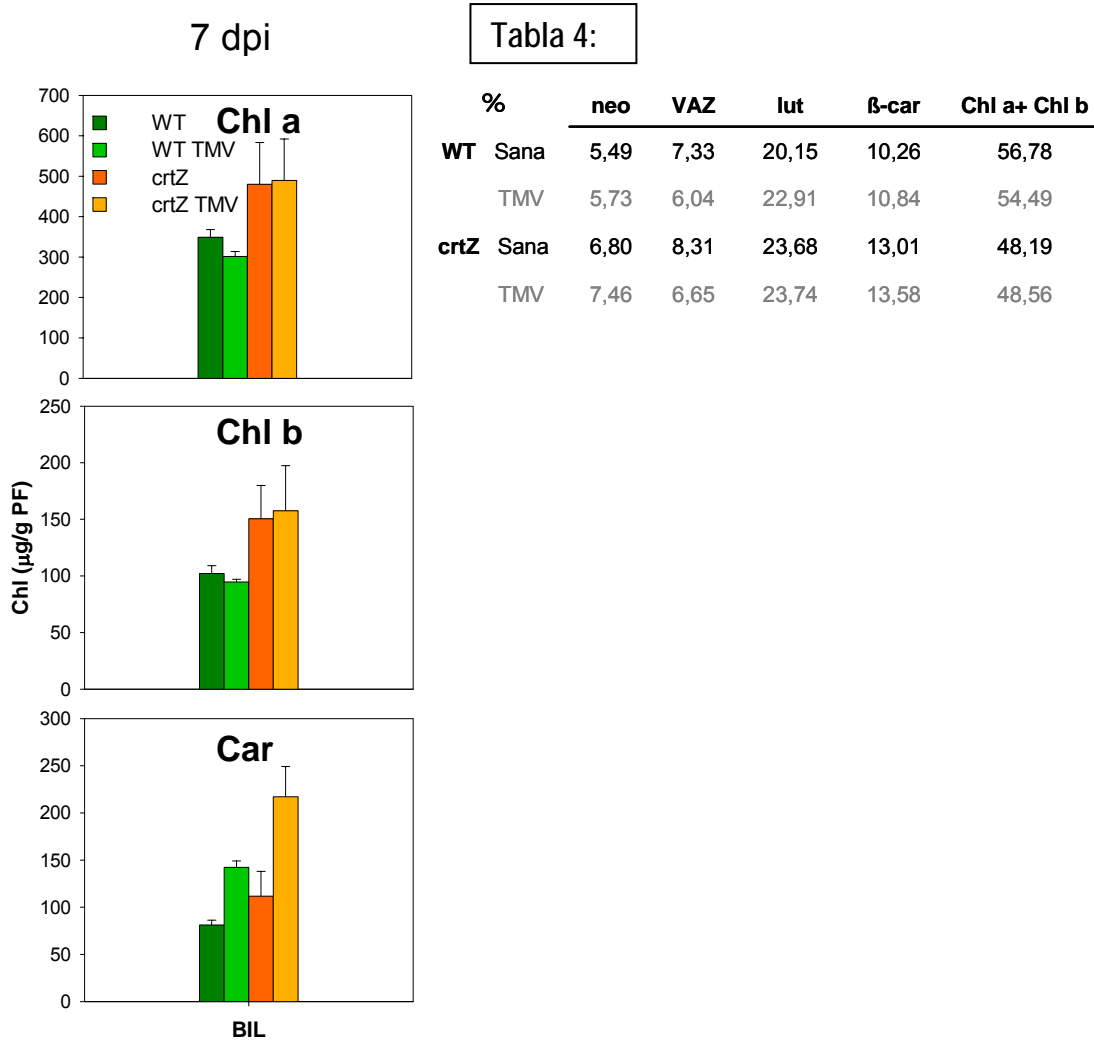


Fig 32: Gráficas con el contenido total de Chl a, Chl b y Car en hoja SIN de planta de *N. tabacum* sana e infectada por TMV a 7dpi, cultivadas con BIL.

Tabla 4: muestra la proporción de los diferentes pigmentos, analizados mediante HPLC, presentes en las muestras anteriores. Se ha considerado la suma de todos ellos como el 100%.

provocó de entrada diferencias entre plantas sanas de unas líneas y otras. Las plantas crtZ presentaron un mayor contenido de Chls que las WT; con el contenido de los Car la situación fue análoga pero menos significativa. En cuanto a la acción del virus, ésta prácticamente no indujo cambios en el contenido de las Chls en todas las plantas tratadas; si acaso ligeros descensos o poco significativos. Sin embargo, el contenido de Car, comparado con el de las respectivas plantas sanas, aumentó de forma muy manifiesta en las hojas de plantas crtZ infectadas y algo menos en las hojas infectadas de plantas WT.

Se realizó posteriormente un experimento en las mismas condiciones, con plantas de tabaco WT y crtZ, para tomar muestras a 7 y 14 dpi. A 7 dpi observamos el mismo efecto que desaparece a 14 dpi por lo que no se muestran.

En la tabla 4 se recogen los porcentajes, determinados mediante HPLC, de los los distintos pigmentos, Chl a + b, neo, VAZ, lut y  $\beta$ -car, en las hojas SIN a 7dpi, provenientes del experimento anterior (fig 2). En la línea crtZ el efecto de la BIL como factor de estrés indujo una subida del pool VAZ respecto del WT, junto con la subida de las proporciones de los carotenoides restantes. Solamente la proporción de las Chls disminuyó.

La acción adicional de TMV sobre las hojas de la plantas crtZ provocó, respecto de las plantas crtZ sanas, la disminución de la proporción del pool de VAZ junto con la subida de neo. La línea WT también vio su pool de VAZ disminuido por la acción del virus, y el de la lut aumentado, pero la neo junto con el  $\beta$ -car prácticamente no varió. Los datos de chl a+b en esta ocasión descendieron en plantas infectadas de ambas líneas, comparado con sus respectivos controles sanos.

#### *Experimentos en condiciones de MIL y AIL*

En la fig 33 se presentan los datos, a 7 y a 14dpi, del contenido total de pigmentos en hoja, de Chl a, b y Car, expresados en microgramos por gramo de peso fresco, en plantas de tabaco WT y crtZ sanas e infectadas, sometidas a MIL ( $130 \mu\text{moles. m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y a AIL ( $130 \mu\text{moles. m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  más 4 horas diarias a  $1000 \mu\text{moles. m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

A 7dpi se observa que la acción de TMV sobre las plantas en condiciones de MIL, produce en la línea crtZ ocurre lo mismo aunque con una menor magnitud. Tras la aplicación de la AIL, los

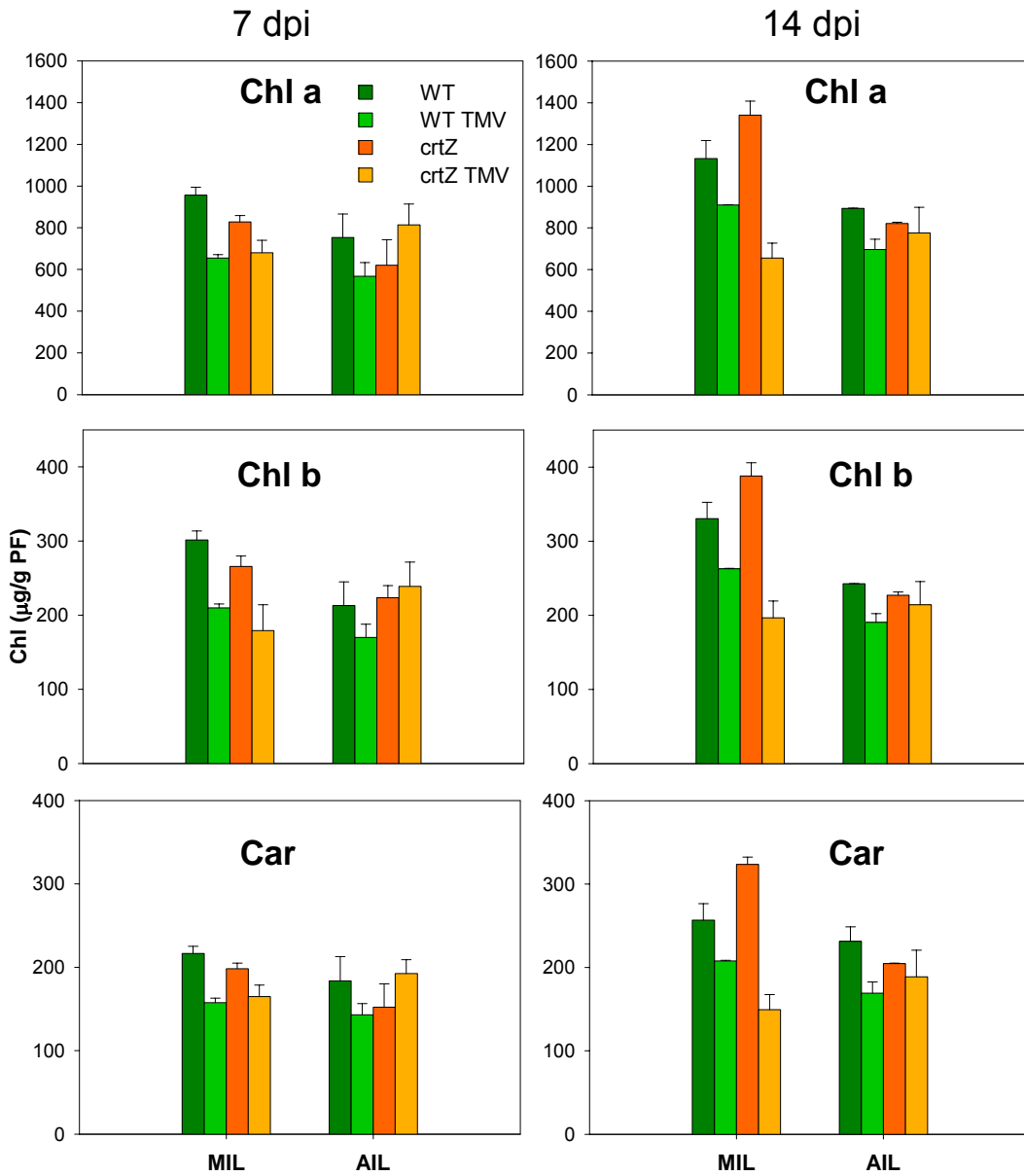


Fig 33: Gráficas con el contenido total de Chl a, Chl b y Car en hoja SIN de planta de *N. tabacum* sana e infectada por TMV a 7 y 14dpi, cultivadas con MIL y AIL.



Tabla 5		Experimento MIL					
	%	neo	VAZ	lut	$\beta$ -car	chl b+a	
7 dpi	WT	SANA	5,28 $\pm$ 0,21	7,54 $\pm$ 0,09	23,80 $\pm$ 0,73	16,98 $\pm$ 1,78	46,40 $\pm$ 2,82
		TMV	5,00 $\pm$ 0,02	8,45 $\pm$ 0,02	22,99 $\pm$ 0,01	15,38 $\pm$ 0,47	48,19 $\pm$ 0,42
	crtZ	SANA	5,55 $\pm$ 0,47	7,33 $\pm$ 0,47	25,89 $\pm$ 1,71	10,19 $\pm$ 7,36	51,04 $\pm$ 4,71
		TMV	5,30 $\pm$ 0,06	7,52 $\pm$ 0,52	24,05 $\pm$ 0,02	14,89 $\pm$ 0,18	48,24 $\pm$ 0,75
14 dpi	WT	SANA	4,68 $\pm$ 0,09	6,76 $\pm$ 0,06	23,25 $\pm$ 0,67	17,30 $\pm$ 0,01	47,76 $\pm$ 0,65
		TMV	4,50 $\pm$ 0,01	7,56 $\pm$ 0,10	22,47 $\pm$ 0,65	16,36 $\pm$ 0,03	49,12 $\pm$ 0,79
	crtZ	SANA	4,70 $\pm$ 0,03	6,53 $\pm$ 0,17	23,30 $\pm$ 0,13	17,26 $\pm$ 0,18	48,20 $\pm$ 0,09
		TMV	4,75 $\pm$ 0,14	6,88 $\pm$ 0,24	23,45 $\pm$ 0,04	16,53 $\pm$ 0,24	48,39 $\pm$ 0,10

Tabla 6		Experimento AIL					
	%	neo	VAZ	lut	$\beta$ -car	chl b+a	
7 dpi	WT	SANA	4,65 $\pm$ 0,22	9,79 $\pm$ 0,06	21,78 $\pm$ 0,11	16,63 $\pm$ 0,13	47,15 $\pm$ 0,52
		TMV	4,85 $\pm$ 0,09	10,92 $\pm$ 0,30	22,35 $\pm$ 0,13	17,59 $\pm$ 1,26	44,29 $\pm$ 1,17
	crtZ	SANA	4,97 $\pm$ 0,18	9,89 $\pm$ 0,29	22,35 $\pm$ 0,13	16,19 $\pm$ 0,02	46,61 $\pm$ 0,32
		TMV	4,89 $\pm$ 0,02	9,28 $\pm$ 0,23	22,32 $\pm$ 0,34	17,66 $\pm$ 0,17	45,84 $\pm$ 0,24
14 dpi	WT	SANA	4,46 $\pm$ 0,09	9,82 $\pm$ 0,15	22,49 $\pm$ 0,02	17,34 $\pm$ 0,03	45,89 $\pm$ 0,29
		TMV	4,27 $\pm$ 0,05	10,12 $\pm$ 0,22	21,86 $\pm$ 0,35	17,46 $\pm$ 0,07	46,29 $\pm$ 0,44
	crtZ	SANA	4,43 $\pm$ 0,02	9,21 $\pm$ 0,31	22,55 $\pm$ 0,31	17,52 $\pm$ 0,02	46,33 $\pm$ 0,04
		TMV	4,48 $\pm$ 0,11	10,02 $\pm$ 0,66	22,52 $\pm$ 0,26	18,02 $\pm$ 0,93	44,96 $\pm$ 0,64

Tabla 5 y 6: muestra la proporción de los diferentes pigmentos, analizados mediante HPLC, presentes en las muestras de la figura 3; en condiciones de MIL (tabla 5) y AIL (tabla 6). Se ha considerado la

efectos del virus en la línea de tabaco control fueron los mismos, mientras que en las plantas crtZ, el contenido de ambos tipos de pigmentos, Chls y Car, aumentó.

A 14 dpi, bajo MIL, las plantas inoculadas de la línea tanto WT como crtZ sufrieron un descenso en las cantidades totales de todos los pigmentos, comparado con las plantas de la misma

línea sanas. Las plantas del experimento de AIL sin embargo muestran que si pertenecen a la línea WT, TMV induce una bajada de todos los pigmentos y si pertenecen a la línea crtZ, el virus no provoca cambios significativos. De nuevo, tras la segunda semana de infección, el efecto observado de incremento pigmentario en la línea crtZ a 7 dpi, no persiste.

Con los datos de la tabla 5 y 6, podemos analizar los perfiles obtenidos mediante HPLC, de todas estas plantas en condiciones de MIL y AIL, respectivamente.

Como rasgo general destacamos que los cambios fueron pocos y discretos. Así las diferencias más significativas que encontramos a 7 dpi, con MIL (tabla 5), entre ambas líneas en plantas sanas, es únicamente, que en las plantas crtZ comparado con las de la línea WT, la proporción del  $\beta$ -car baja, pero con una baja significancia. Si ahora comparamos ambas líneas, pero bajo AIL (tabla 6), vemos que no hay diferencias significativas en sus perfiles en este punto de la infección. Tampoco encontraremos diferencias importantes en el porcentaje de los distintos pigmentos a 14 dpi, en ninguno de los dos tipos de experimentos con diferentes regímenes lumínicos.

Si analizamos ahora los efectos del virus en ambos regímenes lumínicos, vemos que a 7 dpi y con MIL, se da una ligera subida del pool VAZ, en las plantas WT infectadas, respecto de su propio control sano. En la línea crtZ infectada, sin embargo, la proporción de VAZ, al igual que los pigmentos restantes, no cambia. Ante la AIL, lo que indujo TMV en el tabaco WT que fuera significativo, fue una pequeña subida de los valores de VAZ y de la lut, así como la ligera bajada de la proporción de las Chls. En esta ocasión las hojas de planta crtZ inoculadas por TMV, no presentaron prácticamente diferencias, de sus equivalentes sanas.

Tras la segunda semana de infección, con MIL, de la línea control con virus cabe destacar únicamente una subida ligera de la proporción de VAZ (a su vez menor que la de tuvo lugar a 7 dpi) acompañado de una pequeña bajada en de la neo y del  $\beta$ -car. Si las condiciones fueron de AIL, todas las diferencias, en la distribución de pigmentos, se disiparon en el WT. En cuanto a la línea crtZ infectada con TMV, comparado con sus respectivas plantas sanas, a 14 dpi, ni bajo MIL ni AIL mostró diferencia alguna en los porcentajes de sus Chls y Car.

### 3.3 Estudio de la interacción *Nicotiana tabacum* -TMV mediante FI. Análisis del efecto de la sobreexpresión de la $\beta$ -carotínhidroxilasa en la planta.

Se realizaron medidas de FI en plantas de NT, de las líneas WT, crtZ y Azyg, sanas e infectadas por TMV. Los datos proceden de experimentos realizados en condiciones MIL, en los que se midió hoja SIN y ASIN y en condiciones AIL, en los que se midió la hoja SIN. En paralelo se hicieron determinaciones del contenido relativo de clorofila con el Chlorophyl Content Meter (Hansatech, UK), para tener una aproximación de las posibles diferencias existentes, en lo que a cantidad de este pigmento se refiere, entre las hojas sanas e infectadas. Todo ello se llevó a cabo según el aptdo. 2.5.1.2 de M y M.

Las medidas de FI estuvieron seguidas de un amplio examen de todos los parámetros de fluorescencia que se obtienen directamente a partir de las mismas ( $F_0$ ,  $F_M$ ,  $F_t$ ,  $F_M'$ ), así como de los resultantes de operaciones aritméticas con éstos como son:  $F_V$ ,  $F_V/F_M$ ,  $F_V/F_0$ ,  $F_M/F_0$ , NPQ,  $\Phi$ PSII, qCN y qTQ (ver tabla 1 del aptdo. 2.5.1.2. de M y M).

El objetivo con esta técnica es estudiar los cambios que pueda sufrir la actividad fotosintética en hoja infectada o en las diferentes líneas de *N. tabacum*, así como la búsqueda de los parámetros más adecuados que sirvan de indicadores tempranos de estrés.

El análisis de las ciento de imágenes obtenidas y la enorme información generada, es muy complejo. En este capítulo sólo se muestran los resultados más claros y relevantes.

#### 3.3.1 Estudio mediante FI de la hoja ASIN

El examen de los datos obtenidos en hoja ASIN, dio como resultado la selección de las imágenes de los parámetros NPQ y  $\Phi$ PSII, para mostrar las diferencias entre planta sana e infectada con TMV. Asimismo, estudios preliminares nos permitieron descartar las medidas anteriores a los 7 dpi, por no presentar cambio alguno entre las distintas líneas de tabaco empleadas, ni entre las plantas tratadas con virus y los correspondientes controles.

*Experimento en condiciones de MIL.*

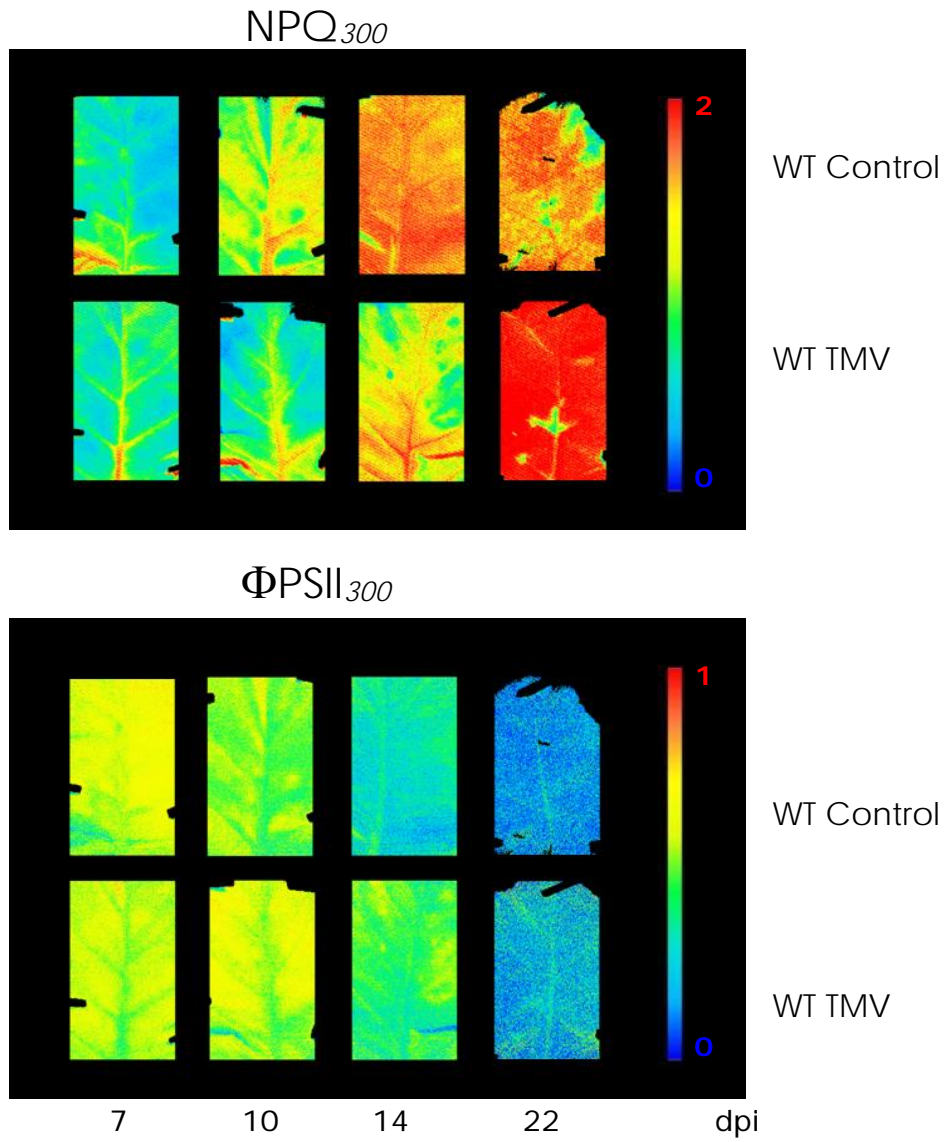


Fig34: Imágenes de los parámetros de  $NPO$  y  $\Phi PSII$ , en el estado estacionario de plantas de *Nicotiana tabacum* WT control e infectadas por TMV a distintos días post-infección.

Los datos que aquí se exponen se corresponden con medidas en hoja ASIN a 7, 10, 14 y 22 dpi.

El análisis de los coeficientes de quenching durante la cinética de inducción de la fluorescencia de la Chl revela diferencias claras entre hoja sana e infectada en NPQ a 300 s de su inicio, en el considerado estado estacionario (imagen NPQ<sub>300</sub>).

La fig. 34 muestra las imágenes de NPQ<sub>300</sub> correspondientes al WT de *N.tabacum* sano e infectado. A 7 dpi, cuando la hoja SIN ya muestra sus primeros síntomas, no se aprecian diferencias entre la hoja ASIN de plantas infectadas y sus controles sanos; a partir de los 10 dpi y hasta los 14 dpi, las mismas imágenes, indican que este parámetro es menor en hoja ASIN infectada por TMV. Al final de la infección, a los 22 dpi, esta tendencia se invierte completamente y pasa a ser el NPQ en la

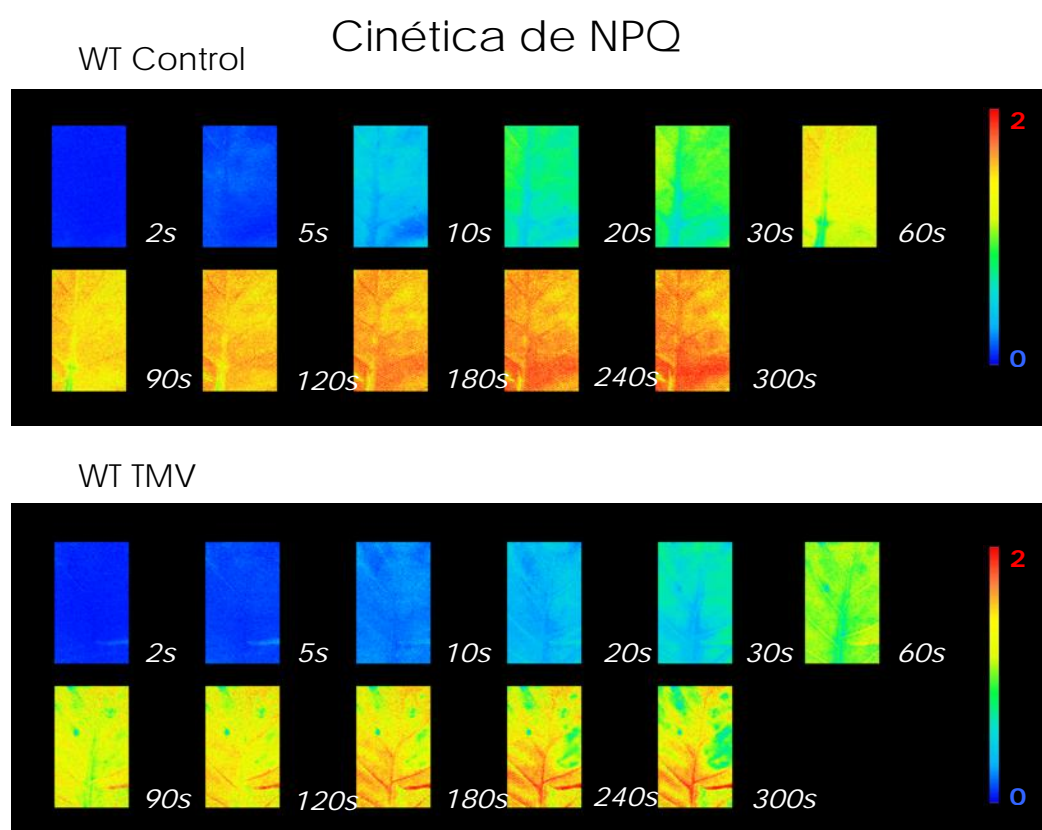


Fig 35: Cinética de inducción de NPQ de plantas de *Nicotiana tabacum* WT control e infectadas por TMV, a 14 dpi.

hoja infectada mucho mayor que en la sana en prácticamente toda la superficie foliar.

Las imágenes, de forma general, permiten diferenciar el mesófilo de la hoja, de la zona de las venas principales. El mesófilo se caracteriza por su heterogeneidad a lo largo y ancho de la topografía de la hoja y a lo largo de la infección sin que ninguna zona destacara de forma particular.

Las imágenes de  $\Phi\text{PSII}_{300}$ , son complementarias, en general, a las anteriores, es decir, las zonas con mayor actividad fotosintética son las mismas que presentan menor disipación energética o

NPQ. La hoja infectada, en las fases iniciales de la infección a 10 y 14 dpi, presenta mayor tasa de fotosíntesis que su respectivo control sano. A 22 dpi, los procesos fotoquímicos son mínimos en ambos casos.

La fig. 35 muestra las imágenes de NPQ de una cinética completa de inducción de la

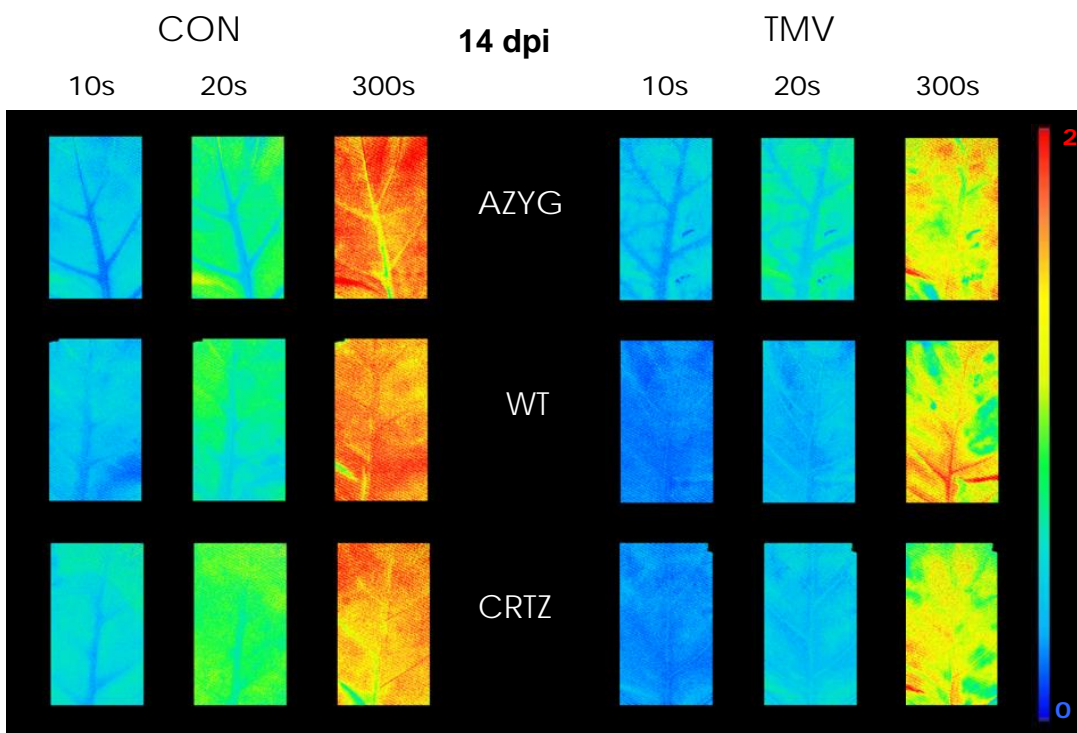


Fig 36: Imágenes de  $\text{NPQ}_{10}$ ,  $\text{NPQ}_{20}$  y  $\text{NPQ}_{300}$  de hoja ASIN de plantas de *Nicotiana tabacum* WT, crtZ y Azyg, control e infectadas por TMV a 14 dpi.

fluorescencia en las plantas anteriores WT a 14 dpi, un punto importante en la infección ya que aparece el mosaico en las hojas jóvenes de las plantas infectadas. Vemos que a todo lo largo de la cinética (salvo los primeros segundos) los valores de NPQ son siempre menores en la hoja infectada con TMV que en la hoja control. Se pueden destacar las imágenes de NPQ a 10, 20 y 300 s, por ser las que mayor contraste ofrecen entre muestra control e infectada. Tomando las imágenes de NPQ<sub>10</sub>, NPQ<sub>20</sub> y NPQ<sub>300</sub> como referencia, se comparó la disipación térmica de las tres líneas de plantas de tabaco utilizadas, WT, Azyg y crtZ a lo largo de la infección. La fig. 36 muestra concretamente los datos de 14 dpi. El resultado fue equivalente en todos los casos. No hay ninguna diferencia en el parámetro de NPQ ni en el  $\Phi$ PSII (no se muestra) en hoja ASIN sana, a pesar de la transformación genética en la línea crtZ. Igualmente tampoco hay diferencias entre las distintas líneas de tabaco durante la infección con TMV: las imágenes de NPQ de plantas infectadas de las tres líneas muestran que en todos los casos los valores de este parámetro vuelven a ser menores que en los respectivos controles.

Dentro de los parámetros clásicos de fluorescencia está la eficiencia fotoquímica potencial del PSII, Fv/F<sub>M</sub>. En la fig. 37 se analizan los valores promedio de este parámetro (ver aptdo. 2.5.1.2. de M y M) en toda la superficie foliar en hojas ASIN sanas e infectadas de las tres líneas de tabaco. No se muestran los datos de los primeros dpi, ya que los cambios aparecen a partir de de la segunda semana de infección. Cuando las plantas control de cualquiera de las tres líneas son más jóvenes, (7 y 10 dpi), los valores de Fv/F<sub>M</sub> están dentro de los considerados fisiológicos (aproximadamente 0.83), incluso en plantas infectadas. A 14dpi, Fv/F<sub>M</sub> experimenta un ligero descenso en las tres líneas de plantas analizadas, situándose todos los valores por debajo de 0,8. También observamos que en la hoja ASIN infectada con TMV estos datos no varían respecto del control sano, las diferencias no son significativas.

A 22 dpi el valor Fv/F<sub>M</sub> tiene una caída notable en general en las tres líneas y en plantas sanas e infectadas; destaca en este caso la línea crtZ, por ser la que mayores valores presenta con independencia de la presencia del virus. Este parámetro es además más elevado en las plantas infectadas que en sus controles sanos en el caso de la línea WT; en las restantes no muestran diferencias entre sí.

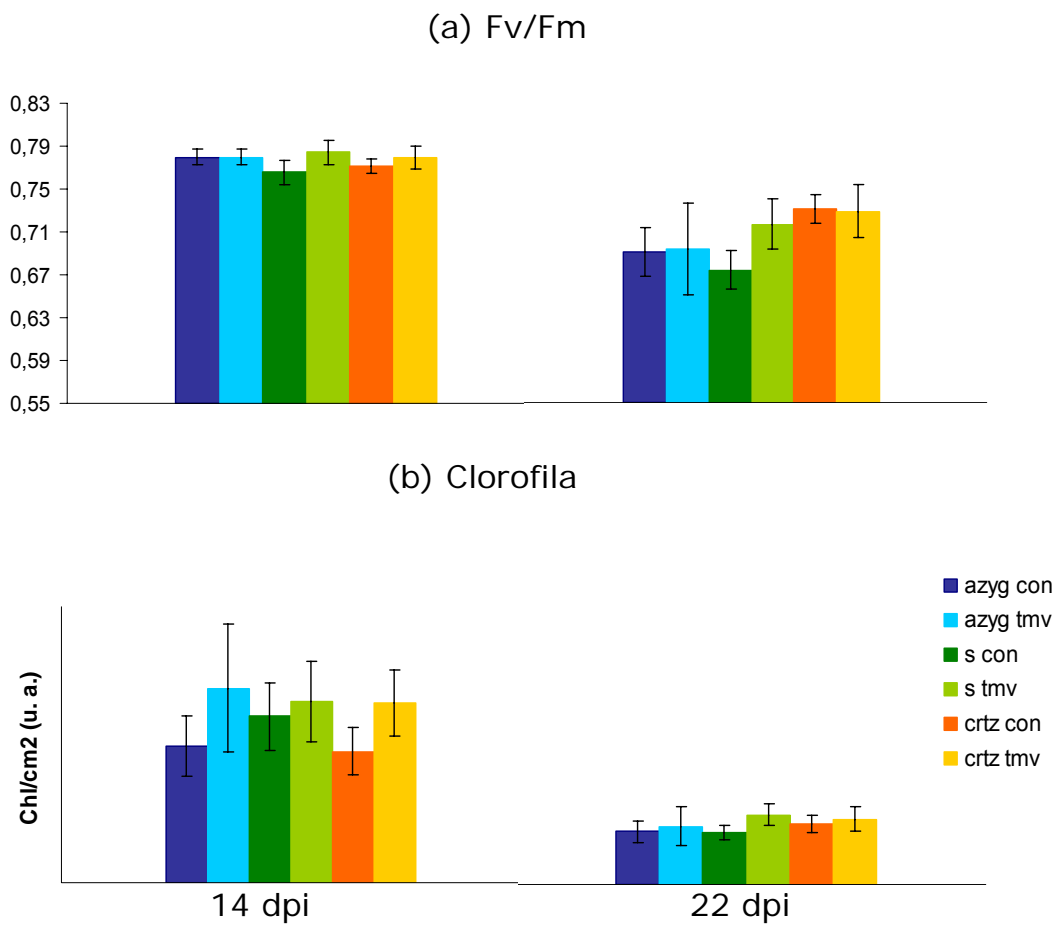


Fig 37: Contenido de Chl por área foliar ( $\text{Chl}/\text{cm}^2$ ) (b) y valores de  $F_v/F_m$  (a) en hoja ASIN sana e infectada con TMV a 14 y 22 dpi de *Nicotiana tabacum*, WT, Azyg y Crtz.

Si atendemos al contenido de clorofila total de las hojas ASIN de plantas infectadas (fig 37), los cambios con respecto a los controles sanos a 14 dpi no fueron significativos. A 22 dpi, la clorofila foliar presenta valores bastante menores a los anteriores en las hojas ASIN de todas las plantas, infectadas y controles. Las diferencias entre plantas sanas e infectadas tampoco fueron significativas.



### 3.3.2 Estudio mediante FI de la hoja SIN

El análisis de la hoja SIN, implicó en principio la realización de medidas cada 2 días, entre los 0 y 14 dpi, para un mejor seguimiento de la infección. No obstante, los datos, no mostraron grandes cambios entre períodos tan cortos de tiempo. En contraposición a la hoja ASIN en la hoja joven infectada se manifiestan los síntomas y presenta variaciones discretas en los distintos parámetros de fluorescencia analizados. Nuevamente esto nos lleva a seleccionar, tanto para los experimentos en condiciones de MIL como AIL, NPQ y  $\Phi$ PSII, como principales indicadores de los cambios en la hoja infectada. 7 y 14 dpi, resultaron ser los puntos de infección más significativos.

#### *Experimento en condiciones MIL*

Los datos que aquí se exponen se corresponden con medidas en hoja SIN a 7 y 14 dpi.

La fig 38 muestra que, en todas las plantas de tabaco analizadas (Wt, Azyg y crt2), las imágenes de NPQ<sub>20</sub> y NPQ<sub>30</sub> tras la primera semana de infección, revelan valores ligeramente mayores de NPQ en la hoja joven infectada respecto a su control sano y ninguna diferencia en el estado estacionario (NPQ<sub>300</sub>). A los 14 dpi, esta subida además de ser más acusada en las imágenes de NPQ<sub>20</sub> y NPQ<sub>30</sub>, se manifiesta también en las imágenes de NPQ<sub>300</sub>. La obtención de estos valores de NPQ tan altos en hoja SIN infectada a 14 dpi se dan cuando éstas han desarrollado, de forma extensa, los síntomas característicos que TMV provoca en tabaco (ver aptdo.3.1.2 de resultados).

Si observamos las imágenes correspondientes a  $\Phi$ PSII en los mismos puntos de la cinética de inducción de fluorescencia de la clorofila (20, 30 y 300s) (fig 39), se aprecia, al igual que en la hoja ASIN, existe una la relación inversamente proporcional entre ambos parámetros más notable a 14 dpi,.No obstante, la magnitud con la que ambos parámetros varían, no es la misma.

Las imágenes de  $\Phi$ PSII<sub>20</sub> y  $\Phi$ PSII<sub>30</sub> de hoja SIN de cualquiera de la líneas de tabaco inoculadas con TMV a 7 dpi, no se distinguen de las sanas. A 14 dpi,  $\Phi$ PSII<sub>20</sub>  $\Phi$ PSII<sub>30</sub> y  $\Phi$ PSII<sub>300</sub> muestran valores más bajos en plantas infectadas que en sus respectivos controles; el último de estos parámetros es el que se ve menos afectado. Las diferencias entre hoja sana e infectada en las imágenes de  $\Phi$ PSII no son tan acusadas como en el caso de NPQ.

El cociente  $F_v/F_M$ , no sufre ningún cambio significativo en la hoja SIN sana o infectada de las tres líneas de tabaco a lo largo de los 14 días muestreados, manteniéndose siempre por encima de

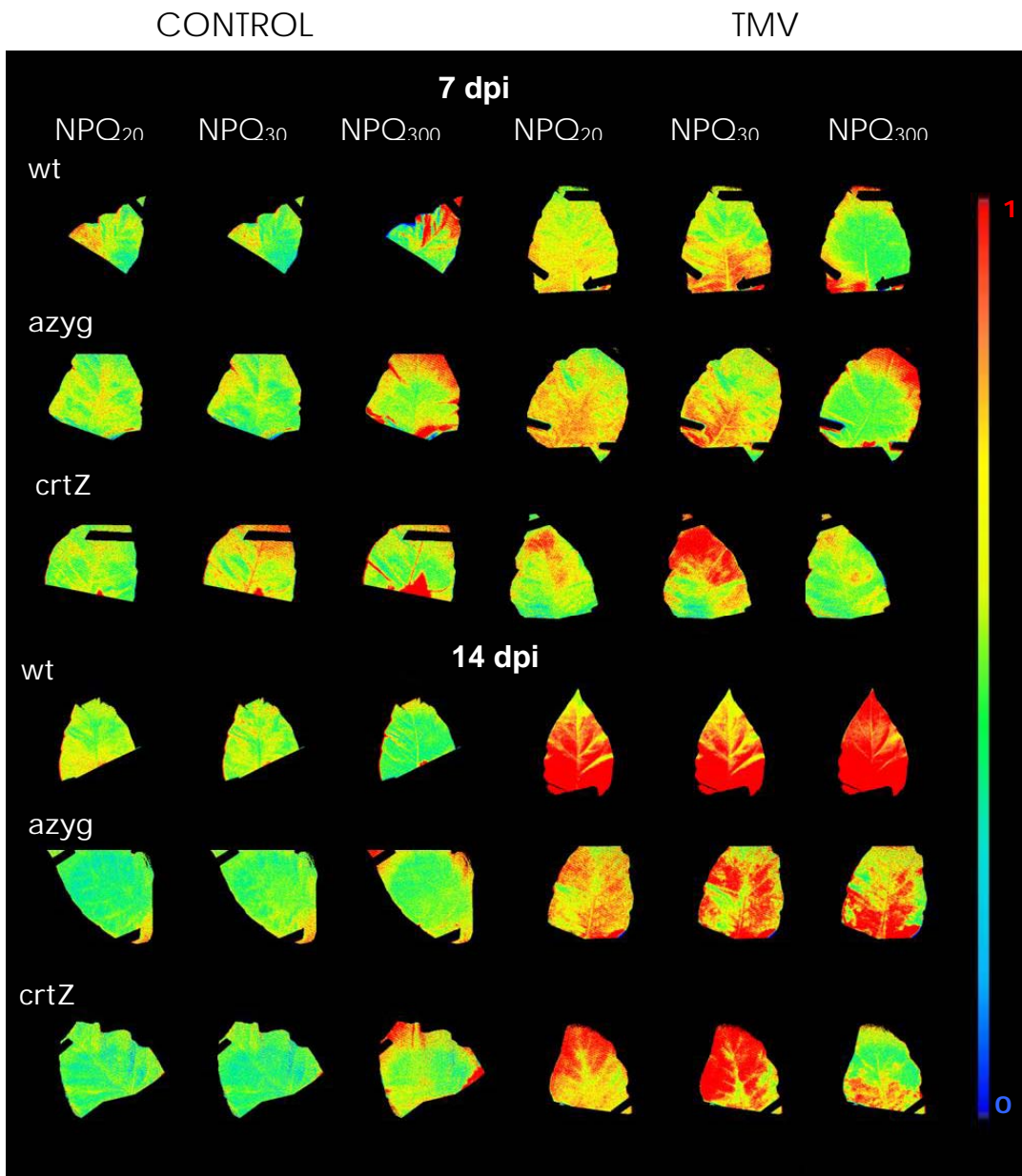


Fig 38: Imágenes de NPQ de hoja SIN de plantas de *Nicotiana tabacum* WT, Crtz y Azy, sanas e infectadas con TMV a 7 y 14 dpi, cultivadas en condiciones MIL.

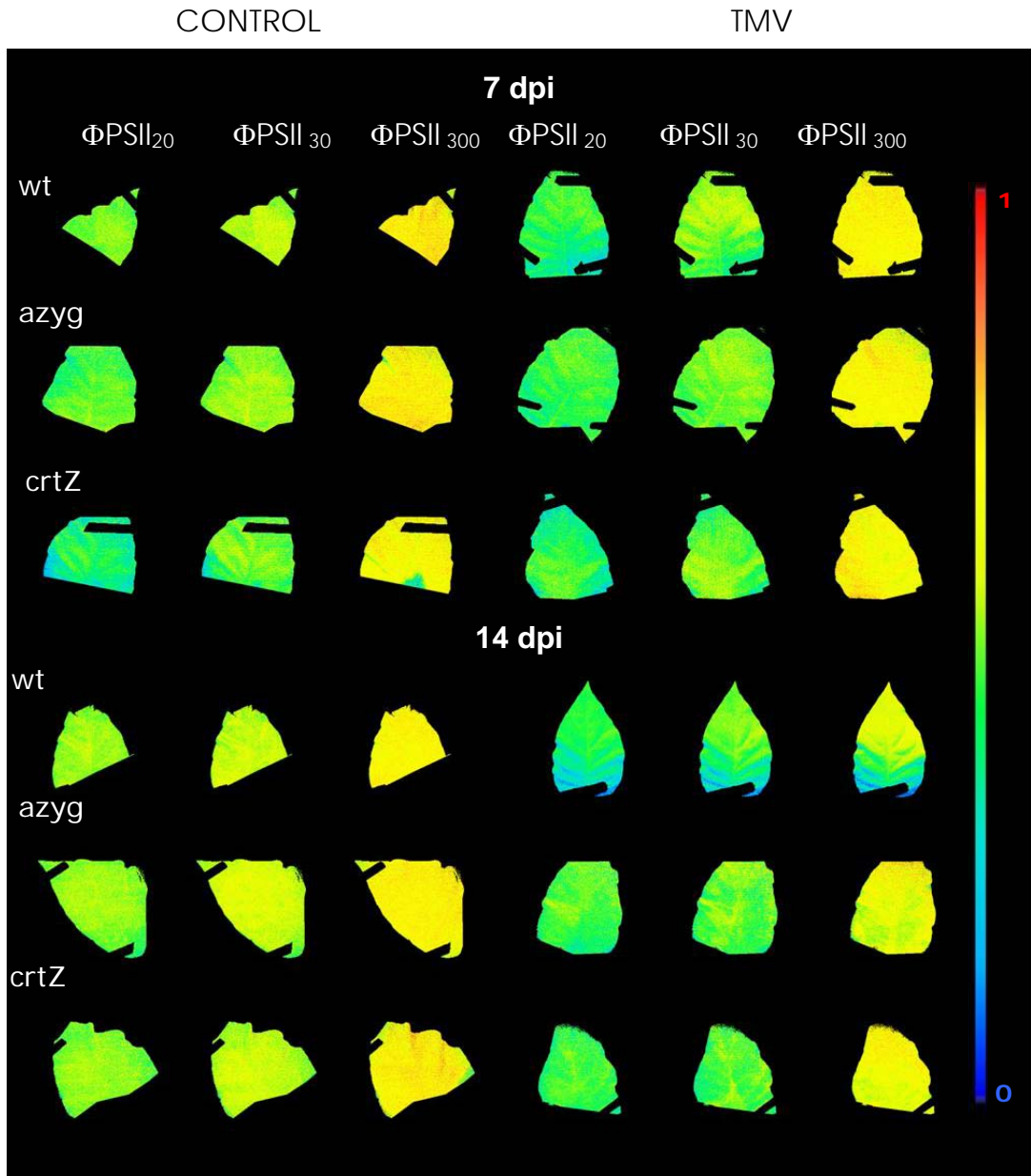


Fig 39: Imágenes de  $\Phi$ PSII de hoja SIN de plantas de *Nicotiana tabacum* WT, Crtz y Azyg sanas e infectadas con TMV a 7 y 14 dpi, cultivadas en condiciones MIL.

0.8 (no se muestra).

En cuanto al contenido de clorofila por área foliar que se detalla en la fig 40 , existe un descenso creciente en el contenido de Chl en hoja SIN de planta infectada a lo largo de la infección. Es evidente desde la primera semana de infección y afecta a las líneas WT, Azyg y crtZ de tabaco,

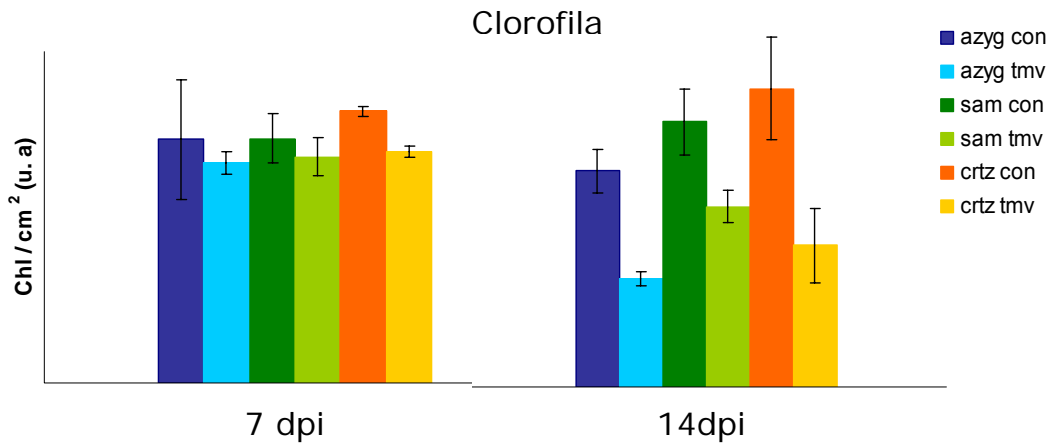


Fig 40: Contenido de Chl por área foliar (Chl /cm<sup>2</sup>) en hoja SIN de plantas de *Nicotiana tabacum* WT, Azyg y Crtz, sanas e infectadas con TMV a 7 y 14 dpi, cultivadas en condiciones MIL

#### Experimento en condiciones de AIL

Los datos que aquí se resumen corresponden a medidas en hoja SIN a 7 y 14 dpi, de plantas sometidas a un estrés lumínico adicional, tal y como se describe en el aptdo.2.1. de M y M.

La fig 40 muestra las imágenes de NPQ<sub>20</sub>, NPQ<sub>30</sub> y NPQ<sub>300</sub> en hoja SIN de planta sana e infectada a 7 y 14 dpi en estos experimentos. Los valores de NPQ de planta sana sometida a AIL, en comparación con la cultivada en condiciones MIL, son en líneas generales más altos, particularmente en el estado estacionario y a 7 dpi (comparar con fig 38).

Si estudiamos además el efecto que el virus provoca en estas condiciones, comprobamos que a 7 dpi, en las imágenes de NPQ en los tres puntos de la cinética considerados en las hojas SIN de plantas infectadas de las tres líneas de tabaco no se aprecian cambios respecto de las sanas.

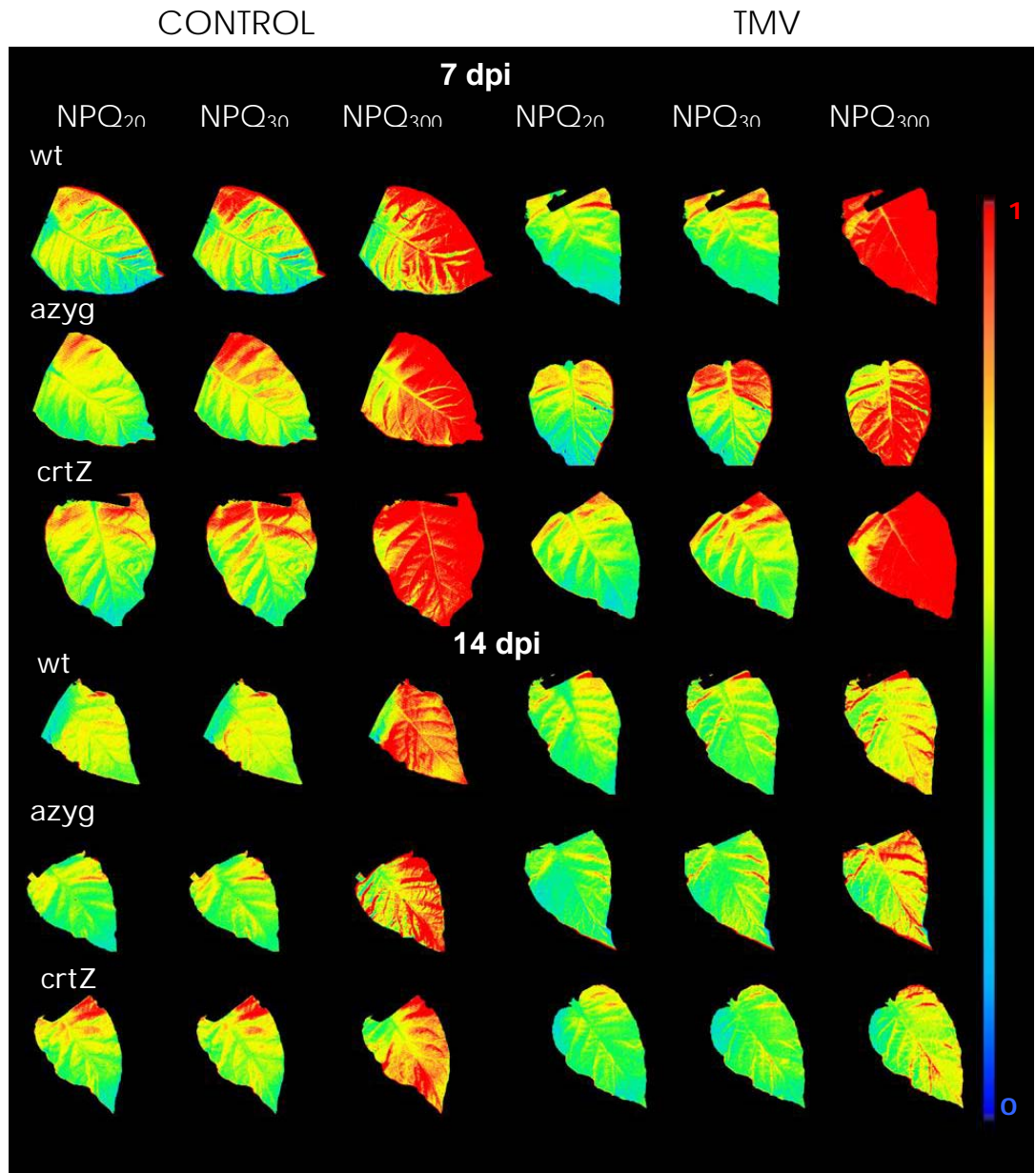


Fig 40: Imágenes de NPO de hoja SIN de plantas de *Nicotiana tabacum* WT, Crtz y Azyg, sanas e infectadas con TMV a 7 y 14 dpi, cultivadas en condiciones AIL

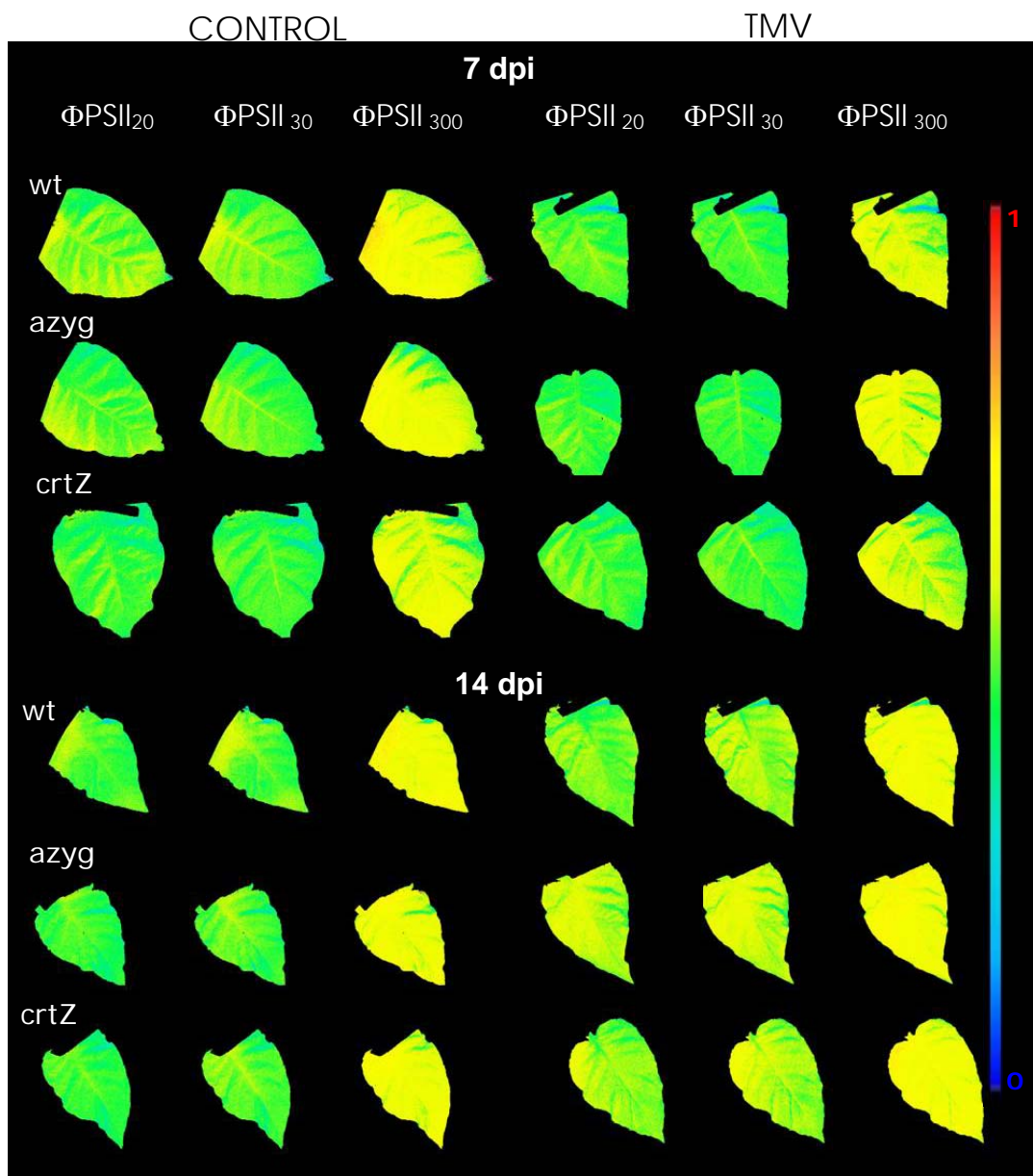


Fig 41: Imágenes de  $\Phi\text{PSII}$  en hoja SIN de plantas de *Nicotiana tabacum* WT, *CrtZ* y *Azyg* sanas e infectadas con TMV a 7 y 14 dpi cultivadas en condiciones AIL

Mientras que, comparando todas estas imágenes en condiciones MIL y AIL, los valores de NPQ son mayores en el segundo caso. A 14 dpi hay una bajada de este parámetro, en hoja infectada

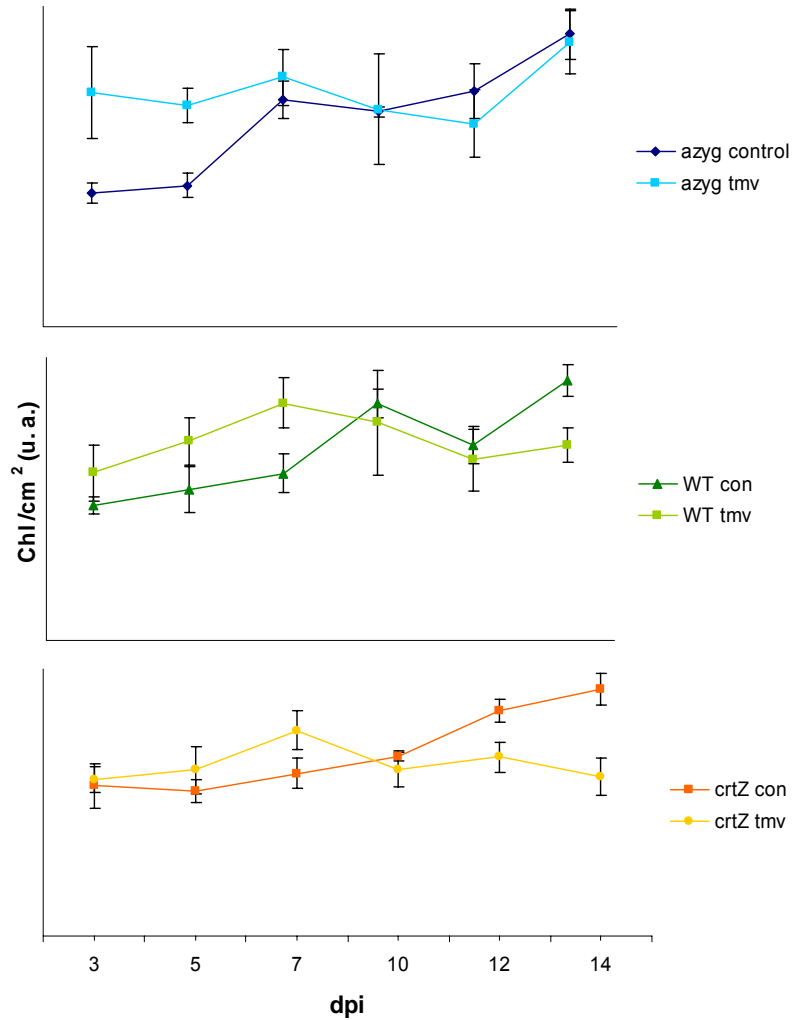


Fig 42: Contenido de Chl por área foliar ( $\text{Chl}/\text{cm}^2$ ) en hoja SIN de plantas de *Nicotiana tabacum*, WT, Azyg y Crtz sanas e infectadas con TMV, cultivadas en condiciones de AIL durante la infección, hasta 14dpi.

por TMV comparada con la sana, También en este punto de la infección encontramos diferencias con los parámetros de las hojas cultivadas con MIL en que el virus inducía una subida de NPQ.

Aún en las drásticas condiciones de estrés que supone la infección bajo AIL, la línea crtZ de tabaco, no muestra diferencias en su comportamiento fotosintético con respecto a las restantes líneas. y en definitiva tampoco ventajas

El análisis de  $\Phi$ PSII durante la infección viral en hojas SIN en condiciones AIL de todas las plantas de tabaco analizadas, se muestra en la fig 41. Como se ha comentado anteriormente, mantiene una relación inversa con los datos de NPQ. Así las imágenes de  $\Phi$ PSII<sub>20</sub>,  $\Phi$ PSII<sub>30</sub>, aunque no las de  $\Phi$ PSII<sub>300</sub>, marcan valores más altos en hoja SIN infectada, en relación a los controles sanos, a 14 dpi. Tras la primera semana de infección, sin embargo, no se manifiestan diferencias significativas en la actividad fotosintética de la hoja joven entre planta sana e inoculada con TMV.

Durante estos experimentos, al igual que en los realizados en condiciones MIL,  $F_v/F_M$  permaneció invariable y siempre superior a 0.8 en todos los casos. Ni las características de las distintas líneas de tabaco, ni la infección viral en cada uno de ellas, indujeron diferencias notables en este parámetro.

Las medidas del contenido de Chl por área foliar ( fig: 42) muestra que su contenido en hoja SIN de planta infectada de las tres líneas de tabaco es mayor que en sus controles. Los cambios comienzan en estadios muy tempranos, desde 3 dpi. A 10 dpi aproximadamente la tendencia se invierte, y la hoja infectada pasa a tener un contenido menor de pigmentos que la hoja sana. Cabe destacar que a 14 dpi el contenido de Chl es menor en la hoja infectada de las tres líneas de tabaco, tanto en los experimentos en condiciones MIL como AIL, al tiempo que los valores de NPQ en el primer caso aumentan y en el segundo bajan. Análisis mediante TL en hoja completa de la infección viral

### **3.4 Caracterización de las bandas de TL en hoja de *Nicotiana benthamiana*. Evolución según la edad de la hoja.**



Para el estudio de la interacción *N. benthamiana*-PMMoV mediante TL se realizó una caracterización previa de las curvas de emisión de TL en hoja madura sana de 45 días de edad, bajo

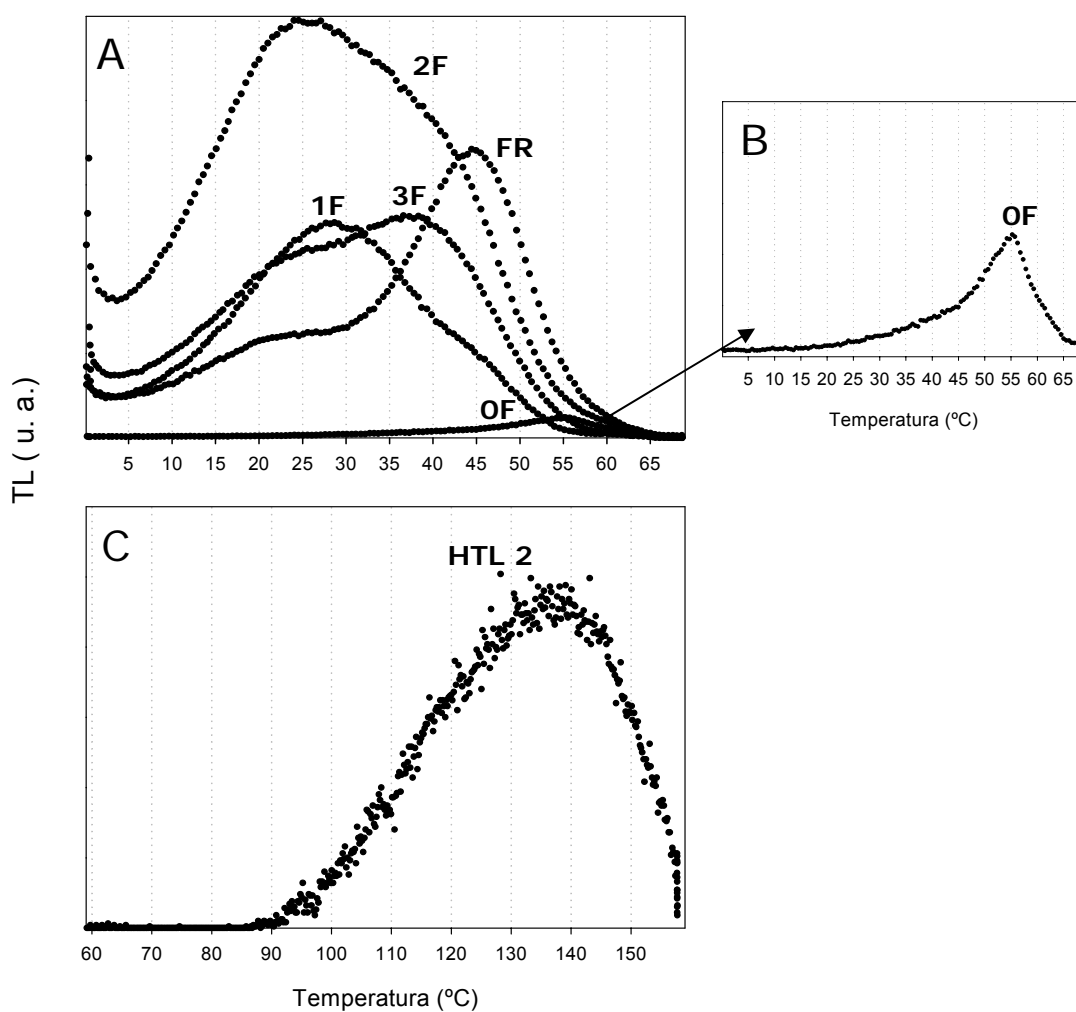


Fig 43: (A) Curvas de termoluminiscencia inducidas mediante 0, 1, 2 y 3F ó luz en el FR en hoja de *Nicotiana benthamiana*. (B) Curva resultante tras aplicar 0F (banda C) magnificada con un factor 10, con respecto a la presente en A(C). Banda HTL 2, medida en hoja ASIN infectada por PMMoV-S a 14 dpi.

distintas condiciones de medida, según se describe en el aptdo. 2.5.2.2. de M y M.

Las curvas de emisión de TL obtenidas, en hoja previamente adaptada a la oscuridad durante 10 min., y posteriormente excitadas con 0, 1, 2 ó 3 flases o luz en el rojo lejano se muestran en la fig 43 A. Aunque complejas, se caracterizan por la intensidad y la temperatura de su pico máximo ( $T_m$ ). Si bien no se puede comparar directamente la intensidad de la señal de TL entre diferentes muestras, la curva obtenida tras iluminación con 2F es claramente la de mayor intensidad, con una  $T_m$  de unos 26°C, además de un hombro en torno a los 45°C. Esta curva corresponde a la banda B, suma de las bandas  $B_2$  y  $B_1$ , generadas por los pares recombinantes  $S_2Qb^-$  y  $S_3Qb^-$ , respectivamente. Tras la iluminación con 1F, se registra una curva con una  $T_m$  alrededor de 29°C que se corresponde prácticamente con una banda  $B_2$ . En el caso de 3F, la zona de la curva correspondiente a la banda B tiene una  $T_m$  entorno a los 21°C, que se considera una banda  $B_1$ .

Podemos observar que, conforme se incrementa el número de flases con la consiguiente prevalencia de estados  $S_3$  frente a los  $S_2$ , la  $T_m$  de de la banda B disminuye: 1F / 29°C > 2F / 26°C > 3F / 21°C.

Cuando se ilumina la hoja con FR, se induce la banda AG con una  $T_m$  de 45°C ( $S_2/S_3 Q_B X^-$ ). También es visible una pequeña banda B, ya que aunque la luz en el FR excita principalmente al PSI, la pequeña absorción por parte del PSII, es suficiente para generar esta segunda banda. El hombro a 45°C en curvas en las que predomina la banda B, generadas por 3F, 2F y apenas visible tras 1F se corresponde también con la banda AG. En condiciones de generación de la banda B no sólo aparecen los pares recombinantes correspondientes a esta banda, sino que hay una proporción de  $Q_B$  oxidada que tras reducirse por electrones procedentes del estroma, participa en la generación de la banda AG.

La quinta curva (0F) de la fig 43 (A y B), cuya  $T_m$  ronda a los 55°C, aparece cuando no se ilumina la muestra tras su adaptación a la oscuridad y se corresponde con la banda C, única banda emergente que proviene de la recombinación  $Tyr_D^+ Q_a^-$ .

Realizando las medidas en el mismo aparato, pero con las modificaciones pertinentes, (ver aptdo.2.5.2.2 de M y M) podemos detectar también las bandas de HTL en hoja. La aparición de una banda con una  $T_m$  en torno a 130°C (Banda HTL 2), es indicativa de peroxidación lipídica y por lo

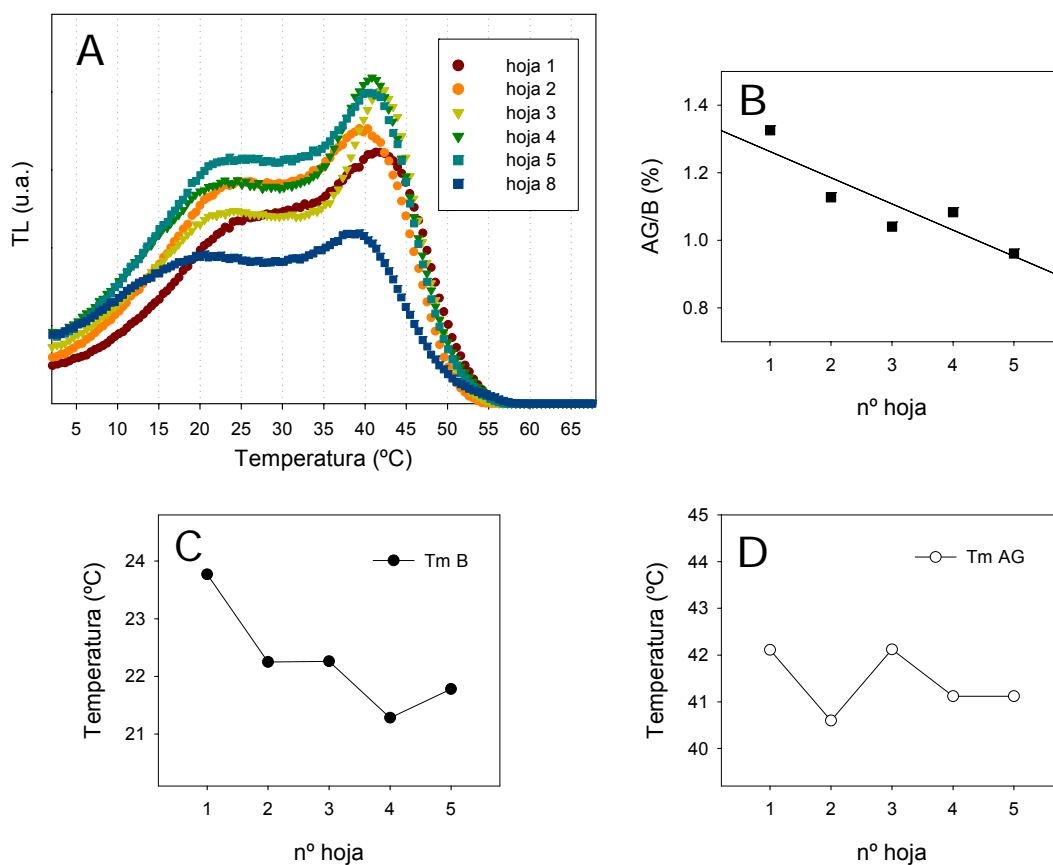


Fig 44: (A) Medidas generadas con 2F en las diferentes hojas de una misma planta, numeradas según su posición, siendo la hoja 1 la más cercana al ápice. (B) Proporción de la banda AG respecto a B en las distintas hojas. (C y D) Tm de las bandas B y AG, respectivamente, en las diferentes hojas de una misma planta.

tanto sólo ha sido estudiada en hojas infectadas. En la fig 43 (C) se muestra un ejemplo habiendo usado una hoja ASIN infectada por PMMoV-S a 14 dpi.

Las hojas de una misma planta de *Nicotiana benthamiana*, presentan diferencias en sus curvas de TL, relacionadas con su grado de madurez. En la fig 44 (A), se muestran las curvas de TL, en las que pueden distinguirse la contribución de las bandas B y AG, obtenidas tras iluminación con

2F en hojas numeradas según su posición en la planta. Se comprueba que, si bien el perfil de todas estas curvas es análogo, tras realizar la descomposición de cada una de ellas (ver aptdo. 2.5.2.2 de M y M), que nos revela la proporción de las bandas B y AG, se evidencia que la relación AG/B, disminuye gradualmente conforme la edad de la hoja aumenta (fig 44 B). La T<sub>m</sub> de la banda B, es también inversamente proporcional a la edad; en contraste con la T<sub>m</sub> de la banda AG, que no parece presentar una tendencia clara en función de la edad de las hojas (fig 44 (C) y 44 (D), respectivamente). Las hojas utilizadas para el estudio del efecto de la infección viral, las denominadas hojas SIN y ASIN, son equivalentes a las hojas 2 y hoja 8, respectivamente, de la fig 44 (A) cuando las medidas se realizaron a 14 dpi, momento en el que la planta tenía aproximadamente 45 días de edad.

### 3.4.1 Análisis de la interacción de *Nicotiana benthamiana* con PMMoV mediante TL.

Se analizaron plantas de *Nicotiana benthamiana* sanas e infectadas por PMMoV-S y PMMoV-I a 7 y 14 dpi, tanto hojas ASIN como SIN, y sus correspondientes controles. Se estudió en cada caso las bandas B, AG y C, siguiendo los protocolos de medida descritos en el aptdo. 2.5.2.2 de M y M. Las curvas aquí presentadas pertenecen a una sola infección, de todas las analizadas, que consideramos como infección “tipo”. Al final de cada bloque de resultados se presenta la estadística de los datos más relevantes.

Asimismo, en todos los casos se realizaron medidas de HTL para detectar peroxidación lipídica en tejido fotosintético infectado.

#### 3.4.1.1 Análisis mediante TL de la hoja ASIN

##### *Banda AG y B*

Las curvas de emisión de TL tras iluminación de la hoja con 2F (fig 45), para la detección de las bandas B y AG, se registraron en plantas que estuvieron previamente 12 h en oscuridad y en otras equivalentes que, tras estar bajo iluminación 3-4 h, se adaptaron durante 10 min a la oscuridad. Se comprueba que un período prolongado de oscuridad aumenta la contribución de la banda AG a la curva obtenida, al igual que desplaza hacia valores más altos la T<sub>m</sub> de la misma.

Se detectan diferencias, en ocasiones ya desde la primera semana de infección, entre las bandas de hojas ASIN de plantas infectadas y sus correspondientes controles de plantas sanas, así como entre las correspondientes a plantas infectadas con las cepas española e italiana de PMMoV.

Así en las curvas de hojas ASIN infectadas por PMMoV-S de la fig 45, la banda AG sufre un desplazamiento, discreto a 7 dpi y muy significativo a 14 dpi, hacia bajas temperaturas con respecto a la del control. El efecto es similar tanto en las medidas realizadas en plantas adaptadas sólo 10 min.

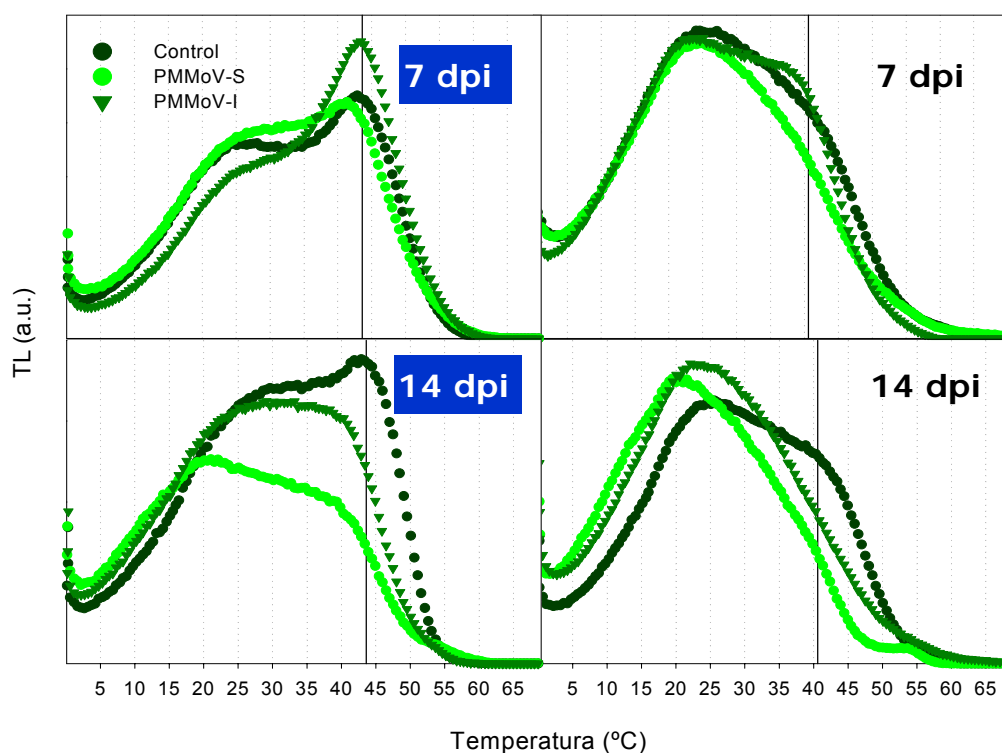


Fig. 45: Ejemplo de curvas de TL en medidas realizadas con 2F, tras un período de adaptación a la oscuridad de 12 h (izq) ó 10 min (dra.) a 7 y 14 dpi, en hoja ASIN sana e infectada por PMMoV-S e - I de *N. benthamiana*. La línea vertical de cada gráfica marca la  $T_m$ , en cada caso, de la banda AG en la muestra control.

como 12h a oscuridad.

Esta tendencia se corrobora al realizar las medidas con luz FR, que favorece principalmente la generación de la banda AG (fig 46). La  $T_m$  de esta banda en hoja de plantas infectadas con PMMoV-S a 14 dpi es bastante menor a la  $T_m$  de su control sano correspondiente; en la primera semana esta diferencia es mucho menos acusada. De forma análoga a las medidas realizadas con 2F, este efecto es evidente tanto en medidas realizadas tras 10 min como tras 12 h de oscuridad

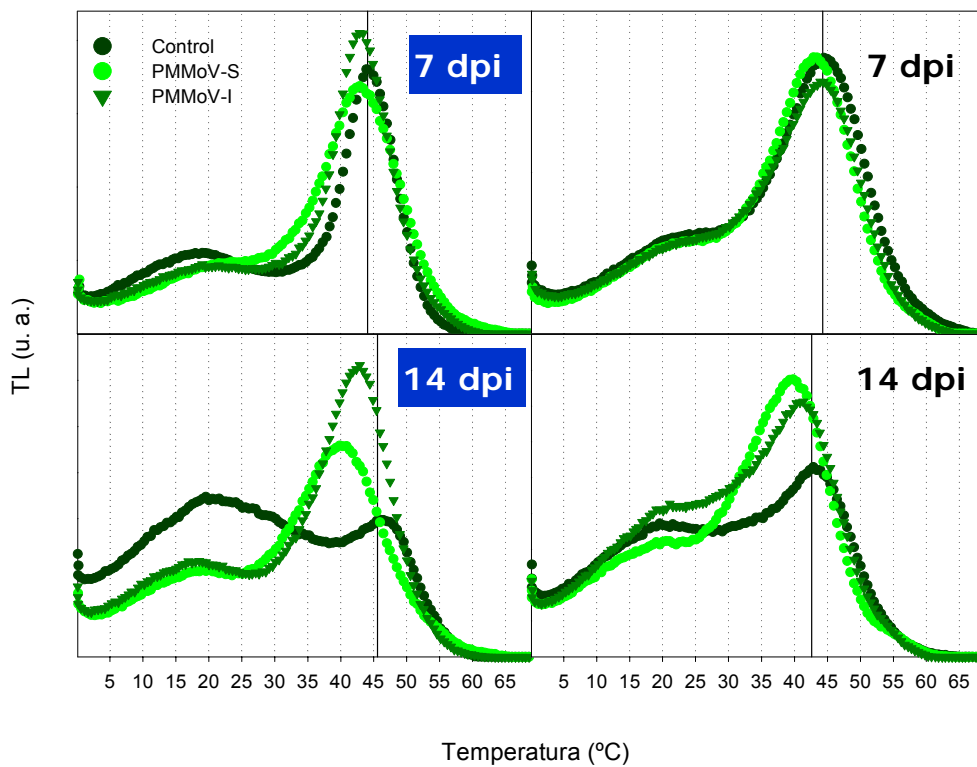


Fig 46: Ejemplo de medidas realizadas con luz FR, tras un período de adaptación a la oscuridad de 12 h (izq) ó 10 min (dra.) a 7 y 14 dpi, en hoja ASIN sana e infectada por PMMoV-S e - I. La línea vertical de cada gráfica marca la  $T_m$ , en cada caso, de la banda AG en la muestra control.

Por su parte, el PMMoV-I provoca en la planta de *Nicotiana benthamiana* los mismos cambios en la banda AG, tanto en medidas 2F (fig 45) como FR (fig 46), que la cepa española del virus, pero siempre de menor grado. Incluso a 7 dpi, las diferencias con el control, en muchas ocasiones fueron indetectables.

Puntualmente se midió la emisión de luminiscencia inducida con luz FR a temperatura constante, la denominada DL (decay luminiscence), concretamente a 20°C, 25°C y 30°C, según se describe en el aptdo.2.5.2.2 de M y M, en hoja ASIN sana e infectada a 14 dpi (fig 47). La curva de DL

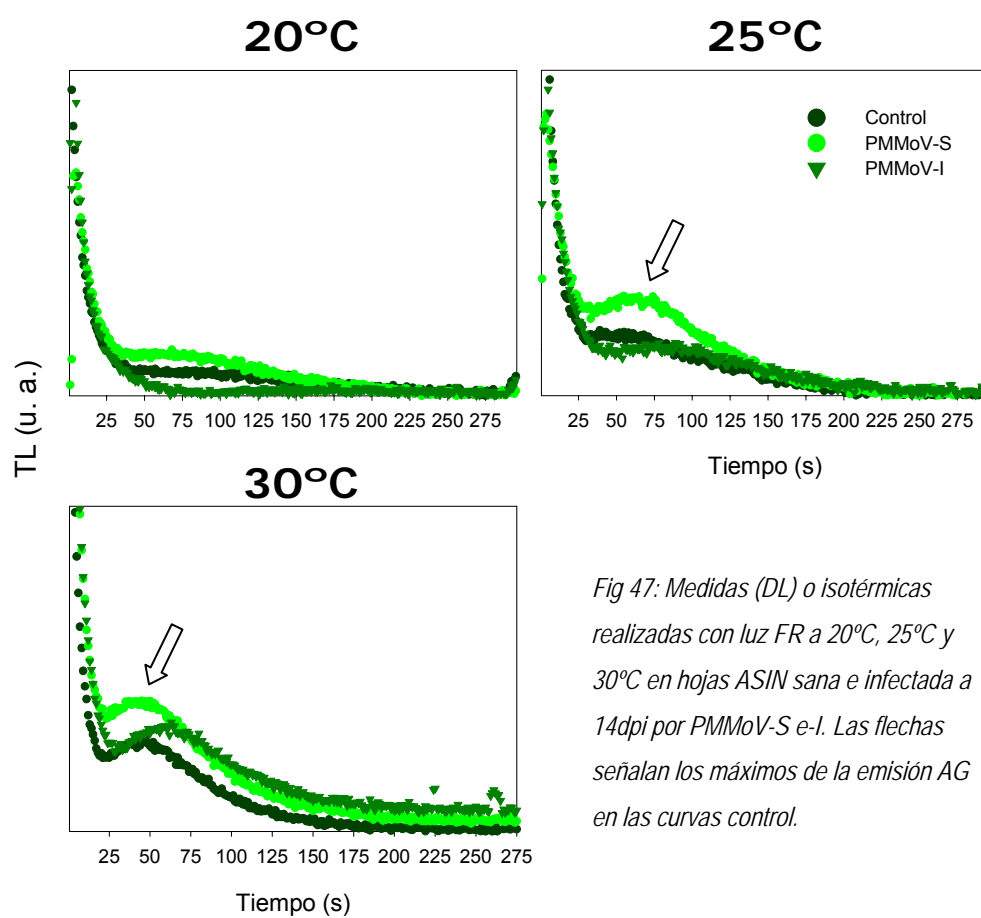


Fig 47: Medidas (DL) o isotérmicas realizadas con luz FR a 20°C, 25°C y 30°C en hojas ASIN sana e infectada a 14dpi por PMMoV-S e-I. Las flechas señalan los máximos de la emisión AG en las curvas control.

que se obtiene en hoja sana presenta una típica cinética exponencial descendente, atribuible a una emisión B, sobre la que se superpone una de tipo AG, que da lugar a un hombro con un máximo, en nuestro caso, pasados los primeros 25 s de la medida.

Las curvas de la hoja ASIN control (fig 47), indican que en la medida realizada a 25°C se empieza a distinguir una pequeña emisión AG cuyo máximo está entorno a los 75s, la cual aparece de forma más definida y con su máximo cerca de los 60s, a 30°C. Conforme la T<sup>a</sup> de medida empleada para la DL se acerca a 45°C, que es la T<sub>m</sub> del pico de la banda AG en las medidas de TL ya mostradas, mejor se genera dicha emisión AG y más se diferencia de la emisión B. En el caso de hoja

ASIN infectada con PMMoV-S, comparando con la hoja control, la banda AG se induce en medidas realizadas a temperaturas más bajas: a 20°C se intuye, mientras que a 25°C surge ya claramente en mayores proporciones a las del control. En las medidas realizadas a 30°C, aparece claramente en el control una pequeña emisión AG, pero es en la hoja infectada por PMMoV-S de nuevo donde mayormente se induce la misma. Las medidas pertenecientes a hoja AS infectada con PMMoV-I, no se diferencian de las control, salvo si éstas son realizadas a 30°C, donde aún así las variaciones no presentaron una tendencia tan clara como en la infección con PMMoV-S.

Respecto a los cambios originados por la infección viral en la banda B, volvemos a la fig 45 de las medidas de 2F, la T<sub>m</sub> de esta banda desciende como la de la banda AG en hoja infectada, siendo este efecto más evidente a 14 dpi. De nuevo PMMoV-S produce cambios más drásticos que PMMoV-I. Este efecto se ilustra con más detalle más adelante, en la fig 49, con la descomposición de las curvas de TL en sus componentes.

Como apoyo a las medidas de 2F, se realizaron otras con 3F y 1F, en las que se favorece en cada caso la generación de las bandas B<sub>1</sub> (S<sub>3</sub>Qb) y B<sub>2</sub> (S<sub>2</sub>Qb), respectivamente (ver fig 48). Los efectos encontrados a 14 dpi son similares a los de las medidas con 2F; los picos de máxima emisión de las bandas B medidas con 3F y 1F en hoja infectada, se sitúan a temperaturas más bajas, en comparación a los registrados en hoja control. El efecto a 7 dpi es mínimo en las medidas con 3F y prácticamente inexistente en las de 1F.

Dado que las medidas de TL en hoja, no permiten comparar directamente las intensidades absolutas de las bandas características entre diferentes muestras, se han descompuesto las curvas



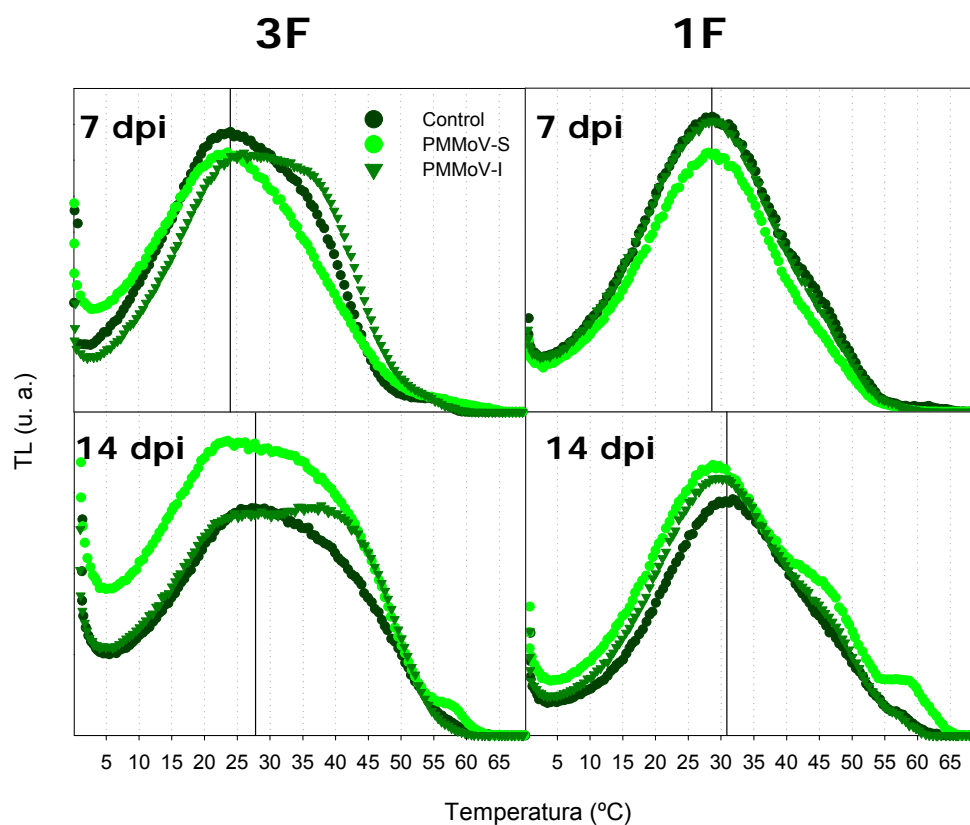


Fig 48: Ejemplo de medidas realizadas con 3F (izq.) y 1F (dra), a 7 y 14 dpi, en hoja ASIN sana e infectada por PMMoV-S e -I. La línea vertical de cada gráfica marca la  $T_m$  en cada caso, de la banda B en la muestra control.

inducidas con 2F y se han obtenido para su análisis las proporciones relativas (expresadas en porcentajes) de bandas B y AG, así como las  $T_m$  de ambas. En la fig 49 se ilustra la descomposición de las curvas correspondiente a plantas sanas e infectadas con los dos virus a 14 dpi, en las medidas realizadas tras 10 min. de oscuridad, que también se recogen en la fig 45 Es evidente que la infección por PMMoV, induce a 14 dpi en hoja ASIN, una disminución –más acusada en el caso de PMMoV-S- de la proporción AG/B, comparado con los resultados obtenidos en su control sano.

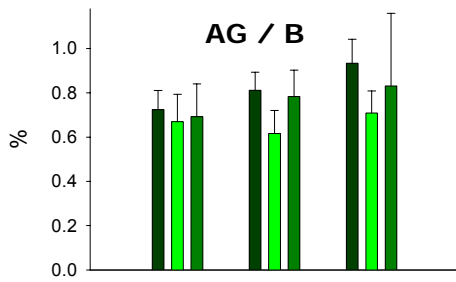
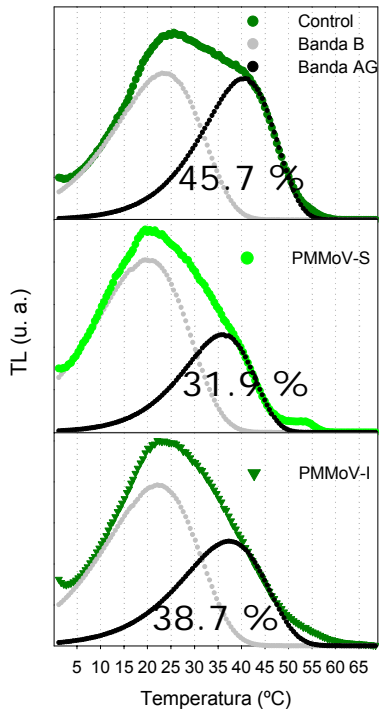
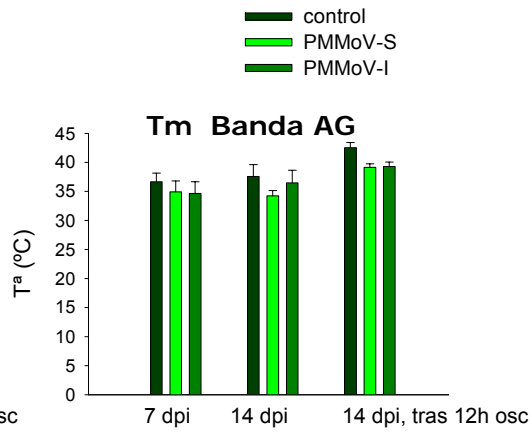
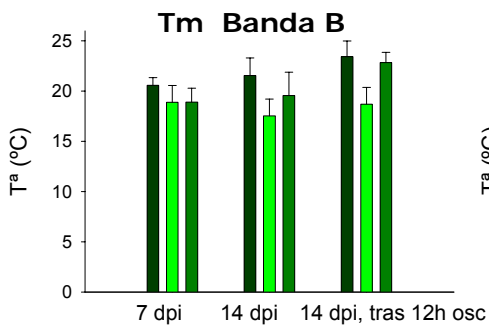


Fig 50: Datos de las distintas infecciones analizadas, que reflejan los cambios a 7 y 14 dpi, que provocan las dos cepas del virus PMMoV, en la relación AG / B y las Tm de B y AG, en hoja ASIN.



La fig 50 es producto del análisis de hasta 5 infecciones, presenta los datos tras un tratamiento estadístico, de la descomposición de las curvas de TL en las medidas realizadas según el protocolo habitual con 2F a 7 y 14 dpi. La disminución en la proporción AG/B en hoja infectada todavía no es significativa a 7 dpi, pero sí lo es tras la segunda semana de infección al menos con PMMoV-S. Los datos de las Tm de las bandas B y AG obtenidas tras la descomposición, también muestran que las diferencias causadas por el virus son significativas a 14 dpi y en la infección con PMMoV-S.

#### Banda C

Hemos registrado también, a lo largo de la infección viral, la banda C obtenida en muestras adaptadas a la oscuridad y sin aplicar posteriormente ningún flas. Esta banda es indicativa de la recombinación de un par redox alternativo, la Tyr D<sup>+</sup>, que no es el un donador de electrones fisiológico y Qa<sup>-</sup>, cuya presencia indica el bloqueo del paso de electrones hacia Qb. A 7dpi la emisión de la banda C no varía entre hoja sana e infectada con cualquiera de los dos virus; sin embargo, pasadas dos semanas de infección, se da un importante incremento de la misma en muestras infectadas por PMMoV-S, y más moderado si la infección es por PMMoV-I.

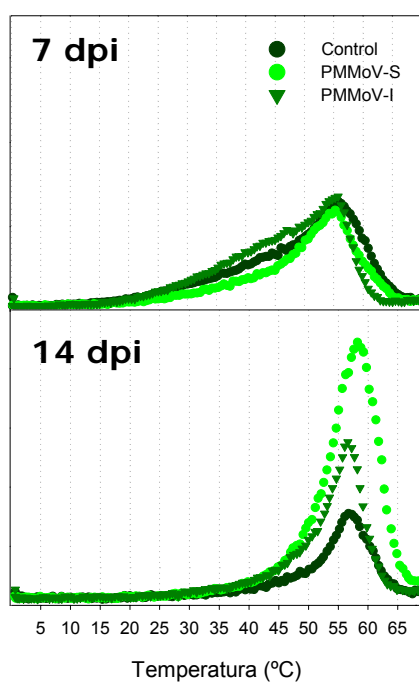


Fig 51: Curvas obtenidas de las medidas realizadas a 7 y 14 dpi, sin iluminación de la muestra tras su adaptación a la oscuridad, en hoja ASIN control e infectada por PMMoV-S y PMMoV-I.

### 3.4.1.2 Análisis mediante TL de la hoja SIN

#### *Banda AG y B*

En las figura 52 A y B se muestra un ejemplo de las medidas realizadas en hojas SIN sana e infectada por ambos virus, con iluminación de 2F y FR, a 7 y 14 dpi. El efecto más destacado inducido por la infección viral es un desplazamiento de la  $T_m$  de la banda AG hacia altas temperaturas comparado con la situación en el control sano, excepto en las medidas de 2F a 14dpi. Pero en esta infección, de la fig 52, no hay una tendencia similar de la banda AG entre las medidas de 2F y FR, como ocurría con la hoja ASIN, ni a 7 ni a 14dpi. A partir de la descomposición de las curvas inducidas

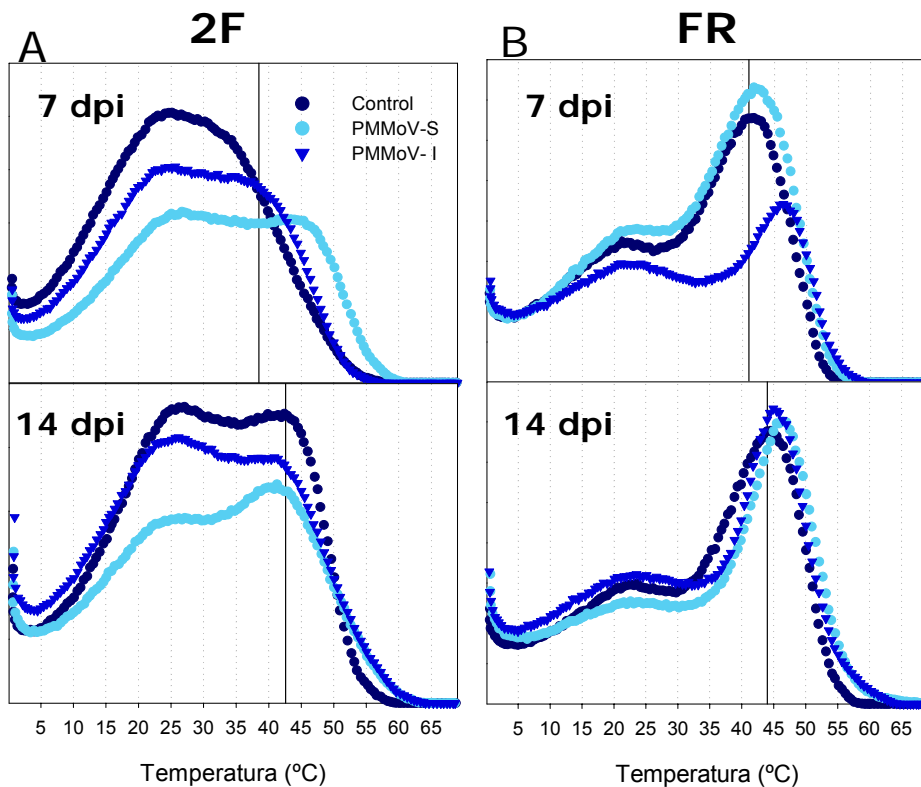


Fig 52: Ejemplo de medidas realizadas con 2F (A) y luz FR (B.), tras un periodo de adaptación a la oscuridad de 10 min. en hoja SIN sana e infectada por PMMoV-S e – a 7 y 14 dpi. La línea vertical de cada gráfica marca la  $T_m$  en cada caso, de la banda AG en la muestra control.

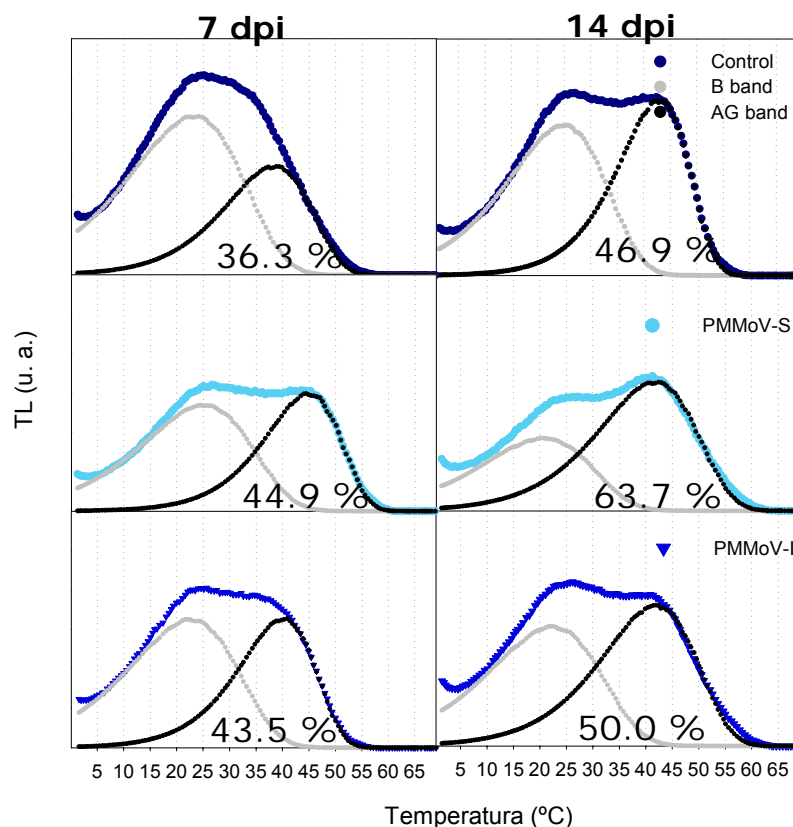
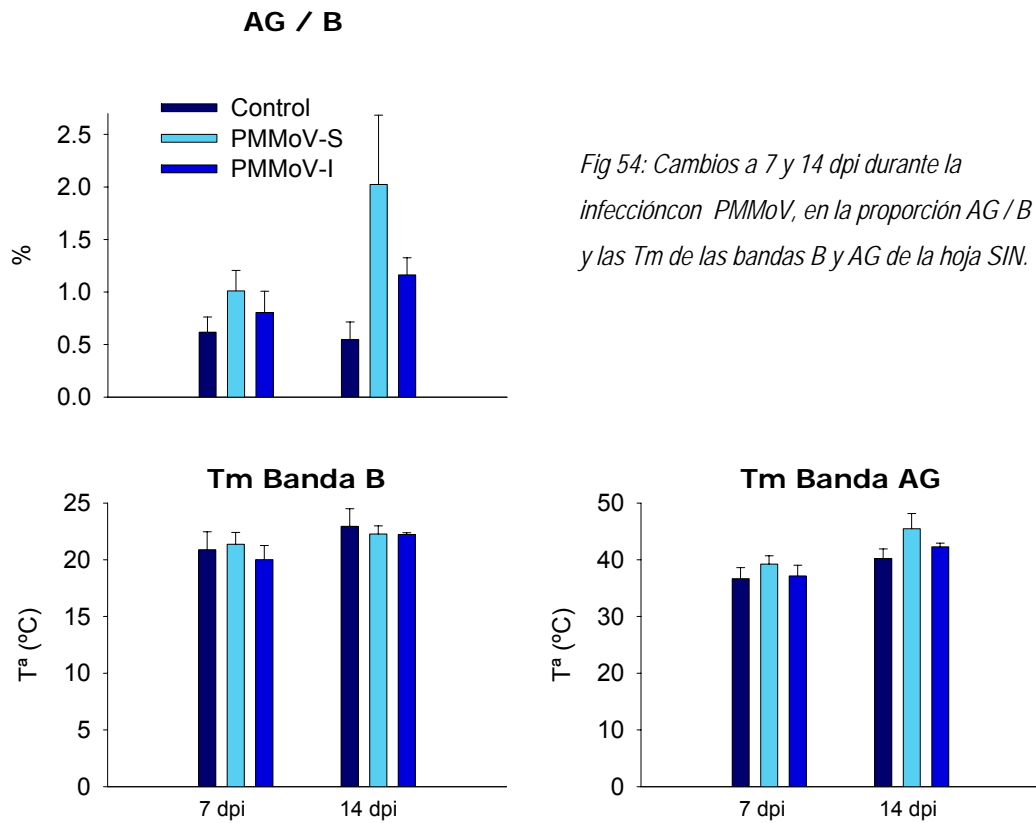


Fig 53: Ejemplo de descomposición de las curvas de hojas SIN sana e infectada por ambas cepas del virus, a 7 y 14 dpi, para el análisis de las bandas B y AG. Los porcentajes indicados, se corresponden con la contribución de la banda AG.

con 2F (fig 53) y el tratamiento estadístico de los datos resultantes considerando hasta 5 infecciones (fig 54) sí se pudieron observar más claramente los cambios en las  $T_m$  y en la proporción AG/B, inducidos por la infección viral.

El análisis conjunto de las diferentes infecciones (fig 54) muestra que la proporción AG/B crece significativa y progresivamente en hojas de plantas infectadas respecto a su control sano, desde la primera semana de infección y siempre en menor grado por la infección con PMMoV-I. El incremento de la banda AG a 14 dpi es tal que, en algunos casos, su proporción en hoja infectada con PMMoV-S supera a la de B. Esto lo podemos ver en detalle tanto en fig 53 como en la fig 54.



Respecto a los cambios en la Tm de las bandas B y AG durante la infección con PMMoV, en el primer caso no fueron significativos en ningún punto; sin embargo la Tm de la banda AG se desplaza hacia más altas temperaturas con respecto a los valores control a partir de los 14 dpi, con un efecto más marcado en plantas infectadas con PMMoV-S.

#### *Banda C*

Las medidas de la banda C en hoja SIN infectada (fig 55) no muestra diferencias a 7dpi respecto a la hoja sana, pero a 14 dpi su intensidad crece drásticamente. A diferencia de lo que ocurre en hoja ASIN con este tipo de banda, este efecto en la hoja SIN, es independiente del virus presente en la planta.

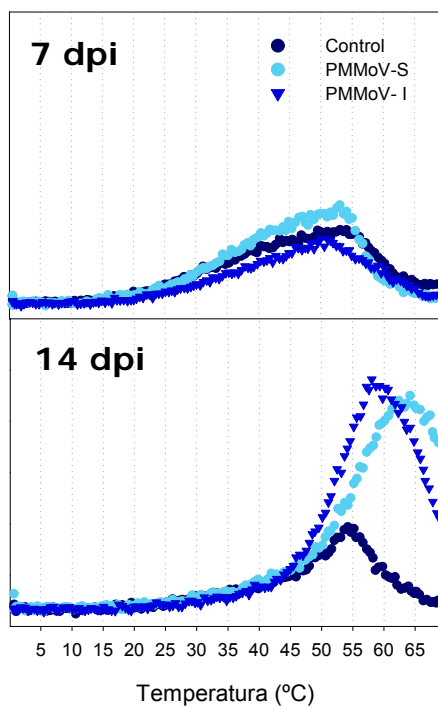


Fig 55: Curvas correspondientes a la banda C de hojas SIN control e infectadas por PMMoV-S y PMMoV-I, a 7 y 14 dpi.

### 3.4.2 Análisis mediante HTL de la hoja ASIN y SIN

Las figuras 56 A y 56 B resumen las medidas de HTL realizadas en hojas ASIN y SIN, respectivamente, las cuales permiten detectar estrés oxidativo en hoja.

La banda de HTL2, caracterizada por un pico máximo entorno a los 130°C, aparece desde la primera semana de infección, así como a 14dpi, con PMMoV-S en hoja ASIN (fig 56 A). Sin embargo, en la hoja SIN, a pesar de presentar enrollamiento y clorosis desde los 7 dpi, no se observa la aparición de esta banda hasta los 14 dpi y además sólo lo hace en hoja de planta inoculada con la cepa española del virus (fig 56 B). En las medidas de plantas infectadas con PMMoV-I, no se registran bandas de HTL ni en hoja SIN ni ASIN, al menos durante las dos primeras semanas de infección.

Estas gráficas están representadas con la misma escala y en estas medidas, al contrario que las de TL, las intensidades pueden compararse entre unas muestras y otras. En este caso, y en consonancia con los datos de las restantes infecciones medidas, se aprecia que la intensidad de la banda HTL2 no difiere mucho entre los 7 y 14 dpi en las hojas ASIN infectadas por PMMoV-S. Sin embargo, en la hoja SIN infectada por el mismo virus, si bien esta banda aparece más allá de la primera semana de infección, su intensidad es claramente mayor a las de la hoja ASIN.

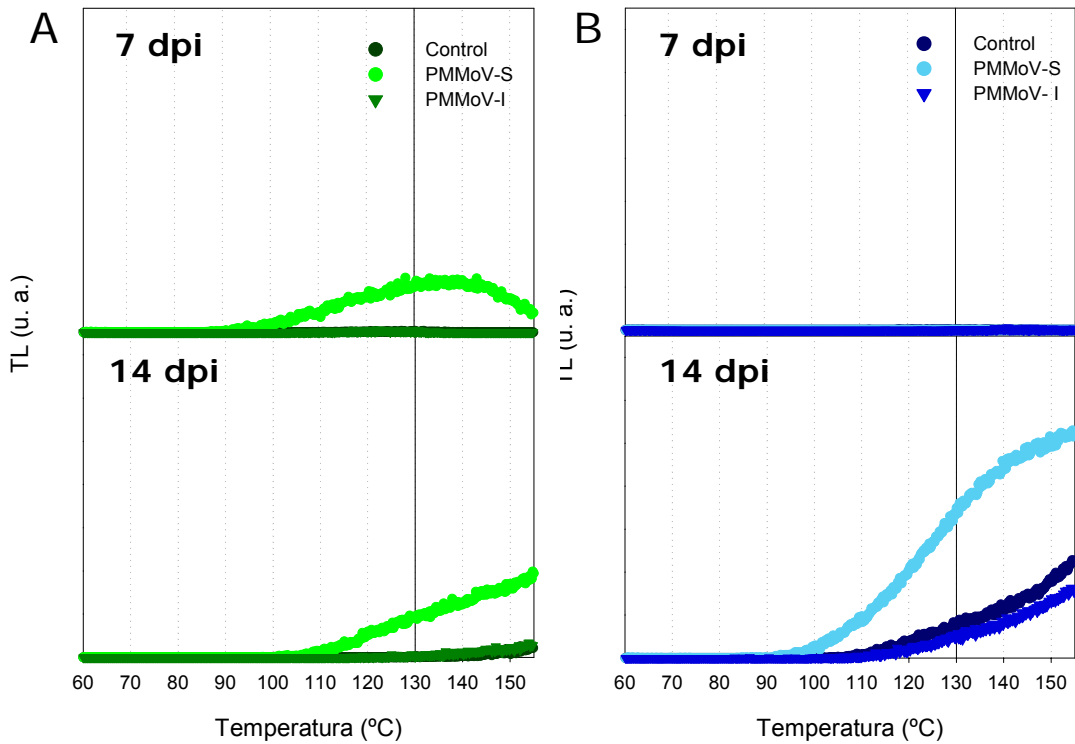


Fig 56: Curvas obtenidas de las medidas de HTL realizadas en hoja ASIN (A) y SIN (B) control e infectada por PMMoV-S y PMMoV-I, a 7 y 14 dpi.



### 3.5 Medidas de BGF y compuestos que absorben en el UV en plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas por PMMoV.

Se obtuvieron los espectros de emisión y excitación de la ChIF inducidos por luz UV, (aptdo. 2.5.3.2. de M y M), con objeto de analizar los cambios en la BGF y en el contenido de compuestos que absorben en el UV, en hojas SIN y ASIN de plantas de *N. benthamiana* control e infectadas por ambos PMMoV, -S e -I, a lo largo de las dos primeras semanas de infección.

En el caso de los espectros de excitación, los resultados se muestran como el logaritmo del cociente entre los espectros de la cara AB y AD de la hoja ( $\log \text{FER AB/AD}$ ) y los logaritmos del cociente entre los espectros de las caras adaxiales o las caras abaxiales de las hojas control y las infectadas ( $\log \text{FER ADc/ADi}$  y  $\log \text{FER ABc/ABi}$ , respectivamente).

#### 3.5.1 Caracterización de plantas de *N. benthamiana*

El espectro de emisión de fluorescencia inducido por luz UV (350nm) de una hoja de *N. benthamiana* presenta, como muestra la fig 57 (A), tres máximos, en el azul, el rojo y el rojo lejano y un hombro en el verde. El espectro es semejante en hoja madura o ASIN y hoja joven o SIN. La intensidad de la emisión de la cara AD (haz) de la hoja, es ligeramente menor a la de la cara AB (envés) por debajo de los 460nm aproximadamente, (región del violeta, el índigo y algo del azul) y de forma muy marcada en la región del rojo/rojo lejano. Adicionalmente, en esta última región, se observa que la relación entre el máximo RF y el FRF, varía entre ambas caras. En la cara AD el pico RF es mucho menor en relación al pico de FRF. Diferencias análogas aunque menos acusadas, encontramos entre el espectro de emisión de la cara AD de una hoja madura respecto al de una hoja joven (ver fig 57 B), siendo menor también en el primer caso las distancias entre sus máximos RF y FRF.

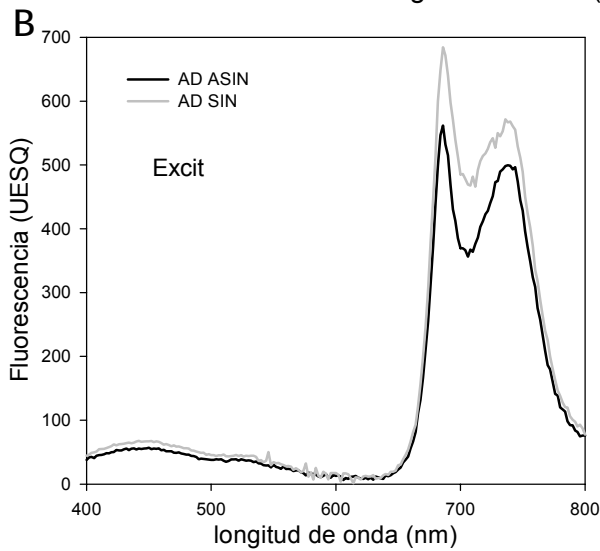
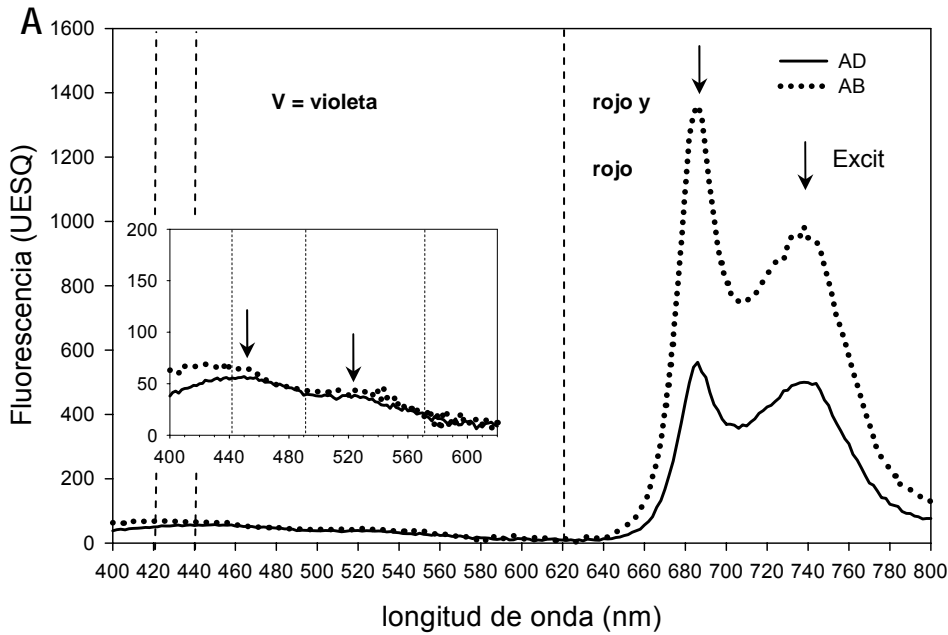


Fig 57: (A) Espectros de emisión inducidos por luz UV (350nm) de la cara AB y AD de una hoja madura (ASIN) sana de *N. benthamiana*, en los que se señalan las regiones del espectro estudiadas y sus máximos característicos (ver texto). El inserto muestra la región del espectro del verde y el azul a menor escala para mayor claridad. (B) Comparación de los espectros de emisión de la cara AD de una hoja joven (SIN) y una hoja madura (ASIN) sanas.

El espectro de excitación de una hoja de *N. benthamiana* varía también según en la cara

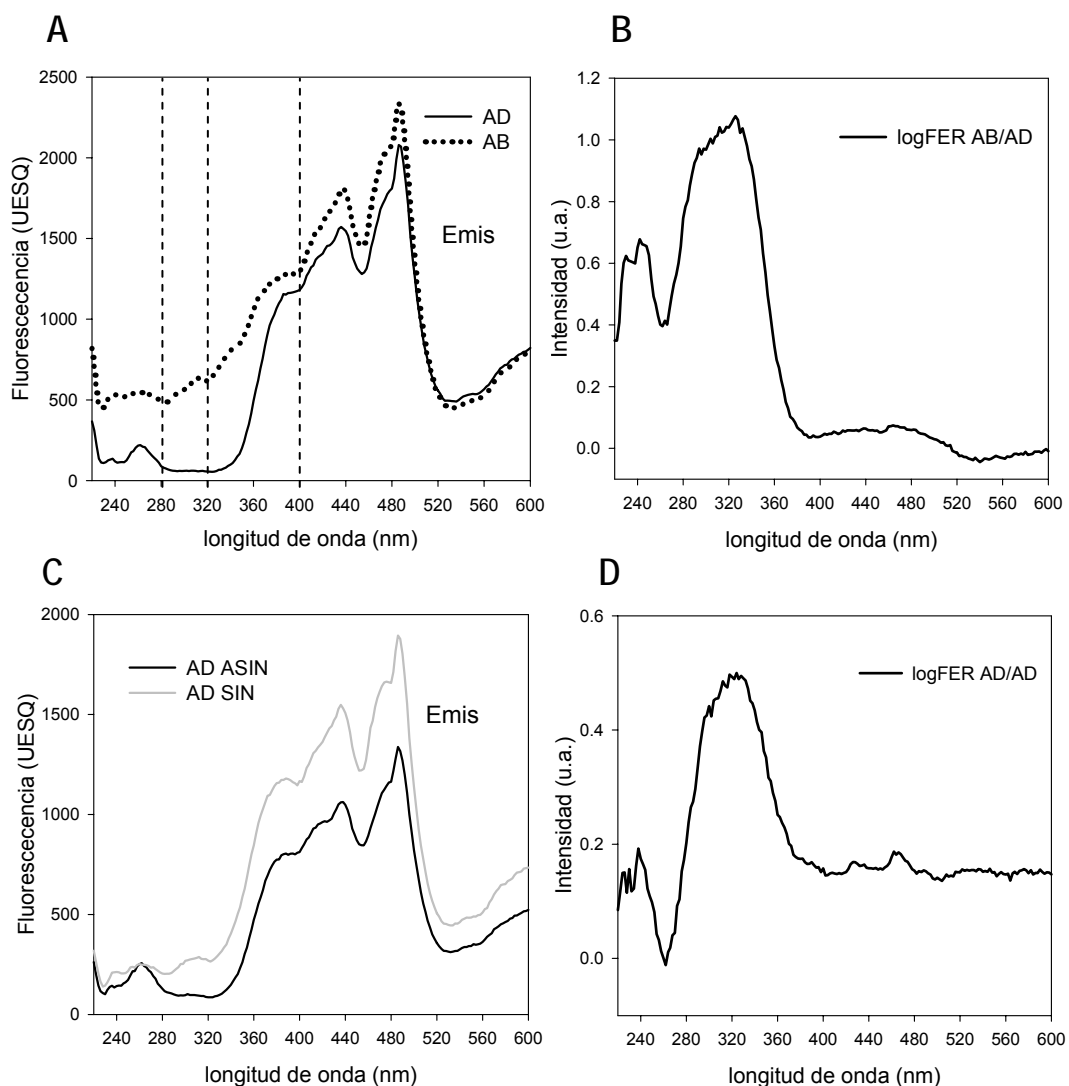


Fig 58: (A) Espectros de excitación de la cara AB y AD de una hoja joven sana de *N. benthamiana* y (B) el logFER AB/AD obtenido a partir de los mismos. (C) Espectros de excitación de la cara AD de una hoja joven (SIN) y una hoja madura (ASIN) sanas y (D) el logFER AD<sub>ASIN</sub>/AD<sub>SIN</sub> obtenido a partir de los mismos. La emisión se registra a 685nm.

que se mida, tal y como muestra la fig 58 (A) La intensidad del espectro de la cara adaxial es mucho

menor que la del correspondiente a la cara abaxial en la región del UV. En la fig 58 (B) se muestra el logFER AB/AD de los espectros de la fig 58 (A), que refleja las diferencias en absorbancia entre las dos caras de la hoja. Éste presenta un máximo en la región UV a 326 nm y un hombro a 290nm. Este perfil refleja la existencia de uno o varios compuestos que absorben en el UV que se acumulan en la cara expuesta a la luz o cara AD. La presencia de estos compuestos disminuye la capacidad de excitación de la hoja por la cara AD, por lo tanto, es la disminución del denominador lo que provoca el aumento del cociente (AB/AD) entre ambas caras de la hoja.

La región verde-azul de los espectros de excitación de la ChlF muestran como es la cara AB la que más eficientemente se excita, dada la mayor intensidad del espectro en dicha región fig 58 (A). Podemos observar también comparando los espectros de ambas caras, aunque de forma leve, como en la cara AD se da un incremento de la absorbancia en la región azul del espectro respecto de la verde, o dicho de forma inversa, una mayor eficiencia en la excitación de la ChlF en la región azul respecto de la verde en la cara AB. Los espectros de excitación registrados con una emisión a 685 nm, como es el caso, muestran además una caída muy marcada de la intensidad de la excitación por encima de los 500nm, en ambas caras de la hoja.

Al realizar el logFER de las caras adaxiales de dos hojas de una misma planta sana de edad diferente (el logFER ADasin/ADsin) (fig 58 C y D), vemos como el perfil obtenido es muy similar al que se obtiene con el logFER AB/AD (fig 58 B) de cualquier hoja sana. Podría pensarse que los mismos compuestos que se acumulan preferentemente en el haz de las causando espectros de excitación diferentes de los del envés, también lo hacen en una mayor proporción en el haz de las hojas maduras frente al de las más jóvenes.

A continuación, presentamos los resultados de los estudios de la BGF de planta sana e infectada por ambas cepas del PMMoV, fruto del análisis y comparación de distintas infecciones. Las medidas que aquí se muestran, tanto en hoja SIN como ASIN, pertenecen a una misma infección que consideramos "infección tipo", puesto que refleja la tendencia de todas las analizadas.

### 3.5.2 Estudio de la interacción de plantas de *N.benthamiana* y el PMMoV mediante BGF y análisis de compuestos que absorben en el UV

#### *Análisis en hoja ASIN de planta sana e infectada por PMMoV-S e-I*

Se midieron los espectros de excitación en hoja madura de planta control e infectada por PMMoV-S y PMMoV-I, tanto en la cara AD como en la AB, a 7 y 14 dpi, a partir de los cuales se obtuvieron los logFER de la fig 59, para su comparación.

En las fig 59 A y B se muestran los log FER ADc/ADi y log FER ABc/ABi, que comparan los espectros de excitación de una hoja ASIN de plantas infectadas con la correspondiente hoja control, en medidas realizadas a 7 y 14 dpi, respectivamente. En la fig 59 (A) con las medidas a 7 dpi, vemos cómo hay una mayor acumulación, comparado con el control, de compuestos que absorben en el UV únicamente en el caso de las hojas ASIN infectadas por el PMMoV-S y de forma más acentuada en la cara AD. A 14 dpi fig 59 (B), este fenómeno no es sólo más acusado, sino que se da con ambas cepas del virus, de nuevo principalmente en las caras AD y de forma menos acusada en las AB. Los perfiles del logFER de las caras AD muestran una transición entorno a los 280nm que se corresponde con un artefacto causado por un cambio que sufre el filtro empleado. Si obviamos este fenómeno, y el “ruido” que acompaña a toda medida, podemos advertir que los perfiles resultantes de las comparaciones de las caras AD muestran una meseta, una zona sin picos característicos (más evidente en la 59 (B), también denominado logFER plano.

Observando las fig 59 C y D que contienen los logFER AB/AD procedentes de las hojas sanas e infectadas anteriores, a 7 y 14 dpi respectivamente, se confirma lo anteriormente expuesto. El mayor contenido de sustancias que absorben en el UV en la hoja, inducido por el virus, es mucho más pronunciado en la cara AD que en la AB lo que provoca la mayor intensidad de los logFER AB/AD de las hojas infectadas respecto de la sana, tras la segunda semana de infección. La presencia de estos compuestos disminuye la capacidad de excitación de la hoja, por lo tanto, es la disminución del denominador lo que provoca el aumento del cociente AB/AD en la hoja infectada. A los 7 dpi, de

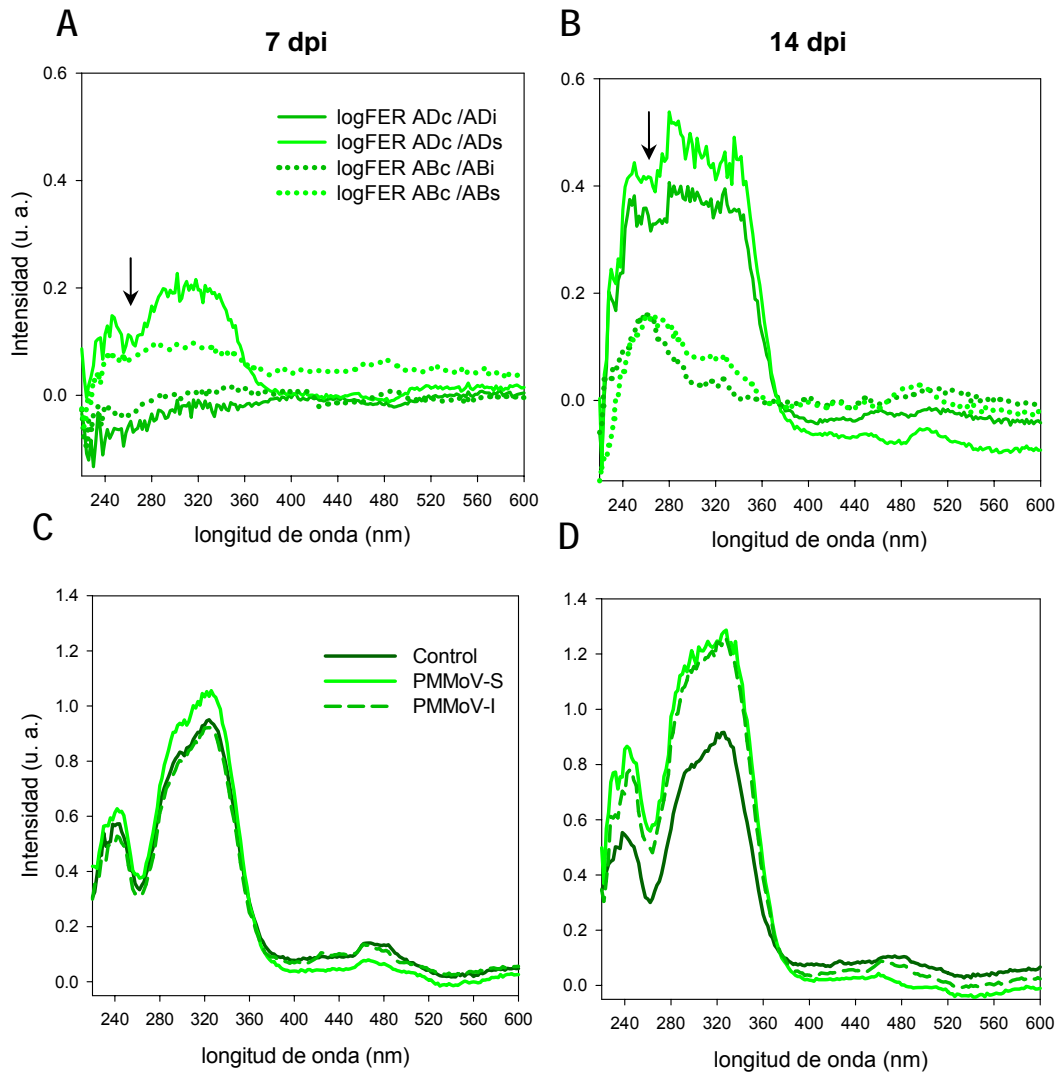


Fig 59: (A, B) Análisis de los logFER resultantes de la comparación de las caras AD y AB de hojas ASIN infectadas por PMMoV-S (subíndice "s") e -I(subíndice "i") con sus correspondientes controles de plantas de *N. benthamiana*, a 7 y 14 dpi. Las flechas indican el artefacto a 280 nm causado por el filtro empleado. (C, D) Log FER AB/AD de las mismas hojas a 7dpi y 14 dpi.

acuerdo con las 59 A y B, sólo aumenta un poco la intensidad del logFER AB/AD del PMMoV-S. Todos los perfiles obtenidos, además, son análogos en su forma y en sus picos máximos.

A 14 dpi, donde los efectos fueron claros en los espectros de excitación con ambas cepas del virus, se midieron los espectros de emisión, de nuevo en las dos caras de la hoja como muestra la fig 60. Es interesante observar que la BGF se incrementa en hojas infectadas y mayormente en la cara AB; a su vez, el efecto se acentúa más en hoja inoculada por el PMMoV-S (Fig 60 A y B, ver insertos). La emisión de fluorescencia en la región del rojo y rojo lejano en los espectros de emisión inducidos por luz UV de hojas infectadas, disminuye de forma general y significativa comparados al de la hoja sana. Estas diferencias no se pueden atribuir a diferencias en el contenido de Chl de las hojas (ver datos a pie de fig 60).

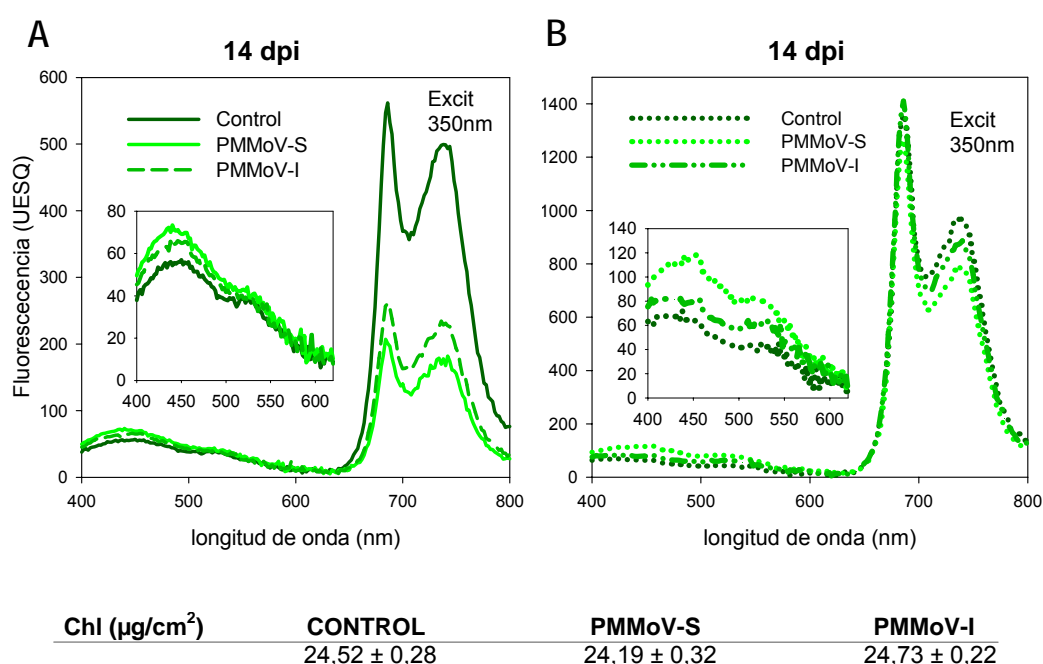


Fig 60: Espectros de emisión inducidos por luz UV de la cara AD(A) y AB (B) de hoja ASIN infectadas por PMMoV-S y PMMoV-I y sus correspondientes controles, de plantas de *N. benthamiana*, acompañados de los correspondientes contenidos de Chl

*Análisis en hoja SIN de planta sana e infectada por PMMoV-S e-I*

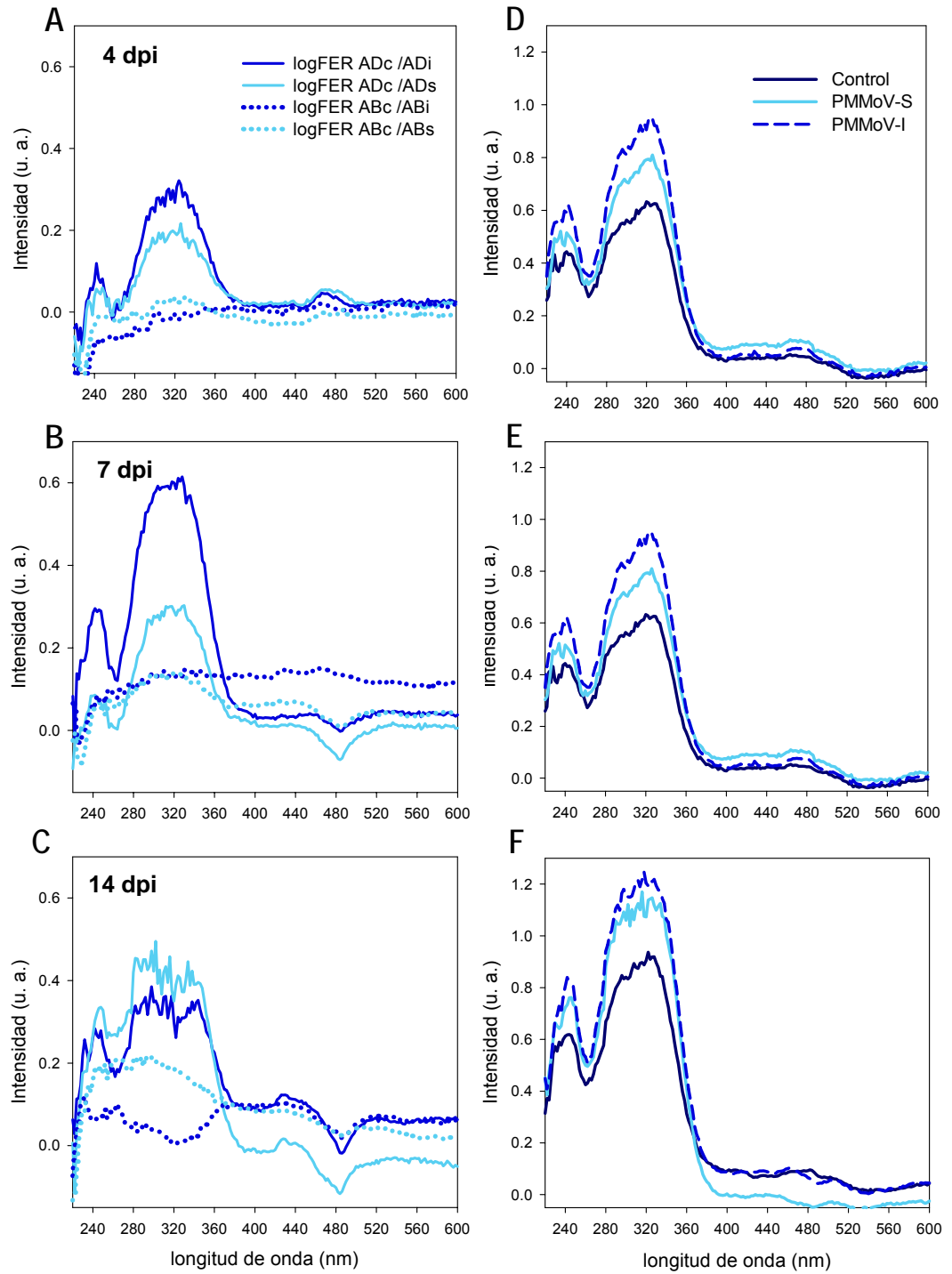
En el caso de las hojas SIN, las cuales se analizaron de forma análoga y en paralelo a las hojas ASIN, nos encontramos con que hubo diferencias significativas en los espectros de excitación incluso antes de los 7 dpi; por ello también se muestran medidas a 4 dpi. La fig 61 nos muestra los log FER de las caras AD de hoja control entre infectada, log FER ADc/ADi y los AB, log FER ABc/ABi, (fig 61 A, B y C), así como la comparación de logFER AB/AD de los controles con los de las hojas inoculadas por PMMoV-S e -I (fig 61 D, E y F), a 4, 7 y 14 dpi, respectivamente. En las fig 61 A, B y C, se observa que en las hojas SIN de plantas infectadas, al igual que en las ASIN, existe una mayor acumulación de compuestos que absorben en el UV respecto de los controles y siempre en mayor medida en la cara AD. En este caso, queremos destacar que este fenómeno se produce en la cara AD, al menos, desde los 4 dpi, cuando las hoja SIN no ha desarrollado aún los síntomas característicos (aptdo. 3.1.1. de Resultados). En esta infección, a 4 y 7 dpi, los perfiles de mayor intensidad son los que comparan la cara AD de la hoja afectada por la PMMoV-I con la del control (fig 61 A y B), si bien con PMMoV-S también hay un efecto claro. A 14 dpi (fig 61 C), el efecto de ambos virus está más igualado, aunque resulta mayor en la hoja infectada por PMMoV-S.

En lo que respecta a las caras AB de las hojas SIN infectadas, sólo a partir de los 7 dpi (fig 61 B) se puede apreciar una mínima acumulación de ese tipo de compuestos en hojas infectadas por ambos virus, que se incrementa a 14 dpi (fig 61 C), sólo durante la infección con PMMoV-S.

Los perfiles de los logFER AB/AD, procedentes de esta mismas hojas, representados en las figuras 61 A, B y C, nos permiten afirmar que, el/los compuestos que atrapan la luz UV que se están acumulando principalmente en la cara AD de las hojas SIN infectadas respecto de las sanas, /son los mismo que en el caso de las hojas ASIN (fig 59 C y D). Los cambios en estas gráficas, además, son proporcionales a las diferencias halladas en las figuras anteriormente comentadas. Es decir, en cada punto de la infección, el virus que causa mayores diferencias en los diversos logFER AB/AD, es el

*Fig 61: (A, B, C) Comparación de los logFER resultantes de la comparación de las caras AD y AB de hojas SIN infectadas por PMMoV-S (subíndice "s") e -I (subíndice "i") con sus correspondientes controles de plantas de N. benthamiana, a 4, 7 y 14 dpi. (D, E, F) Log FER AB/AD de las mismas hojas a 4, 7dpi y 14 dpi.*





mismo que provocó las mayores diferencias en los diversos espectros de las (fig 61 A, B y C). Destaca por lo tanto la intensidad del perfil de la hoja SIN infectada por PMMoV-I a 4 y 7 dpi (fig 61 D y E), igualándose ya posteriormente la de ambos virus a 14dpi (fig 61 F).

A 14 dpi, se midieron adicionalmente, al igual que en hojas ASIN, los espectros de emisión en la cara AD y AB, de hojas SIN control e infectadas.

Si miramos las figuras 62 A y B, encontramos una situación absolutamente análoga a la de las hojas ASIN: la BGF se ve incrementada en las hojas infectadas y de forma muy manifiesta en la cara AB de las mismas. Una vez más, es PMMoV-S el que produce mayores efectos en la BGF y éstos se acompañan de una disminución general de la emisión en la región del rojo y rojo lejano. Esta vez, además, se obtiene que la distancia entre el máximo de la FR y el de la FRF es mayor en el espectro procedente de hoja inoculada por PMMoV-S, tanto en el AD como en el AB, que en el que se

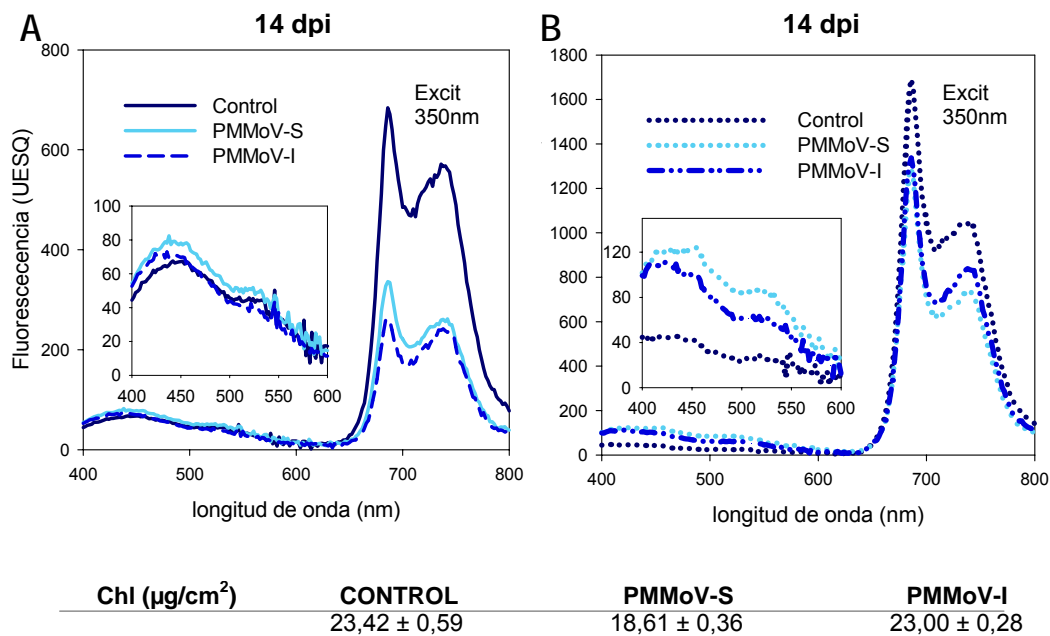


Fig 62: Espectros de emisión inducidos por luz UV de la cara AD y AB (6a, 6b) de hoja SIN de plantas de *N. benthamiana* infectadas por PMMoV-S y PMMoV-I y sus correspondientes controles, acompañados de los correspondientes contenidos de Chl

obtiene de la inoculada por PMMoV-I y del control. Comparando hoja sana e infectada por PMMoV, vemos que el contenido de Chl es menor sólo en el caso del –S. (ver datos a pie de fig 62).

Hay que añadir que si analizamos la diferencia entre los espectros de hoja infectada y hoja control (no se muestra), el incremento de BGF en la cara AB de las hojas SIN afectadas por el virus, es más del doble al hallado en las hojas maduras (ASIN) infectadas por ambas cepas del virus. En la cara AD, sin embargo, este incremento es similar en ambos tipos de hoja.

### 3.6 Análisis del proteoma cloroplastídico de *Nicotiana benthamiana*.

Los primeros trabajos de nuestro grupo en proteómica del cloroplasto de *N. benthamiana* se centraron en las proteínas OEC, que habíamos descrito previamente como punto de acción de la infección viral. Estas proteínas resultaban ser mayoritarias en geles 2D de muestras de membranas

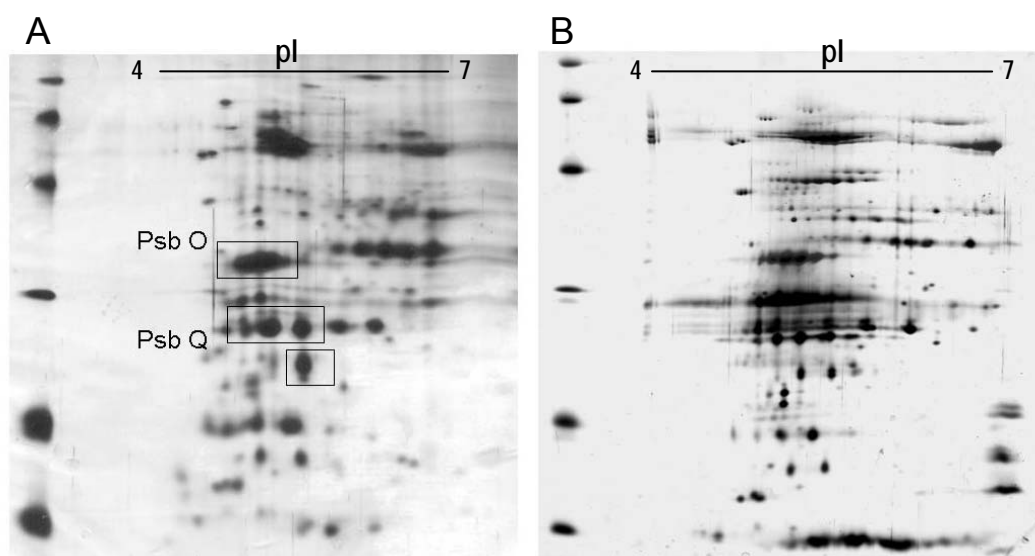


Fig 63: Geles 2D de muestras de MT tras IEF en gel de disco (A) y de CL tras IEF en tiras IPG (B) ambos con tinción de plata. En el gel A, se señalan las proteínas PsbO y PsbQ identificadas en trabajos anteriores.

tilacoidales (MT) según el protocolo de Ford y Evans (1983); además las proteínas PsbO y PsbQ se presentaban como familias proteicas con cuatro miembros cada una, presentando las proteínas PsbP identificadas un descenso diferencial de las distintas isoformas por la infección con PMMoV (Rahoutei y col. 1998; Rahoutei, 2000; Pérez-Bueno y col., 2004). En estos trabajos el protocolo seguido con las MT aisladas fue de extracción fenólica para la solubilización de la muestra, seguida de un IEF mediante electroforesis de disco y SDS-PAGE, para la segunda dimensión. Un gel tipo que realizamos según el protocolo anterior (Pérez-Bueno y col., 2004) se muestra en la (fig 63, A).

Para el presente trabajo se aislaron cloroplastos íntegros (CI) de plantas de *N.benthamiana*, por un método alternativo, descrito en el aptdo. 2.2.2 de M y M, que procesamos de igual forma que las MT para realizar geles 2D y comparar muestra sana e infectada por PMMoV-S e -I, a 14 dpi (no se muestra). A partir de CI, tras aplicarles un choque osmótico, obtuvimos además cloroplastos lisados (CL) (aptdo. 2.2.2. de M y M). En la fig 63 (B), presentamos un gel típico de muestra de CL, que se solubilizó con el mismo protocolo que la muestra del gel de la fig 1a, pero que se enfocó mediante

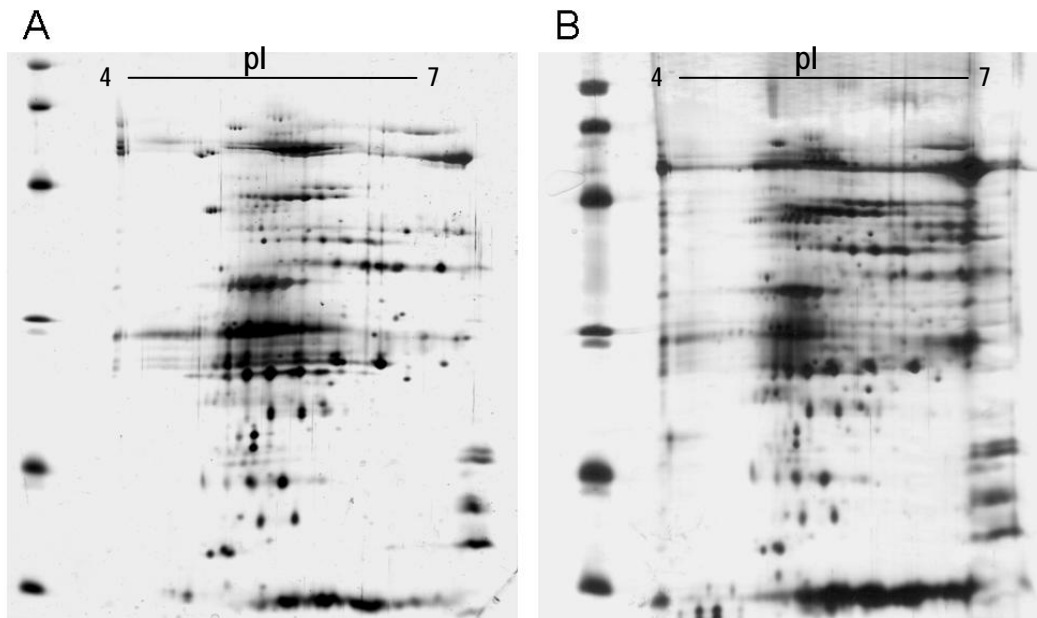


Fig 64: Geles 2D con tinción de plata tras IEF (tiras IPG)-SDS-PAGE de muestras de MT tratadas con Fenol (A) o Acetona-TCA (B).

tiras IPG. Si cotejamos las fig 63 (A) y fig 63 (B) resultado de procesar muestras similares (MT y CL), comprobamos que el uso de las tiras IPG mejora notablemente el proceso de IEF y la resolución posterior de los geles 2D. Mediante este último método, también comparamos muestras de CL de *N.benthamiana* sana e infectada por ambos tobamovirus, a14dpi.

Con objeto de intentar mejorar el proceso de extracción de proteínas de la muestra de cloroplasto, ensayamos distintos métodos de solubilización de la muestra. Los mejores resultados fueron obtenidos con los métodos de extracción por fenol o Acetona-TCA) (fig 64 A y B). No obstante, éste último genera unos geles con un fuerte *streaking* (rayado) horizontal y en sus flancos aparecen además gran cantidad de proteínas que no han sido enfocadas.

Los resultados que se muestran de aquí en adelante, proceden todos de muestra de cloroplastos

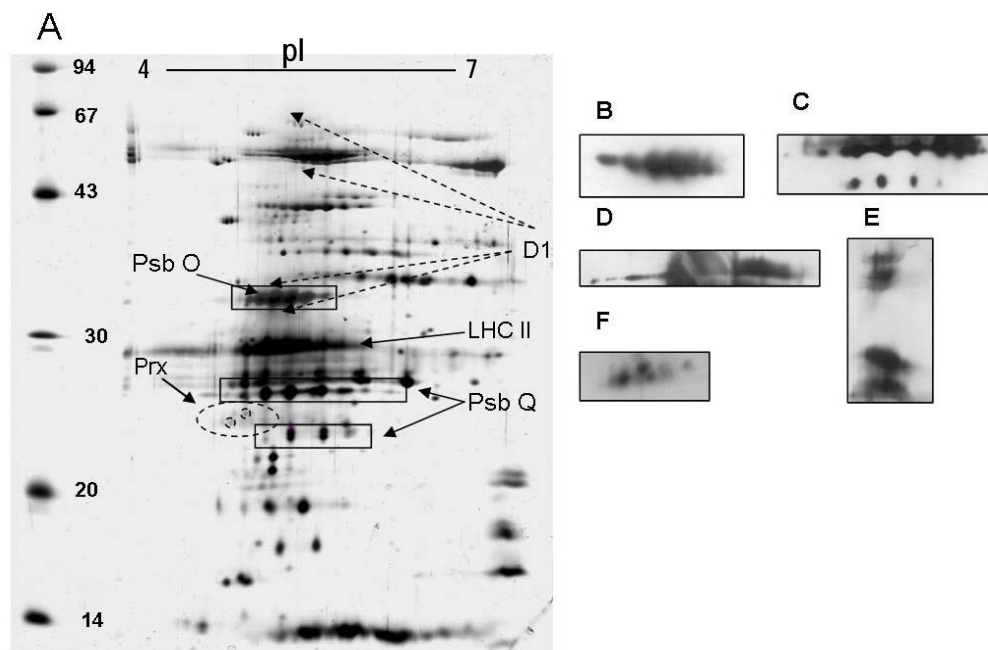


Fig 65: (A) Gel 2D con tinción de plata tras IEF (tiras IPG)-SDS-PAGE de muestras de CL donde se ubican las proteínas identificadas por WB.nmunodetección por quimioluminiscencia (kit ECL) con los Ac correspondientes de las proteínas PsbO (B), PsbP(C), LHC II (D), D1 (E) y la Prx (F).

procesados por el método de extracción con fenol.

*Estudio e identificación del patrón proteico de N. benthamiana mediante Western-blot*

La identificación de proteínas de interés en el proteoma cloroplástico de *N. benthamiana* se realizó en primer lugar mediante Western-blot e inmunodetección con los anticuerpos disponibles en nuestro laboratorio (aptdo. 2.3.4. de M y M). En la fig 65 se muestran los resultados obtenidos, frente a cada uno de los Ac (fig 65 B, C, D, E y F) y la ubicación en el gel de las proteínas identificadas (fig 65 A). Pudieron determinarse dentro del PSII las proteínas PsbO y PsbP del OEC, el LHC II o antena principal y la D1 del CR; también se detectó la peroxirredoxina (Prx), una peroxidasa estromática implicada en el estrés oxidativo.

El Ac frente a la proteína PsbO reacciona con 6 puntos contiguos (fig 65 B) en el gel de Pm aparente similar, entorno a los 35,4 kDa. En la familia proteica PsbP identificamos hasta 12 manchas (fig 65 C), con dos *trenes* de proteínas de distinto peso molecular: uno con 8 manchas de 26,2kDa y el segundo con 4 manchas de 23,2kDa de Pm aparente.

La proteína LHCII aparece en el gel 2D, como una gran mancha que detecta su correspondiente Ac (fig 65 D), ubicada inmediatamente encima del grupo de proteínas PsbP.

La D1, únicamente se visualiza mediante revelado del WB con ECL. Aparece siempre como una gran mancha ovalada y difusa (fig 65 E) en 4 regiones del gel (fig 65 A): dos inmediatamente por encima y por debajo de las proteínas PsbO y otras dos en la zona de alto Pm. Todas tienen similares pls.

Por último, se muestran las distintas manchas que dieron respuesta al Ac de la Prx cloroplástica (fig 65 F). Son numerosas y su visualización es bastante mejor en la película revelada que en el gel (ver fig 65 A y F). Cuatro de ellas destacan por su mayor definición en la señal de revelado, el resto son pequeñas manchas difusas. A su vez, las dos mayoritarias (señal más intensa) de estas cuatro mencionadas, son las únicas que se han localizado de forma precisa en el gel, donde también se delimitado el área correspondiente al conjunto de manchas que han respondido al Ac de la Prx (fig 65 A). Éste se sitúa entre los 26 y los 23kDa de Pm (aparente).

*Estudio e identificación del patrón proteico de N. benthamiana mediante MALDI-TOF*

A través del Servicio de Proteómica del CNIC (CSIC. Madrid) se llevó a cabo la identificación por MALDI-TOF (aptdo. 2.3.5 de M y M) de manchas proteicas de interés del proteoma cloroplastidico de *Nicotiana benthamiana* partiendo de geles 2D de muestras de cloroplastos aislados de plantas sanas. En la fig.66 A y B, y en la tabla 7 se muestran todas las proteínas identificadas por comparación con la base de datos de MASCOT.

De un total de al menos 150 manchas visualizadas en el gel en el rango de pl entre 4 y 7 y con Pm menores de 94kDa, 78 fueron seleccionadas para su análisis basándonos en su reproducibilidad y cantidad relativa procesable. De estas, a su vez, se han identificado de forma inequívoca 55, las cuales representan a 29 proteínas diferentes.

Un total de 21 manchas identificadas pertenecen a los distintos complejos fotosintéticos de la CTE, de las cuales 16 son proteínas del PSII. Como proteínas mayoritarias, encontramos la familia proteica PsbO del OEC con 6 miembros (1-6), y la Psb P con 10 puntos identificados (7-16), 4 de ellas de un Pm inferior a las restantes.

De las 5 proteínas restantes de la CTE, 3 pertenecen al complejo citocromo b<sub>6</sub>/ f, la plastoquinol-plastocianín reductasa, la Ferredoxin-NADP+-Reductasa (FNR) y el citocromo f (18, 19 y 20). Se sitúan muy próximas y presentan el mismo Pm aparente, 37,9kDa. Del PSI fueron identificadas una proteína putativa del CR y una proteína *cab* de su antena (31 y 32); ambas son muy minoritarias en el gel.

Otro de los macrocomplejos proteicos que forman parte de la membrana cloroplastidica es la ATP-sintetasa. De éste hemos identificado 10 proteínas (21-30) que se corresponden con sus 5 subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ) que componen el centro catalítico (CF1) de la ATP-asa, que está formado por 3 subunidades  $\alpha$ , 3  $\beta$ , 1  $\gamma$ , 1  $\delta$  y 1  $\epsilon$ . Las subunidades  $\alpha$  (22-24) y  $\beta$  (25-27), son las de más alto Pm aparente, 59kDa y muy abundantes en el gel. La subunidad  $\gamma$  (21) es minoritaria en el gel y presenta un Pm aparente entorno a los 43 kDa, la  $\delta$  (28) es de más bajo Pm (aprox 20kDa) y  $\epsilon$ , la menor, se halló en 2 manchas diferentes (29 y 30) y bien separadas de igual Pm y distinto pl. Los pl de todas las subunidades son muy dispares (fig 66 y tabla 7)

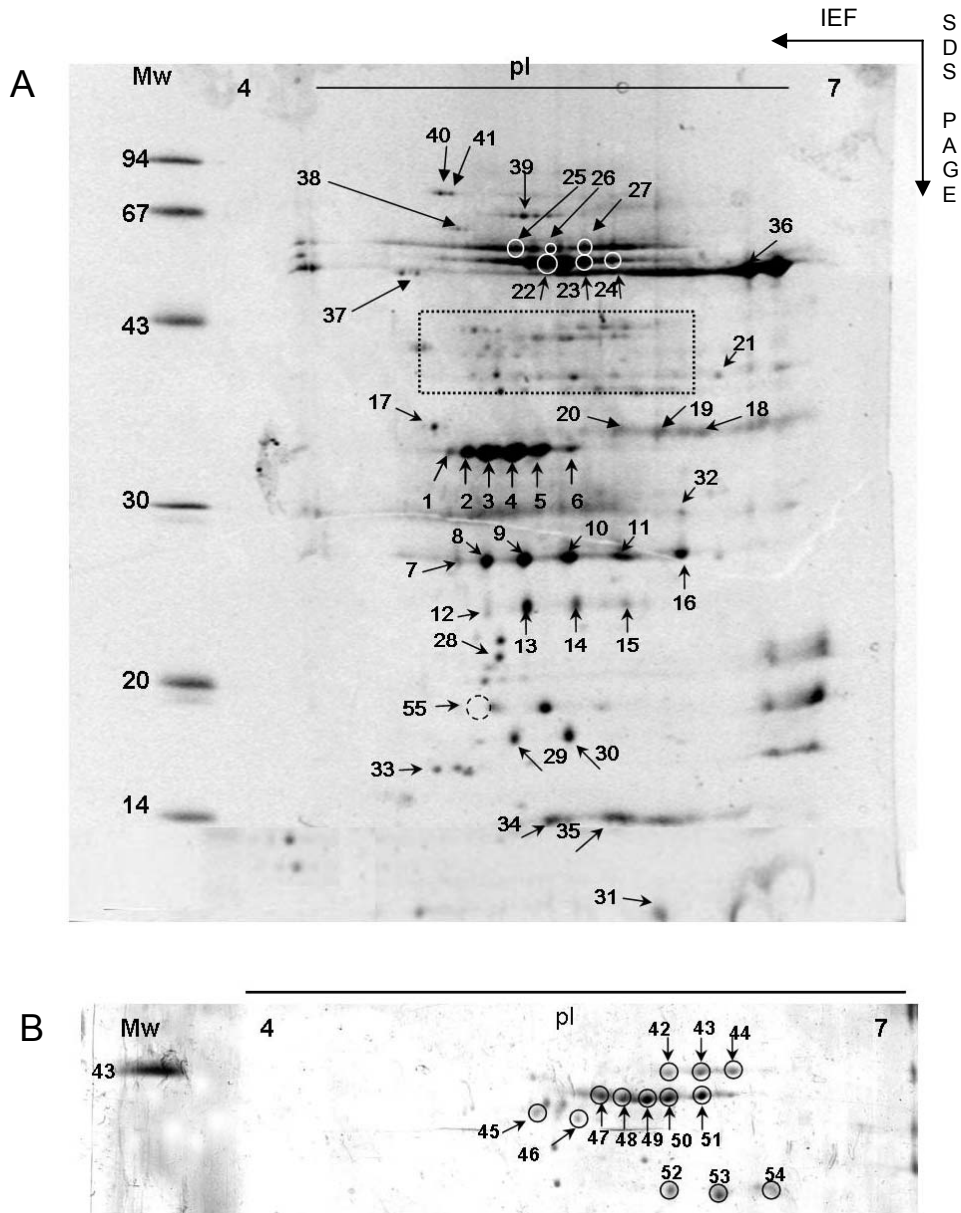


Fig 66: (A) Gel 2D con tinción SYPRO Rubí tras IEF (tiras IPG)-SDS-PAGE de muestras de CL donde se señalan y numeran las proteínas identificadas por MALDI-TOF, descritas en la Tabla 2.(B) Detalle de la zona del gel A que se recuadra con línea de puntos, se corresponde con un gel análogo al de la foto A, cuyas proteínas se detectaron con tinción de plata



Tabla 7

Mancha	Homología	Origen	Nº acceso	Pm aparente	pl./Pm teorico	Mascot	Pept emparej	Cober. %
1	psbO 33 kDa OEC	*	gi 30013657	35,4	5,3 / 35	152	10	26
2	psbO 33 kDa OEC	*	gi 30013657	35,4	5,3 / 35	85	5	20
3	psbO 33 kDa OEC	*	gi 30013657	35,4	5,3 / 35	124	7	27
4	psbO 33 kDa OEC	*	gi 30013657	35,4	5,3 / 35	96	6	33
5	psbO 33 kDa OEC	*	gi 30013657	35,4	5,3 / 35	182	11	42
6	psbO 33 kDa OEC	*	gi 30013657	35,4	5,3 / 35	189	10	37
7	psbP 24 kDa OEC	*	gi 19911	26,2	7,5 / 29	125	6	33
8	psbP 24 kDa OEC	*	gi 19911	26,2	7,5 / 29	108	7	39
9	psbP 24 kDa OEC	*	gi 49259455	26,2	5,1 / 19	105	5	37
10	psbP 24 kDa OEC	*	gi 49259455	26,2	5,1 / 19	105	5	37
11	psbP 24 kDa OEC	*	gi 49259455	26,2	5,1 / 19	106	5	37
12	psbP 24 kDa OEC	*	gi 1345550	23,2	7,5 / 29	96	5	26
13	psbP 24 kDa OEC	*	gi 1345550	23,2	7,5 / 29	121	6	29
14	psbP 24 kDa OEC	*	gi 1345550	23,2	7,5 / 29	113	6	33
15	psbP 24 kDa OEC	*	gi 1345550	23,2	7,5 / 29	80	4	25
16	psbP 24 kDa OEC	*	gi 49259455	26,2	5,1 / 19	197	4	37
17	Prot asociada a lípidos plastidicos	*	gi 2632088	37,9	4,6 / 29	122	7	25
18	Plastoquinol-plastocianin reductasa, precursor cit f	*	gi 65614	37,9	8,2 / 35	163	9	42
19	Cadena b, ferredoxin NADP+ reductasa (FNR)	<i>Capsicum annuum</i>	gi 47169164	37,9	ND / 34	171	7	ND
20	Citocromo f	*	gi 11465970	37,9	8,2 / 35	92	6	18

Mancha	Homología	Origen	Nº acceso	Pm aparente	pl./Pm teorico	Mascot	Pept emparej	Cober. %
21	ATP sintasa, subunidad gamma	*	gi 19785	43,8	7,6 / 42	109	7	17
22	ATP sintasa, subunidad beta	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	gi 114556	59,0	4,9 / 54	196	13	37
23	ATP sintasa, subunidad beta	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	gi 114556	59,0	4,9 / 54	230	16	42
24	ATP sintasa, subunidad beta	<i>Nuphar variegata</i>	gi 14718153	59,0	4,7 / 51	108	6	16
25	ATP sintasa, subunidad alfa	*	gi 55977763	59,0	4,9 / 55	240	15	31
26	ATP sintasa, subunidad alfa	*	gi 55977763	59,0	4,9 / 55	269	16	35
27	ATP sintasa, subunidad alfa	<i>Atropa belladonna</i>	gi 28261702	59,0	5 / 55	183	11	23
28	ATP sintasa, subunidad delta	*	gi 19787	20,1	8,1 / 27	85	6	24
29	ATP sintasa, subunidad epsilon,	<i>Atropa belladonna</i>	gi 28261723	16,1	5 / 15	114	5	43
30	ATP sintasa, subunidad epsilon.	*	gi 11465963	16,2	5 / 15	117	6	51
31	Prot putativa del CR del PSI	<i>Solanum tuberosum</i>	gi 34787119	11,1	6,9 / 9	145	6	71
32	Chlorophyll a/b binding, tipo III, PSI	<i>Lycopersicon esculentum</i>	gi 19182	30,1	ND / 29	67	ND	ND
33	Precursor de la prot del lumen 16.5 kDa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 7388292	14,8	ND / 26	80	ND	ND
34	Subunidad menor de la Rubisco	<i>Flaveria ramosissima</i>	gi 13241101	12,9	ND / 16	98	4	ND
35	Subunidad menor de la Rubisco	<i>Chrysanthemu m x morifolium</i>	gi 28139169	12,9	ND / 21	116	5	ND
36	Subunidad mayor de la Rubisco	<i>Nolana albescens</i>	gi 11182397	58,5	6,5 / 52	87	6	16
37	Prot hipotética	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 7267602	57,7	ND / 49	62	ND	9
38	Sub. Alfa, chaperonina 60, (CPN-60 alpha)/ prot unión Rubisco	<i>Brassica napus</i>	gi 1351030	66,7	4,6 / 58	123	7	ND
39	FtsH like-prot	*	gi 4325041	69,3	6 / 75	101	7	18

Mancha	Homología	Origen	Nº acceso	Pm aparente	pl /Pm teorico	Mascot	Pept emparej	Cober. %
40	Hsp 70	<i>Pisum sativum</i>	gij445605	73,1	ND / 76	108	5	14
41	Hsp 70	<i>Pisum sativum</i>	gij445605	72,5	ND / 76	106	4	ND
42	Glutamina sintetasa GS58	<i>Nicotiana attenuata</i>	gij40457328	49,9	6,8 / 48	94	6	ND
43	Glutamina sintetasa GS58	<i>Nicotiana attenuata</i>	gij40457328	49,9	6,8 / 48	92	6	16
44	Glutamina sintetasa GS58	<i>Nicotiana attenuata</i>	gij40457328	49,9	6,8 / 48	125	8	22
45	Seudoheptulosa,1,7 bifosfatasa,precursora del cloroplasto	<i>Spinacia oleracea</i>	gij3914940	47,3	ND / 43	80	ND	ND
46	Fosforibulo quinasa	<i>Spinacia oleracea</i>	gij21279	45,5	5,8 / 45	89	6	15
47	Rubisco activasa	*	gij19990	48,7	7,6 / 49	176	13	29
48	Rubisco activasa	*	gij19990	48,7	7,6 / 49	119	10	25
49	Rubisco activasa	*	gij445628	48,7	5,5 / 43	206	8	22
	Fosfoglicerato quinasa	*	gij1161600	48,7	8,5 / 50		8	20
50	Rubisco activasa	*	gij445628	48,7	5,5 / 43	205	7	ND
	Fosfoglicerato quinasa	*	gij1161600	48,7	8,5 / 50		8	ND
51	Fosfoglicerato quinasa	*	gij1161600	48,7	7,8 / 50	104	7	21
52	Aldolasa plastídica NPALDP1	<i>Nicotiana paniculata</i>	gij4827251	41,2	7 / 43	94	6	16
53	Aldolasa plastídica NPALDP1	<i>Nicotiana paniculata</i>	gij4827251	41,2	7 / 43	90	6	16
54	Aldolasa plastídica NPALDP1	<i>Nicotiana paniculata</i>	gij4827251	41,2	7 / 43	99	5	15
55	Prot de cubierta (CP)	<i>ToMV(tobamovirus)</i>	gij10719965	17,6	ND / 17	159	9	ND

Tabla 7: Proteínas identificadas por MALDI-TOF a partir de geles 2D IEF-SDS-PAGE. La columna señalada como MASCOT indica la puntuación (score), que es  $10^4 \text{Log}(P)$ , donde  $P$  es la probabilidad de que el suceso observado sea aleatorio. Puntuaciones  $>65$  son significativas ( $p < 0.05$ )

De las proteínas estromáticas identificadas, la Rubisco se encuentra en una proporción mucho mayor a las restantes. La subunidad mayor (Rbcl) (36), estaba ubicada en el extremo más básico del gel (pI 7), mientras que la subunidad menor, aparecía como dos manchas (34 y 35) de igual Pm aparente 12,9kDa y pI diferente (ver tabla 7)

En la región central del gel, a la altura del marcador de Pm de 43 kDa, se sitúan numerosas manchas, y todas las identificadas resultaron ser proteínas estromáticas que participan en distintas rutas metabólicas (ver fig 66 B). Tres puntos proteicos se corresponden con la glutamina sintetasa (42-44), enzima del metabolismo del nitrógeno. En un rango menor de Pm se sitúan 4 proteínas de la Rubisco activasa (Rca) (47-50) y 3 de la fosfoglicerato quinasa (PGK) (49-51). En las manchas señaladas como 49 y 50 se detectaron ambas proteínas. Ambas enzimas, están relacionadas con el Ciclo de Benson-Calvin, la primera modulando a la Rubisco y la segunda fosforilando al 3-fosfoglicerato.

Otras tres proteínas implicadas en esta misma ruta son la fosforibulo-quinasa (PRK) (46) y pseudoheptulosa, 1,7 bifosfatasa (SBPasa) (45) identificadas en sendas manchas, las menos intensas y de pI más ácido de este grupo que estamos describiendo. La PRK fosforila a la ribulosa 5 fosfato, mientras que la SBPasa, cataliza la reacción de defosforilación de la pseudoheptulosa 1,7 bifosfato. En un rango más básico y de menor Pm, encontramos también en esta zona la aldolasa pseudoheptulosa /fructosa bifosfato plastídica (SFBA) (52-54); este enzima es capaz de condensar a la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) con el gliceraldehído 3 fosfato (G3P) dando lugar a la fructosa 1,6 bifosfato o con la eritrosa 4 fosfato, en cuyo caso se obtiene pseudoheptulosa 1,7 bifosfato. Se conocen dos genes que dan lugar dos isoformas diferentes de este mismo enzima y nuestros resultados coincidieron solamente con uno de ellos, concretamente con el denominado gen NPALDP1, de *N. paniculata*.

En la zona del marcador de Pm de 67kDa identificamos 4 manchas adicionales, de las cuales 3 son chaperonas -CPN-60 alpha, relacionada con la Rubisco (38) y las otras dos son la proteína *heat shock 70* (Hsp 70) (40-41)- y la cuarta mancha equivale a la FtsH (39) implicada en el recambio de la D1, cuando el PSII sufre daños irreversibles, y en la reacción hipersensible (HR) en interacciones huésped-patógeno incompatibles.

Finalmente encontramos tres proteínas más, pero de función desconocida, la proteína hipotética (37) y la proteína de 16.5 kDa del lumen (33). Ambas se encuentran en la porción ácido del gel. La tercera es la proteína plastídica asociada a lípidos (17), que forma parte de los plastoglóbulos del cloroplasto.

### 3.6.1 Expresión diferencial de proteínas en cloroplastos de planta sana e infectada por PMMoV

La aproximación al proteoma cloroplastídico mediante estas técnicas permite estudiar su modulación por distintas condiciones ambientales. En nuestro caso es de especial interés analizar el efecto de la infección por *tobamovirus* en el proteoma cloroplastídico de un hospedador habitual de distintas familias virales como es *Nicotiana benthamiana*.

Así hemos llevado a cabo un estudio comparativo del patrón proteico de geles 2D de cloroplastos aislados de plantas sanas e infectadas con PMMoV-S y PMMoV-I, a 14 dpi en diferentes infecciones. Se compararon las diferencias en muestra de CI y de CL procedentes de plantas sanas e infectadas, aquellas que fueron observadas en ambos casos son las que presentamos en la fig 67. Aquí se presentan las zonas de los geles 2D donde aparecen proteínas que disminuyen sus niveles por la infección viral, con respecto a los que presentan en plantas control. Estos mismos datos se resumen en la Tabla 8.

Hemos encontrado muchas proteínas afectadas en la franja de Pm del marcador de 43 kDa que se mostró en detalle en la fig. 66 Si comparamos en la fig 67 A esta zona del gel en muestras controles e infectadas, vemos cómo las proteínas ya identificadas como 42-54 (ver tabla 2 y Fig 4) disminuyen sus niveles de forma muy notoria por la infección con PMMoV-S y , en menor grado, por la acción de PMMoV-I. Todas estas manchas, un total de 13, se correspondían con 6 proteínas estromáticas: Rca, PGK, PRK, SBPasa y SFBA implicadas en el Ciclo de Calvin, así como la glutamina sintetasa, del metabolismo nitrogenado. Otra proteína esencial del ciclo de Calvin, la Rubisco, también disminuye sus niveles durante la patogénesis; lo que es evidente en la (fig 67 B) para la RbcS con 2 manchas proteicas próximas, en la infección por ambos virus y en la fig 67 C para la RbcL en la infección por PMMoV-S.

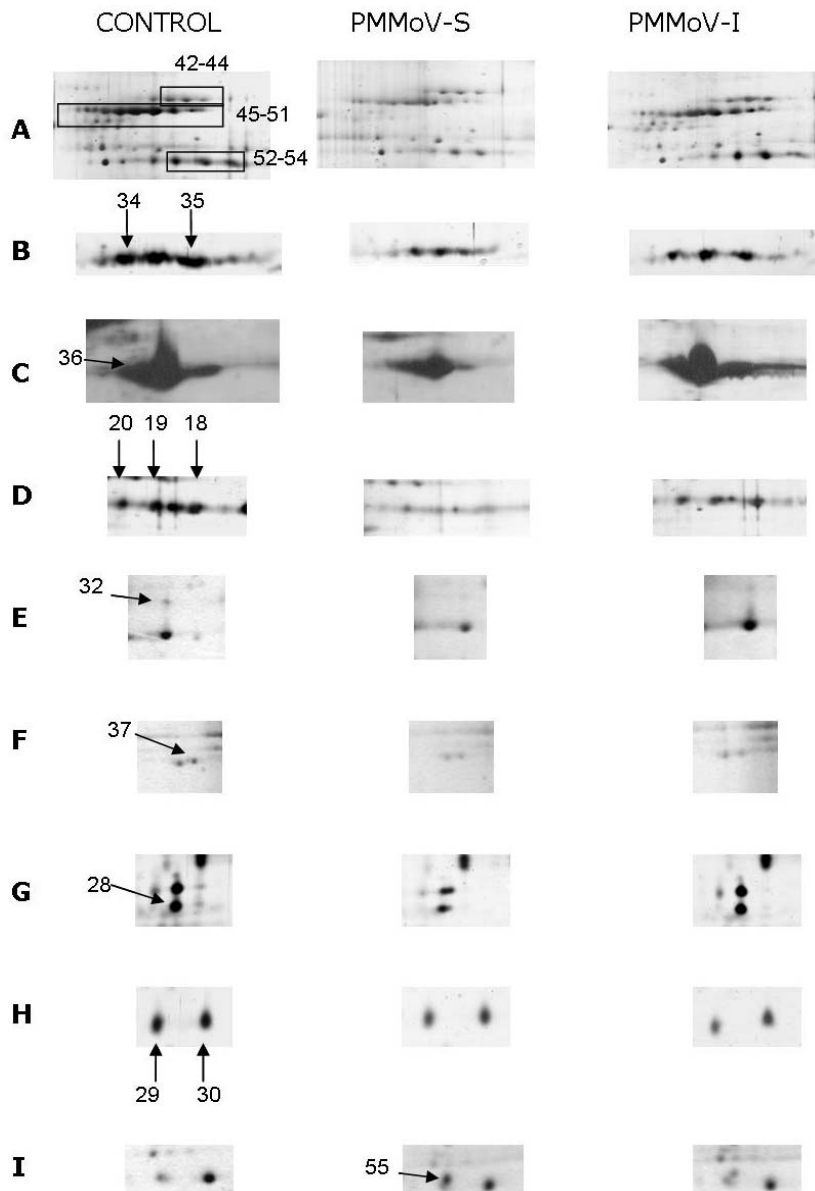


Fig 67: Cambio en los niveles de proteínas cloroplásticas detectados en los geles 2D de muestras de cloroplastos aislados de plantas infectadas por PMMoV-S e-I con respecto a los detectados en cloroplastos de plantas control. La numeración de las proteínas coincide con las de la Tabla 7 y 8 y la figura 66.

Tabla 8

Fig	Mancha Nº	Homología	PMMoV-S	PMMoV-I
5A	42, 43, 44	Glutamina sintetasa GS58	↓	↓
	45	Seudoheptulosa,1,7 bifosfatasa, precursora del cloroplasto	↓	↓
	46	Fosforibulo quinasa	↓	↓
	47, 48, 49, 50	Rubisco activasa	↓	↓
	49, 50, 51	Fosfoglicerato quinasa	↓	↓
	52, 53, 54	Aldolasa plástica NPALDP1	↓	↓
	5B	34, 35	Subunidad menor de la Rubisco	↓
5C	36	Subunidad mayor de la Rubisco	↓*	N D
5D	20	Citocromo f	↓	↓
	19	Cadena b, (ferredoxin-nadp+ reductase) FNR	↓	↓
	18	Plastoquinol-plastocianin reductasa, precursor cit f	↓	↓
5E	32	Chlorophyll a/b binding, tipo III, PSI	↓	↓
5F	37	Prot hipotética	↓	↓
5G	28	ATP sintasa, subunidad delta	↓	N D
5H	29	ATP sintasa, subunidad epsilon	↓	↓
	30	ATP sintasa, subunidad epsilon	↓	↓
5I	55	Prot de cubierta (CP)	I V	N D

*Tabla 8: Diferencias en la expresión de ciertas proteínas que han sido identificadas por MALDI-TOF a partir de geles 2D IEF-SDS-PAGE (recogidas también en la tabla 7), entre geles de muestra de cloroplastos de planta infectada por PMMoV-S e- I con los de muestra control.*

También hemos comprobado el descenso por la infección con ambos virus, de las 3 proteínas relacionadas con el complejo cit b6/f, la FNR, el citocromo f y la plastoquinol-plastocianín

reductasa (fig 67 D), así como la proteína perteneciente a la antena del PSI (fig 67 E) y la proteína hipotética, de función desconocida (fig 67 F).

De las distintas subunidades de la ATPsintetasa que hemos identificado, dos ellas podemos afirmar que disminuyen claramente, la subunidad  $\delta$  en el caso de la cepa española del virus y las dos manchas que se corresponden con la  $\epsilon$  con ambos tobamovirus (fig 67 G y H)

Hay un único caso de aparición de proteína en muestra infectada, que haya sido identificada, y es la proteína de cubierta del virus. Sólo se detectó, mediante MALDI-TOF, en geles de cloroplastos de planta inoculada con PMMoV-S (fig 67 I).



## 4 Discusión

## CONTENIDO PIGMENTARIO y ESTRÉS BIÓTICO

### *Pigmentos y Virus*

En los dos sistemas huésped-patógeno compatibles utilizados hemos estudiado los cambios en el contenido pigmentario de la planta en condiciones de estrés biótico. Éste, como cabría esperar, provoca un descenso general de Chls y Car desde fases tempranas de la infección y acorde con la aparición y desarrollo de los síntomas. Los cocientes Chla /b y Car/Chls no obstante sólo varían cuando la infección está bastante avanzada y de forma más significativa con la cepa más virulenta (PMMoV-S). De acuerdo con esto último, los cambios en los contenidos relativos de los diferentes pigmentos separados por HPLC en las mismas muestras, también indican que la composición pigmentaria de los fotosistemas parece no sufrir grandes alteraciones hasta las fases tardías de la infección. Por lo tanto, un descenso en los niveles de pigmentos de forma general, puede estar indicando que a lo largo de la infección el número de unidades de fotosistemas disminuye y/o que esté disminuyendo el tamaño de los mismos. A 28dpi cuando los efectos de la infección son drásticos, los porcentajes del  $\beta$ -car bajan radicalmente y en menor extensión los de neo, mientras el pool de VAZ no se ve tan alterado respecto del control; características propias también hojas senescentes (Lu y col. 2001). La diferencia, sin embargo, la hallamos en la relación Chla/b que con el virus desciende y en senescencia se ha descrito que aumenta (Lu y col.2001; Dong Yoo y col. 2003). Se ha apuntado que el efecto del virus sobre los niveles de pigmentos a lo largo de la infección es indirecto: el descenso en la síntesis de proteínas del tilacoide con las que ha de ensamblarse, induce que los pigmentos sobrantes sean degradados (Lehto y col. 2003). En nuestro grupo se ha demostrado cómo la infección inhibe a nivel transcripcional la síntesis de diversas proteínas del PSII (Pérez-Bueno, 2003; Pérez-Bueno y col. 2004), lo que favorecería la caída en el contenido pigmentario.

Aunque los cambios son discretos en estadios tempranos, cabe destacar el incremento del contenido relativo del pool VAZ, inducido por TMV -en el caso de tabaco- a 7 y 14 dpi y de PMMoV - en el caso de *N. benthamiana*- a 7 dpi, tras el cual, en este segundo caso, la tendencia se invierte y pasa a ser menor que en su control sano. El papel de los Car en el estrés biótico presenta cierta controversia dado que hay índices acerca del incremento de Car en diferentes interacciones planta-

hongo y más concretamente del ciclo de las xantofilas (Fleischmann y col. 2004), así como de la ausencia de cualquier afectación de este tipo de pigmentos por la presencia del patógeno o incluso de alguno que provoca su descenso (Baranski y col. 2005 y referencias incluidas). El incremento de Car en la planta aporta beneficios claros a su defensa, entre otros, por su papel antioxidante. No obstante esta cuestión necesitaría de trabajos adicionales que permitan saber si en los cambios de los niveles de Car subyace un mecanismo general o dependen de la patogenicidad del agente infeccioso, del propio tipo de patógeno (virus, hongos, parásitos) etc.

*Análisis del papel del pool VAZ mediante el mutante crtZ de tabaco infectado bajo diferentes regímenes lumínicos*

El estudio de la interacción N.tabacum-TMV nos ha permitido además analizar el efecto que diferentes intensidades lumínicas puedan tener sobre la misma. La interacción de dos o más factores de estrés en la planta, que por otro lado es una situación habitual en la naturaleza, puede modificar los efectos del virus sobre el proceso fotosintético, siendo lo más habitual que la vitalidad de la planta se vea aún más afectada (Lichtenthaler, 1996; Balachandran y Osmond, 1994; Osmond y col. 1990). Asimismo, se ha visto que las plantas infectadas pueden ver agravados sus síntomas tanto en condiciones de baja (Funayama y col., 2001) como alta iluminación (Osmond, 1990). En nuestros experimentos las plantas de tabaco WT cultivadas a bajas, moderadas y altas intensidades mostraron la misma sintomatología, si bien en líneas generales la combinación de la luz en exceso o por defecto con el virus, como cabría esperar, disminuyó aun más el contenido de pigmentos en la hoja. La línea crtZ infectada, sin embargo, con AIL no presentó síntomas a 7 dpi y los de 14dpi fueron más leves que los de la línea WT, si bien más tarde se igualó con las mismas. A 7dpi este fenómeno estuvo acompañado por un incremento tanto de las Chls como de los Car totales y un pool de VAZ que prácticamente era igual al de su control sano. Aunque el contenido de pigmentos totales se vio también fuertemente inducido en las plantas equivalentes cultivadas a BIL, la sintomatología fue en este caso la misma que el de las plantas WT infectadas y su pool de VAZ descendió frente al de la correspondiente planta crtZ sana. No parece muy probable que las características de la línea mutante inhiban cualquiera de las actividades del virus, si bien si podría ocurrir que ésta, temporalmente, contrarreste una de sus efectos-directo o indirecto-, el estrés oxidativo; un incremento de los Car

totales junto a un alto pool de VAZ, inducidos por la AIL, es capaz de preservar en mejores condiciones la membrana del tilacoide frente a dicho estrés. (Havaux y Niyogi, 1999). Un estrés que provocarían la propia AIL y el virus. Asumimos que con mayores cantidades de Viol de partida, la Zea transformada con AIL también sería mayor. Asimismo el  $\beta$ -car, por su parte, es capaz de amortiguar al oxígeno singlete (Krieger-Liszkay, 2004). Todo ello podría estar contribuyendo al retardo de la aparición de los síntomas.

Los mutantes *chyB* de Arabidopsis, que también sobreexpresan la  $\beta$ -carotínhidroxilasa (Davison y col. 2002), presentaron incrementos de más del 50% en los contenidos relativos de los pigmentos del ciclo de las xantofilas (Viol y Antera), respecto de su línea control, con MIL y BIL y la Zea hallada bajo AIL también fue del doble. Nuestras plantas sanas *crtZ* cultivadas con AIL no sufrieron cambios respecto al pool VAZ de su línea control o WT y a BIL hubo un incremento del mismo en un 13%. Sin duda la eficiencia del mutante *crtZ* es muy baja y tal vez por ello las diferencias frente a la línea WT fueron pasajeras y no fueron contundentes como en el caso de los mutantes *chyB* de Arabidopsis. Estos presentaron mayor crecimiento y menor índice de necrosis y peroxidación lipídica tras la AIL y las altas temperaturas. Asimismo hay que tener en cuenta que la transformación de tabaco con un gen heterólogo (de *Erwinia eurodovora*) podría tener ciertas desventajas sobre la de Arabidopsis que se hizo mediante el gen homólogo.

Los resultados de todos los experimentos realizados con la línea *crtZ*, mostraron que no posee ventajas notables frente al WT. A pesar de ello, es interesante el incremento que tiene lugar en el contenido total de pigmentos únicamente ante la combinación de ambos factores de estrés (AIL y virus). Este fenómeno podría guardar relación con los trabajos que demuestran que la luz es el factor predominante que controla el crecimiento, desarrollo y respuesta a estrés de la planta. Se ha podido vincular, incluso, directamente la respuesta de defensa de la planta a infección por patógeno con su sistema o red sensor de la luz (fotorreceptores). (Karpinski y col. 2003 y referencias incluidas).

Estudios a nivel transcripcional, por ejemplo, podrían ayudar a clarificar la posibilidad de una relación directa entre ambos factores de estrés y el incremento en los niveles de pigmentos.

Análisis del NPQ mediante FI en la interacción *N.tabacum*-TMV bajo distintos regímenes lumínicos; análisis del efecto de la sobreexpresión de la  $\beta$ -carotínhidroxilasa en la planta estresada.

Existen evidencias de que la línea crtZ presenta ventajas sobre todo para protegerse frente a la radiación UV, a corto y a largo plazo, gracias a su capacidad para incrementar el pool del ciclo de las xantofilas, en comparación con la línea de tabaco WT (Götz y col. 2002). Bajo la combinación de los dos factores de estrés, radiación UV y AIL, una vez más la línea crtZ presentó una mayor proporción de los pigmentos del ciclo de las xantofilas, dando resultados positivos a corto plazo.

Nuestros experimentos realizados con la combinación de dos factores de estrés, plantas de tabaco WT y crtZ infectadas por TMV y sometidas a AIL, fueron los únicos que permitieron evidenciar diferencias a nivel de síntomas, entre ambas líneas de tabaco crt Z y la WT. A esto le acompañó, como se ha discutido anteriormente, cambios significativos en el contenido de pigmentos a 7dpi. Todo ello no parece repercutir en la actividad fotosintética de la planta, dado que los datos obtenidos a partir de FI, NPQ y  $\Phi$ PSII, de hoja SIN de tabaco mutante y WT no revelaron diferencia alguna. Por otro lado a 14dpi, sí se observó que la aplicación de un sólo factor de estrés (AIL ó virus) inducía una subida de los valores de NPQ, mientras que la combinación de ambos llegó a provocar, sorprendentemente, índices de NPQ más bajos que los del respectivo control sano. El experimento de MIL se empleó a su vez como control del de AIL; éste nos permitió observar también como los valores de NPQ en una hoja ASIN infectada, primero son inferiores y más tarde, en estadios avanzados de la infección, superan a los de la hoja sana.

#### *Condiciones MIL*

NPQ es un parámetro que se ha empleado ya de forma exitosa para la detección de estrés en hoja (Lichtenthaler, 1996; Rolfe y Scholes., 1995; Chou y col., 2000; Van Kooten y col., 1990), también en trabajos previos del grupo en *N.benthamiana* (Rahoutei 2000; Pérez-Bueno 2003).

Los primeros cambios que presentó la hoja ASIN de planta de tabaco inoculada por TMV, fueron las imágenes de NPQ en el estado estacionario con valores menores al los del control, acompañadas de la respectiva subida en  $\Phi$ PSII. El incremento en la demanda de ATP es una de las

razones atribuidas a la disminución del NPQ de hojas de roble, en estadios tempranos de la infección causada *Puccinia coronata* (Rolfe y Scholes, 1995); una mayor síntesis de ATP, va a provocar una disminución de los protones del lumen, disminuyendo el potencial transmembrana y por lo tanto  $qE$ . Está descrito asimismo que la demanda en el tejido infectado se incrementa debido a la activación de los mecanismos de defensa y síntesis de proteínas inducidas por el estrés (Ayres, 1992; Balachandran y col., 1997a y b). La hoja ASIN infectada, es una hoja "fuente" para la planta, luego la presencia del virus en la misma, o en la hoja SIN que es su sumidero natural, podrían explicar este fenómeno dirigido a satisfacer las nuevas necesidades aparecidas con la infección.

Las imágenes correspondientes a la planta ASIN control indican que a lo largo de las tres semanas que dura el experimento, los índices de  $\Phi PSII_{300}$  disminuyen progresivamente junto con el contenido de Chl y el Fv/Fm, a la vez que suben los correspondientes del NPQ, reflejando la entrada en senescencia de la hoja, también observado por Subash y col. (1999). Descensos en Fv/Fm son indicativos de procesos fotoinhibitorios y por lo tanto de centros del PSII dañados (Roháček y Barták, 1999). En estadios finales de la infección en la hoja inoculada sucede lo mismo aunque de forma más acentuada, indicando que la hoja ya está severamente afectada, como se observó en *Arabidopsis thaliana* infectada por *Albugo candida* (Chou y col. 2000). Aun en hojas senescentes estamos detectando una diferencia en la hoja infectada que se muestra como una subida adicional de los valores de NPQ respecto al control, debido a la presencia de un estrés adicional en la misma.

Estos datos son análogos a los observados en nuestro grupo (Pérez-Bueno, 2003) a partir de las medidas de FI realizadas en hojas ASIN de *N.benthamiana* infectada por PMMoV-I, donde a la subida de los valores de NPQ<sub>300</sub> a 17 dpi, le precedió una bajada de este mismo coeficiente, comparado con su control sano. Resultados análogos se han obtenido al emplear la cepa española del PMMoV (M. Pineda, comunicación oral).

Los datos de hoja SIN infectada por TMV, presentaron, como cabía esperar, una subida en los valores de NPQ, destacando NPQ<sub>20</sub> y NPQ<sub>30</sub>, paralela al desarrollo y agravamiento de los síntomas, a lo que también contribuye una bajada progresiva en el contenido de la clorofila. Los valores de  $\Phi PSII$  disminuyeron a 14 dpi, en las hojas afectadas por TMV, pero más significativamente en las imágenes de  $\Phi PSII_{20}$  y  $\Phi PSII_{30}$ , apuntando todo ello a una acción del virus en este tipo de

hoja, que difiere de la ejercida en la hoja ASIN. Además los valores de Fv/Fm de la hoja SIN infectada a 14 dpi, que continúan por encima de 0,8, indican que está preservada la integridad del PSII. En otros experimentos se ha evaluado el efecto de un mismo factor de estrés en hoja joven y madura (Havaux y col. 2000) comprobándose que los efectos así como los mecanismos compensatorios que desarrollaban unas y otras, eran diferentes. Van Kooten y col. (1990) midió la fluorescencia en tabaco infectado por TMV y vio que en hojas jóvenes y maduras en las que se inhibe el transporte electrónico por acción del virus, eran distintos mecanismos los que operaban; en las hojas en expansión el punto principal de inhibición podría ser posterior a la fotoquímica del PSII, presentando limitaciones en el ciclo de Calvin. Este podría ser nuestro caso, ya que además disponemos de datos que demuestran la disminución de los niveles de proteínas que participan en dicho ciclo (ver Resultados aptdo. 3.6.1.) así como sus niveles de transcrito (Pérez-Bueno).

#### *Condiciones AIL*

La AIL hizo que los valores de NPQ obtenidos en planta sana de tabaco de cualquiera de las tres líneas, fueran en general más altos que el de las cultivadas con MIL. Comprobamos así como los mecanismos fotoprotectores se activan tanto en el caso de infección (en condiciones MIL) como tras la exposición a la AIL, si bien en este último caso, la respuesta fue a los 7dpi más notoria.

En el caso de las hojas infectadas, el resultado fue interesante y complejo, puesto que a 7 dpi no se hallaron diferencias con los controles respectivos y a 14 dpi encontramos un descenso en los valores de NPQ, acompañado de un incremento de los de  $\Phi$ PSII. Estamos, tal vez, ante un efecto rebote, inducido por la AIL, positivo para la planta de cara a la presencia del virus, en estas dos primeras semanas de infección; la luz es uno de los principales factores detonantes de la respuesta del cloroplasto a cambios en el ambiente (Karpinski y col. 2003). Otra de las múltiples posibilidades podría ser que la suma de ambos sea la que induzca una respuesta más eficaz, al menos de forma transitoria, por parte de la planta. Para saber el mecanismo por el cual este fenómeno tiene lugar habría que realizar experimentos adicionales.

Otra diferencia hallada tan sólo con la combinación del virus y la AIL fue el mayor contenido de Chl en la hoja SIN de la planta, desde fases tempranas de la infección y hasta los 10 dpi. Este

factor, sin embargo, no contribuye al incremento de  $\Phi$ PSII de la hoja infectada, dado que a 14 dpi su contenido de Chl ya es inferior comparado con la misma.

#### *La línea crtZ y el NPQ*

Como se ha comentado, la mayor resistencia de la línea crtZ a la radiación UV combinada con la AIL, gracias a la mayor proporción de pigmentos del ciclo de las xantofilas (Götz y col. 2002), se comprobó en este trabajo sin embargo a corto plazo (minutos). Parece claro que a medio (largo) plazo en nuestras condiciones experimentales, AIL junto con la infección viral, el incremento en las cantidades de  $\beta$ -carotínhidroxilasa que posee la línea crtZ de tabaco frente a la WT, no le reporta ventajas al funcionamiento del cloroplasto, ni contribuyó a disminuir el grado de estrés de las plantas tratadas, que interpretamos por los índices de NPQ que mostraron, que fueron idénticos, a los de las líneas WT y Azyg. Havaux y Kloppstech (2001) tras los trabajos realizados con mutantes *npq1* (no expresan la VDE) de *A. thaliana* que carecen de ciclo de las xantofilas, sometidos a bajas temperaturas y a AIL, también observan que el ciclo de las xantofilas y el NPQ relacionado con el mismo, es más relevante para la protección de la fotosíntesis frente a incrementos repentinos de la intensidad de la luz que frente a los efectos a medio plazo.

Una cuestión clave en nuestro experimento es el contenido y perfil de pigmentos de las diferentes plantas empleadas, sobre el que ya se ha discutido en detalle: los cambios encontrados entre la línea crtZ y WT son leves y transitorios. Asimismo el tabaco crtZ, a 7dpi, cuando incluso el incremento de Car va acompañado de un cambio en la sintomatología en el experimento con AIL y virus, ello no repercute en la actividad del cloroplasto (NPQ y  $\Phi$ PSII). Es posible que nuestras condiciones lumínicas no fueran lo suficientemente fuertes para estimular el pool VAZ de forma destacable, sin embargo ello, junto con el retardo en la aparición de los síntomas, estaría de acuerdo con el trabajo de Davison y col. 2002; ellos a pesar de obtener incrementos importantes en el contenido relativo de pigmentos del pool de VAZ, no observaron cambio alguno en sus valores de NPQ; aunque sí plantas en mejor estado a las WT tras ser sometidas a AIL y calor. Atribuyeron, por lo tanto, sus resultados positivos a la capacidad antioxidante de la Zea. La capacidad de los carotenos para reducir la peroxidación lipídica ha sido demostrada (Havaux y Niyogi, 1999; Havaux y col. 2000) y nosotros, como ya hemos comentado, pensamos que también otros carotenos como el  $\beta$ -car



podrían estar contribuyendo. Tal vez una muestra más de ello, son los valores de Fv/Fm a 22 dpi: Estos fueron claramente más altos en la línea crtZ que en las restantes, independientemente de la presencia del virus. Por lo tanto la protección adicional presente en esta línea, preservaría durante más tiempo una mayor proporción de centros del PSII. No obstante, esta variación en el parámetro de Fv/Fm en hoja ASIN en fases tardías de la infección, parece que siga siendo insuficiente para reportarle una ventaja notable respecto a la línea de tabaco WT.

Todos estos datos parecen confirmar, como ya se ha descrito, que el componente qE, en el que el pool VAZ es necesario pero no suficiente, protege al PSII de AIL y de las fluctuaciones de la luz a corto plazo, mientras que el pool de xantofilas puede tener adicionalmente un papel fotoprotector a largo plazo (Müller y col. 2001).

Nosotros hemos observado como en ninguna de las medidas de fluorescencia realizadas en hoja ASIN o SIN, bajo ninguna de las condiciones aquí expuestas, hemos hallado diferencia alguna entre la línea de tabaco transgénica, crtZ y la WT. Además, en los análisis de pigmentos de todas estas plantas los niveles de Zea no fueron detectables. Niyogi y col. (1997) comprobaron que en mutantes *npq1* de *Chlamydomonas* sólo un porcentaje determinado del NPQ total, es el que requería de la formación de Zea y Antera via la VDE. La línea de *A. thaliana* denominada Lsr1 con una reducción de hasta el 50% en el NPQ respecto al control, presentó una composición pigmentaria y una actividad del ciclo de las xantofilas normales (Peterson y Havir, 2000). También está el papel de la proteína psb S, que es indispensable para la generación de qE (Li y col, 2002; Holt y col. 2004), así como el de la lut, que se ha visto está implicada en el mismo (Niyogi y col. 1997, 2001). Incluso existen datos sobre plantas de tabaco que carecen de VDE que en los experimentos en campo, frente a los de laboratorio, no mostraron diferencia alguna a las WT, en crecimiento, asimilación de CO<sub>2</sub> o en la susceptibilidad a la fotoinhibición. (Sun y col. 2001). La plasticidad de los Car, y su capacidad de reacción ante la falta uno o más de ellos, está aceptada (DellaPenna, 1999).

Todos estos trabajos, incluyendo el nuestro, muestran la complejidad del tema señalando que son varios los factores que intervienen en el NPQ además del pool de VAZ, sin olvidar que a su vez, el mecanismo por el que los carotenoides pueden proteger del daño fotooxidativo no es único (Havaux y Niyogi, 1999).

Estudio de los cambios en la BGF y de la acumulación de compuestos que absorben en el UV, en hojas de planta de *N. benthamiana*, sana e infectadas. Implicaciones en la detección temprana de estrés.

En pleno desarrollo de la infección (14dpi) se pudo detectar un incremento de la BGF en ambas caras de la hoja infectada, más acentuado en el lado AB. Este aumento es más notable en la hoja SIN que en la ASIN, y en plantas infectadas con PMMoV-S en comparación con las que lo estaban con PMMoV-I; lo que era evidente en los espectros de emisión inducidos por luz UV.

De forma complementaria, el estudio de los espectros de excitación y sus correspondientes logFER revelaron que las hojas infectadas acumulaban más compuestos que absorben en el UV que las hojas control, principalmente en la cara AD. En el caso de la hoja SIN, éste proceso se detecta en estadios muy tempranos de la infección (3-4 dpi), antes incluso de que llegue a desarrollar sus primeros síntomas.

Los perfiles obtenidos a partir de los diferentes log FER AB/AD y log FER ADc/ADi e incluso el logFER ADasin/ADsin fueron semejantes: presentaban un pico entorno a 326nm y un hombro a 290nm. Estas características espectrales podrían coincidir con las del espectro del ácido clorogénico puro, un ácido hidroxicinámico éster del ácido cafeico, mayoritario en plantas de tabaco, cuyos niveles podrían aumentar además con la edad de la hoja (Bate-Smith, 1962; Takahama 1998, Ounis y col. 2001, Cerovic y col. 2002). Del Moral (1972) describe su presencia y la de sus isómeros en plantas de tabaco bajo estrés. De todas formas, otros ac.hidroxicinámicos, no pueden ser excluidos como causantes de este incremento de absorbancia en el UV.

El hecho de que la cara AD presente una mayor absorción en el UV, que la cara AB, ha sido documentado en diversas especies (Bilger y col. 1997) y se ha atribuido a una mayor exposición a la luz del haz de la hoja. Por la misma razón, la absorción en el UV también es mayor conforme más madura es la hoja (ADasin>ADsin), datos que además coinciden con los hallados en las diferentes hojas de una misma planta de *N. tabacum* (Ounis y col.2001) y de alcachofa (Morales y col.2004).

La diferencia en los espectros de excitación de la cara AD y AB de una hoja sana también está relacionada con la anatomía y el contenido de Chl de la hoja. Se ve claramente que en la cara

AD comparado con la AB, se da un incremento de la absorbancia en la región azul del espectro respecto de la verde, que se atribuye al mayor contenido de Chl en dicha cara AD (Cerovic y col. 2002 y referencias incluidas). Además una hoja de *N. benthamiana*, como las del resto de plantas dicotiledóneas, es asimétrica: bajo la epidermis superior el mesófilo posee una estructura de células en empalizada y bajo la inferior el parénquima lagunar. En la cara superior hay una gran cantidad de células muy abigarradas con una alta concentración de cloroplastos que provoca que los fenómenos de reabsorción por parte de la Chl sean mucho mayores que en la mitad inferior (Lichtenthaler y Rinderle, 1988). En la cara abaxial la luz puede además, penetrar mejor por el parénquima lagunar o esponjoso, siendo en definitiva, la eficiencia de excitación comparado con la cara AD, mucho mayor.

Si los espectros de excitación de la cara AB y AD se recogen a 720 nm, en lugar de a 685nm como ha sido el caso, esta diferencia se hace aún más patente. El registro de la emisión a 685nm, provoca una caída de la intensidad del espectro, bastante similar en ambas caras de la hoja, ya que la fluorescencia que se emite como resultado de la absorción de la luz verde, está siendo reabsorbida antes de que pueda abandonar la hoja. Cabe añadir, no obstante, que está demostrado que el log FER en la región del UV no se ve influenciado por la longitud de onda a la que se mide la emisión de la fluorescencia (ver aptdo 2.5.3.2 M y M)

La luz incidente en las diferentes hojas es un causante directo de la acumulación de este tipo de compuestos y en nuestras hojas infectadas lo que observamos, por lo tanto, es fruto de dos factores: la luz a la que son cultivadas, ya mencionada, y el virus. Este es el motivo, probablemente, por el cual los espectros de excitación de la cara AD son tan variables de un día post-infección a otro, entre la hoja infectada por el virus español y el italiano, no pudiendo extraerse así conclusiones acerca del mayor o menor efecto sobre la acumulación de este tipo de sustancias por una de las dos cepas. Cualquier cambio en la luz recibida por las hojas de una misma planta, puede provocar diferencias significativas en su espectro; este fenómeno de hecho se observó entre las 2 hojas de un mismo nodo de una planta (Ounis y col. 2001).

Los espectros fueron así variables sobre todo en las hojas SIN infectadas, mientras que las hojas ASIN infectadas, lo que sí pudimos apreciar es que el incremento de compuestos que absorben en el UV comenzó siempre antes en plantas inoculadas con el PMMoV-S (fig 3a, por ejemplo). A

14dpi, sin embargo, los espectros de ambas cepas eran muy similares. En este caso, notamos además, que se obtenía lo que se denomina un logFER plano, motivado por la presencia del mismo compuesto en las dos caras medidas. En un log FER ADc/ADi, de hoja madura a 14dpi, la cara AD del control como sabemos, por el mero hecho de haber estado muchas semanas expuesta a la luz, ha sintetizado cantidades más notorias de compuestos que absorben en el UV, que una semana antes (7dpi), o claro está que una hoja SIN (joven). Por lo tanto la presencia de estas sustancias es detectada en la cara AD de ambas hojas, aunque sigue siendo mucho mayor su acúmulo en la hoja de la planta infectada.

Otra conclusión evidente de nuestros resultados era el aumento de la BGF durante la infección. *N.benthamiana* emite BGF al igual que otras dicotiledóneas como tabaco y remolacha, y al contrario que por ejemplo guisante, donde prácticamente no se detecta (Cerovic y col 1999, 2002). En general, la emisión de BGF es menor en dicotiledóneas que en monocotiledóneas (Lichtenthaler 1997; Cerovic y col 1999).

El hecho de que incluso en hojas sanas la emisión de BGF sea siempre mayor en la cara AB se debe a diferencias en las propiedades ópticas de cada una de las caras de la hoja, así como en el contenido de Chl (Buschmann y col. 2000 y ver Introducción aptdo 1.5). Además, como hemos visto anteriormente, los espectros de excitación también indican una mayor acumulación de compuestos que absorben en el UV en la cara AD, actuando de *pantalla* que atrapa esta radiación con que la se induce el espectro de emisión, propiciando una menor eficiencia en la excitación de la fluorescencia.

A pesar de ello, en la hoja infectada es mayor la BGF que en la control, siendo la diferencia mucho más llamativa en la cara AB, donde no se acumulan tanto estas sustancias que protegen de la radiación ultravioleta. El efecto *pantalla* es, asimismo, muy notorio en la cara AD de hoja infectada (aunque también se puede apreciar en la AB), en toda la región del rojo, cuya emisión se ve fuertemente disminuida, y que como mostramos y se ha descrito no tiene que deberse a la disminución del contenido de Chl (Lichtenthaler, 1997; Buschmann y Lichtenthaler 1998). Un descenso de la Chl se dio, únicamente, en la hoja SIN infectada por PMMoV-S a 14 dpi, lo que se reflejó en una mayor distancia entre el pico de RF y el de FRF (Lichtenthaler y Rinderle, 1988).

Diversos factores de estrés pueden provocar un incremento de la BGF respecto a la roja, y de hecho el grupo de Lichtenthaler promovió el uso de los cocientes F440/F690, F440/740 y F690/740 como indicadores de estrés (Lichtenthaler, 1996), que han resultado ser muy sensible a los cambios medioambientales (Mercure y col. 2004), pudiendo alterarse incluso antes de que el propio aparato fotosintético se vea dañado. Buschmann y Lichtenthaler (1998) resumen en una revisión los cambios en estas proporciones en situaciones como fotoinhibición, estrés hídrico y térmico, tratamiento por herbicidas, deficiencias nutricionales y ataque por ácaros.

Los cambios pueden ser resultados de una disminución en la ChIF como consecuencia de un bajada en el contenido de Chls (y los Car), como es el caso de la deficiencia en Fe (Morales y col. 1994), que termina provocando un incremento de la BGF. Pero este fenómeno igualmente puede producirse en situaciones de estrés lumínico, hídrico o por radiación UV por un aumento de compuestos fenólicos en la planta que absorben en la región UV del espectro reduciendo en gran medida la luz que atraviesa la epidermis y por tanto la ChIF en el rojo (Lang y col. 1996; Hideg y col. 2002; Lichtenthaler, 1997; Gilbert y col. 2004).

En nuestro caso, la infección viral ha causado un aumento de la BGF respecto a la ChIF en el rojo, por dos razones: un incremento en la emisión de la BGF posiblemente causado por un aumento en la síntesis de compuestos fenólicos y una disminución adicional de la emisión en la región del rojo por el acusado incremento de compuestos que absorben el UV en hoja infectada respecto de la sana. El incremento de la BGF es proporcional al grado de afectación de la hoja: fue mayor, a 14 dpi, en la hoja SIN frente a la ASIN y en general también mayor en plantas infectadas con la cepa más virulenta de las dos, la española. Esto podría estar indicando que la alteración directa/o indirecta del metabolismo secundario, por parte del virus, es proporcional a la cantidad del mismo presente en la hoja. No hemos podido constatar si estos cambios se pueden detectar precozmente; por el contrario, sí detectamos de forma temprana, la acumulación anómala de compuestos que atrapan la luz UV en hoja SIN infectada desde los 3-4 dpi. Esto significa que se está realizando antes de que los síntomas de la hoja SIN sean visibles y de que la maquinaria fotosintética de la misma haya sufrido daños severos. Creemos ser los primeros que datan este efecto y de forma precoz, ya descrito en planta bajo condiciones de estrés abiótico, en condiciones de estrés por virus.

Se ha descrito la activación de la ruta de los fenilpropanoides y acumulación de compuestos fenólicos (solubles y ligados a la pared celular) en plantas infectadas con virus (Kofalvi y Nassuth, 1995). En algunos casos de deficiencias nutricionales se ha podido describir incluso una relación causal entre compuestos fenólicos, cambios en la BGF e inhibición del crecimiento (Mercure y col. 2004).

Así en la hoja infectada se induce la aparición de compuestos que absorben en el UV y se incrementa también la presencia de fluoróforos azules y verdes. Análisis cromatográficos de extractos de hoja serán necesarios para clarificar cuál de las múltiples posibles sustancias posibles puede estar implicada en este fenómeno.

#### La bandas de TL *in vivo* como indicador de estrés. Importancia de la banda AG.

Hemos caracterizado *in vivo* las bandas de TL B, AG y C en hojas de plantas de *N. benthamiana*. La infección por PMMoV-S e-I dió lugar a cambios en todas ellas, al menos a 14 dpi, un punto de la infección en el que se han observado cambios importantes en la sintomatología de la planta y en distintos parámetros fotosintéticos analizados (contenido de pigmentos y proteínas, niveles de expresión de aquellas, etc..) en el presente trabajo y en otros previos del grupo (Rahoutei y col., 1998, 1999, 2000; Pérez-Bueno 2003 y Pérez-Bueno y col., 2004). Las contribuciones o porcentajes relativos de las bandas B y AG, así como sus Tm, de hoja de planta de *N. benthamiana* infectada mostraron cambios comparado con el control sano, que diferían según si la hoja era joven (SIN) o madura (ASIN.)

Destacaron por su significancia los cambios en la banda AG. Esta banda es indicativa del potencial energético [NADPH +ATP] del cloroplasto (Roman y Ducruet, 2000) y de forma equivalente en plantas CAM, de la relación dihidroxiacetonafofato/3-fosfoglicerato (DHAP/PGA), indicativos del potencial de fosforilación y del potencial reductor alcanzado en el cloroplasto a partir de la fotosíntesis (Krieger y col. 1998). Asimismo, se la ha relacionado con la activación, por calor, del flujo cíclico entorno al PSI /clororrespiración (Björn, 1971; Havaux 1996).

#### *Caracterización de la banda AG en N.benthamiana*

En las curvas de planta sana de *N.benthamiana* generadas con luz FR se induce una banda AG ( $S_2/S_3$   $Q_B$   $X \cdot$ ) clara con una  $T_m$  entorno a los 45°C y si éstas se generan con flases también aparece un componente o banda AG, al igual que en plantas de tabaco, guisante y pepino y al contrario que en *Arabidopsis* o maíz donde ésta es muy débil en las medidas realizadas con flases (Ducruet y col. 2005; Ducruet comunicación oral). Esta banda desaparecía, como cabría esperar, en curvas también inducidas con flases, que se realizaron añadiéndole a la hoja DCMU, (no se muestra).

Largos períodos de adaptación a oscuridad de la hoja sana tipo ASIN provocan un aumento de la contribución de la banda AG en las curvas de 2F. Este fenómeno coincide con los resultados obtenidos por Miranda y Ducruet (1995a), Constantin-Roman (2000) y Roncel y Ortega (2005), los cuales sugieren que la oscuridad estaría provocando un estado fisiológico similar al que provoca la iluminación con FR; por lo que podemos pensar en una oxidación en la oscuridad de  $Q_B$ . Asimismo, de la cantidad de  $Q_B$  previa a la medida parece que dependerán los porcentajes relativos de AG y B (Ducruet y col. 2004). Este es un fenómeno que observaron en distintas especies vegetales y ahora nosotros también en *N.benthamiana*, apoyando la idea de que la relación AG/B podría ser un buen parámetro para medir el estado redox de  $Q_B$  (Roncel y Ortega, 2005). Adicionalmente, las medidas con 2F ó 30sg de luz FR tras largos períodos de adaptación a la oscuridad frente a los cortos (sólo 10min) en hoja de *N. benthamiana*, inducen una mayor  $T_m$  de la banda AG. El ensanchamiento de la banda o un desplazamiento de su  $T_m$  hacia valores menores, sugiere que el transporte circular de electrones entorno al PSI ya estaba activado a más bajas temperaturas, siendo por tanto el efecto del calor menos pronunciado (Ducruet, 2003). Parece ser que la inducción del flujo cíclico entorno al PSI/clororrespiración por la luz, es lo que está provocando estos cambios en el pico máximo de la banda bajo una y otra condición (Constantin-Roman 2000; Ducruet, 2003).

También hemos comprobado que la contribución de la banda AG inducida mediante 2F varía según la edad de la hoja, siendo mayor la relación AG/B en las hojas más jóvenes de una misma planta. Esto podría estar reflejando la relación *fuentel sumidero* existente entre hojas de una misma planta. En hojas jóvenes tiene lugar una gran actividad metabólica con acumulación progresiva de potencial energético, que atribuimos a su progresivo papel como *sumideros*.

En las diferentes hojas de una misma planta aparentemente sólo varió la  $T_m$  de B, la cual disminuyó con el aumento de la edad de la hoja. Este fenómeno viene reflejando una mayor acidez del lumen, que se ha visto puede tener un papel protector para el OEC (Peltier y Cournac, 2002).

*Cambios en las bandas AG y B inducidos por la infección viral*

*Cambios en la banda AG*

Al estudiar los cambios en la banda AG en hojas SIN infectada, vemos cómo a 14 dpi además de inducirse un desplazamiento hacia  $T^a$  más altas de la banda AG, la relación AG/B se ve fuertemente incrementada con respecto a su correspondiente control. Un acúmulo muy notorio del potencial energético en las mismas podría ser la causa de este fenómeno, por otra parte análogo al registrado en hojas de plantas sometidas a otros tipos de estrés como la deficiencia de fósforo o de  $CO_2$ , en las que se comprobó que usaban el [ATP +NADPH] mucho más lentamente (Mellvig y Tilberg, 1986; Palmqvist y col. 1986). En el caso de nuestras hojas SIN de plantas infectadas se correspondería con un mal funcionamiento del Ciclo de Benson-Calvin hacia el que apuntan resultados de este trabajo y los de otros trabajos previos realizados por el grupo (Pérez-Bueno, 2003).

En la hoja ASIN infectada a 14 dpi, sucede lo contrario a lo observado en hoja SIN: la proporción de la banda AG respecto de B, así como su  $T_m$ , disminuyen comparando con el control, en curvas inducidas por 2 flases. La disminución de la  $T_m$  indica que el flujo cíclico entorno al PSI/clororrespiración está siendo inducido a temperaturas más bajas que en la hoja sana. Se ha visto que este flujo cíclico se activa en otras situaciones de estrés causadas por la luz o el frío (Bukhov y Carpentier, 2004 y, pudiendo ello deberse al intento de satisfacer un incremento en la demanda de ATP (Manuel y col. 1999). Esto podría guardar relación con la disminución del potencial reductor y de fosforilación que refleja la reducción de la contribución de AG en la hoja ASIN (y fuente) infectada comparado con la sana, ya que éste podría deberse a la mayor actividad que tiene lugar en dicha hoja ante el aumento de demanda por parte de la planta, motivado por la presencia del virus.

Nuestros datos sobre cambios en banda AG indican que en las hoja ASIN infectadas opera el flujo cíclico entorno al PSI/clororrespiración para satisfacer la extraordinaria demanda energética de la hoja SIN quedando además su propio potencial energético disminuido. La hoja SIN parece presentar



problemas para emplear la energía dado el importante acúmulo adicional del potencial energético que observamos en ella.

#### *Cambios en la banda B y C*

Los cambios en la banda B en nuestras medidas son significativos en hoja ASIN infectada a 14 dpi y consisten en la disminución de su Tm con respecto al control, siendo más acentuado el efecto con la cepa española del PMMoV-S. Este mismo resultado se ha obtenido en otros casos como guisante y pepino sometidos a bajas temperaturas (Glémin y col. 1992) o en tomate y cebada afectadas por el ozono (Gilbert y col. 2002) El desplazamiento a más bajas temperaturas del pico de B, se asocia a una mayor acidez del lumen unido a una mayor inestabilidad de los estados S más oxidados. Valores de pH más bajos en el lumen se han asociado además de a una mejor protección del OEC, a un aumento del NPQ.

Información acerca de daños en el lado donador del PSII por la infección viral, también la podemos encontrar en la banda C (TyrD+ QA-). La recombinación que la origina implica que la TyrZ+ donadora habitual de electrones al CR del PSII y/o QB-, aceptor también habitual de la CTE, están bloqueados. Esta banda puede inducirse en hoja sana, joven o madura, lo que indicaría que en condiciones fisiológicas ya existe un porcentaje de centros del PSII inactivos (Zurita y col. 2005, van Wijk y col., 1993; Critchley y Russell, 1994. La presencia de PMMoV en hoja ASIN provoca un incremento muy significativo de esta banda respecto del control, en el caso de la cepa española y algo menor si es la italiana. Podemos estar detectando un daño en lado donador del PSII, en consonancia con la disminución de los niveles de las proteínas OEC también más acentuada con la infección por la cepa española que por la italiana (Pérez-Bueno, 2003). Este mismo efecto de los niveles de transcrito se observa en la hoja SIN infectada, sin embargo, las bandas C aumentan con la misma magnitud con ambos virus. En este caso, algo más que el descenso de las proteínas del OEC, son las causantes del daño en el lado donador de diversas unidades del PSII. Dichos resultados sugieren de nuevo, mecanismos de acción diferentes del virus en ambos tipos de hojas.

#### *Cambios en HTL*

La realización en la última década de trabajos acerca de la emisión HTL en hoja, ha permitido definir las diferentes bandas que aparecen, así como el fenómeno causante de cada una de ellas; y la

banda HTL2 se ha propuesto como valioso indicador de peroxidación lipídica y estrés oxidativo (Vavilin y Ducruet, 1998 ; Ducruet y Vavilin, 1999; Havaux, 2003; Havaux y Niyogi, 1999; Baroli y col. 2004).

La detección de la emisión de TL a altas temperaturas, hasta los 160°C, nos permitió observar la presencia de la banda HTL2 (130°C) en plantas infectadas pero únicamente por la cepa española del virus y apareciendo además antes (7 dpi) en la hoja ASIN que en la SIN (14 dpi). No descartamos que PMMoV-I pueda provocar este efecto en estadios más avanzados de la infección, ya que el trabajo previo con MT de plantas infectadas de *N. benthamiana* indicó presencia de peroxidación lipídica con ambas cepas virales a los 21 dpi (Rahoueti y col. 1999). De acuerdo con nuestros resultados, Havaux y col. (2000), encontraron bandas de peroxidación lipídica únicamente en hojas maduras de mutantes npq1 (que no pueden fabricar Zea) de *Arabidopsis*, tras tratamientos fotoinhibitorios; comprobaron que la hoja joven sometida a este estrés lumínico, sin embargo, fabricaba mayores cantidades de vitamina E, un eficaz antioxidante. Las hojas jóvenes parecen mostrar así una mayor versatilidad metabólica. En el caso de *N. benthamiana*, a 14 dpi, la banda HTL2 que aparece en hoja SIN es de mayor intensidad a la de las hojas ASIN; en este punto de la infección son numerosas y a diversos niveles, las alteraciones que se producen en la hoja infectada, lo que explicaría su incapacidad para frenar ya el daño oxidativo.

En nuestros experimentos la HTL ha resultado ser una técnica útil para detectar de forma temprana (7 dpi) estrés oxidativo en nuestras plantas infectadas, a diferencia del trabajo previo en MT donde no se pudo detectar hasta los 21 dpi, diferenciar ambos tipos de hoja (SIN y ASIN) y confirmar la menor agresividad de la cepa viral italiana frente a la española.

**Análisis proteómico del cloroplasto de *N. benthamiana*: Cambios inducidos por la infección por tobamovirus.**

Los trabajos previos de nuestro grupo mediante geles 2D de MT estuvieron destinados al estudio y caracterización de proteínas del OEC del PSII en plantas de *N. benthamiana* sana e infectadas por PMMoV (Rahoueti y col. 1998; Rahoueti, 2000; Pérez-Bueno y col., 2004).

En este trabajo con objeto de realizar un acercamiento más global al proteoma del cloroplasto de *N. benthamiana* hemos obtenido nuevos geles 2D, empleando tiras IPG para la primera dimensión, de muestras de cloroplastos aislados que permiten la visualización de al menos, unas 150 manchas correspondientes a proteínas cloroplásticas. Todas ellas están comprendidas en el rango 4-7 de pH y la gran mayoría en la zona de Pm entre los 20 y los 43kDa. De todas ellas se seleccionaron 78 para su procesamiento por MALDI-TOF, identificándose de forma inequívoca 55, que representaban a 29 proteínas diferentes. Así hemos logrado la identificación positiva del 70% de las proteínas seleccionadas, de las cuales aproximadamente un 58% pertenecían a la CTE y un 12% eran altamente hidrofóbicas, además del 27% perteneciente al Ciclo de Calvin.

La inmunodetección nos permitió localizar tres proteínas adicionales (LHCII, Prx y D1), de las cuales 2, se visualizaban mucho mejor (Prx) o únicamente (D1) en la película de revelado, dado su presencia minoritaria en el gel. La D1 es una proteína altamente hidrofóbica, lo que dificulta en gran medida su solubilización, y por lo tanto podría ser la razón de la aparición de las manchas a muy alto peso molecular que serían agregados de la misma. En cuanto a la Prx, resulta curioso el gran número de manchas detectables por el Ac correspondiente, dado que hasta ahora se ha descrito una sola forma cloroplástica de esta proteína (Bernier-Villamor y col. 2004). Se puede pensar, por lo tanto, que la respuesta múltiple al Ac sean reacciones cruzadas, modificaciones no deseables de la misma debido a su manipulación o fragmentos incompletos de la proteína. El análisis de las mismas por MS podría contribuir a descartar modificaciones postranscripcionales o posibles isoformas.

Para la solubilización de la muestra optamos por la extracción fenólica tras comparar diversos métodos, ya que ofrece los mejores resultados, como se documenta en la literatura correspondiente (Saravanan y Rose 2004). La técnica del IEF seguido del SDS-PAGE, permite la obtención de un buen número de proteínas solubles y periféricas (Peltier y col., 2000; van Wijk, 2001) pero las muestras de cloroplastos presentan un gran número de proteínas hidrofóbicas. Por ello, recientemente se han propuesto nuevos abordajes proteómicos para la identificación de proteínas de membrana en preparaciones cloroplásticas (Ciambella y col. 2005).

Una dificultad añadida de estas muestras es que las proteínas presentes difieren mucho en sus niveles de acumulación; así proteínas como la Rubisco, muy abundantes en la muestra, impiden

la resolución de otras minoritarias (Schröder y Kiesselbach, 2003). Con objeto de sortear parte de este problema, empleamos muestra no sólo de CI sino también de CL, donde una buena parte de las proteínas estromáticas se lavaban.

Entre las proteínas de la CTE identificadas destacamos el alto grado de resolución que se ha conseguido para las proteínas OEC, comparado con nuestros trabajos anteriores. PsbO ha pasado de ser una gran mancha poco resuelta a dar lugar a un tren de 6 manchas proteicas y PsbP de 4 manchas ha pasado a dar lugar a 12. Si bien hemos confirmado a qué tipo de proteína se corresponden, la identificación mediante MALDI no clarifica si son isoformas diferentes dado que dicha información no está aún disponible en la base de datos con la que se comparó. Todas ellas han sido comparadas positivamente con las secuencias aminoacídicas únicas de PsbO y PsbQ pertenecientes a *N. tabacum* con las que se sabe que cualquiera de las secuencias *N. benthamiana* (de PsbO y PsbQ respectivamente) guarda un alto grado de homología (Pérez-Bueno, 2003). Hasta ahora, las comparaciones realizadas (no se muestra) manualmente con los péptidos obtenidos y emparejados de las diferentes manchas del gel obtenidos del MALDI-TOF, correspondientes a la proteína PsbO (con la que hemos comenzado), con las secuencias aminoacídicas deducidas del cDNA de los cuatro clones de psbO aislados por Pérez-Bueno (2003; y col. 2004) de las distintas isoformas, no han dado resultado. Futuras comparaciones y/o análisis más exhaustivos mediante la MS, por ejemplo en tándem, nos permitan tal vez localizar en el gel a las diferentes isoformas, así como averiguar si hay isoformas nuevas o si algunas de las manchas peptídicas son debidas a modificaciones post-transcripcionales. La función y características de las distintas isoformas de las proteínas del OEC han sido descritas y ampliamente discutidas en Pérez-Bueno (2003; y col. 2004).

La ATPasa, otro de los grandes complejos fotosintéticos, aparece en el gel de forma mayoritaria. Hemos localizado 5 de las 9 subunidades que la componen, todas ellas pertenecientes al fragmento CF1. Creemos además que, por analogía con los datos de Friso y col. (2004), las proteínas contiguas, de igual Pm, a las identificadas como las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  serían *trenes* de proteínas correspondientes a cada una de las subunidades.

Se han hallado en el gel de muestra de cloroplasto varias de las chaperonas, todas con un alto peso molecular: la chaperona 60, una FtsH-like, y la Hsp70. La primera es una chaperona

implicada en el ensamblaje del oligómero que es la Rubisco, mientras la Hsp70 se ha visto está implicada en la protección (Schroda y col. 2001) y la FtsH en la reparación (Nixon y col. 2005; Cheregi y col. 2005); y biogénesis (Zaltsman y col. 2005a , 2005b) del PSII.

Dos de las proteínas halladas, una proteína hipotética (gi|7267602) y la proteína del lumen de 16,5kDa son por el momento proteínas de función desconocida. La denominada proteína hipotética disminuye sin embargo a causa de la infección por tobamovirus.

Con los geles 2D estudiamos adicionalmente la expresión diferencial de proteínas cloroplásticas de planta de *N. benthamiana* sana e infectada por PMMoV-S e-I, en un punto crítico de la infección que son los 14dpi. Mostramos cuáles proteínas de las identificadas, disminuyen sus niveles frente a los del control. La diferencia más notoria se encuentra en las proteínas pertenecientes al Ciclo de Calvin, severamente afectado en el caso de infección por PMMoV-S y en menor grado por el -I. También hemos detectado alteraciones en otras proteínas de la CTE, así como del metabolismo del nitrógeno, dado que las cantidades de la GS de igual forma descienden.

En un trabajo anterior del grupo, Pérez-Bueno (2003) mostró la disminución en los niveles de transcritos de Rubisco y Rca en planta de *N. benthamiana* infectada por PMMoV-I y -S (mayor en el segundo caso) e incluso de los de RbcL en estadíos más tardíos de la infección. Ello coincide con los resultados de geles 2D de muestras infectadas a 14dpi: un descenso en los niveles de proteína de RbcS y Rca, más acentuados con PMMoV-S, mientras que la RbcL sólo disminuye con el PMMoV-S. La importancia de la RbcS en el funcionamiento de el conjunto de este enzima clave ha sido subrayada por Spreitzer (2003), que destaca los experimentos que demuestran que ésta es requerida para la máxima actividad catalítica del enzima y en muchas ocasiones contribuye a su especificidad CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>. La Rca está regulada transcripcionalmente y, dependiendo de la especie vegetal y de las condiciones de estrés, los transcritos sufren procesamientos alternativos (Spreitzer y Salvucci, 2002). La proteína Rca cumple la función de activasa de la RuBisCO cuando está ensamblada formando un gran complejo pero, en condiciones de estrés como altas temperaturas, se ha visto que se disocia y se ancla a la membrana tilacoidal para actuar como chaperona, asociándose a complejos polipeptídicos nacientes. En nuestro caso el cloroplasto perdería ambas funciones debido al descenso de sus transcritos y sus niveles proteicos. Respecto a la RbcL, es posible que en fases más avanzadas se

visualice su descenso en las muestras afectadas por PMoV-I, acorde con los niveles de transcritos que se ven más severamente afectados. No obstante, no descartamos que por la gran abundancia de dicha proteína no sea posible llegar a discriminar fácilmente cambios no tan drásticos en sus niveles de acumulación. Los trabajos realizados hasta ahora bajo diferentes condiciones de estrés (radiación UV, ozono, carencia de nutrientes, osmótico, AIL), concluyen que su degradación se debe a modificaciones oxidativas de la misma (Houtz y col. 2003 y referencias incluidas). Todos estos factores de estrés testados se sabe que generan ROS al igual que podría estar haciéndolo el virus.

Otros enzimas pertenecientes al Ciclo de Benson-Calvin han visto sus niveles disminuidos en presencia del virus: PGK, PRK, SBPasa y SFBA o aldolasa plastídica. La SFBA o aldolasa plastídica identificada, es codificada por el gen NpAldP1 que tiene otro gen homólogo NpAldP2 en el género *Nicotiana*. Ambos genes bajo condiciones de estrés como el salino y en tres especies diferentes del género *Nicotiana* pueden diferir en su expresión: NpAldP1 se reprime y NpAldP2 se induce (Yamada y col. 2000). Nuestros datos en *N. benthamiana* parecen apuntar en la misma dirección. Los experimentos realizados en plantas de papa antisentido para la aldolasa plastídica demostraron que la fotosíntesis, el crecimiento y el flujo fotosintético del carbono, estaban disminuidos (Haake y col. 1998).

La SBPasa, por su parte, está considerada una de las enzimas clave en la regulación del ciclo de Calvin. Plantas de tabaco transgénicas en las que se redujo su expresión vieron limitada su tasa de asimilación de carbono, y el contenido de carbohidratos en la hoja, que mostraban clorosis (Harrison y col. 1997) De forma inversa, su sobreexpresión produjo un incremento en la tasa de fotosíntesis, carbohidratos, el área de la hoja y la biomasa, al igual que ofrecía ventajas en fases tempranas del crecimiento (Lefebvre y col. 2005).

Se han obtenido también mutantes de tabaco con descensos en la expresión de la PRK (Paul y col. 1995), pero sólo ante una disminución del 95 % de la misma se logró detectar una reducción en la tasa de fotosíntesis. Se ha podido comprobar además que la planta es capaz de compensar esta carencia incrementando la actividad de la PRK presente (Banks y col. 1999).

En resumen, nuestros datos señalan que durante la patogénesis se afecta el Ciclo de Calvin, en enzimas como Rubisco, PGK, PRK, SBPasa y SFBA., cuyo impacto sobre la fijación fotosintética

del carbono, acumulación de carbohidratos y crecimiento de la planta está en algunos casos documentado (Raines 2003). Pero dado que el virus induce a un mismo tiempo alteraciones a distintos niveles celulares es difícil de definir la importancia relativa que tiene la disminución de los niveles de estas enzimas de los procesos celulares, cambios bioquímicos y fisiológicos implicados en el desarrollo de los síntomas.

De acuerdo con ello Golem y Culver (2003), basándose en sus análisis por microarrays de plantas de *Arabidopsis* infectadas por TMV, subrayaron el impacto del virus en un amplio espectro de los procesos celulares, cambios bioquímicos y fisiológicos implicados en el desarrollo de los síntomas.

Otro descenso importante en sus niveles por la acción viral lo experimenta la GS plastídica, proteína reguladora del metabolismo del nitrógeno y presente en tres machas proteica en el gel. Según la información disponible hasta la fecha (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Qu y col. 2004), todas las especies del género *Nicotiana* poseen un solo gen para esta enzima, con la excepción de *N. clevelandii*, con 2 genes diferentes. Su regulación difiere de la de la enzima citosólica, la cual se ve inducida en senescencia, mientras los niveles de la cloroplastídica e incluso de sus RNAm descienden (Masclaux-Daubresse y col. 2005; Texeira y col. 2005).

En cuanto a las pruebas que aportamos en este trabajo del descenso de proteínas de la CTE en el complejo Citb<sub>6</sub>/f (Cit f, FNR y la plastoquinol-plastocianin reductasa) y el PSI (proteína de unión a Chla/b, tipo III), hay que unir las a la información previa aportada por el grupo acerca del descenso de proteínas del PSII (Barón y col. 1995; Rahoutei y col. 1998, 2000) y de varios de sus transcritos (Pérez-Bueno, 2003) en condiciones de estrés por virus. Todo ello habla de un notable efecto de la infección viral en la CTE, mayor en la hoja SIN que en la ASIN y en la infectada por PMMoV-S que en la inoculada con PMMoV-I.

En los geles de muestra infectada aparece una nueva mancha proteica, que en el caso PMMoV-S, confirmamos que es la CP del virus. Por homología, pensamos que la proteína que aparece en la misma posición, aunque en mucha menor cantidad, en los geles de muestras infectadas con PMMoV-I también les a CP. En trabajos anteriores se vió que la acumulación de los RNAsg de la CP en el tejido foliar era menor en la infección provocada por PMMoV-S que por PMMoV-I (Pérez-Bueno, 2003).

Si analizamos nuestros resultados en conjunto, podemos encontrar también, similitudes con los cambios hallados mediante un análisis proteómico en hojas de trébol (*Trifolium repens* (L.)), que una vez entradas en senescencia presentaban descensos significativos en las proteínas cloroplásticas PsbO, RbcL, RbcS, Rca y algo menores en la GS plastídica, respecto del control (Wilson y col. 2002). Ya anteriormente pudimos observar que el patrón de acumulación de todos los mRNA nucleares analizados en las hojas ASIN de plantas de *N. benthamiana* infectadas respecto al detectado en las plantas control por Pérez-Bueno (2003) era un ejemplo claro de que la infección viral acelera los procesos de senescencia de las plantas (Hull 2002).



# Conclusiones

1. La infección por los tobamovirus objeto de estudio - TMV y PMMoV- provoca un descenso general en el contenido total de pigmentos fotosintéticos desde fases tempranas de la infección, mientras que el contenido relativo de los pigmentos constituyentes de los fotosistemas sólo se ve alterado en fases muy tardías de la misma.
2. La línea de tabaco transgénica crtZ, que sobreexpresa la  $\beta$ -carotínhidroxilasa, no mostró diferencias significativas comparada con la línea de tabaco WT al ser sometida simultáneamente a dos factores de estrés -altas o bajas condiciones lumínicas junto a la infección por TMV- ni en los contenidos relativos de los diferentes pigmentos fotosintéticos, ni en las imágenes de los parámetros de fluorescencia NPQ y  $\Phi$ PSII. En nuestras condiciones de trabajo, la línea crtZ no presenta ventajas frente a la WT en la defensa contra estrés biótico o abiótico, a corto o medio plazo.
3. En las medidas de TL, es evidente que PMMoV induce en la planta de *N. benthamiana* infectada un incremento de la banda C, indicativo de una posible alteración en el lado donador del PSII, además de un desplazamiento de la banda B hacia bajas temperaturas, lo que se asocia a una mayor acidez del lumen. Los cambios (contribución respecto a la banda B y temperatura de su máximo) en la banda AG en hojas S y AS, podrían indicar una posible activación del flujo cíclico de electrones alrededor del PSI atendiendo a una mayor demanda de ATP y un bloqueo del ciclo de Calvin, respectivamente
4. Hojas sintomáticas y asintomáticas presentaron bandas HTL2, indicativas de estrés oxidativo, únicamente en presencia de la cepa española del PMMoV, al menos durante las dos primeras semanas de infección.
5. La BGF se incrementa, de forma más acentuada en la cara abaxial que en la adaxial, en hojas de *N. benthamiana* infectadas por ambas cepas de PMMoV. Adicionalmente, se ha registrado

una acumulación de compuestos que absorben en la región del UV, principalmente en la cara adaxial de la hoja sintomática de plantas infectadas, en estadios muy tempranos de la infección, incluso antes de que sus síntomas aparezcan.

6. Una primera aproximación al proteoma del cloroplasto de *N. benthamiana*, mediante la técnica de IEF-SDS-PAGE, nos ha permitido resolver unas 150 manchas proteicas, de las cuales hemos identificado 55 que pertenecen a 29 proteínas diferentes. La infección por PMMoV indujo un descenso en al menos 26 de ellas, pertenecientes a 13 proteínas diferentes, de las cuales la mayoría pertenecen a la CTE y al Ciclo de Calvin.

# Concluding remarks

1. Infection with both tobamovirus used in this study - PMMoV and TMV- induces at early infection steps a general decrease of the photosynthetic pigment content, whereas the relative pigment content, which reflects the pigment composition of both photosystems, only is being altered at the later infection steps.
2. The tobacco transgenic line (crtZ), which overexpresses the  $\beta$ -carotinhydroxylase, does not show any significant differences comparing with the tobacco WT, regarding the measured photosynthetic parameters. Photosynthetic pigment content, as well as NPQ and  $\Delta$ PSII images, are similar in both kind of plants after being exposed to viral infection and light stress simultaneously. Under our experimental conditions, the tobacco transgenic line crtZ does not present advantages at short or medium-term against biotic or abiotic stress, comparing with the WT.
3. *N. benthamiana* plants infected with PMMoV show changes in their TL bands. Increase of the intensity of the C band, indicative of donor side alterations and shift of the B band towards lower temperatures are evident. Changes on the AG/B band ratio in SIN and ASIN leaves, could be associated to an activation of the cyclic electron transport around PSI to satisfied a higher demand of ATP and inhibition of the Calvin–Cycle, respectively..
4. Only PMMoV-S induces HTL2 bands, indicative of oxidative stress, in SIN and ASIN leaves during the first two infection weeks.
5. The BGF increase, mostly in the abaxial side comparing to the adaxial one, in *N. benthamiana* infected leaves with the two strains of the PMMoV. Additionally, an accumulation of UV-

absorbing compounds was detected in the adaxial side of the SIN leaves at the early infection steps, before the visual symptoms appearance.

6. A first approach to the *N. benthamiana* chloroplast proteome, using the IEF-SDS-PAGE technique, allowed us to resolve around 150 spots; 55 of them were identified and represent 29 different proteins. PMMoV infection induces a decrease in at least 26 spots, which represent 13 different proteins; most of them belong to the Calvin-Cycle and the electron transport chain (ETC).

## 5 Bibliografía

- Abbinck T.E.M., Peart J.R., Moss N.M., Baulcombe D.C., Bol J.F., Linhorst H.J.M. 2002. Silencing of a gene encoding a protein component of the oxygen-evolving complex of photosystem II enhances virus replication in plants. *Virology*. 295: 307-319.
- Abbot J.A. 1999. Quality measurement of fruits and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 15: 207-225.
- Aebersold R. y Mann M. 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422: 198-207.
- Almási A., Apatini D., Bóka K., Bóddi D., Gáborjányi R. 2000. BSMV infection inhibits chlorophyll biosynthesis in barley plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56: 227-33.
- Almási A., Ekés M., Gáborjányi R. 1996. Comparison of Ultrastructural Changes of *Nicotiana benthamiana* Infected with Three Different Viruses. *Acta Phytopathologica Et Entomologica Hungarica* 31: 181-90.
- Almási A., Harsanyi A., Gaborjanyi R. 2001. Photosynthetic alterations of virus infected plants. *Acta Phytopathologica Et Entomologica Hungarica*. 36: 15-29.
- Arnold W. y Azzi J.R. 1968. Chlorophyll energy levels and electron flow in photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 61:29-35
- Arnold W. y Sherwood H. 1957. Are chloroplasts semiconductors? *Proc Natl Acad Sci USA*. 43: 105-114.
- Aro E.M., Sorsa M., Rokka A., Allahverdiyeva Y., Paakkarinen V., Saleem A., Battchikova N., Rintamaki E. 2005. Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. *Exbot. Oupjournals. Org.* 56, 411: 347-56.
- Ayres P.G. 1992. Plants versus pests and pathogenes: An old story but the same story? En *Pests and Pathogenes: Plant Responses to Foliar Attack* (Ayres, P.G. Ed.). Bios. Scientific Publishers, Oxford.
- Babani F., Langsdorf G., Knapp M., Buschmann K., Lichtenthaler H.K. 2005. UV-A induced fluorescence images in sun and shade leaves. *BMC Plant Biology*. 5:S3 Meeting abstract.
- Baginsky S. y Gruissem W. 2004. Chloroplast proteomics: potentials and challenges. *J. Exp. Bot.* 55, 400: 1213-20.

- Bahrman N., Negróni L., Jaminon O., Le Gouis J. 2004. Wheat leaf proteome analysis using sequence data of proteins separated by two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*. 4: 2672-84.
- Bailiss K.W. 1970. Infection of cucumber cotyledons by cucumber mosaic virus and the participation of chlorophyllase in the development of the chlorotic lesions. *Ann Bot.* 34: 647-55.
- Baker N.R. y Rosenqvist E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J. Exp. Bot.*
- Balachandran S. y Osmond B.C. 1994. Susceptibility of Tobacco Leaves to Photoinhibition following Infection with Two Strains of Tobacco Mosaic Virus under Different Light and Nitrogen Nutrition Regimes. *Plant Physiol.* 104: 1051-57.
- Balachandran S., Hull J.R., Martins A.R., Vaadia Y., Lucas J.W. 1997a. Influence of environmental stress on biomass partitioning in transgenic tobacco plants expressing the movement protein of tobacco mosaic virus. *Plant Physiol.* 114: 475-81.
- Balachandran S., Hurry V.M., Kelley S.E., Osmond C.B., Robinson S.A., Rohozinski J., Seaton G.G.R., Sims D.A. 1997b. Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis. *Physiol. Plant.* 100: 203-13.
- Balachandran S., Osmond C.B., Daley F.P. 1994. Diagnosis of the Earliest Strain-Specific Interactions between Tobacco Mosaic Virus and Chloroplasts of Tobacco Leaves in Vivo by Means of Chlorophyll Fluorescence Imaging. *Plant Physiol.* 104: 1059-65.
- Balmer Y., Koller A., del Val G., Manieri W., Schürmann P., Buchanan B. 2003. Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *PNAS*. 100, 1: 370-75.
- Banerjee N., Wang J.Y., Zaitlin M. 1995. A single nucleotide change in the coat protein gene of tobacco mosaic virus is involved in the induction of severe chlorosis. *Virology*. 207: 234-39.
- Banks F.M., Driscoll S.P., Parry M.A.J., Lawlor D.W., Knight J.S., Gray J.C. and Paul M.J. 1999. Decrease in phosphoribulokinase activity by antisense RNA in transgenic

- tobacco. Relationship between photosynthesis, growth and allocation at different nitrogen levels. *Plant Physiol.* 119: 1125–1136.
- Baranski R., Baranska M., Schulz H. 2005. Changes in carotenoid content and distribution in living plant tissue can be observed and mapped in situ using NIR-FT-Raman spectroscopy. *Planta.* 222: 448-57.
- Barbagallo P.R., Oxborough K., Pallett E.K., Baker R.N. 2003. Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiol.* 132: 485-93.
- Baroli I., Gutman B.L., Ledford H.K., Shin J.W., Chin B.L., Havaux M., Niyogi K.K. 2004. Photo-oxidative stress in a xanthophyll-deficient mutant of *Chlamydomonas*. *Biol. Chem.* 279: 6337-44.
- Barón M., Rahoutei J., Lázaro J.J., Garcia-Luque I. 1995. PSII response to biotic and abiotic stress. *Photosynthesis: From Light to Biosphere. Vol.IV: 897-900* (Mathis,P. Ed.) Kluwer Academic Publishers.
- Bate-Smith, E. C. 1962. The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. *Journal of the Linnean Society of London, Botany* 58: 95-175.
- Benhamou N. y Bélanger R.R. 1998. Induction of systemic resistance to *Pythium* damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Plant J.* 14:13-21.
- Bennounn. P. 1982. Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 4352-56.
- Berger S., Papadopoulos M., Schreiber U., Kaiser W., Roitsch T. 2004. Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiol. Plant.* 122: 419-28.
- Bernier-Villamor L., Navarro E., Sevilla F., Lázaro J.J. 2004. Cloning and characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from *Pisum sativum*. *J Exp Bot.* 55:2191-9.
- Bertamini M. y Nedunchezian N. 2004. Photoinhibition and recovery of photosynthesis in leaves of *Vitis berlandieri* and *Vitis rupestris*. *J Plant Physiol.* 161:203-10.
- Bertsch W.F. y Azzi J.R. 1965. A relative maximum in the decay of long-term delayed light emission from the photosynthetic apparatus. *Biochim. Biophys. Acta.* 94:15-26.



- Bilger W. y Björkman O. 1990. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.* 25: 173-186.
- Bilger W., Veit M., Schreiber L., Schreiber, U. 1997. Measurement of leaf epidermal transmittance of UV radiation by chlorophyll fluorescence. *Physiologia Plantarum* 101: 754-763.
- Björkman O. y Demming B. 1987. Photon yield of O<sub>2</sub>-evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta.* 170: 489-504.
- Björn L.O. 1971. Far-red induced, long-live afterglow from photosynthetic cells. Size of afterglow unit and paths of energy accumulation and dissipation. *Photochemistry and Photobiology* 13, 5-20.
- Briantais J.M., Ducruet J.M., Hodges M., Krause G.H. 1992. The effects of low temperature acclimation and photoinhibitory treatments on Photosystem 2 studied by thermoluminescence and fluorescence decay kinetics. *Photosynth Res.* 31: 1-10.
- Bukhov N. y Carpentier R. 2004. Alternative Photosystem I-driven electron transport routes: mechanisms and functions. *Photosynth. Res.* 82: 17-33.
- Bukhov N.G., Heber U., Wiese C., Shuvalov V.A. 2001. Energy dissipation in photosynthesis: does the quenching of chlorophyll fluorescence originate from antenna complexes of photosystem II or from the reaction center? *Planta.* 212: 749-58.
- Burchard P., Bilger W., Weissenböck G. 2000. Contribution of hydroxycinnamates and flavonoids to epidermal shielding of UV-A and UV-B radiation in developing rye primary leaves as assessed by ultraviolet-induced chlorophyll fluorescence measurements. *Plant Cell Environ.* 23: 1373-1380.
- Buschmann C. y Lichtenthaler H.K. 1998. Principles and characteristics of multi-colour fluorescence imaging of plants 1,2. *J Plant Physiol.* 152: 297-314.
- Buschmann C., Langsdorf G., Lichtenthaler H.K. 2000. Imaging of the blue, green, and red fluorescence emission of plants: An overview. *Photosynthetica* 38: 483-91.
- Cartelat A. 2004. Étude de l'autofluorescence des feuilles de blé (*Triticum aestivum* L.).  
Universidad Paris-Sur (Francia)

- Cerovic Z.G., Bergher M., Goulas Y., Tosti S., Moya I. 1993. Simultaneous measurement of changes in red and blue fluorescence in illuminated chloroplasts and leaf pieces: the contribution of NADPH to the blue fluorescence signal. *Photosynth Res* 36: 193-204
- Cerovic Z.G., Langrand E., Latouche G., Morales F., Moya I. 1998. Spectral characterization of NAD(P)H fluorescence in intact isolated chloroplasts and leaves: Effect of chlorophyll concentration on reabsorption of blue-green fluorescence. *Photosynth Res* 56: 291-301.
- Cerovic Z.G., Ounis A., Cartelat A., Latouche G., Goulas Y., Meyer S., Moya I. 2002. The use of chlorophyll fluorescence excitation spectra for the non-destructive in situ assessment of UV-absorbing compounds in leaves. *Plant Cell Environment* 25: 1663-76.
- Cerovic Z.G., Samson G., Morales F., Tremblay N., Moya I. 1999. Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. *Agronomie* 19: 543-78.
- Chaerle L. y Van der Straeten D. 2000. Technical focus: imaging techniques and the early detection of plant stress. *Trends in Plant Science* 5: 495-503.
- Chaerle L. y Van der Straeten D. 2001. Seeing is believing: imaging techniques to monitor plant health. *Biochim Biophys Acta* 1519: 153-66.
- Chaerle L., Hagenbeek D., De Bruyne E., Valcke R., Van Der Straeten D. 2004. Thermal and chlorophyll-Fluorescence imaging distinguish plant-pathogen interactions at an early stage. *Plant Cell Physiol.* 45: 887-96.
- Chaerle L., Hulsen K., Hermans Ch., Strasser J.R., Valcke R., Höfte M., Van der Straeten D. 2003. Robotized time-lapse imaging to assess in-planta uptake of phenylurea herbicides and their microbial degradation. *Physiol. Plant.* 118: 613-19.
- Chaerle L., Van Caeneghem W., Messens E., Lambers H., Van Montagu M., Van Der Straeten D. 1999. Presymptomatic visualization of plant-virus interactions by thermography. *Nature Biotechnology* 17: 813-16.
- Chappelle E.W., Wood F.M., Newcomb W.W., McMurtrey J.E. 1985. Laser-induced fluorescence of green plants. 3: LIF spectral signatures of five major plant types, *Appl. Opt.*, 24(1): 74-80.

- Chen W, Provart N.J., Glazebrook J., Katagiri F., Chang H.S., Eulgem T., Mauch F., Luan S., Zou G., Whitham S.A., Budworth P.R., Tao Y., Xie Z., Chen X., Lam S., Kreps J.A., Harper J.F., Si-Ammour A., Mauch-Mani B., Heinlein M., Kobayashi K., Hohn T., Dangl J.L., Wang X., Zhu T. 2002. Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* 14:559-74.
- Cheragi O., Sicora C., Kos P.B., Nixon P.J., Vass I. 2005. The FtsH protease is required for the repair of Photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803 damaged UV-B radiation. *BMC Plant Biology* 5:S8. Meeting Abstract.
- Chou H.M., Bundock N., Rolfe A.S., Scholes D.J. 2000. Infection of *Arabidopsis thaliana* leaves with *Albugo candida* (white blister rust) causes a reprogramming of host metabolism. *Mol. Plant Pathol.* 2: 99-113.
- Chow W.S., Lee H.Y., Park Y.I., Park Y.M., Hong Y.N., Anderson J.M. 2002. The role of inactive photosystem-II-mediated quenching in a last-ditch community defence against high light stress in vivo. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 357:1441-50.
- Ciambella C., Roepstorff P., Aro E.M., Zolla L. 2005. A proteomics approach for investigation of photosynthetic apparatus in plants. *Proteomics* 5: 746-57.
- Ciscato M., Sowinska M., Vande Ven M., Heisel F., Deckers T., Bonany J., Valcke R. 2000. Fluorescence imaging as a diagnostic tool to detect physiological disorders during storage of apples. *Acta Hort* 553: 07-512.
- Ciscato, M. 2000. Development of a fluorescence imaging system for quality assesment of fruits and vegetables. Tesis Doctoral. Universidad de Limburg (Bélgica).
- Codrea M., Tyystjärvi E., Vande Ven M., Valcke R., Nevalainen O. 2002. Classifying apples by the means of fluorescence imaging. *Technical Report* 455: 1-24.
- Constantin-Roman M. 2000 Etude spectroscopique des effets de stress thermique sur la membrane photosynthétique: relations avec les données écophysiologicals. Tesis Doctoral. Universidad Paris-Sud-Orsay y Bucarest.
- Conti G.G., Vegetti G., Bassi M., Favalli M.A. 1972. Some structural and cytochemical observations on chinese cabbage leaves infected with cauliflower mosaic virus. *Virology* 47: 649-700.

- Corp L.A., McMurtrey J.E., Chappelle E.W., Daughtry C.S.T., Kim M.S. 1997. UV band fluorescence (in vivo) and its implications for the remote assessment of nitrogen supply in vegetation. *Remote Sens. Environ.* 61:110-117.
- Critchley C. y Russel A.W. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in vivo: The role of protein turnover in photosystem II. *Physiol. Plant.* 92: 188-196.
- Dai G.H., Andary C., Mondolot-Cosson L., Boubals D. 1995. Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia* and the downy mildew fungus, *Plasmopara viticola*. *Physiol Mol Plant Pathol* 46: 177-188
- Daley P.F., Raschke K., Ball J.T., Berry. J.A. 1989. Topography of photosynthetic activity of leaves obtained from video images of chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol* 90: 1233-38.
- Dat J., Vandenameele S., Vranova E., Van Montagu M., Inze D., Van Breusegem F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci.* 57:779-95.
- Davison P.A., Hunter C.N., Horton P. 2002. Overexpression of beta-carotene hydroxylase enhances stress tolerance in Arabidopsis. *Nature.* 418: 203-6.
- Dawson O.W. 1992. Tobamovirus-Plant Interactions. *Virology* 186: 359-67.
- del Moral, R. 1972. On the variability of chlorogenic acid concentration. *Oecologia* 9: 289-300.
- DellaPenna D. 1999. Carotenoid synthesis and function in plants: Insights from mutant studies in Arabidopsis thaliana. *Pure and Applied Chemistry* 71:2205-2212.
- Demeter S. y Govindjee. 1989. Thermoluminescence in plants. *Physiol.Plant.* 75: 121-30.
- Demeter S. y Vass I. 1984. Charge accumulation and recombination in Photosystem II studied by thermoluminescence. I. Participation of the primary acceptor Q and secondary acceptor B in the generation of thermoluminescence of chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 764: 24-32
- Demeter S., Droppa M., Vass I., Horváth G. 1982. Thermoluminescence of chloroplasts in the presence of Photosystem II herbicides. *Photobiochem. Photobiophys.* 4: 163-168

- Demeter S., Rozsa Zs., Vassand I., Sallai A. 1985. Thermoluminescence study of charge recombination in photosystem II at low temperatures. I. characterization of the Zv and A thermoluminescence bands. *Biochim Biophys Acta* 809: 369-78.
- Demmig-Adams B 2003. Linking the xanthophyll cycle with thermal energy dissipation. *Photosynth Res.* 76: 73-80
- Demmig-Adams B., Adams III W.W., Barker H.D., Logan A.B., Bowling R.D., Verhoeven S.A. 1996. Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiol Plant* 98: 253-64.
- Dennison C. y Lovrien R. 1997. Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. *Protein Expr Purif.* 11:149-61. Review.
- Desai T.S., Sane P.V., Tatake V.G. 1975. Thermoluminescence studies on spinach leaves and *Euglena*. *Photochem Photobiol.* 21:345-350
- Dixon R.A. y Paiva N.L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085-1097.
- Dong Yoo S., Greer D.H., Laing W.A., McManus M.T. 2003. Changes in photosynthetic efficiency and carotenoid composition in leaves of white clover at different developmental stages. *Plant Physiol. Biochemistry.* 41: 887-893
- Donnelly E.B., Madden D.R., Ayoubi P., Porter R.D., Dillwith W.J. 2005. The wheat (*Triticum aestivum* L.) leaf proteome. *Proteomics* 5: 1624-33.
- Ducruet J-M. 2003. Chlorophyll thermoluminescence of leaf disc: simple instruments and progress in signal interpretation open the way to new ecophysiological indicators. *J. Exp. Bot.* 54: 2419-30.
- Ducruet J-M. y Vavilin D. 1999. Chlorophyll high-temperature thermoluminescence emission as an indicator of oxidative stress: Perturbating effects of oxygen and leaf water content. *Free Rad. Res* 31: 187-92.
- Ducruet J-M., Román M., Havaux M., Janda T., Gallais A. 2005. Cyclic electron flow around PSI monitored by afterglow luminescence in leaves of maize inbred lines (*Zea mays* L.). Correlation with chilling tolerance.
- Ducruet J-M., Román M., Ortega J-M., Janda T. 2004. Role of the oxidized secondary acceptor Q<sub>B</sub> of Photosystem II in the delayed "afterglow" chlorophyll luminescence. *Photosynth. Res.* 00: 1-6.

- Escaler M., Aranda A.M., Roberts M.I., Thomas L.C., Maule J.A. 2000. A comparison between virus replication and abiotic stress (heat) as modifiers of host gene expression in pea. *Molecular Plant Pathology* 1: 159-67.
- Farineau J. 1993. Compared thermoluminescence characteristics of pea thylakoids studied in vitro and in situ (in leaves). The effect of photoinhibitory treatments. *Photosynth Res* 36: 25-34.
- Fenton M.J. y Crofts R.A. 1990. Computer aided fluorescence imaging of photosynthetic systems: Application of video imaging to the study of fluorescence induction in green plants and photosynthetic bacteria. *Photosynth Res* 26: 59-66.
- Ferro M., Salvi D., Brugiére S., Miras S., Kowalski S., Louwagie M., Garin Joyard J., Rolland N. 2003. Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Proteomics*. 2: 325-45. Epub 2003 May 23.
- Ferro M., Salvi D., Rivière-Rolland H., Vermat T., Seigneurin-Berny D., Grunwald D., Garin J., Joyard J., Rolland N. 2002. Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: identification and subcellular localization of new transporters. *PNAS* 99: 11487-92.
- Ferry-Dumazet H., Houel G., Montalent P., Moreau L., Languella O., Negroni L., Vincent D., Lalanne C., de Daruvar A., Plomion C., Ziyi M., Joets J. 2005. PROTiCdb: A web-based application to store, track, query, and compare plant proteome data. *Proteomics* 5: 2069-81.
- Finazzi G., Rappaport F., Furia A., Fleischmann M., Rochaix J-D., Zito F., Forti G. 2002. Involvement of state transitions in the switch between linear and cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO Reports* 31: 280-285.
- Fleischmann F, Göttlein A, Rodenkirchen H, Lütz C, Oßwald W. 2004. Biomass, nutrient and pigment content of beech (*Fagus sylvatica*) saplings infected with *Phytophthora citricola*, *P. cambivora*, *P. pseudosyringae* and *P. undulata*. *Forest Pathology* 34: 79-92.
- Flor-Henry M., McCabe T. C., de Bruxelles G. L. y Roberts M.R. 2004. Use of a highly sensitive two-dimensional luminescence imaging system to monitor endogenous bioluminescence in plant leaves. *BMC Plant Biology*. 4:19.

- Friso G., Giacomelli L., Ytterberg J.A., Peltier J-B., Rudella A., Sun Q., van Wijk J.K. 2004. In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. *Plant Cell* 16: 478-99.
- Froehlich J.E., Wilkerson C.G., Ray W.K., McAndrew R.S., Osteryoung K., W. Gage D.A., Phinney B.S. 2003. Proteomics study of the *Arabidopsis thaliana* chloroplastic envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis. *J. Proteome Res.* 2: 413-25.
- Fryer M.J., Ball L., Oxborough K., Karpinski S., Mullineaux P.M., Baker N.R. 2003. Control of ascorbate peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organisation of *Arabidopsis* leaves. *Plant Journal* 33: 691-705.
- Fryer M.J., Mullineaux P.M., Baker N.R. 2002. Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves. *Journal Experimental Botany* 53: 1249-54.
- Funayama S., Hikosaka K., Yahara T. 1997a. Effects of virus infection and growth irradiance on fitness components and photosynthetic properties of *Eupatorium Makinoi* (Compositae). *American Journal Botany* 84: 823-29.
- Funayama S., Sonoike K., Terashima I. 1997b. Photosynthetic properties of leaves of *Eupatorium makinoi* infected by a geminivirus. *Photosynth. Res.* 53: 253-61.
- Funayama S., Terashima I., Yahara T. 2001. Effects of virus infection and light environment on population dynamic of *Eupatorium Makinoi* (Asteraceae). *American Journal Botany* 88: 616-22.
- Ganeteg U., Kulheim C., Andersson J., Jansson S. 2004. Is each light-harvesting complex protein important for plant fitness? *Plant Physiol.* 134:502-9.
- Garab G., Lajko F., Mustardy L., Marton L. 1989. Respiratory control over photosynthetic electron transport in chloroplasts of higher-plant cells: evidence for chlororespiration. *Planta* 179, 349-358.
- Genty B. y Meyer S. 1994. Quantitative mapping of leaf photosynthesis using chlorophyll fluorescence imaging. *Aust J Plant Physiol* 22: 277-84.

- Genty B., Briantais J.M., Baker R.N. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta.* 990: 87-92.
- Gilbert M., Skotnica J., Weingart I., Wilhelm C. 2002. Thermoluminescence as a selective tool for monitoring plant stress: a method not only interesting for basic research but also for plant breeding institutions screening for new stress tolerant plant varieties. *13<sup>th</sup> Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology*, Creta (Grecia).
- Gilbert M., Skotnica J., Weingart I., Wilhelm C. 2004. Effects of UV irradiation on barley and tomato leaves: thermoluminescence as a method to screen the impact of UV radiation on crop plants. *Functional Plant Biology* 31:825-45.
- Glémin A., Miranda T., Ducruet J.M. 1992. Temperature behaviour of photosystem II in chilling-resistant and chilling-susceptible plant species, studied by fluorescence and luminescence methods. En: *Research in photosynthesis*, Vol. IV. 85-188 (Murata N, Ed.) Utrecht: Kluwer.
- Glombitza S., Dubuis P.H., Thulke O., Welzl G., Bovet L., Gotz M., Affenzeller M., Geist B., Hehn A., Asnaghi C., Ernst D., Seidlitz H.K., Gundlach H., Mayer K.F., Martinoia E., Werck-Reichhart D., Mauch F., Schaffner A.R. 2004. Crosstalk and differential response to abiotic and biotic stressors reflected at the transcriptional level of effector genes from secondary metabolism. *Plant Mol Biol.* 54:817-35.
- Goff S.A., Ricke D., Lan T.H., Presting G., Wang R., Dunn M., Glazebrook J., Sessions A., Oeller P., Varma H., Hadley D., Hutchison D., Martin C., Katagiri F., Lange B.M., Moughamer T., Xia Y., Budworth P., Zhong J., Miguel T., Paszkowski U., Zhang S., Colbert M., Sun W.L., Chen L., Cooper B., Park S., Wood T.C., Mao L., Quail P., Wing R., Dean R., Yu Y., Zharkikh A., Shen R., Sahasrabudhe S., Thomas A., Cannings R., Gutin A., Pruss D., Reid J., Tavtigian S., Mitchell J., Eldredge G., Scholl T., Miller R.M., Bhatnagar S., Adey N., Rubano T., Tusneem N., Robinson R., Feldhaus J., Macalma T., Oliphant A., Briggs S., 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science.* 296: 92-100.
- Golem S., Culver J.N. 2003. Tobacco mosaic virus induced alterations in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact.* 16:681-8.



- Gomez M.S., Bil Y.K., Aguilera R., Nishio N.J., Faull F.K., Whitelegge P.J. 2003. Transit peptide cleavage sites of integral thylakoid membrane proteins. *Molecular Cellular Proteomics* 2: 1068-85.
- Gomez S.M., Nishio J.N., Faull K.F., Whitelegge J.P. 2002. The chloroplast grana proteome defined by intact mass measurements from liquid chromatography mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 1: 46-59.
- Goodman R., N. Király Z., Wood R.K. 1986. Photosynthesis. *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease*. 2: 46-74.
- Gotz T., Sandmann G., Romer S. 2002. Expression of a bacterial carotene hydroxylase gene (*crtZ*) enhances UV tolerance in tobacco. *Plant Mol Biol*. 50:129-42.
- Govindjee, Koike H., Inoue Y. 1985. Thermoluminescence and oxygen evolution from a thermophilic blue-green alga obtained after single-turnover flashes. *Photochem. Photobiol.* 42: 579-585
- Govindjee. 1995. Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll a fluorescence. *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 131-160.
- Gunasinghe U.B. y Berger P.H. 1991. Association of Potato Virus y Gene Products with Chloroplasts in Tobacco. *Molecular Plant - Microbe Interactions* 4: 452-57.
- Haake V., Zrenner R., Sonnewald U., Stitt M. 1998. A moderate decrease of plastid aldolase activity inhibits photosynthesis, alters the levels of sugars and starch, and inhibits growth of potato plants. *Plant J.* 14:147-57.
- Haas B.J., Volfovsky N., Town C.D., Troukhan M., Alexandrov N., Feldmann K.A., Flavell R.B., White O., Salzberg S.L. 2002. Full-length messenger RNA sequences greatly improve genome annotation. *Genome Biol.* 3:RESEARCH0029. Epub 2002 May 30.
- Harris P.J. y Hartley R.D. 1976. Detection of bound ferulic acid in cell walls of the Gramineae by ultraviolet fluorescence microscopy. *Nature* 259: 508-510.
- Harrison E.P., Willingham N.M., Lloyd J.C., Raines C.A. 1998. Reduced sedoheptulose-1,7-bisphosphatase levels in transgenic tobacco lead to decreased photosynthetic capacity and altered carbohydrate accumulation. *Planta*. 204: 27-36
- Hartley R.D. y Harris P.J. 1981. Phenolic constituents of the cell walls of dicotyledons. *Biochem Syst Ecol* 9: 189-203.

- Harvaux M., Kloppstech K. 2001. The protective functions of carotenoid and flavonoid pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in *Arabidopsis npq* and *tt* mutants. *Planta*. 213:953-66.
- Havaux M. 1996. Short-term response of photosystem I to heat stress. *Photosynth. Res.* 47: 85-97.
- Havaux M. 2003. Spontaneous and thermoinduced photon emission: new methods to detect and quantify oxidative stress in plants. *TRENDS in Plant Science* 8: 103-13
- Havaux M. y Niyogi K.K. 1999. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8762–8767
- Havaux M., Bonfils J.P., Lutz C., Niyogi K.K. 2000. Photodamage of the photosynthetic apparatus and its dependence on the leaf developmental stage in the *npq1* *Arabidopsis* mutant deficient in the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase. *Plant Physiol.* 124:273-84.
- Havaux M., Bonfils J.P., Lutz C., Niyogi K.K. 2000. Photodamage of the photosynthetic apparatus and its dependence on the leaf developmental stage in the *npq1* *Arabidopsis* mutant deficient in the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase. *Plant Physiol.* 124:273-84.
- Havelda Z. y Maule J.A. 2000. Complex spatial responses to cucumber mosaic virus infection in susceptible cucurbita pepo cotyledons. *Plant Cell* 12: 1975-85.
- Heisel F., Sowinska M., Miehe J.A., Lang M., Lichenthaler H.M. 1996. Detection of nutrient deficiencies of maize by laser induced fluorescence imaging. *Journal of Plant Physiology* 148: 622-31.
- Herbers K., Takahata Y., Melzer M., Mock P.H., Hajirezael M. 2000. Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco. *Mol. Plant Pathol.* 1: 51-59.
- Herranen M., Battchikova N., Zhang P., Graf A., Siriö S., Paakkarinen V., Aro E-M. 2004. Towards functional proteomics of membrane protein complexes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant. Physiol.* 134: 470-481.
- Hideg E. y Vass I. 1993. The 75°C thermoluminescence band of green tissues: chemiluminescence from membrane-chlorophyll interaction. *Photochem. Photobiol.* 58: 00-00.

- Hideg E., Sass L., Barbato R., Vass I. 1993. Inactivation of photosynthetic oxygen evolution by UV-B irradiation: A thermoluminescence study. *Photosynth. Res.* 38: 455-62.
- Hodgson A.J.R., Beachy N.R., Pakrasi B.H. 1989. Selective inhibition of photosystem II spinach by tobacco mosaic virus: an effect of the viral coat protein. *FEBS Lett* 245: 267-70.
- Hofius D., Herbers K., Melzer M., Omid A., Tacke E., Wolf S., Sonnewald U. 2001. Evidence for expression level-dependent modulation of carbohydrate status and viral resistance by the potato leafroll virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant J.* 28: 529-544.
- Holt N.E., Fleming G.R., Niyogi K.K. 2004. Toward an Understanding of the mechanism of nonphotochemical quenching in green plants. *Biochemistry* 43: 8281-89.
- Homann P.H. 1993. Thermoluminescence properties of the S2-state in chloride-depleted water oxidizing complexes after reconstituting treatments with various monovalent anions. *Photosynth. Res.* 38: 395-400.
- Homann P.H. y Madabusi L.V. 1993. Modification of the thermoluminescence properties of Ca<sup>2+</sup> depleted photosystem II membranes by the 23KDa extrinsic polypeptide and by oligocarboxylic acids. *Photosynth Res* 35: 29-39.
- Horton P. y Hague A. 1988. Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplast. IV. Resolution of non-photochemical quenching. *Biochim. Biophys. Acta* 932: 107-15.
- Horváth G. 1986. Usefulness of thermoluminescence in herbicide research. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences* 4: 293-310.
- Horváth G., Arellano J.B., Droppa M., Barón M. 1998. Alterations in photosystem II electron transport as revealed by thermoluminescence of Cu-poisoned chloroplast. *Photosynthesis Research* 57: 175-82.
- Horváth G., Droppa M., Fodorpataki L., Istókovics A., Garab G., Oettmeier W. 1996. Acridones: A chemically new group of protonophores. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3876-80.
- Houtz R.L., Portis A.R. Jr. 2003. The life of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase--posttranslational facts and mysteries. *Arch Biochem Biophys.* 414:150-8.

- Huala E., Dickerman A.W., Garcia-Hernandez M., Weems D., Reiser L., LaFond F., Hanley D., Kiphart D., Zhuang M., Huang W., Mueller L.A., Bhattacharyya D., Bhaya D., Sobral B.W., Beavis W., Meinke D.W., Town C.D., Somerville C., Rhee S.Y. 2001. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic Acids Res.* 1; 29:102-5.
- Huber C.G., Timperio A.M., Zolla L. 2001. Isoforms of photosystem II antenna proteins in different plant species revealed by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Biol Chem.* 276:45755-61. Epub 2001 Oct 1.
- Huber C.G., Walcher W., Timperio A.M., Troiani S., Porced du A., Zolla L. 2004. Multidimensional proteomic analysis of photosynthetic membrane proteins by liquid extraction-ultracentrifugation-liquid chromatography-mass spectrometry. *Proteomics* 4: 3909-20.
- Hull R. 2002. *Matthew's Plant Virology*. 4th ed. Academic Press.
- Huybrechts C, Deckers T, Valcke R 2003. Predicting fruit quality and maturity of apples by fluorescence imaging: effect of ethylene and AVG. *Acta Horti* 599: 243-247
- Ichikawa T., Inoue Y., Shibata K. 1975. Characteristics of thermoluminescence bands in intact leaves and isolated chloroplasts in relation to the water-splitting activity in photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 408: 228–239
- Inoue Y. 1976. Manganese catalyst as a possible cation carrier in thermoluminescence. *FEBS Lett* 72: 279–282
- Inoue Y. 1981. Charging of the A band thermoluminescence dependent on the S3-state in isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 634: 309–320
- Inoue Y. 1983. Recent advances in the studies of thermoluminescence of Photosystem II. En: *The Oxygen Evolving System of Photosynthesis*, 439–450. (Inoue Y, Crofts AR, Govindjee, Murata N, Renger G, and Satoh K ,eds) Academic Press Japan, Tokyo.
- Inoue Y. 1996. Photosynthetic thermoluminescence as a simple probe of photosystem II electron transport. *Biophysical techniques in photosynthesis*. 93-107 (Amesz J. y Hoff A.J.) Kluwer Academic Publishers.

- Inoue Y., Ichikawa T., Shibata K. 1976. Development of thermoluminescence bands during greening of wheat leaves under continuous and intermittent illumination. *Photochem. Photobiol.* 23: 125–130
- Janda T., Wiessner W., Paldi E., Mende D., Demeter S. 1992. Thermoluminescence Investigation of Photoinhibition in the Green Alga, *Chlamydomonas stellata* and in *Pisum sativum* L. Leaves. *Z Naturforsch* 47c: 585-90.
- Johnson G., Mantha S., Day T. 2000. A spectrofluorometric survey of UV-induced blue-green fluorescence in foliage of 35 species. *J. Plant Physiol.* 156: 242–252.
- Kang G.J., Pyo J.Y., Cho W.J., Cho H.M. 2004. Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by K<sup>+</sup> deficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics* 4: 3549-59.
- Karpinski S, Reynolds H, Karpinska B, Wingsle G, Creissen G, Mullineaux P. 1999. Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science*. 23;284(5414):654-7.
- Karpinski S., Gabrys H., Mateo A., Karpinska B., Mullineau M.P. 2003. Light perception in plant disease defence signalling. *Curr Opin Plant Biol.* 6: 390-396.
- Kautsky H., Hirsch A. 1931. Neue Versuche zur Kohlenstoffassimilation. *Naturwissenschaften*. 19: 964-971.
- Kenyon G.L., DeMarini D.M., Fuchs E., Galas D.J., Kirsch J.F., Leyh T.S., Moos W.H., Petsko G.A., Ringe D., Rubin G.M., Sheahan L.C. 2002. National Research Council Steering Committee. Defining the mandate of proteomics in the post-genomics era: workshop report. *Mol Cell Proteomics* 1:763-80.
- Kieselbach T., Bystedt M., Hynds P., Robinson C., Schröder P.W. 2000. A peroxidase homologue and novel plastocyanin located by proteomics to the *Arabidopsis* chloroplast thylakoid lumen. *FEBS Lett* 480: 271-76.
- Kieselbach T., Hagman A., Andersson B., Schröder W.P. 1998. The thylakoid lumen of chloroplast. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 273: 6710-6716.
- Kieselbach T., Schröder P.W. 2003. The proteome of the chloroplast lumen of higher plants. *Photosynth. Res.* 78: 249-64.

- Kim T.S., Kim G.S., Hwang H.D., Kang Y.S., Kim J.H., Lee H.B., Lee J.J., Kang Y.K. 2004. Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from rice leaves induced by rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Proteomics* 4: 3569-78.
- Kleffmann T., Russenberger D., von Zychlinski A., Christopher W., Sjölander K., Gruissem W., Baginsky S. 2004. The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Current Biology* 14: 354-62.
- Koiwa H., Kojima M., Ikeda T., Yoshida Y. 1992. Fluctuations of Particles on Chloroplast Thylakoid Membranes in Tomato Plants Infected with Virulent or Attenuated Strain of Tobacco Mosaic Virus. *Ann Phytopath Soc Japan* 58: 58-64.
- Koiwa H., Kojima M., Yoshida Y. 1989. Ultrastructural Observations on Chloroplasts in Tomato Plants Infected with an Attenuated Strain (L11 A) of Tobacco Mosaic Virus. *Ann Phytopath Soc Japan* 55: 41-48.
- Koo A.J. y Ohlrogge J.B. 2002. The predicted candidates of *Arabidopsis* plastid inner envelope membrane proteins and their expression profiles. *Plant Physiol.* 130:823-36.
- Krapp A. y Stitt M. (1995). An evaluation of direct and indirect mechanism for the "sink-regulation" of photosynthesis in spinach: Changes in gas exchange, carbohydrates, metabolites, enzymes activities and steady-state transcript levels after cold-girdling source leaves. *Planta* 195: 313-323.
- Krieger A. y Weis E. 1993. The role of calcium in the pH-dependent control of photosystem II. *Photosynth. Res.* 37: 117-130.
- Krieger A., Bolte S., Dietz K.J., Ducruet J.M. 1998. Thermoluminescence studies on the facultative crassulean-acid-metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Planta*. 205: 587-94.
- Krieger A., Rutheford A.W., Jegerschöld C. 1998. Thermoluminescence measurements on chloride-depleted and calcium-depleted photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1364: 46-54.
- Krieger-Liszkay A. 2004. Singlet oxygen production in photosynthesis. *J Exp Bot.* 56: 337-46.

- Kyle D.J., Staehelin L.A., Arntzen C.J. 1983. Lateral mobility of the light-harvesting complex in chloroplast membranes controls excitation energy distribution in higher plants. *Arch Biochem Biophys*, 222, 527–541.
- Lang M., Lichtenthaler H.K., Sowinska M., Summ P., Heisel F. 1994. Blue, green and red fluorescence signatures and images of tobacco leaves. *Bot. Acta* 107: 230-36.
- Lang M., Lichtenthaler K.H., Sowinska M. 1996. Fluorescence imaging of water and temperature stress in plant leaves. *J Plant Physiol*. 148: 613-21.
- Lang M., Stober F., Lichtenthaler H.K. 1991. Fluorescence emission spectra of plant leaves and plant constituents. *Radiat. environ. Biophys*. 30: 333–347.
- Lavorel J. y Etienne A.L. 1977. In Vivo Chlorophyll Fluorescence. En: Primary Processes of Photosynthesis. 206-268 (Barber J., Ed.) Elsevier, Holland, London.
- Lawson T., Oxborough K., Morrison J.I.L., Baker N.R. 2002. Responses of photosynthetic electron transport in stomatal guard cells on mesophyll cells in intact leaves to light, CO<sub>2</sub>, and humidity. *Plant Physiol*. 128: 52-62.
- Lefebvre S., Lawson T., Zakhleniuk O.V., Lloyd J.C., Raines C.A. 2005. Increased sedoheptulose-1,7-bisphosphatase activity in transgenic tobacco plants stimulates photosynthesis and growth from an early stage in development. *Plant Physiol*. 138: 451-60.
- Lehto K., Tikkanen M., Hiriart J-B., Paakkari V., Aro E-M. 2003. Depletion of the photosystem II core complex in mature tobacco leaves infected by the Flavum strain of Tobacco mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 1135-44.
- Leipner J., Oxborough K., Baker N.R. 2001. Primary sites of ozone-induced perturbations of photosynthesis in leaves: identification and characterization in *Phaseolus vulgaris* using high resolution chlorophyll fluorescence imaging. *J. Exp. Bot*. 52: 1689-1696.
- Li X.P., Björkman O., Shih C., Grossman A.R., Rosenquist M., Jansson S., Niyogi K.K. 2000. A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* 403: 391-395
- Lichtenthaler H.K. 1996. Vegetation stress: an introduction to the stress concept plants. *J Plant Physiol* 148: 4-14.
- Lichtenthaler H.K. y Babani F. 2000. Detection of photosynthetic activity and water stress by imaging the red chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol Biochem* 38: 889-95.

- Lichtenthaler H.K. y Miehe J.A. 1997. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends in Plant Science* 2: 316-20.
- Lichtenthaler H.K. y Rinderle U. 1988. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 19: S29-S85.
- Lichtenthaler H.K. y Schweiger J. 1998. Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plants. *Journal of Plant Physiology* 152: 272-82.
- Lichtenthaler H.K., Lang M., Sowinska M., Summ P., Heisel F., Miehe J.A. 1997. Uptake of the herbicide diuron as visualised by the fluorescence imaging technique. *Bot.Acta* 110: 158-63.
- Lichtenthaler H.K., Stober F, Lang M. 1992. The nature of the different laser-induced fluorescence signatures of plants. *EARSeL Adv. Remote Sens.* 1: 20-32.
- Lichtenthaler H.K., Stober F., Lang M.1992. The nature of the different laser-induced fluorescence signstures of plants. *EARSeL Adv. Remote Sens.* 1:20-32
- Lindbeck A.G.C., Dawson O.W., Thomson W.W. 1991. Coat protein-related polypeptides from in Vitro tobacco mosaic virus coat protein mutants do not accumulate in the chloroplast of directly inoculated leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4: 89-94.
- Lohaus G., Heldt H.W., Osmond C.B. 2000. Infection with phloem limited abutilon mosaic virus causes localized carbohydrate accumulation in leaves of abutilon striatum: relationships to symptom development and effects on chlorophyll fluorescence quenching during photosynthetic induction. *Plant. Biol.*, 2: 161-67.
- Lu C., Lu Q., Zhang J., Kuang T. 2001. Characterization of photosynthetic pigment composition, photosystem II photochemistry and thermal energy dissipation during leaf senescence of wheat plants grown in the field. *J Exp Bot.* 52: 1805-10.
- Lucas J.W., Olesinki A., Hull J.R., Haudenschild S.J., Deom M.C., Beachy N.R., Wolf S. 1993. Influence of the tobacco mosaic virus 30-kDa movement protein on carbon metabolism and photosynthate partitioning in transgenic tobacco plants. *Planta* 190: 88-96.



- Lüdeker W., Hans-Günter D., Günther K.P. 1996. Detection of fungal infection of plants by laser-induced fluorescence: an attempt to use remote sensing. *J.Plant.Physiol* 148: 579-85.
- Manuel N., Cornic G., Aubert S., Cholet Bligny P., Heber U. 1999. Protection against photoinhibition in the alpine plant *Geum montanum*. *Oecologia* 119: 149-158.
- Marder J.B., Droppa M., Varde C., Raskin V.I., Horváth G. 1998. Light-independent thermoluminescence from thylakoids of greening barley leaves.evidence for involvement of oxygen radicals and chlorophyll. *Physiol. Plant.* 104: 713-19.
- Marouga R., David S., Hawkins E. 2005. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem.* 382:669-78. Epub 2005 May 18.
- Masclaux-Daubresse C., Carrayol E., Valadier M.H. 2005. The two nitrogen mobilisation- and senescence-associated GS1 and GDH genes are controlled by C and N metabolites. *Planta* 221:580-8.
- Maxwell D. P., Laudenbach D. E., Huner N. P. A. 1995. Redox Regulation of Light-Harvesting Complex II and cab mRNA Abundance in *Dunaliella salina* *Plant Physiol.* 109: 787-795.
- Mellvig S. y Tillberg J.S. 1986. Transient peaks in the delayed luminescence from *Scenedesmus obtusiusculus* induced by phosphorous starvation and carbon dioxide deficiency. *Physiologia Plantarum* 28, 180-188.
- Mercure S-A., Daoust B., Samson G. 2004.-Causal relationship between growth inhibition, accumulation of phenolic metabolites, and changes of UV-induced fluorescences in nitrogen-deficient barley plants. *Can J. Bot.* 82: 815-821
- Meyer S., Saccardy-Adji K., Rizza F., Genty B. 2001. Inhibition of photosynthesis by *Colletotrichum lindemuthianum* in bean leaves determined by chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Cell and Environment* 24: 947-55.
- Middleton E.M., Chappelle E.W., Cannon T.A., Adamse P., Britz S.J. 1996. Initial assessment of physiological response to UV-B irradiation using fluorescence measurements J. *Plant. Physiol.* 148: 69-77.

- Miranda T. y Ducruet J.M. 1995a. Characterization of the chlorophyll thermoluminescence afterglow in dark-adapted or far-red-illuminated plant leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 33: 689-99.
- Miranda T. y Ducruet J.M. 1995b. Effects of dark – and light – induced proton gradients in thylakoids on the Q and B thermoluminescence bands. *Photosynthesis Research.* 43: 251-262.
- Misra A.N., Dilanwaz F., Misra M., Biswal A.K. 2001. Thermoluminescence in chloroplasts as an indicator in photosystem 2 reaction centre by biotic and abiotic stress. *Photosynthetica* 39: 1-9.
- Morales F., Cartelat A., Meyer S., Moya I., Cerovic Z. 1994. Time-resolved blue-green fluorescence of artichoke leaves. Acta Horticulturae 660.V International Congress on Artichoke.
- Morales F., Cerovic G.Z., Moya I. 1994. Characterization of blue-green fluorescence in the mesophyll of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves affected by iron deficiency. *Plant Physiol* 106: 127-33.
- Morales F., Cerovic G.Z., Moya I. 1996. Time-resolved blue-green fluorescence of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. Spectroscopic evidence for the presence of ferulic acid as the main fluorophore of the epidermis. *Biochim Biophys Acta* 1273: 251-62.
- Motohashi K., Kondoh A., Stumpp M.T., Hisabori T. 2001. Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *PNAS.* 98:11224-9. Epub 2001 Sep 11.
- Müller P., Xiao-Ping Li., Krishna K., Niyogi. 2001. Non-photochemical quenching. a response to excess light energy. *Plant Physiology* 125: 1558-66.
- Mullineaux P. y Karpinski S. 2002. Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast. *Curr Opin Plant Biol* 5:43-8.
- Naidu R.A., Krishnan M., Nayudu M.V., Gnanam A. 1984b. Studies on peanut green mosaic virus infected peanut (*Arachis hypogaea* L.) leaves. II Chlorophyll-protein complexes and polypeptide composition of thylakoid membranes. *Physiol. Plant Pathol.* 25: 191-98.
- Naidu R.A., Krishnan M., Nayudu M.V., Gnanam A. 1986. Studies on peanut green mosaic virus infected peanut (*Arachis hypogaea* L.) leaves. III. Changes in the polypeptides of photosystem II particles. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 29: 53-58.

- Naidu R.A., Krishnan M., Ramanajam P., Gnanam A., Nayudu M.V. 1984a. Studies on peanut green mosaic virus infected peanut (*Arachis hypogaea* L.) leaves. I. Photosynthesis and photochemical reactions. *Physiol. Plant Pathol.* 25: 181-190.
- Nedbal L., Soukupová J., Kaftan D., Whitmarsh J., Trtilek M. 2000. Kinetic imaging of chlorophyll fluorescence using modulated light. *Photosynth Res* 66: 3-12.
- Nedbal L., Soukupová J., Whitmarsh J., Trtiler M. 2000. Postharvest imaging of chlorophyll fluorescence from lemons can be used to predict fruit quality. *Photosynthetica* 38: 571-79.
- Newton R.P., Brenton A.G., Smith C.J., Dudley E. 2004. Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. *Phytochemistry* 11: 1449-85.
- Nilsson H-E. 1995. Remote sensing and image analysis in plant pathology. *Ann. Rev. Phytopathol* 15: 489-527.
- Ning L., Edwards G.E., Strobel G.A., Daley L.S., Callis J.B. 1995. Imaging fluorometer to detect pathological and physiological change in plants. *Applied Spectroscopy* 49: 1381-89.
- Nixon P.J., Barker M., Boehm M., de Vries R., Komenda J. 2005. FtsH-mediated repair of the photosystem II complex in response to light stress. *J Exp Bot.* 56:357-63.
- Niyogi K.K., Bjorkman O., Grossman A.R. 1997. Chlamydomonas xanthophyll cycle mutants identified by video imaging of chlorophyll fluorescence quenching. *Plant Cell* 9: 1369-80.
- Niyogi K.K., Shih C., Soon Chow W., Pogson B.J., Dellapenna D., Bjorkman O. 2001. Photoprotection in a zeaxanthin-and lutein-deficient double mutant of Arabidopsis. *Photosynth Res.* 67:139-45.
- Oja V. y Laisk A. 2000. Oxygen yield from single turnover flashes in leaves: non-photochemical excitation quenching and the number of active PSII. *Biochimica Biophysica Acta* 1460: 291-301.
- Ono T. e Inoue Y. 1985. S-state turnover in the O<sub>2</sub>-evolving system of CaCl<sub>2</sub>-washed Photosystem II particles depleted of three peripheral proteins as measured by thermoluminescence: removal of 33 kDa protein inhibits S<sub>3</sub> to S<sub>4</sub> transition. *Biochim. Biophys. Acta* 805: 331-340

- Ono T. e Inoue Y. 1989. Roles of Ca<sub>2+</sub> in O<sub>2</sub> evolution in higher plant photosystem II: effects of replacement of Ca<sub>2+</sub> site by other cations. *Archives Biochem. Biophys.* 275: 440-448.
- Osmond B.C., Daley F.P., Badger R.M., Lüttge U. 1998. Chlorophyll fluorescence quenching during photosynthetic induction in leaves of *Abutilon striatum* Dicks. Infected with *Abutilon mosaic virus*, observed with a Fiel-Portable imaging system. *Bot. Acta* 111: 390-397.
- Osmond C.B., Berry J.A., Balachandran S., Büchen-Osmond C., Daley P.F., Hodgson J.A. 1990. Potential consequences of virus infection for shade-sun acclimation in leaves. *Bot. Acta* 103: 226-29.
- Osmond C.B., Daley P.F., Badger M.R., Luttge U. 1998. Chlorophyll fluorescence quenching during photosynthetic induction in leaves of *abutilon striatum* dicks.infected with *abutilon mosaic virus*, observed with a field-portable imaging system. *Botanica Acta* 111: 390397.
- Ounis A., Cerovic Z.G., Briantais J.M., and Moya I. 2001. Dual excitation FLIDAR for the estimation of epidermal UV. absorption in leaves and canopies. *Remote Sensing of Environment* 76: 33-48.
- Oxborough K. y Baker N.R. 1997. An instrument capable of imaging chlorophyll-alpha fluorescence from intact leaves at very-low irradiance and at cellular and subcellular levels of organization. *Plant Cell and Environment* 20: 1473-83.
- Palmqvist K., Sundbad L.G., Samuelsson G., Sundbom E. 1986. A correlation between changes in luminescence decay kinetics and the appearance of a CO<sub>2</sub> -accumulating mechanism in *Scenedesmus obliquus*. *Photosynth. Res.* 10: 113-23.
- Papageorgiou G 1975. Chlorophyll fluorescence: an intrinsic probe of photosynthesis. En 'Bioenergetics of photosynthesis'. 319–372 (Ed. Govindjee). Academic Press: New York, USA.
- Park J.M., Park C.J., Lee S.B., Ham B.K., Shin R., Paek K.H. 2001. Overexpression of the tobacco Tsi1 gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *Plant Cell.* 13:1035-46.

- Pastori G. M. y Foyer C.H. 2002. Common Components, Networks, and Pathways of Cross-Tolerance to Stress. The Central Role of "Redox" and Abscisic Acid-Mediated Controls. *Plant Physiol.* 129: 460-468.
- Paul M.J., Knight J.S., Habash D., Parry M.A.J, Lawlor D.W., Barnes S.A., Loynes A., Gray J.C. 1995. Reduction in phosphoribulokinase activity by antisense RNA in transgenic tobacco: effect on CO<sub>2</sub> assimilation and growth at low irradiance. *Plant J.* 7:535-542.
- Peck S.C. Early phosphorylation events in biotic stress. 2003. *Curr Opin Plant Biol.* 6:334-8.
- Peltier B.J., Friso G., Kalume E. D., Roepstorff P., Nilsson F., Adamska I., van Wijk J.K. 2000. Proteomics of the Chloroplasts: Systematic Identification and Targeting Analysis of Lumenal and Peripheral Thylakoid Proteins. *Plant Cell* 12: 319-41.
- Peltier G. y Cournac L. 2002. Chlororespiration. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 523-50.
- Peltier J.B., Emanuelsson O., Kalume D.E., Ytterberg J., Friso G., Rudella A., Liberles D.A., Söderberg L., Roepstorff P., von Heijne G., van Wijk K.J. 2002. Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of arabidopsis determined by experimentation and genome-wide prediction. *The Plant Cell* 14: 211-36.
- Peltier J.B., Ripoll R.D., Friso G., Rudella A., Cai Y., Ytterberg J., Giacomelli L., Pillardy J., van Wijk J.K. 2004a. Clp protease complexes from photosynthetic and non-photosynthetic plastids and mitochondria of plants, their predicted three-dimensional structures, and functional implications. *J. Biol. Chem.* 279:4768-81.
- Peltier J.B., Ytterberg J., Liberles D.A., Roepstorff P., van Wijk K.J. 2001. Identification of a 350-kDa ClpP protease complex with 10 different Clp isoforms in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* 276:16318-27. Epub 2001 Jan 26.
- Peltier J.B., Ytterberg J.A., Sun Q., van Wijk J.K. 2004b. New functions of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* revealed by a simple, fast, and versatile fractionation strategy. *J. Biol. Chemistry* 279: 49367-83.
- Peñuelas J. y Filella I. 1998. Visible and near-infrared reflectance techniques for diagnosing plant physiological status, *Trends in Plant Science*, 3:151-156.
- Pérez-Bueno M. L., Ciscato M., vandeVen M., García-Luque I., Barón M., Valcke R. 2001. Chlorophyll fluorescence imaging of tobamovirus-infected plants. *12th International Congress on Photosynthesis*. Brisbane (Australia).

- Pérez-Bueno M.L. 2003. Fotosistema II e infección viral: Analisis de fluorescencia de imagen y regulación de la biosíntesis de las proteínas OEC durante la patogénesis. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, Granada
- Pérez-Bueno M.L., Rahoutei J., Sajnani C., García-Luque I., Barón M. 2004. Proteomic analysis of the oxygen-evolving complex of photosystem II under biotic stress. Studies on *Nicotiana benthamiana* infected with tobamoviruses. *Proteomics* 4: 418-425
- Peterson R. B. y Havir E.A. 2000. A nonphotochemical-quenching deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* possessing normal pigment composition and xanthophyll-cycle activity. *Plant Physiol* 126: 502-514.
- Peterson R.B. y Aylor D.E. 1995. Chlorophyll fluorescence induction in leaves of *Phaseolus vulgaris* infected with bean rust (*Uromyces appendiculatus*). *Plant Physiol* 108: 163-171.
- Pfannschmidt T. 2003. Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *TRENDS Plant Sciences* 8: 33-41.
- Phee B.K., Cho J.H., Park S., Jung H.J., Lee Y.H., Jeon J.S., Bhoo H.S., Hahn T.R. 2004. Proteomic analysis of the response of *Arabidopsis* chloroplast proteins to high light stress. *Proteomics* 4: 3560-3568.
- Qu N., Schittko U., Baldwin I.T. 2004. Consistency of *Nicotiana attenuata*'s Herbivore - and Jasmonate - Induced Transcriptional Responses in the Allotetraploid Species *Nicotiana quadrivalvis* and *Nicotiana clevelandii*. *Physiol Plant* 135: 539-48.
- Rahoutei J. 2000. Efecto de la infección viral en el proceso fotosintético de la planta huésped. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Rahoutei J., Barón M., Garcia-Luque I., Droppa M., Neményi A., Horvath G. 1999. Effect of tobamovirus infection on the thermoluminescence characteristics of chloroplast from infected plants. *Z. Naturforsch* 54c: 634-639.
- Rahoutei J., Garcia-Luque I., Barón M. 2000. Inhibition of photosynthesis by viral infection: Effect on PSII structure and function. *Physiol Plant* 110: 286-92.
- Rahoutei J., Garcia-Luque I., Cremona V., Barón M. 1998. Effect of tobamovirus infection on PSII complex of infected plants. En: *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*. Vol IV. 2761-64 (Garab, G. Ed.): Kluwer Academic Publishers.

- Raines C.A. 2003. The Calvin cycle revisited. *Photosynth Res.* 75: 1–10.
- Reinero A. y Beachy N.R. 1986. Association of TMV coat protein with chloroplast membranes in virus-infected leaves. *Plant Molecular Biology* 6: 291-301.
- Reinero A. y Beachy N.R. 1989. Reduced photosystem II activity and accumulation of viral coat protein in chloroplasts of leaves infected with tobacco mosaic virus. *Plant Physiol* 89: 111-16.
- Roháček K. y Barták M. 1999. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica* 37: 339-63.
- Rolfe A.S. y Scholes D.J. 1995. Quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *New Phytol* 131: 69-79.
- Rolland N., Ferro M., Seigneurin-Berny D., Garin J., Douce R., Joyard J. 2003. Proteomics of chloroplast envelope membranes. *Photosynth. Res.* 78: 205-30.
- Roman M. 2002. Whole leaf thermoluminescence emission in *Pisum sativum* L.: influence of leaflet age. *Photosynthetica* 40: 153-56.
- Roman M. y Ducruet J-M. 2000. Evidence from leaf thermoluminescence for a decrease of the (NADPH + ATP) energetic potential in cold-sensitive *Pisum sativum* L. varieties upon hardening at 5°C. *J Plant Physiol* 157: 177-81.
- Roncel M. y Ortega J.M. 2005. Afterglow thermoluminescence band as a possible early indicator of changes in the photosynthetic electron transport in leaves. *Photosynth. Res.* 84:167-72
- Rose J.K., Bashir S., Giovannoni J.J., Jahn M.M., Saravanan R.S. 2004. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant J.* 39:715-33.
- Ruban A.V. y Horton P. 1995. Regulation of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in plants. *Aust.J.Plant Physiol.* 22: 221-30.
- Rubin A.B. y Venediktov P.S. 1969 .Storage of light energy by photosynthesizing organisms at low temperature. *Biofiz.* 14: 105–109
- Russo M, Martelli G.P. 1981. Ultrastructure of turnip crinkle- and saguaro cactus virus infected 57. *Virology.* 118: 109-116.
- Rutherford A.W., Crofts A.R., Inoue Y. 1982. Thermoluminescence as a probe of Photosystem II photochemistry: the origin of the flash-induced glow peaks. *Biochim Biophys Acta* 682: 457–465

- Rutherford A.W., Govindjee, Inoue Y. 1984a. Charge accumulation and photochemistry in leaves studied by thermoluminescence and delayed light emission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1107–1111
- Rutherford A.W., Renger G., Koike H., Inoue Y. 1984b. Thermoluminescence as a probe of PS II: The redox and protonation state of the secondary acceptor quinone and the O<sub>2</sub> evolving enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 767: 548–556
- Sahnoun I., Déhais P., Van Montagu M., Rosignol M., Rouzé P. 2000. PPMdb: a plant plasma membrane database. *J. Biotechnology* 78: 235–46.
- Sampol B., Bota J., Riera D., Medrano H., Flexas J. 2003. Analysis of the virus-induced inhibition of photosynthesis in malmsey grapevines. *New Phytologist* 160: 403–412.
- Sane P. y Rutherford A.W. 1986. Thermoluminescence from photosynthetic membranes. En: *Light Emission by Plants and Bacteria*. 291–329 (Govindjee, J. Ames and D.C. Fork, eds.) Orlando: Academic Press.
- Sane P.V., Desai T.S., Tatake V.G., Govindjee 1977. On the origin of glow peaks in Euglena cells, spinach chloroplasts and subchloroplast fragments enriched in system I or II. *Photochem Photobiol.* 26: 33–39
- Saravanan R.S., Rose J.K. 2004. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics* 4:2522–32.
- Schagger H., Cramer W.A., von Jagow G. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. 1994. *Anal Biochem.* 217:220–30.
- Schleiff E., Eichacker L.A., Eckart K., Becker T., Mirus O., Stahl T., Soll J. 2003. Prediction of the plant beta-barrel proteome: a case study of the chloroplast outer envelope. *Protein Sci.* 12:748–59.
- Scholes J.D. y Rolfe S.A. 1996. Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust (*puccinia coronata*): quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *Planta* 199: 573–82.
- Scholes J.D., Lee P.J., Horton P., Lewis D.H. 1994. Invertase: understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. *New Phytol* 126: 213–22.



- Schreiber U. y Neubauer C. 1990. O<sub>2</sub>-dependent electron flow, membrane energization and the mechanism of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosynth. Res* 25: 279-93.
- Schreiber U., Bilger W., Neubauer C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. *Springer-Verlag*.
- Schroda M., Kropat J., Oster U., Rudiger W., Vallon O., Wollman F.A., Beck C.F. 2001. Possible role for molecular chaperones in assembly and repair of photosystem II. *Biochem Soc Trans.* 29:413-8.
- Schröder P.W. y Kieselbach T. 2003. Update on chloroplast proteomics. *Photosynth. Res.* 78: 181-93.
- Schubert M., Peterson Urika A., Hass Brian J., Funk C., Schröder P.W., Kieselbach T. 2002. Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chemistry* 277: 8354-65.
- Schweiger J., Lang M., Lichtenthaler H.K. 1996. Differences in fluorescence excitation spectra of leaves between stressed and non-stressed plants. *J. Plant Physiol.* 148: 536-547.
- Seigneurin-Berny D., Rolland N., Garin J., Joyard J. 1999. Differential extraction of hydrophobic proteins from chloroplast envelope membranes. a subcellular-specific proteomic approach to identify rare intrinsic membrane proteins. *The Plant Journal* 19: 217-28.
- Shaw M.M. y Riederer M.B. 2003. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 3: 1408-17.
- Sheen J. 1990. Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* 2: 1027-38.
- Singh K.B., Rhonda F.C. y Oñate-Sánchez L. 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr Opin Plant Biol.* 5: 430-36.
- Soukupová J., Smatanová S., Nedbal L., Jegorov A. 2003. Plant response to destruxins visualized by imaging of chlorophyll fluorescence. *Physiologia Plantarum* 118: 399-405.
- Spreitzer R.J. 2003. Role of the small subunit in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 414, no. 2: 141-49.

- Spreitzer R.J. y Salvucci M.E. 2002. RUBISCO: Structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 449 - 475.
- Stallaert V.M., Ducruet J-M., Tavernier E., Blein J-P. 1995. Lipid peroxidation in tobacco leaves treated with the elicitor cryptogein: evaluation by high-temperature thermoluminescence emission and chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta.* 1229 : 290-295.
- Stober F. y Lichtenthaler H.K. 1993. Studies on the constancy of the blue and green fluorescence yield during the chlorophyll fluorescence induction kinetics (Kautsky effect). *Radiat. Environ. Biophys.* 32: 357-65.
- Sun W.H., Verhoeven A.S., Bugos R.C., Yamamoto H.Y. 2001. Suppression of zeaxanthin formation does not reduce photosynthesis and growth of transgenic tobacco under field conditions. *Photosynth Res.* 67:41-50.
- Sundblad L.G., Palmqvits K., Samuelsson G. 1986. Luminescence decay kinetics in relation to the relaxation of the transthylakoid ApH from high and low CO<sub>2</sub> adapted cells of *Scenedesmus obliquus*. *FEBS Lett.* 209: 28-32.
- Sundblad L.G., Schröder W.P., Akerlung H.E. 1988. S-state distribution and redox state of Q<sub>A</sub> in barley in relation to luminescence decay kinetics. *Biochim. Biophys. Acta* 973: 47-52.
- Sundböm E. y Björn L.O. 1977. Phytoluminography: Imaging plants be delayed light emission. *Physiol. Plant.* 40: 39-41.
- Takahama, U. 1998. Ascorbic acid-dependent regulation of redox levels of chlorogenic acid and its isomers in the apoplast of leaves of *Nicotiana tabacum* L. *Plant and Cell Physiology* 39: 681-689.
- Takahashi H. y Ehara Y. 1992. Changes in the Activity and the Polypeptide Composition of the Oxygen-Evolving Complex in Photosystem II of Tobacco Leaves Infected with Cucumber Mosaic Virus Strain Y. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5: 269-72.
- Takahashi H., Ehara Y., Hirano H. 1991. A protein in the oxygen-evolving complex in the chloroplasts is associated with symptom expression on tobacco leaves infected with cucumber mosaic virus strain Y. *Plant Mol Biol* 16: 689-98.

- Técsi L.I., Smith A.M., Maule A.J., Leegood R.C. 1996. A spatial analysis of physiological changes associated with infections of cotyledons of marrow plants with cucumber mosaic virus. *Plant Physiol.* 111: 975-985.
- Teixeira J., Pereira S., Canovas F., Salema R. 2005. Glutamine synthetase of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Desiree) plants: cell- and organ-specific expression and differential developmental regulation reveal specific roles in nitrogen assimilation and mobilization. *J Exp Bot.* 56:663-71.
- The Arabidopsis Genome Initiative, 2000 *Nature* 408:796-815.
- Tyers M. y Mann M. 2003. From genomics to proteomics. *Nature* 422: 193-97.
- Tyystjärvi E. y Vass I. 2004. Light emission as a probe of charge separation and recombination in the photosynthetic apparatus: relation of prompt fluorescence to delayed light emission and thermoluminescence. *Advances in photosynthesis and respiration.* (Govindjee, Ed.). Kluwer Academic Publishers
- Valcke R. 2003. Fluorescence imaging: the stethoscope of the plant physiologist. *Adv. Plant Physiol.* 6: 445-62.
- Valcke R., Ciscato M., Heisel F., Miehe J., Sowinska M. 1999. Analysis of heavy-metal stressed plants by fluorescence imaging. *Proc. SPIE, 13<sup>th</sup> Annual International Symposium on Aerosense* 3707: 82-90.
- van Kooten O., Meurs C., van Loon L.C. 1990. Photosynthetic electron transport in tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol Plant* 80: 446-52.
- van Wijk J.K. 2001. Challenges and prospects of plant proteomics. *Plant Physiology* 126: 501-8.
- van Wijk J.K. 2004. Plastid proteomics. *Plant. Physiol. Biochem.* 42: 963-77.
- van Wijk J.K., Schnettger B., Graf H., Krause G.H. 1993. Photoinhibition and recovery in relation to heterogeneity of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1142: 59-68.
- Vass I. 2003. The history of photosynthetic thermoluminescence. *Photosynth. Res.* 76: 303-18.
- Vass I. e Inoue Y. 1992. Thermoluminescence in the study of photosystem II. *The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology.* 259-94 (Barber, J. Ed.) Elsevier Science Publishers B.V.

- Vass I. y Demeter S. 1982. Classification of Photosystem II inhibitors by thermodynamic characterization of thermoluminescence of inhibitor-treated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 682: 496–499
- Vass I., Mohanty N., Demeter S. 1988. Photoinhibition of electron transport activity of Photosystem II in isolated thylakoids studied by thermoluminescence and delayed luminescence. *Z Naturforsch* 43c: 871–876
- Vass I., Ono T., Inoue Y. 1987. Removal of 33 k Da extrinsic protein specifically stabilizes the S<sub>2</sub> Q<sub>A</sub><sup>-</sup> charge pair in photosystem II. *FEBS Lett.* 211: 215-20.
- Vavilin D.V. y Ducruet J.M. 1998. The origin of 120-130 C thermoluminescence bands in chlorophyll-containing material. *Photochem. Photobiol.* 68: 191-98.
- Venedklov P.S., Matorin D.N., Kafarov R.S. 1989. Chemiluminescence of chlorophyll upon lipid photoperoxidation in thylakoid membranes. *Biofizika (Moscow)*. 34: 241-45.
- White J.L., Brakke, M.K. 1983. Protein changes in wheat infected with wheat streak mosaic virus and in barley infected with tobacco mosaic virus. *Physiol. Plant Pathol.* 13: 253-258.
- Whitelegge J.P., Zhang H., Aguilera R., Taylor R.M., Cramer W.A. 2002. Full subunit coverage liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (LCMS+) of an oligomeric membrane protein: cytochrome b(6)f complex from spinach and the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Mol Cell Proteomics*. 1:816-27.
- Whitelegge P.J. 2003. Thylakoid membrane proteomics. *Photosynth. Res.* 78: 265-77.
- Williams K.L. y Hochstrasser D.F. 1997. Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics, Ed. Wilkins, Williams, Appel, Hochstrasser, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Wilson K.A., McManus M.T., Gordon M.E., Jordan T.W. 2002. The proteomics of senescence in leaves of white clover, *Trifolium repens* (L.). *Proteomics* 2: 1114-22.
- Wolfbeis O.S. 1985. Fluorescence of organic natural products. En: Molecular luminescence spectroscopy: Methods and application. p. 167. Part I (Schulman S. G.,ed.). John Wiley & Sons, New York.
- Wright P.D., Baldwin C.B., Shephard C.M., Scholes D.J. 1995. Source-sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew. II. Changes in the regulation of the Calvin cycle. *Physiological Molecular Plant Pathology* 47: 255-67.

- Yamada S., Komori T., Hashimoto A., Kuwata S., Imaseki H., Kubo T. 2000. Differential expression of plastidic aldolase genes in *Nicotiana* plants under salt stress. *Plant Sci* 54:61-69.
- Yamaguchi K. y Subramanian A.R. 2000. The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 50 S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). *J Biol Chem*. 275:28466-82.
- Yamaguchi K., von Knoblauch K., Subramanian A.R. 2000. The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 30 S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). *J Biol Chem*. 275:28455-65.
- Yu J., Hu S., Wang J., Wong G.K., Li S., Liu B., Deng Y., Dai L., Zhou Y., Zhang X., Cao M., Liu J., Sun J., Tang J., Chen Y., Huang X., Lin W., Ye C., Tong W., Cong L., Geng J., Han Y., Li L., Li W., Hu G., Huang X., Li W., Li J., Liu Z., Li L., Liu J., Qi Q., Liu J., Li L., Li T., Wang X., Lu H., Wu T., Zhu M., Ni P., Han H., Dong W., Ren X., Feng X., Cui P., Li X., Wang H., Xu X., Zhai W., Xu Z., Zhang J., He S., Zhang J., Xu J., Zhang K., Zheng X., Dong J., Zeng W., Tao L., Ye J., Tan J., Ren X., Chen X., He J., Liu D., Tian W., Tian C., Xia H., Bao Q., Li G., Gao H., Cao T., Wang J., Zhao W., Li P., Chen W., Wang X., Zhang Y., Hu J., Wang J., Liu S., Yang J., Zhang G., Xiong Y., Li Z., Mao L., Zhou C., Zhu Z., Chen R., Hao B., Zheng W., Chen S., Guo W., Li G., Liu S., Tao M., Wang J., Zhu L., Yuan L., Yang H. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*. 296:79-92.
- Zaltsman A., Feder A., Adam Z. 2005. Developmental and light effects on the accumulation of FtsH protease in *Arabidopsis* chloroplasts--implications for thylakoid formation and photosystem II maintenance. *Plant J*. 42:609-17.
- Zaltsman A., Ori N., Adam Z. 2005. Two Types of FtsH Protease Subunits Are Required for Chloroplast Biogenesis and Photosystem II Repair in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 17:2782-90.
- Zhou H., Boyle R., Aebersold R. 2004. Quantitative protein analysis by solid phase isotope tagging and mass spectrometry. *Methods Mol. Biol*. 261: 511-18.
- Zolla L., Timperio A.M., Walcher W., Huber C.G. 2003. Proteomics of light-harvesting proteins in different plant species. Analysis and comparison by liquid

chromatography-electrospray ionization mass spectrometry.photosystem II. *Plant Physiol* 131: 198-214.

Zurita L.J., Roncel M., Aguilar M., Ortega J.M. 2005. A thermoluminescence study of photosystem II back electron transfer reactions in rice leaves. Effects of salt stress. *Photosynth. Res.* 84:131-7.