

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal

**Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias
(CIALE)**

Facultad de Biología



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**Genetic and molecular characterization of nitric oxide
homeostasis (NO) during early plant development in
*Arabidopsis thaliana***

TAMARA LECHÓN GÓMEZ

Salamanca, Julio2018

FINANCIACIÓN Y ORGANISMOS IMPLICADOS

Durante el desarrollo de la Tesis he disfrutado de una ayuda para la Formación del Profesorado Universitario (FPU13/05569) otorgada por el Ministerio de Educación y Formación Profesional.

Los experimentos realizados durante la presente Tesis Doctoral se han llevado a cabo en el Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE) de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca, bajo la dirección de los Dres. D. Óscar Lorenzo Sánchez y D. Luis Sanz Andreu. Los proyectos de investigación que han permitido financiar este trabajo se detallan a continuación:

“Impacts of Environmental Conditions on Seed Quality” ERC.KBBE.2012.1.1-01. “EcoSeed-311840”. PI: Dr. Óscar Lorenzo Sánchez. (2013-2016).

“Descifrado de la señalización molecular del óxido nítrico (NO) en el desarrollo y la biotecnología de plantas”. MINECO (BIO2017-85758-R). PI: Dr. Óscar Lorenzo Sánchez. (2017-2019).

“Explotación de nuevas funciones biotecnológicas de la señalización del óxido nítrico (NO) en el desarrollo de las plantas.”. MINECO (BIO2014-57107-R). PI: Dr. Óscar Lorenzo Sánchez. (2015-2017).

“Potencial biotecnológico de la señalización del óxido nítrico (NO) en la germinación de semillas y las respuestas a estrés”. JCyL UIC 152 (SA093U16). PI: Óscar Lorenzo Sánchez. (2016-2018).

“Integración de la señalización de óxido nítrico (NO), ácido abscísico (ABA) y otros reguladores del crecimiento vegetal en la germinación y las respuestas a estrés”. JCyL (SA239U13). PI: Óscar Lorenzo Sánchez. (2013-2015).

“Regulación redox durante la germinación en condiciones de estrés salino y osmótico en *Arabidopsis thaliana*”. Fundación Solórzano (FS/12-2017). PI: Isabel Mateos Moreno (2017-2018).

“El óxido nítrico (NO) como regulador de la proliferación y diferenciación de las células madre vegetales”. Fundación Solórzano (FS/16-2014). PI: Luis Sanz Andreu (2014-2015).

Resumen General

1. El óxido nítrico

El óxido nítrico o monóxido de nitrógeno (NO) fue identificado como un gas de nitrógeno por primera vez por el reverendo Joseph Priestley en 1789, un teólogo y químico inglés responsable también del descubrimiento del oxígeno y otros gases. El reconocimiento de su importancia fisiológica no se produjo hasta 1980, cuando Robert F. Furchgott descubrió que una sustancia desconocida sintetizada en el endotelio vascular, a la que llamó EDRF (*Endothelium Derived Relaxing Factor*), era la responsable de la relajación muscular y de la tonicidad vascular (Furchgott y Zawadzki, 1980). Poco después y de manera independiente, Louis J. Ignarro y Furchgott llegaron a la conclusión de que el EDRF era idéntico al NO (Ignarro *et al.*, 1987; Matsunaga y Furchgott, 1989). A raíz de este descubrimiento, esta molécula se convirtió en una importante fuente de investigaciones en animales. Desde entonces, se ha descrito el papel del NO en el mantenimiento de la presión arterial, la función sexual masculina, la agregación plaquetaria, la estimulación de las defensas inmunológicas, la regulación de la transmisión neurológica y de la expresión génica, y en el aprendizaje y la memoria. Así, la revista *Science* reconoció al NO como “Molécula del Año” en 1992 por su extraordinaria versatilidad e importancia, especialmente al tratarse de un gas capaz de difundir a través de las membranas que hasta entonces había sido considerado exclusivamente como un gas tóxico muy lábil (*Science*, 1992). En 1998, Furchgott, Murad e Ignarro recibieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina por sus descubrimientos concernientes al NO como molécula señalizadora en el sistema cardiovascular.

En 1960, Fewson y Nicholas fueron los primeros en identificar al NO como parte esencial del metabolismo del nitrógeno en la interacción entre plantas y bacterias desnitrificantes (Fewson y Nicholas, 1960), en las que se había descubierto la formación de NO a partir de nitrito unos años antes (Najjar y Allen, 1954). Aún así, durante el resto del siglo XX, la investigación sobre NO en sistemas vegetales se centró en las propiedades fitotóxicas de los óxidos de nitrógeno y en sus efectos sobre la vegetación. El NO se produce durante la combustión de la gasolina, pasando a formar parte del conocido *smog*

fotoquímico. Una vez liberado, este gas pasa de la atmósfera a la estratosfera, donde participa en la degradación de la capa de ozono (Olszyk *et al.*, 1989). Aunque algunos estudios ya señalaban que las plantas poseen la capacidad de sintetizar NO (Dean y Harper, 1988; Cueto *et al.*, 1996; Ninnemann y Maier, 1996), su funcionalidad biológica no se descubrió hasta 1998, cuando apareció una serie de publicaciones que establecía la importancia del NO en la respuesta de defensa frente al ataque de microorganismos patógenos (Dangl, 1998; Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998).

2. Bioquímica del óxido nítrico

El NO es una molécula pequeña, gaseosa y de vida media relativamente larga en comparación con otros radicales libres, que es soluble tanto en ambientes hidrofóbicos como hidrofílicos, aunque presenta mayor solubilidad en los primeros. Debido a sus características físicas y químicas, esta molécula es capaz de atravesar fácilmente las membranas biológicas sin necesidad de transportadores específicos (Arasimowicz y Floryszak-Wieczorek, 2007). El NO está formado por la unión de un átomo de oxígeno y uno de nitrógeno, lo que conlleva que posea un electrón desapareado en un orbital $2p-\pi$ antienlazante. Por este motivo es una molécula altamente reactiva, al intentar ganar o perder el electrón desapareado para alcanzar un estado energéticamente más favorable, y está clasificada como especie reactiva de nitrógeno (RNS). Por tanto, la bioquímica del NO es en realidad la de tres especies diferentes e interconvertibles entre sí, el propio radical óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), el catión nitrosonio (NO^+) y el anión nitroxilo (NO^-). Se diferencian unas de otras por sus propiedades físicas y por su reactividad química (Stamler *et al.*, 1992).

El radical reacciona principalmente con el oxígeno molecular (O_2) y los radicales superóxido (O_2^-) e hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), además de con metales de transición como hierro, cobre y cinc, presentes en metaloproteínas, y con otros radicales libres como el radical tirosilo. El catión nitrosonio lleva a cabo reacciones de adición y sustitución nucleofílicas con nitrógeno, azufre, oxígeno o carbono en moléculas orgánicas y en especial con compuestos aromáticos, dando lugar a tionitritos o *S*-nitrosotioles (RS-NO), nitrosaminas (RNH-NO), alquilnitritos (RO-NO) y óxidos de nitrógeno. Por otra parte, el anión nitroxilo se convierte rápidamente en dióxido de nitrógeno, aunque también puede reaccionar con

grupos tiol dando lugar a grupos *S*-nitrosotiol (Stamler *et al.*, 1992). Todas estas propiedades constituyen la base química de las diversas funciones que ejerce el NO en los organismos (Wojtaszek, 2000).

3. Homeostasis del óxido nítrico en las plantas

El descubrimiento de que las plantas poseen la capacidad de producir NO endógeno, y no solo de detoxificar el NO presente en la atmósfera o en el suelo, dio lugar a un cambio de paradigma en cuanto a qué moléculas pueden actuar en la transducción de la señal como reguladores del crecimiento y el estrés, lo que permitió identificar otros compuestos reactivos gaseosos de pequeño tamaño que también participan en la regulación de procesos fisiológicos, llamados de forma general gasotransmisores. Estos compuestos incluyen el monóxido de carbono, el sulfuro de hidrógeno, las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las RNS, entre las que se encuentra el NO (Hancock y Whiteman, 2016). Los gasotransmisores pueden potenciarse o antagonizarse entre ellos alterando la actividad de enzimas involucradas en su biosíntesis o mediante una reacción química directa, controlando así su concentración y el balance redox en la célula (Lamattina y García-Mata, 2016). Por tanto, y a pesar de su aparente ubicuidad, la concentración de NO se regula a muchos niveles, desde su biosíntesis hasta su detoxificación o eliminación, pasando por la formación de intermediarios estables para su almacenamiento y transporte. Todo esto resulta en un complejo equilibrio u homeostasis que aún así permite la aparición de concentraciones elevadas de NO en localizaciones subcelulares específicas (Figura 1).

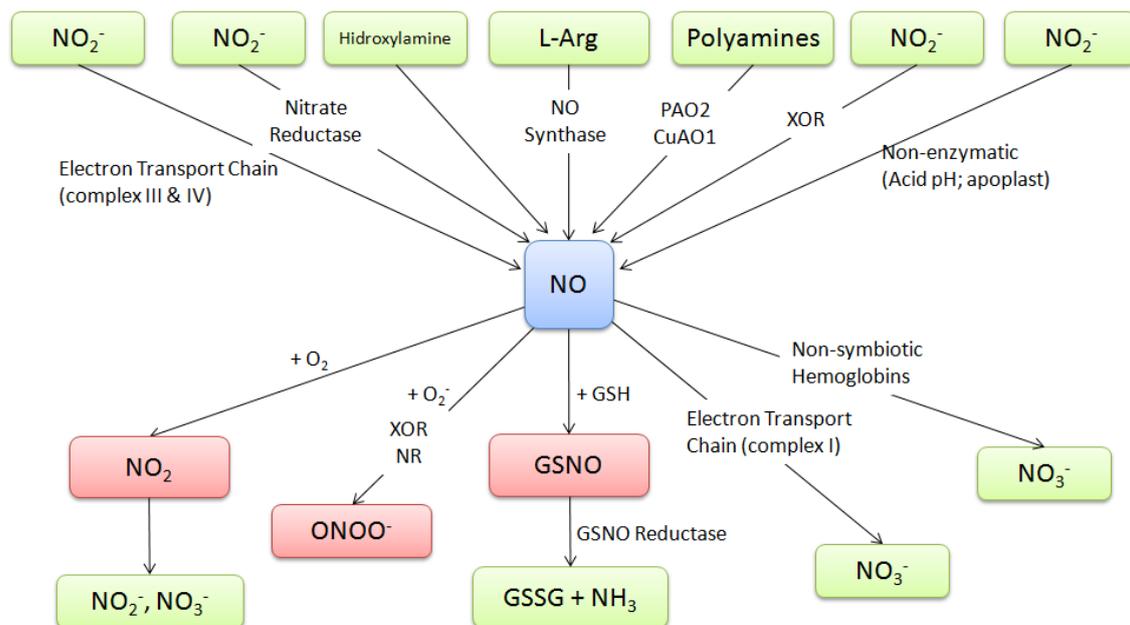


Figura 1. Resumen de los procesos implicados en la homeostasis del óxido nítrico (NO) en plantas. Adaptada de Moreau *et al.* (2010).

3.1. Biosíntesis

Mientras que en mamíferos el NO es sintetizado mediante una única reacción mayoritaria catalizada enzimáticamente, en plantas se han detectado siete posibles rutas de biosíntesis, que suelen clasificarse en mecanismos oxidativos y mecanismos reductores (Yu *et al.*, 2014). La formación de NO en plantas depende directamente de la asimilación y de la eficiencia de uso del nitrógeno por parte de la planta (Chamizo-Ampudia *et al.*, 2017), que a su vez depende de la biodisponibilidad del oxígeno (Stöhr *et al.*, 2007). Al contrario que otros eucariotas, que solo reciclan nitrógeno orgánico, las plantas son capaces de asimilar nitrógeno inorgánico en forma de nitrato o de amonio, por lo que la complejidad de la biosíntesis del NO en plantas en comparación con otros organismos eucariotas posiblemente se deba a las diferencias existentes entre ellos en el metabolismo del nitrógeno (Maia y Moura, 2014).

3.1.1. Rutas oxidativas

Una de las rutas oxidativas consiste en la generación de NO a partir L-arginina en una reacción catalizada por un grupo de enzimas denominadas NO sintasas (NOS). Estas enzimas catalizan la conversión de arginina en L-citrulina y NO, en una reacción dependiente de NADPH y O₂ (Palacios *et al.*, 1989). Las NOS

poseen un dominio N-terminal oxigenasa y un dominio C-terminal reductasa unidos por un dominio de unión a calmodulina. Esta estructura proteica está muy conservada en todas las especies que poseen NOS.

En plantas superiores no se ha identificado ninguna enzima con actividad NOS, pero sí una proteína relacionada con la síntesis oxidativa de NO, la proteína de *Arabidopsis thaliana* Nitric Oxide Associated 1 (NOA1). Esta proteína fue inicialmente aislada como una NOS, a pesar de la falta de homología con NOS de otros organismos. Los mutantes de pérdida de función de NOA1 presentan un fenotipo de retraso en el desarrollo que puede ser recuperado mediante la adición exógena de NO, además de tener un contenido menor de NO endógeno (Guo *et al.*, 2003). Sin embargo, Zemojtel *et al.* (2006) fueron incapaces de replicar la conversión de arginina en NO con la enzima purificada, por lo que esta proteína fue posteriormente renombrada como NOA1 e identificada como una GTPasa circularmente permutada (cGTPasa) plastidial, conservada en procariotas y otros eucariotas (Moreau *et al.*, 2008; Flores-Pérez *et al.*, 2008), que podría ser requerida para el correcto funcionamiento de los ribosomas plastidiales.

Por otra parte, se ha caracterizado la primera NOS vegetal en el alga verde *Ostreococcus tauri*, capaz de producir NO cuando se le suministra arginina en presencia de luz (Foresi *et al.*, 2010). Kumar *et al.* (2016) han encontrado posibles NOS adicionales en *Ostreococcus lucimarinus*, *Thalassiosira oceanica* y *Bathycoccus prasinos* mediante análisis de homología de secuencias. Todas las NOS identificadas en organismos fotosintéticos marinos comparten los tres dominios esenciales de la NOS humana, aunque el uso de cofactores parece no ser el mismo (Foresi *et al.*, 2016). Un estudio comparativo de genomas de más de un millar de especies vegetales no ha encontrado ortólogos en ninguna de las especies de plantas terrestres analizadas, lo que parece sugerir que la NOS proveniente del ancestro común eucariota se ha perdido en plantas superiores (Jeandroz *et al.*, 2016).

La pérdida de NOS en plantas terrestres es bastante sorprendente, ya que los mecanismos básicos de señalización del NO en plantas son muy similares a los de animales, compartiendo incluso proteínas involucradas en la regulación de los efectos mediados por el NO. La habilidad de las plantas de asimilar y reducir

nitrito podría explicar la ausencia de NOS, ya que la síntesis oxidativa podría ser redundante en vista de la existencia de otras rutas biosintéticas de NO en vegetales (Jeandroz *et al.*, 2016). Sin embargo, varios estudios han demostrado que la acumulación de NO en respuesta a patógenos o ácido abscísico (ABA) se inhibe con la adición de monoacetato de L-N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), un análogo no metabolizable de la arginina que compite con este aminoácido en la unión a la NOS, inhibiendo su actividad, y también con la adición de aminoguanidina, un inhibidor irreversible de la NOS (Durner *et al.*, 1998; Galatro *et al.*, 2004; Corpas *et al.*, 2006; Jasid *et al.*, 2006; Glyan'ko, 2013; Sanz *et al.*, 2014).

Además, en *A. thaliana* se han encontrado varios mutantes que acumulan arginina y en los que el contenido de NO es más elevado que el de plantas control. La biosíntesis de L-arginina depende del amonio disponible, que es transformado en nitrógeno orgánico en forma de glutamina y glutamato mediante el ciclo GS/GOGAT (glutamina sintetasa/glutamato sintasa, por sus siglas en inglés, *glutamine synthetase/ glutamine oxoglutarate aminotransferase*) (Stöhr *et al.*, 2007). Estos aminoácidos, junto con la asparagina y el aspartato, actúan como reservorios de nitrógeno orgánico para la formación de otros aminoácidos, y pueden ser transportados a los órganos en los que se necesite formación de nuevas proteínas (Coruzzi *et al.*, 2003). Para sintetizar arginina, el paso de amonio a glutamato tiene que suceder en el interior del cloroplasto, donde puede ser transformado en ornitina, el precursor de la arginina, pasando primero por citrulina y argininosuccinato (Winter *et al.*, 2015).

El mutante *nox1/cue1* (*NO overproducer 1/ chlorophyll a/b binding protein gene underexpressed*), que tiene alterado un translocador fosfoenolpiruvato/fosfato (PPT) de la membrana interna plastidial, es incapaz de importar fosfoenolpiruvato (PEP) al interior del cloroplasto, de manera que mayor proporción de glutamato pasa a arginina en vez de a otros aminoácidos sintetizados por la ruta del shikimato, entre los que se encuentran los aminoácidos aromáticos (Streatfield *et al.*, 1999; Staehr *et al.*, 2014). La mayor biodisponibilidad de arginina se ha relacionado con una mayor producción de NO mediante síntesis oxidativa (He *et al.*, 2004) y algunos de sus defectos fisiológicos han podido ser rescatados mediante la adición del secuestrador de

NO 2,4-carboxyfenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido (cPTIO) (Fernández-Marcos *et al.*, 2011). Por otra parte, el catabolismo de la arginina comienza con su degradación a ornitina y urea dentro de la mitocondria, en una reacción catalizada por la enzima arginasa (Winter *et al.*, 2015). La disminución de la actividad de cualquiera de las dos isoformas de arginasas presentes en *A. thaliana*, ARGAH1 o ARGAH2, ambas localizadas en la mitocondria, resulta en la acumulación de NO, señalando de nuevo a la arginina como una de las fuentes más importantes en la biosíntesis de NO en plantas terrestres (Flores *et al.*, 2008).

La arginina es también el precursor de las poliaminas, compuestos orgánicos policatiónicos nitrogenados de bajo peso molecular que interaccionan con compuestos polianiónicos como el ADN o las proteínas. Las poliaminas pueden bien sintetizarse en el cloroplasto a partir de la conversión de arginina en agmatina por la arginina descarboxilasa, bien en la mitocondria o el citosol a partir de la ornitina. El catabolismo de arginina está coordinado con la disponibilidad de carbohidratos y se ha demostrado que la falta de azúcares causa un incremento sustancial de la actividad arginasa y arginina descarboxilasa, iniciando la biosíntesis de poliaminas (Winter *et al.*, 2015). Los mutantes de pérdida de función de las arginasas presentan mayores niveles de expresión de enzimas involucradas en la biosíntesis de poliaminas (Shi *et al.*, 2013) y, de hecho, Tun *et al.* (2006) han demostrado la producción rápida de NO en respuesta a poliaminas, especialmente en respuesta a espermina y espermidina, tanto en cultivos celulares como en plántulas de *A. thaliana*.

Un análisis tisular de la síntesis de NO demostró que la actividad de las poliaminas como precursoras del NO se limita a la zona de elongación de la raíz primaria y a las venas y tricomas en hojas jóvenes (Tun *et al.*, 2006). Aunque la ruta completa de producción de NO a partir de poliaminas se desconoce, se han identificado algunas de las enzimas implicadas mediante el estudio de la producción de NO en respuesta a estreses abióticos, como la diamino-oxidasa de unión a cobre CuAO1 (Wimalasekera *et al.*, 2011) y la poliamina oxidasa PAO2 (Wimalasekera *et al.*, 2015). La oxidación de las poliaminas sucede en el apoplasto y en los peroxisomas (Agurla *et al.*, 2017), ambos lugares importantes de producción de NO que se han relacionado tanto con germinación como con

estreses oxidativos (Bethke *et al.*, 2004; Corpas *et al.*, 2009), que son procesos regulados por ABA. De hecho, la producción de NO por poliaminas se ha relacionado con la regulación del cierre de estomas (Agurla *et al.*, 2017), un proceso en el que la interacción entre el ABA y el NO está muy documentada (Desikan *et al.*, 2002; García-Mata *et al.*, 2003; Bright *et al.*, 2005).

Asimismo, en animales (Markert *et al.*, 1994) y bacterias (Hooper y Terry, 1979) se ha descubierto que las hidroxilaminas pueden ser oxidadas a NO mediante reacciones que conllevan la producción de peróxido de hidrógeno o superóxido. Aunque en plantas se ha demostrado que la adición de hidroxilaminas resulta en un incremento de NO, la eficiencia de estos sistemas es baja y la existencia de hidroxilaminas en plantas no ha sido confirmada (Rümer *et al.*, 2009).

3.1.2. Rutas reductoras

La ruta reductora que mejor se ha caracterizado en plantas es la catalizada por la enzima nitrato reductasa (NR). Los primeros indicios de que un exceso de nitrito podía ser convertido en NO se encontraron en hojas de soja tratada con un herbicida que promovía la acumulación de nitrito (Klepper, 1979). El papel de la NR en este proceso fue identificado mediante el uso de mutantes *nr* en soja y *Psophocarpus tetragonolobus*. Estos mutantes son incapaces de expresar la enzima y, por consiguiente, tampoco pueden producir NO a partir de nitrito (Dean y Harper, 1986). Aunque la NR normalmente reduce el nitrato a nitrito, cuando el nitrito se encuentra en concentraciones micromolares es también capaz de catalizar la reducción de nitrito a NO empleando NADH como donador de electrones (Yamasaki y Sakihama, 2001). El propio nitrato actúa como un inhibidor competitivo en la producción de NO mediada por NR y la enzima tiene mayor afinidad por este sustrato que por el nitrito, por lo que la contribución de esta enzima a la homeostasis del NO se da principalmente en condiciones en las que la NR muestra mayor actividad, es decir, en condiciones de pH ácido, bajo condiciones de luz óptimas o en anoxia (Rockel *et al.*, 2002). La regulación postraduccional de esta enzima, que es activada mediante fosforilación por la kinasa SNF1 y por la adición exógena de azúcares, la convierte en un nodo muy

importante de la regulación de la asimilación del carbono y el nitrógeno, de nuevo reflejando la importancia de la homeostasis del NO en la coordinación del metabolismo primario (Kaiser y Huber, 2001).

La enzima NR es un homodímero de 200-250 kDa, cuyos monómeros están constituidos por tres grupos prostéticos que incluyen FAD (flavín-adenín-dinucleótido), hemo (citocromo b577) y un cofactor de molibdeno (MoCo), que es el responsable de la transferencia de electrones desde el NADH al sustrato oxidado (Yamasaki y Sakihama, 2000). En la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, esta enzima está codificada por dos genes homólogos, *NIA1* y *NIA2*, que presentan una elevada similitud en su secuencia, con zonas divergentes en el extremo N-terminal y otras pequeñas regiones (Desikan *et al.*, 2002). *NIA2* es la forma mayoritaria y se encuentra en varios orgánulos, mientras que *NIA1* se localiza exclusivamente en el citosol y sólo contribuye un 15% de la actividad NR total en la planta (Yu *et al.*, 1998). El potencial señalizador del NO producido por la NR se demostró gracias al doble mutante de pérdida de función *nia1;nia2*, incapaz de cerrar los estomas en respuesta a ABA o nitrito debido a la reducción en el contenido de NO en las células guarda de estas plantas (Desikan *et al.*, 2002). Además de la NR, también se ha propuesto la existencia de otra enzima capaz de catalizar la reducción de nitrito a NO, conocida como nitrito:NO oxidorreductasa (Ni-NOR). Esta enzima es una proteína de unión a membrana específica de raíz que hasta ahora solo se ha descrito en tabaco (Stöhr *et al.*, 2001; Vandana *et al.*, 2012) y, al contrario que la NR, utiliza el citocromo *c* como donador de electrones en lugar del NADH. Se piensa que el nitrito que utiliza como sustrato proviene de la reducción de nitrato que lleva a cabo la enzima NR (Stöhr *et al.*, 2001).

Asimismo, el sistema de transporte de electrones mitocondrial es capaz de producir la reducción de nitrito a NO cuando la concentración de oxígeno es inferior a 20 μM (Planchet *et al.*, 2005), de manera que la célula puede obtener ATP en condiciones de hipoxia o anoxia (Stoimenova *et al.*, 2007). Esta ruta parece estar localizada en las raíces de plantas superiores, donde la tensión del oxígeno es baja (Gupta *et al.*, 2005). El empleo de los compuestos inhibidores específicos de los complejos III y IV del sistema respiratorio mitocondrial, mixotiazol y SHAM, ha permitido esclarecer que los electrones que reducen al

nitrito provienen del ciclo redox de la ubiquinona, asociado al citocromo *bc1*, y que ambas oxidasas terminales, la citocromo *c* oxidasa y la oxidasa alternativa, están involucradas en la biosíntesis mitocondrial de NO (Gupta *et al.*, 2005).

Además de estos complejos enzimáticos, la xantina oxidasa (XOR) peroxisomal también puede reducir el nitrito a NO empleando xantina o NADH como sustrato reductor en condiciones anaeróbicas, pero con condiciones de pH más flexibles que las de la NR (Godber *et al.*, 2000). Paralelamente, existe otra vía no enzimática de producción del NO basada en la reducción de nitrito a NO en condiciones de pH ácido, empleando compuestos que puedan actuar como antioxidantes, como las antocianinas (Bethke *et al.*, 2004). Esta síntesis se ha descrito en el apoplasto del tejido de aleurona de semillas de cereales durante la germinación en respuesta a giberelinas (GAs) y a ABA, debido a que son hormonas que acidifican rápidamente el medio (Bethke *et al.*, 2006).

3.2. Eliminación o detoxificación

Concentraciones excesivamente elevadas de NO pueden ser deletéreas para la planta y causar estrés nitrosativo (Corpas *et al.*, 2016), por lo que existen diferentes mecanismos de detoxificación del NO. Además, estos mecanismos de eliminación son necesarios para el control de la homeostasis del NO, de manera que la concentración de NO pueda controlarse espacial y temporalmente (Corpas *et al.*, 2001). Esto hace que el NO sea una buena molécula señalizadora, ya que, a pesar de su facilidad para difundir, su acción queda limitada a la célula e incluso al orgánulo en el que se produce (Neill *et al.*, 2003).

3.2.1. Reacciones no enzimáticas

Debido a que el NO es un radical libre, puede reaccionar rápidamente con el oxígeno molecular en una reacción de auto-oxidación para formar dióxido de nitrógeno, que en solución acuosa se degrada en las formas oxidadas nitrito y nitrato (Neill *et al.*, 2003). Esta reacción crearía un ciclo fútil del NO en la planta, ya que el nitrato y el nitrito son precursores del NO en la reacción catalizada por la NR o por la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Sin embargo, ambas reacciones están efectivamente separadas a nivel tisular, ya que las rutas

reductoras sólo se han detectado en aquellos tejidos que se encuentran en anaerobiosis o en oscuridad (Gupta *et al.*, 2005). Por otra parte, el propio dióxido de nitrógeno puede mediar reacciones fisiológicas reguladas por NO, como la proliferación y expansión celular (Takashi *et al.*, 2014) o la floración (Takahashi y Morikawa, 2014).

El NO también puede reaccionar con otras moléculas señalizadoras, las ROS, con las que comparte metabolismo y mecanismos de señalización dependiente del estado redox de la célula (Corpas y Barroso, 2013). El caso mejor estudiado es la reacción entre el radical superóxido y el NO para generar peroxinitrito, un compuesto altamente oxidante y aún más reactivo que el NO que causa una serie de modificaciones principalmente relacionadas con el estrés nitro-oxidativo (Bartesaghi y Radi, 2018). La formación espontánea de este compuesto se ha observado principalmente en peroxisomas, orgánulos citoplasmáticos cuyos componentes básicos son catalasas y flavín oxidasas productoras de peróxido de hidrógeno, por lo que son esenciales en el metabolismo de las ROS (Corpas y Barroso, 2014). El anión peroxinitrito es relativamente estable, pero se encuentra en equilibrio con el ácido peroxinitroso, que a su vez puede romperse homolíticamente para dar lugar a los radicales hidroxilo y dióxido de nitrógeno, eventualmente formando nitrito y nitrato (Pryor y Squadrito, 1995).

3.2.2. Reacciones enzimáticas

El NO puede interactuar con la forma reducida del glutatión o gamma-L-glutamyl-L-cysteinylglycine (GSH) para dar lugar a glutatión S-nitrosilado o S-nitrosoglutatión (GSNO), que es la forma principal de almacenamiento y transporte de NO en la planta (Airaki *et al.*, 2011; Malik *et al.*, 2011). El GSNO es el nitrosotiol no proteico de bajo peso molecular más abundante en la planta y su vida media, mayor que la del NO, depende directamente del estado redox de la célula, puesto que en presencia de agentes reductores, como NADH, GSH, o ascorbato (Airaki *et al.*, 2011), el GSNO puede ser metabolizado a la forma oxidada del glutatión (GSSG) y amoniaco en una reacción catalizada por la enzima GSNO reductasa (GSNOR) (Sakamoto *et al.*, 2002). Además, el pH neutro y

los metales de transición, como el cobre, también contribuyen a la reducción del GSNO a GSSG (Airaki *et al.*, 2011).

GSNOR es una formaldehído deshidrogenasa dependiente de GSH, conocida también como alcohol deshidrogenasa de clase III (Espunya *et al.*, 2003). En *A. thaliana* la actividad GSNOR está codificada por un único gen, *GSNOR1*, que está conservado en plantas superiores, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, y que también comparte homología con las GSNOR de bacterias y humanos (Liu *et al.*, 2001). La pérdida de función de esta enzima conlleva la acumulación de GSNO y la alteración de los niveles de proteínas S-nitrosiladas (Liu *et al.*, 2001). La importancia de la homeostasis del GSNO y, con ello, del NO, se evidencia porque los mutantes *gsnor* son hipersensibles a estrés nitrosativo (Sakamoto *et al.*, 2002). Esto hace que también sean hipersensibles a otros estreses, tanto bióticos (Feechan *et al.*, 2005) como abióticos, entre los que se encuentra el estrés por altas temperaturas, por lo que *GSNOR1* también recibe el nombre de *HOT5* (Lee *et al.*, 2008).

Además de tamponar los niveles de NO y actuar de reservorio, el GSNO controla la homeostasis del NO al suprimir la asimilación de nitrógeno y la reducción de nitrato y nitrito a NO a través de la represión transcripcional de los transportadores NRT1 y 2, y de la reducción de la actividad NR, ejerciendo un *feedback* negativo sobre su propia síntesis (Fruntillo *et al.*, 2014). Por otra parte, la propia GSNOR media su propia inhibición mediante S-nitrosilación, impidiendo la oxidación del GSNO y aumentando los niveles endógenos de nitrosotioles (Fruntillo *et al.*, 2014).

Debido a la capacidad del NO de reaccionar con los metales de transición, como el hierro, el grupo hemo de las hemoglobinas es capaz de unir tanto NO como oxígeno molecular. Los primeros indicios de la función detoxificadora del NO se encontraron en hemoglobinas simbióticas aisladas de nódulos de *Parasponia andersonii*, que unían NO con mayor eficiencia que oxígeno a pH ácido (Wittenberg *et al.*, 1986). En plantas encontramos tres grupos de hemoglobinas, simbióticas, no simbióticas y truncadas. Las simbióticas, que intervienen en la nodulación con bacterias fijadoras de nitrógeno, tienen una gran afinidad por el oxígeno y, aunque pueden unir NO, su disociación es muy baja, por lo que únicamente podrían favorecer su eliminación (Wittenberg *et al.*,

1986). Las truncadas, de secuencia más corta que las otras dos clases, tienen una afinidad baja por el oxígeno y una función desconocida en plantas, aunque su estructura es similar a la de hemoglobinas bacterianas que se han relacionado con la eliminación de peroxinitrito (Mukhi *et al.*, 2016; Ascenzi y Pesce, 2017).

Las hemoglobinas no simbióticas o fitoglobinas poseen funciones de transporte de oxígeno y NO en procesos relacionados con la división celular y el crecimiento, además de con respuestas a estrés por hipoxia (Perazzolli *et al.*, 2016). Hay dos clases, nsHb1 y nsHb2, que se diferencian en su afinidad por el oxígeno. Las hemoglobinas de tipo nsHb2 presentan baja afinidad por el oxígeno y una elevada constante de disociación, por lo que se ha propuesto como transportadora de oxígeno. Se expresan en raíces, hojas e inflorescencias y pueden ser inducidas por citoquininas, por lo que se cree que su función principal es llevar oxígeno a tejidos en crecimiento (Hunt *et al.*, 2001). Por otra parte, las nsHb1 se comportan de forma opuesta a las nsHb2 en cuanto a su afinidad por el oxígeno y se inducen por hipoxia, por sacarosa y durante la germinación de la semilla (Hunt *et al.*, 2001). Su función se ha identificado como la detoxificación de NO a nitrato en una reacción dependiente de NAD(P)H (Igamberdiev *et al.*, 2004; Perazzolli *et al.*, 2004). Además, se ha demostrado que la nsHb1 de *A. thaliana*, AHb1, es transnitrosilada por GSNO, lo que le permite transportar también este compuesto en forma de S-nitrosohemoglobina (Perazzolli *et al.*, 2004).

La principal función fisiológica de la oxidación de NO por las nsHb1 parece ser la protección frente al estrés nitrosativo causado por hipoxia (Dordas *et al.*, 2003; Perazzolli *et al.*, 2004). Durante la hipoxia, la NR produce grandes cantidades de NO (Rocket *et al.*, 2002), que pueden llegar a afectar a la respiración mitocondrial si este compuesto no es secuestrado por las hemoglobinas, que ayudan a mantener así el estado redox de la célula al reciclar NAD(P)H (Dordas *et al.*, 2013) y, con ello, el estatus energético de la planta permitiendo la producción de ATP mediante glicólisis y fermentación (Igamberdiev *et al.*, 2004).

Elevadas concentraciones de NO pueden modificar postraduccionalmente al complejo I y a la ATP sintasa de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, llegando a ser tóxicas al impedir la respiración. Esto promueve la

transferencia de electrones al oxígeno, aumentando así la formación de especies ROS y causando, en última instancia, muerte celular (Brown y Borutaite, 2002). Por este motivo, las mitocondrias vegetales poseen la capacidad de controlar los niveles de NO, convirtiéndolo bien en otros óxidos de nitrógeno (Gupta *et al.*, 2010), bien en peroxinitrito por reacción con superóxido (Radi *et al.*, 2002). La conversión de NO en peroxinitrito está regulada por el flujo de electrones que llega a la mitocondria en un momento dado. Si la respiración está inhibida, los electrones del complejo I y de NAD(P)H deshidrogenasas externas favorecen la formación de radicales superóxido que podrán reaccionar con el NO para formar peroxinitrito (Oliveira *et al.*, 2008). Sin embargo, la activación de la oxidasa alternativa, que es resistente a la inhibición por NO, impide la fuga de estos electrones y mantiene el correcto transporte de los mismos, consumiendo el oxígeno antes de que forme ROS y manteniendo a la vez los niveles de NO (Wulff *et al.*, 2009).

Finalmente, otras dos enzimas involucradas en la síntesis de NO también controlan su transformación en peroxinitrito, la NR y la XOR, ambas molibdoflavoproteínas. Estas enzimas tienen una función adicional a la síntesis de NO, la producción de superóxido a partir de nitrito y NADH en condiciones aeróbicas, regulando negativamente la acumulación de NO al promover su reacción con el anión superóxido (Godber *et al.*, 2000; Yamasaki y Sakihama, 2000). Por tanto, la función de estas enzimas en la homeostasis del NO depende directamente de la tensión superficial de oxígeno presente en el tejido en el que lleven a cabo su reacción.

4. Señalización del óxido nítrico

Actualmente no hay ninguna evidencia de la existencia de proteínas receptoras del NO, aunque sí se han identificado elementos *cis* de respuesta a NO en los promotores de genes eucariotas. Entre los genes de respuesta a NO, se encuentran principalmente genes de respuesta a defensa, muerte celular, transporte, metabolismo primario y metabolismo de ROS (Polverari *et al.*, 2003). Análisis bioinformáticos y transcriptómicos han identificado una serie de cajas sobrerrepresentadas en los promotores de estos genes, que se consideran

elementos *cis* de respuesta a NO. Entre ellos destacan los dominios bZIP, WRKY, cajas L1, cajas TATA, MYCL y MYB (Palmieri *et al.*, 2008). Por otra parte, recientemente se ha identificado un grupo de proteínas que actúan como sensores de NO, el grupo VII de factores de transcripción de respuesta a etileno o ERFVII (Gibbs *et al.*, 2014). Los ERFs son un grupo de factores transcripcionales muy amplio que pertenecen a la superfamilia AP2/ERF, con importantes funciones en la regulación transcripcional de multitud de procesos del crecimiento y el desarrollo, además de respuestas a estímulos ambientales. En *A. thaliana* se han identificado 139 ERF distintos, que se clasifican en doce grupos, ERFI a X, ERFVI-L y ERFXb-L. El grupo VII se caracteriza por un dominio amino terminal conservado que comienza por los residuos cisteína y arginina. En *A. thaliana* está formado por cinco miembros, ERF1/HRE1, HRE2, RAP2.12, RAP2.2 y RAP2.3 (Nakano *et al.*, 2006), y se ha demostrado que su estabilidad depende de la ruta de degradación proteolítica regulada por el extremo amino terminal o *N-end rule* (Gibbs *et al.*, 2011).

La ruta proteolítica *N-end rule* regula la vida media de las proteínas en función de sus residuos amino terminales. Todas las proteínas eucariotas se sintetizan con una metionina en su extremo amino, pero la acción de endopeptidasas y de metionina aminopeptidasas deja expuestos nuevos residuos aminoacídicos que pueden estabilizar o desestabilizar la proteína. Aquellas que poseen residuos desestabilizantes, conocidos como N-degrones, serán reconocidas por una clase de ubiquitina ligasas llamada N-recogninas (Varshavsky, 2011). La cisteína terminal de los ERFVII es susceptible de oxidación, proceso que permite la arginilación de la cisteína, transformándola en un N-degrón y posibilitando su ubiquitinación por la N-recognina PRT6 (Gibbs *et al.*, 2011).

Gibbs *et al.* (2014) han demostrado que los ERFVII se acumulan tanto en hipoxia como en ausencia de NO y que su degradación se incrementa en presencia de NO. Aunque no se ha identificado el mecanismo exacto de degradación, es muy posible que la cisteína terminal de los ERFVII tenga que ser modificada previamente a su arginilación (Hu *et al.*, 2005; Gibbs *et al.*, 2014). El papel sensor de los ERFVII se ha comprobado durante la respuesta a estreses abióticos, en particular en respuesta a sequía (Vicente *et al.*, 2017).

Se conocen pocos componentes que intervengan en las cascadas de transducción que desemboca en cambios rápidos en respuesta a cambios de concentración del NO en plantas, pero existen evidencias de que, al igual que en células animales, esta molécula actúa mediante una cascada de transducción en la que intervienen las MAP kinasas (MAPK), el catión calcio, el nucleótido adenosina-difosfato ribosa cíclico (cADPR) y el nucleótido guanosina-monofosfato cíclico (cGMP) (Pagnussat *et al.*, 2003, 2004; Lanteri *et al.*, 2006; Ye *et al.*, 2013). Una de las rutas mejor caracterizadas es la que desemboca en el cierre estomático por sequía. En este proceso, el NO incrementa paralelamente los niveles de calcio y los de cGMP en las células guarda mediante la activación de las MAPKs, lo que permite que se pierda presión de turgencia y se cierren los estomas (Neill *et al.*, 2008). Además, el NO no participa de forma aislada en la activación de los procesos que regula, sino que lo hace interaccionando con otros reguladores del crecimiento, como las fitohormonas. De nuevo, el cierre estomático es un buen ejemplo, puesto que de forma redundante, el NO promueve la S-nitrosilación de canales de potasio en respuesta a ABA, inactivándolos (Sokolovski y Blatt, 2004).

Por tanto, la señalización del NO se produce mediante la modificación postraduccional de otras moléculas biológicas, principalmente proteínas y ácidos grasos, que desembocan en modificaciones estructurales que alteran la actividad de la proteína o en cambios en la expresión génica, como en el caso de los ERFVII (Figura 2). Las modificaciones causadas por el NO sobre sus dianas pueden aumentar o disminuir la estabilidad y la actividad de la molécula diana, fomentar la formación de complejos o la unión al DNA (Albertos *et al.*, 2016). A continuación se detallan las modificaciones que puede causar el NO.

4.1. Nitrosilación de metales

La nitrosilación de metales consiste en la unión del átomo de nitrógeno del radical NO•, gracias a su electrón desapareado, a los metales de transición presentes en metaloproteínas. El grupo resultante es susceptible a ataques nucleofílicos y, en menor medida, electrofílicos, que permiten la participación de complejos metal-nitrosilados en la formación de grupos S-nitrosioles (Astier y Lindermayr, 2012). La nitrosilación de metales más estudiada en plantas es la

modificación del hierro en el grupo hemo de las hemoglobinas, descrita en la sección 3.2.2. Además de estas proteínas, en plantas tan solo se ha demostrado la metal-nitrosilación de cuatro proteínas, la lipooxigenasa-1 de soja (Nelson, 1987), los grupos hemo de la catalasa y la ascorbato peroxidasa en *A. thaliana* (Clark *et al.*, 2000) y una flavín monooxigenasa con actividad guanilato ciclasa en *A. thaliana* (Mulaudzi *et al.*, 2011).

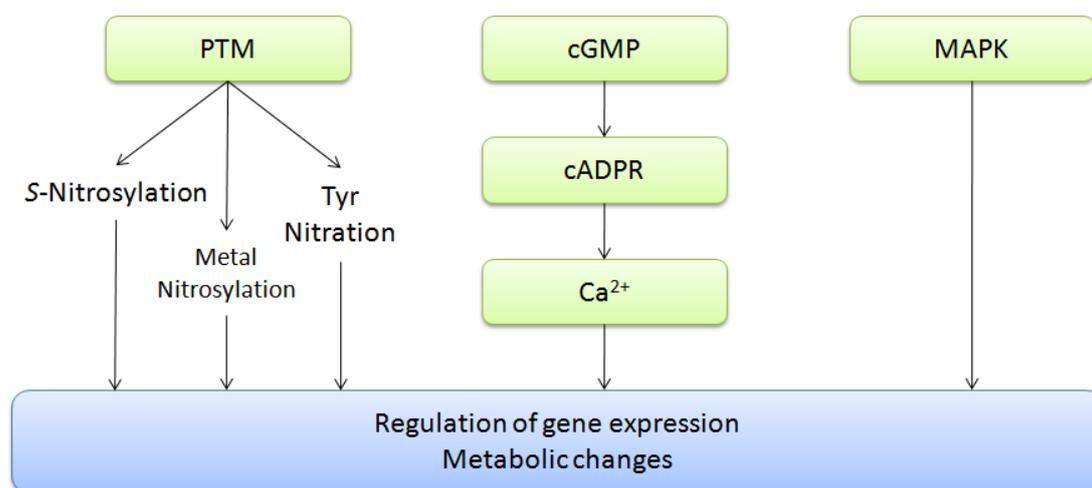


Figura 2. Resumen de los procesos implicados en la transducción de la señal del NO.

4.2. S-nitrosilación de proteínas

La S-nitrosilación es la modificación postraducciona mediada por NO que más se ha estudiado. Es una modificación dinámica y reversible consistente en la unión covalente de NO a un grupo tiol o a un residuo de cisteína de la proteína diana, generando un grupo S-nitrosotiol (Astier y Lindermayr, 2012). La S-nitrosilación sólo se produce en ciertos residuos de cisteína que se encuentran en un microentorno apropiado, en un bolsillo de hidrofobicidad que pueda favorecer la nucleofilia del residuo cisteína. Mediante análisis predictivos de modelos de Markov, se han identificado las secuencias consenso para S-nitrosilación, que son del tipo A-X(9)-C, C-X(6)-G, y C-X(2)-I (Lamotte *et al.*, 2014). El agente nitrosilante puede ser el NO en sí en presencia de oxígeno, una proteína S-nitrosilada o el GSNO. La formación de un nitrosotiol requiere que el grupo tiol de la cisteína esté previamente oxidado, convirtiéndose en un radical que sí puede reaccionar con el NO (Zaffagnini *et al.*, 2016). Por otra parte, la S-nitrosilación que utiliza otras proteínas S-nitrosiladas o GSNO también se conoce como trans-S-nitrosilación (Begara-Morales *et al.*, 2013).

El grupo nitroso de las cisteínas *S*-nitrosiladas puede ser eliminado por agentes reductores como el GSH o las tiorredoxinas (Zaffagnini *et al.*, 2016). Sin embargo, la denitrosilación mediada por GSH es en realidad una transnitrosilación que conlleva la formación de GSNO, por lo que se requiere la actividad de la GSNOR para que la denitrosilación sea verdaderamente efectiva, ya que esta enzima no produce RNS al degradar el GSNO a GSSG. Este mecanismo de denitrosilación ha sido probado en la forma *S*-nitrosilada de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Zaffagnini *et al.*, 2013). Al contrario que la GSNOR, las tiorredoxinas pueden actuar directamente sobre los nitrosotioles gracias a las cisteínas nucleofílicas de su centro activo (Kneeshaw *et al.*, 2014).

En plantas se han descrito cientos de proteínas susceptibles de nitrosilarse, identificadas mediante análisis proteómicos, pero solo se ha confirmado la *S*-nitrosilación *in vivo* de una veintena de ellas (Zaffagnini *et al.*, 2016), en su mayoría implicadas en la respuesta a estreses bióticos, como NPR1 y TGA1 (Lindermayr *et al.*, 2010), en la regulación redox, como la peroxirredoxina IIE (Romero-Puertas *et al.*, 2008) y la ascorbato peroxidasa (de Pinto *et al.*, 2013), en el metabolismo primario, como la RuBisCo (Abat *et al.*, 2009) y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Lindermayr *et al.*, 2005), o en la señalización hormonal, como ABI5 (Albertos *et al.*, 2015), AHP1 (Feng *et al.*, 2013) o TIR1 (Terrile *et al.*, 2012).

4.3. Nitración de proteínas

La nitración de residuos de tirosina es la reacción entre un agente nitrante, normalmente el peroxinitrito (Kolbert *et al.*, 2017) o nitroalquenos (Mata-Pérez *et al.*, 2017), con un residuo tirosina de la proteína diana, que conlleva la sustitución de un átomo de hidrógeno del residuo aminoacídico por un grupo nitro en la posición *orto* del grupo hidroxifenol. Esta reacción tiene como resultado la formación de 3-nitrotirosina, lo que provoca cambios conformacionales en la proteína diana que modifican su actividad (Astier y Lindermayr, 2012). La nitración es un proceso específico, pero se desconoce la secuencia consenso que determina la nitración de una proteína, aunque se sabe que la estructura secundaria de la proteína y la localización de la tirosina en esa

estructura tienen gran influencia en la nitración (Yeo *et al.*, 2015), y que la nitración se favorece si hay residuos cisteína o metionina cercanos a la tirosina diana (Souza *et al.*, 2008). Durante mucho tiempo se ha creído que esta modificación covalente era irreversible, pero recientemente se ha identificado una enzima con actividad denitrasa en líneas celulares murinas y se ha demostrado su capacidad para revertir la nitración de la ciclooxigenasa *in vivo* (Deeb *et al.*, 2013). Sin embargo, en plantas aún no se ha identificado ninguna enzima con capacidad denitrasa.

La nitración, de manera similar a la *S*-nitrosilación, resulta en la degradación proteolítica de la diana nitrada, aunque hasta ahora en *A. thaliana* este mecanismo solo se ha identificado para los receptores solubles de ABA PYR1/PYL/RCAR, que son poliubiquitinados y degradados por el proteosoma 26S tras su nitración (Castillo *et al.*, 2015). Las dianas de nitración identificadas en plantas incluye a la metionina sintasa (Lozano-Juste *et al.*, 2011), una *O*-acetilserina-tiol-liasa (Álvarez *et al.*, 2011), la proteína D1 del fotosistema II (Galetskiy *et al.*, 2011), la isocitrato deshidrogenasa (Begara-Morales *et al.*, 2013a), la ascorbato peroxidasa citosólica (Begara-Morales *et al.*, 2013b), la hidroxipiruvato reductasa peroxisomal (Corpas *et al.*, 2013), el receptor de ABA PYR1 (Castillo *et al.*, 2015), una superóxido dismutasa mitocondrial (Holzmeister *et al.*, 2014), la monodehidroascorbato reductasa 1 (Begara-Morales *et al.*, 2015) y una proteína cloroplástica del fotosistema II con actividad tiorredoxina (Takashi *et al.*, 2015). En la mayoría de casos se ha comprobado que la nitración resulta en la inactivación de la proteína, por lo que la nitración parece tener un efecto general inhibitorio sobre la fotosíntesis y la producción de ROS (Kolbert *et al.*, 2017).

Todas estas modificaciones postraduccionales pueden resultar en la alteración de la expresión génica. En plantas se han identificado numerosos genes regulados por NO, mediante el uso de análisis transcriptómicos (Moreau *et al.*, 2010). La mayoría de estos genes con expresión diferencial codifican proteínas relacionadas con la respuesta de defensa, la muerte celular, la homeostasis del hierro, la floración, el transporte celular, la generación de ROS, la biosíntesis de lignina, la detoxificación celular y la regulación de la síntesis de

hormonas como el ácido salicílico, el jasmónico o el etileno (Palmieri *et al.*, 2008).

5. Efectos fisiológicos del óxido nítrico

Desde el reconocimiento de la importancia del NO en la respuesta inmune vegetal, se han descrito múltiples funciones para esta molécula en procesos esenciales del crecimiento y desarrollo vegetal, además de en numerosas respuestas a estreses bióticos y abióticos, que pueden llegar a parecer contradictorias. Cuando se discuten los efectos fisiológicos del NO hay que tener muy en cuenta sus propiedades físico-químicas, su homeostasis y su señalización. A continuación se introduce el papel del NO durante los procesos fisiológicos que se tratarán en mayor detalle en los siguientes capítulos.

5.1. Dormición y germinación de semillas

La germinación puede definirse como el conjunto de procesos morfogénéticos y metabólicos que tienen como resultado la transformación del embrión durmiente contenido en la semilla en una plántula capaz de valerse por sí misma, que finalmente se desarrollará hasta convertirse en una planta adulta (Bewley, 1997). Por el contrario, la dormición es la incapacidad para germinar de semillas viables, aunque las condiciones ambientales sean favorables (Considine y Considine, 2016). Tras la imbibición de la semilla, se ha detectado un aumento de los niveles de NO en el endospermo de las semillas (Liu *et al.*, 2009), y diversos estudios han demostrado que el NO rompe la dormición de las semillas y, por consiguiente, favorece su germinación (Beligni y Lamattina, 2000; Bethke *et al.*, 2006), además de promover el crecimiento post-germinativo y la desetiología de la plántula (Beligni y Lamattina, 2000; Albertos *et al.*, 2015). Así, donadores de NO como el SNAP, el SNP y el GSNO rompen la germinación de las semillas (Bethke *et al.*, 2004), mientras que el secuestrador de NO cPTIO mantiene la dormición (Libourel *et al.*, 2006).

Durante la germinación, el NO induce el catabolismo del ácido abscísico (ABA), que mantiene la dormición de la semilla (Liu *et al.*, 2009) e inactiva mediante nitración a la enzima ABA3 (Arc *et al.*, 2013), implicada en la

biosíntesis del ABA (Bittner *et al.*, 2001). Además de su efecto en los niveles endógenos de ABA, el NO afecta a su señalización al S-nitrosilar al represor transcripcional ABI5, marcándolo así para su degradación por proteólisis (Albertos *et al.*, 2015), y a la kinasa SnRK2, que activa la respuesta a ABA (Wang *et al.*, 2015). El NO también promueve la biosíntesis de las giberelinas (GAs), que antagonizan al ABA durante la germinación, al aumentar la transcripción de dos enzimas implicadas en la biosíntesis de GAs, *GA3ox1* y *GA3ox2* (Bethke *et al.*, 2007).

5.2. Respuesta a estreses abióticos

Se ha descrito que diversos estreses abióticos como los producidos por metales pesados, radiación UV, sequía o salinidad producen un aumento importante de los niveles de NO. Este NO se produce en la planta conjuntamente con ROS en cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas (Qiao y Fan, 2008). Las ROS, aunque son necesarias para la señalización celular, provocan estrés oxidativo cuando se encuentran en elevadas concentraciones. El NO actúa como citoprotector al regular los niveles de ROS mediante la interacción directa con estas especies y mediante la inducción de los mecanismos celulares de homeostasis redox. También se ha observado que el NO regula los genes que participan en las respuestas frente a los estreses abióticos (Siddiqui *et al.*, 2011).

En el estrés osmótico y en el estrés por sequía, el efecto protector del NO está relacionado con la señalización del ABA y el cierre estomático (Wilson *et al.*, 2009). El movimiento estomático es fundamental para la regulación de la pérdida de agua y está regulado por ABA. El ABA se acumula en las células guarda en respuesta a un déficit hídrico y cambia los flujos iónicos, dando lugar a un aumento del contenido hídrico y de la turgencia de las células guarda, lo que produce el cierre estomático. Se ha observado que el ABA induce un incremento en la síntesis de NO en las células guarda. Además, el aporte exógeno de NO mediante donadores ha permitido demostrar que este compuesto produce el cierre estomático y reduce la transpiración en numerosas especies, mientras que la aplicación del secuestrador de NO cPTIO inhibe el cierre estomático inducido por ABA (García-Mata y Lamattina, 2002).

El estrés salino supone para la planta tanto toxicidad iónica como estrés oxidativo y osmótico. Se ha demostrado que el aporte exógeno de NO aumenta la tolerancia a este estrés en varias especies, tanto en tejidos tratados directamente como en otros tejidos no tratados distales, indicando que esta molécula regula la respuesta sistémica a estrés salino (Molassiotis *et al.*, 2010). El empleo de mutantes deficientes en NO de la planta modelo *A. thaliana* ha permitido observar que el NO tiene un papel esencial en la tolerancia a la salinidad, ya que estos mutantes presentan una mayor acumulación de sodio, menor absorción de potasio y menor tasa de supervivencia en presencia de estrés salino moderado (Zhao *et al.*, 2007).

5.3. Desarrollo de raíces y arquitectura radicular

La raíz es un órgano de la planta con dos funciones principales, la sujeción de la planta al suelo y el suministro de agua y nutrientes inorgánicos al resto de la planta. Se ha observado que elevadas concentraciones de NO inhiben el crecimiento de la raíz principal, un fenotipo utilizado como herramienta de selección de mutantes alterados en la homeostasis de NO (He *et al.*, 2004). Además, se ha demostrado que la adición exógena de NO mediante compuestos químicos donadores favorece la formación de raíces laterales y raíces adventicias (Pagnussat *et al.*, 2002; Correa-Aragunde *et al.*, 2004).

Gran parte del papel del NO como modulador del desarrollo radicular se explica por la existencia de un *crosstalk* entre esta molécula y la fitohormona auxina. Las auxinas promueven la acumulación de NO (Pii *et al.*, 2007; Fattorini *et al.*, 2017) y a su vez el NO actúa en la ruta de señalización de auxinas, promoviendo la formación de pelos radiculares (Lombardo *et al.*, 2006) y raíces laterales (Correa-Aragunde *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2017). Aunque se ha demostrado que el NO es capaz de *S*-nitrosilar la proteína receptora de auxinas TIR1 (Terrile *et al.*, 2012), varios estudios señalan que el NO regula la arquitectura radicular a través de la supresión de la respuesta a auxinas (Fernández-Marcos *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2015; Yuan y Huang, 2016), especialmente durante las respuestas a estrés abiótico (Chen *et al.*, 2013; Gong *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2017). Por otra parte, también hay evidencias que implican al

NO en la inducción del gravitropismo dependiente de auxinas, ya que, al igual que éstas, presenta una acumulación asimétrica en la parte superior e inferior de la raíz (Hu et al., 2005). Recientemente, se ha demostrado que la estimulación gravitrópica de las raíces induce una rápida acumulación de NO que resulta en la estabilización de la proteína transportadora de auxinas PIN2, modulando la acumulación de auxina necesaria para el crecimiento asimétrico de la raíz en respuesta a la gravedad (París *et al.*, 2018).

