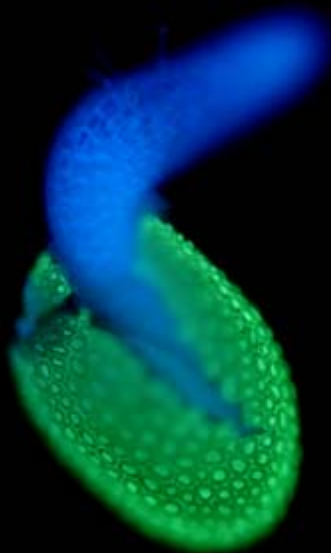


**BIOSÍNTESIS, SEÑALIZACIÓN Y MODO
DE ACCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EN
*Arabidopsis thaliana***



Jorge Lozano Juste

TESIS DOCTORAL
2011



Director: José León Ramos



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

Departamento de Biotecnología

**BIOSÍNTESIS, SEÑALIZACIÓN Y MODO DE ACCIÓN
DEL ÓXIDO NÍTRICO EN *Arabidopsis thaliana***

Jorge Lozano Juste
TESIS DOCTORAL

Director:

Dr. José León Ramos

Valencia, 2011

**BIOSÍNTESIS, SEÑALIZACIÓN Y MODO DE ACCIÓN
DEL ÓXIDO NÍTRICO EN *Arabidopsis thaliana***

Memoria presentada por
JORGE LOZANO JUSTE
para optar al grado de
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA por la UPV

Director
Dr. José León Ramos

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
Departamento de Biotecnología
Valencia, 2011



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

El **Dr. José León Ramos**, Investigador científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICA:

Que la presente memoria titulada “BIOSÍNTESIS, SEÑALIZACIÓN Y MODO DE ACCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EN *Arabidopsis thaliana*” ha sido realizada por Jorge Lozano Juste bajo mi dirección y constituye su Memoria de Tesis para optar al grado de Doctor en Biotecnología.

Para que así conste a todos los efectos oportunos, firma el presente certificado en Valencia, a 18 de Mayo de 2011.

Dr. José León Ramos

A mis padres

RESUMEN

El óxido nítrico (NO) es una molécula gaseosa, muy reactiva, que ha ganado un creciente interés en los últimos años debido a su reconocido papel en señalización. Sin embargo, tanto su biosíntesis como su señalización o su modo de acción siguen siendo, en gran medida, desconocidas, lo que limita el avance del conocimiento de las bases moleculares de su función en plantas. En la presente tesis, hemos identificado las principales rutas enzimáticas de biosíntesis de NO en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* mediante una aproximación genética. En un segundo paso, hemos utilizado los mutantes generados para establecer el papel del NO, y de cada una de sus rutas de biosíntesis, en diferentes procesos de desarrollo y de respuesta a estrés. Así, hemos descrito el papel negativo del NO en la sensibilidad al ácido abscísico en la regulación de la dormición y la germinación de las semillas, el establecimiento de plántula y el cierre estomático. Por otro lado, hemos definido el mecanismo molecular por el que el NO promueve la fotomorfogénesis. Brevemente, la producción de NO tras la transición de oscuridad a luz regula la expresión de genes clave de la fotomorfogénesis, como *SLY1* y los factores de transcripción de tipo *PIF*, lo que promueve la des-etiolación que se concreta en una inhibición de la elongación del hipocotilo en condiciones de iluminación. Finalmente, para avanzar en el conocimiento sobre el modo de acción del NO, hemos caracterizado una de las modificaciones post-traduccionales mediadas por NO mediante el desarrollo de un método proteómico que nos permite enriquecer e identificar proteínas nitradas en residuos de tirosina. El trabajo desarrollado en esta tesis doctoral ha ayudado a avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares por los que el NO regula algunos procesos fisiológicos en *Arabidopsis thaliana* y ha abierto numerosas puertas para el posterior análisis de muchos otros.

RESUM

L'òxid nítric (NO) és una molècula gasosa, molt reactiva, que ha guanyat un creixent interès en els últims anys a causa del seu reconegut paper en senyalització. No obstant això, tant el seu biosíntesi com la seua senyalització o la seua manera d'acció segueixen sent, en gran mesura, desconegudes, la qual cosa limita l'avanç del coneixement de les bases moleculars de la seva funció en plantes. En la present tesi, hem identificat les principals rutes enzimàtiques de biosíntesi de NO en la planta model *Arabidopsis thaliana* mitjançant una aproximació genètica. En un segon pas, hem utilitzat els mutants generats per establir el paper del NO, i de cadascuna de les seves rutes de biosíntesi, en diferents processos de desenvolupament i de resposta a estrès. Així, hem descrit el paper negatiu del NO en la sensibilitat a l'àcid abscísic en la regulació de la dormició i la germinació de les llavors, l'establiment de plàntula i el tancament estomàtic. D'altra banda, hem definit el mecanisme molecular pel qual el NO promou la fotomorfogènesi. Breument, la producció de NO després de la transició de foscor a llum regula l'expressió de gens clau de la fotomorfogènesi, com *SLY1* i els factors de transcripció de tipus *PIF*, la qual cosa promou la des-etiolació que es concreta en una inhibició de l'elongació del hipocòtil en condicions d'il·luminació. Finalment, per avançar en el coneixement sobre la manera d'acció del NO, hem caracteritzat una de les modificacions post-traduccionals intervingudes per NO mitjançant el desenvolupament d'un mètode proteòmic que ens permet enriquir i identificar proteïnes nitrades en residus de tirosina. El treball desenvolupat en aquesta tesi doctoral ha ajudat a avançar en el coneixement dels mecanismes moleculars pels quals el NO regula alguns processos fisiològics en *Arabidopsis thaliana* i ha obert nombroses portes per a la posterior anàlisi de molts uns altres.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a very reactive gaseous molecule that has gained an increasing interest lately due to its well known signaling role. However, its biosynthesis, signaling and mode of action are still largely unknown, thus limiting our knowledge about the molecular basis of NO function in plants. In this Thesis, we have identified, by a genetic approach, the main NO biosynthetic pathways in the model plant *Arabidopsis thaliana*. Next, we have used the NO deficient mutants we have generated to characterize NO function in developmental and stress-related responses. We have characterized a negative role of NO in ABA sensitivity and further regulation of seed dormancy and germination, seedling establishment and stomata closure. On the other hand, we have also defined the molecular mechanism underlying the positive regulation exerted by NO on photomorphogenesis. Briefly, the production of NO upon darkness to light transition modulates the expression of key photomorphogenesis-related genes such as *SLY1* and *PIF5*, thus ensuring de-etiolation under light conditions. Finally, to gain further insight on the regulatory mode of action of NO, we have optimized a proteomic methodology to characterize a NO-based post-translational modification by nitration of tyrosine residues that help in identifying target proteins of direct NO action. This work has allowed to improve our knowledge on NO regulation of different physiological processes in *Arabidopsis* and has opened many others for further analysis.

Índice de contenidos

Introducción	Pág	1
Objetivos	Pág	5
Capítulo 1. Biosíntesis de óxido nítrico (NO)	Pág	7
Introducción	Pág	8
Mecanismos no enzimáticos de producción de NO	Pág	8
Mecanismos enzimáticos de producción de NO	Pág	8
Ruta dependiente de arginina	Pág	9
Rutas dependientes de nitrito	Pág	11
Metabolismo del NO	Pág	13
Resultados	Pág	15
Caracterización de mutantes en las principales vías de biosíntesis de NO	Pág	15
Producción de NO en los diferentes mutantes	Pág	17
Obtención y caracterización del triple mutante <i>nia1nia2noa1-2</i>	Pág	19
Las plantas deficientes en NO muestran alteraciones en el desarrollo	Pág	21
Discusión	Pág	23
Capítulo 2. Interacción del NO y el ABA en procesos de desarrollo y respuesta a estrés	Pág	27
Introducción	Pág	28
Interacción entre el NO y el ABA en procesos de desarrollo	Pág	28
Interacción entre el ABA y el NO en la regulación del cierre estomático	Pág	31
Resultados	Pág	35
La producción de NO activada por ABA está comprometida en los mutantes NO deficientes	Pág	35
Interacción entre el NO y el ABA en el control de la dormición, germinación y el establecimiento de plántula	Pág	36
Análisis de la expresión de genes de respuesta a ABA en los mutantes deficientes en NO	Pág	40
La deficiencia en NO confiere resistencia a la deshidratación	Pág	41
Discusión	Pág	44
Capítulo 3. Interacción NO-Giberelinas en el desarrollo regulado por luz	Pág	49
Introducción	Pág	50
Resultados	Pág	59
El mutante deficiente en NO <i>nia1,2noa1-2</i> , presenta hipocotilos largos en luz	Pág	59
El NO reduce la expresión de los genes <i>PIF</i> y provoca la acumulación de proteínas DELLA para regular el tamaño del hipocotilo	Pág	62
El NO provoca la acumulación de DELLAs mediante la represión de <i>SLY1</i>	Pág	69
La producción de NO responde a transiciones oscuridad-luz y es regulada negativamente por GAs	Pág	73
Discusión	Pág	74
Capítulo 4. Modo de acción del NO: Nitración de proteínas	Pág	81

Introducción	Pág 82
Nitrosilación de cisteínas (S-nitrosilación)	Pág 83
Nitración de tirosinas (Y-nitración)	Pág 84
Nitración de proteínas en plantas	Pág 87
Resultados	Pág 89
Detección y purificación de proteínas nitradas	
<i>in vivo</i> en Arabidopsis	Pág 89
Identificación de proteínas potencialmente nitradas	Pág 92
El análisis de ontología génica apunta a enzimas del	
metabolismo primario y proteínas estructurales	
del citoesqueleto como dianas generales de nitración	
en Arabidopsis	Pág104
Identificación del sitio de nitración de la	
Metionina Sintasa 1	Pág105
Discusión	Pág107
Conclusiones	Pág117
Materiales y Métodos	Pág119
Bibliografía	Pág139
Anexo: Publicaciones derivadas de la tesis doctoral	Pág177

INTRODUCCIÓN

Introducción

Uno de los pilares fundamentales para la aparición de vida en la superficie de la Tierra es la existencia de los organismos fotosintéticos capaces de producir y mantener una atmósfera rica en oxígeno. Hace unos 3000 millones de años, las plantas iniciaron el camino de la colonización del medio terrestre, y su aparición hizo posible el desarrollo de todas las formas de vida terrestre que hoy conocemos. Así, se hace imprescindible estudiar el funcionamiento de estos organismos fotosintéticos, que son, al menos en parte, responsables de la vida animal en la Tierra.

Existen numerosas diferencias entre los reinos animal y vegetal. A nivel celular, la diferencia más importante es que las plantas, a diferencia de los animales, presentan un orgánulo denominado cloroplasto (Strittmatter et al., 2010). En el interior de este orgánulo, se sintetiza y acumula clorofila, un pigmento con unas propiedades únicas que permite a la célula vegetal obtener energía de una fuente inagotable como es la luz solar, lo que supone una ventaja adaptativa frente a las células animales. Además, a diferencia de los animales, capaces de cambiar su localización en busca de un ambiente más favorable, las plantas son organismos sésiles que han evolucionado estableciendo un gran conjunto de respuestas adaptativas que los hacen extremadamente plásticos (Nicotra et al., 2010).

Esta plasticidad característica de las plantas obedece a una serie de mecanismos moleculares que hacen que estas respuestas adaptativas funcionen correctamente (Trewavas 2009). Uno de los pilares fundamentales de esta regulación es la función que ejercen determinadas moléculas, denominadas hormonas vegetales o fitohormonas, que gobiernan el resto de respuestas (Santner et al., 2009). Existen cinco hormonas consideradas clásicas: auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico. Cada una de ellas tiene un papel crucial en procesos esenciales para el correcto desarrollo de una planta, tales como: el establecimiento de la polaridad en el embrión (auxinas), la promoción de la división celular (citoquininas), la elongación de las células fomentando el crecimiento (giberelinas, GAs), la correcta maduración de los frutos para una efectiva dispersión de las semillas (etileno), y el establecimiento del momento idóneo para la germinación que garantice que el individuo progrese de una forma adecuada (ácido abscísico, ABA), entre otros (Buchanan et al., 2000). Estas hormonas vegetales fueron descritas como fruto de la investigación en una gran variedad de especies vegetales que presentaban interés agronómico (maíz, arroz, cebada, trigo, ...). Sin embargo, alrededor de los años 80 apareció un nuevo concepto unificador. Basándose en que las diferentes especies vegetales poseen más características en común de las que las diferencian, los investigadores trataron de concentrarse en la investigación de especies modelo de fácil manejo, como *Arabidopsis thaliana*, que permitieran acelerar el conocimiento sobre la biología de plantas y extrapolarlo a las especies de interés agronómico (Harberd 2006). Fruto de esa idea, a lo largo de los años, a las cinco hormonas clásicas, se les han ido incorporando nuevas hormonas o reguladores del crecimiento como son: el

ácido salicílico (SA), los jasmonatos (JA), las poliaminas, los brasinoesteroides y las estrigolactonas entre otros (Kuppusamy et al., 2009; Xie y Yoneyama 2010). La acción de cada una de estas moléculas por separado así como la interacción existente entre ellas es objeto de intensa investigación en la actualidad. Sin embargo, los modelos elaborados hasta la fecha resultan incompletos y apuntan a la existencia de nuevos reguladores del crecimiento todavía por caracterizar (Lopez-Bucio et al., 2006). Una nueva molécula reguladora que podría cubrir alguna de estas ausencias es el óxido nítrico (NO).

Hasta hace tan sólo dos décadas, se pensaba que el NO no tenía ningún papel en la regulación de la fisiología de ningún organismo, debido a su naturaleza reactiva. Sin embargo, en la actualidad, sabemos que el NO está involucrado en procesos que incluyen la resistencia a enfermedades, la adaptación frente a factores de estrés de tipo abiótico y también juega un papel importante en procesos de crecimiento y desarrollo (Besson-Bard et al., 2008b). No hay duda de que la investigación en NO es, hoy en día, uno de los campos más activos en ciencia en el que más de 7000 artículos han sido publicados el pasado año (basado en búsquedas en PubMed 2010).

El NO es una de las moléculas más simples y ubicuas de la atmósfera. Tiene una naturaleza gaseosa y radicalaria, y es producido biológicamente. Estas propiedades permiten al NO viajar dentro de las células e incluso atravesar membranas sin procesos dependientes de energía, permitiendo la comunicación entre células vecinas (Ignarro 1990). Debido a su rápido movimiento y eliminación, el NO es una molécula excepcional para la señalización, tanto intracelular como intercelular, de procesos fisiológicos (Neill et al., 2002b; Lamattina et al., 2003). El NO puede, además, interactuar con otras moléculas señalizadoras contribuyendo a la amplificación de las cascadas de señalización. Su versatilidad confiere a esta molécula la propiedad de participar simultáneamente en diferentes compartimentos celulares e incluso en direcciones opuestas (Beligni y Lamattina 1999; Clarke et al., 2000; Beligni et al., 2002; Tada et al., 2004; Neill 2005; Mur et al., 2006). Así pues, el comportamiento del NO recuerda al de una hormona, aunque su naturaleza inorgánica la aleja de esta clase de moléculas.

Además, desde un punto de vista molecular, el NO actúa a diferentes niveles. Puede por un lado actuar sobre la expresión génica, regulando genes que cubren todos los aspectos del crecimiento y desarrollo, así como la respuesta a estrés (Huang et al., 2002; Polverari et al., 2003; Parani et al., 2004) y, por otro lado, puede actuar directamente sobre las proteínas modificando su actividad, localización, interacción, o degradación mediante su modificación post-traducciona (Gow et al., 2004). Aunque existen varios tipos de modificaciones post-traduccionales dependientes de NO, la nitrosilación de cisteínas y la nitración de tirosinas, han sido las más estudiadas desde el punto de vista de la señalización celular (Gow et al., 2004).

Años de investigación han resuelto que el papel señalizador del NO se extiende a todos los reinos, regulando procesos en organismos tan dispares como bacterias, protistas, hongos, animales y plantas. Esta conclusión apunta hacia un origen muy ancestral de esta molécula y de su

utilización por parte de los organismos vivos. Se ha propuesto que en estadios tempranos de la evolución, el NO ejerció una actividad fundamentalmente antioxidante. Como consecuencia del desarrollo de organismos más complejos, nuevas y especializadas actividades antioxidantes co-evolucionaron, por lo que el NO fue adquiriendo nuevas funciones contribuyendo así a la extensa y compleja red de señalización celular en la actualidad.

En los últimos años, la investigación sobre el NO en la biología de plantas ha contribuido a su caracterización como un regulador crucial del crecimiento y desarrollo de las plantas (Besson-Bard et al., 2008b). Los procesos que controla, cubren todo el ciclo vital de las plantas, interviniendo en la dormición y germinación de semillas, el crecimiento vegetativo, la floración, la fertilidad y la senescencia. Además, regula la adaptación frente a factores de estrés tanto de tipo biótico como abiótico (Delledonne et al., 1998; Beligni y Lamattina 2000; Bethke et al., 2004b; Pagnussat et al., 2004; He et al., 2004; Prado et al., 2004; Zeier et al., 2004; Hu et al., 2005; Guo y Crawford 2005; Correa-Aragunde et al., 2006; Mishina et al., 2007). El NO regula estos procesos, al menos en parte, mediante la interacción con las rutas de señalización de las diferentes hormonas (Delledonne et al., 1998; Dangl 1998; Tun et al., 2001; Desikan et al., 2002; Beligni et al., 2002; Orozco-Cardenas y Ryan 2002; Guo et al., 2003; Pagnussat et al., 2004; Huang et al., 2004; Jovanovic et al., 2005; Bethke et al., 2006a; Lindermayr et al., 2006; Tun et al., 2006; Flores et al., 2008; Groppa et al., 2008). De una forma paralela, se ha descrito tanto la producción de NO tras la aplicación de diferentes hormonas como las auxinas (Pagnussat et al., 2002; Pagnussat et al., 2003; Kolbert et al., 2008b; a), citoquininas (Tun et al., 2001; Tun et al., 2008), ABA (Neill et al., 2002a; Bright et al., 2006), SA (Zottini et al., 2007), JA ((Huang et al., 2004), GAs (Bethke et al., 2004a) y poliaminas (Tun et al., 2006), como la modulación de los niveles de diferentes hormonas por NO (Huang et al., 2004; Xu et al., 2005; Gniazdowska et al., 2007; Mur et al., 2008; Liu et al., 2009b). Todos estos datos apuntan hacia un papel central del NO en el crecimiento y desarrollo vegetal mediante su interacción en la biosíntesis, metabolismo o señalización de las diferentes hormonas y reguladores del crecimiento. Debido a la diversidad de procesos que regula y a su interacción con las diferentes hormonas, la idea inicial que definía al NO como una molécula de respuesta a estrés, se está expandiendo ahora hacia una participación del NO en procesos del crecimiento y desarrollo en el que el NO juega un papel integrador.

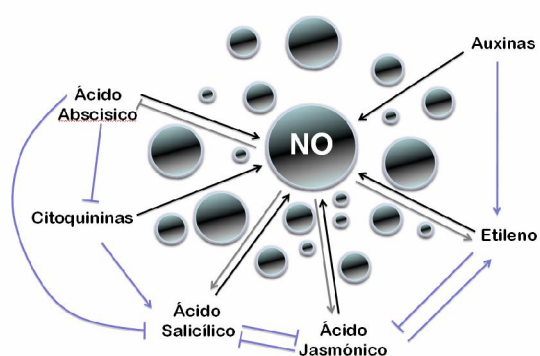


Figura 1. Esquema mostrando el papel integrador del NO en la señalización de las diferentes hormonas.

OBJETIVOS

Objetivos

El presente trabajo pretende analizar la biosíntesis, señalización y modo de acción del óxido nítrico (NO) en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Para ello se plantean los siguientes objetivos:

1. Caracterización funcional de mutantes afectados en la síntesis de NO.
2. Estudio de la interacción del NO con el ácido abscísico en la regulación del desarrollo y las respuestas a estrés abiótico.
3. Estudio de la interacción funcional del NO con la señalización de las giberelinas en el control de la fotomorfogénesis.
4. Análisis del modo de acción del NO mediante la identificación proteómica de proteínas nitradas.

CAPÍTULO 1: BIOSÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO

Introducción

El óxido nítrico (NO) es una molécula gaseosa que regula el establecimiento de la defensa frente a bacterias, insectos, hongos y virus, y también la supervivencia de las plantas frente a condiciones ambientales adversas (Delledonne et al., 1998; Delledonne et al., 2001; Besson-Bard et al., 2008b; Qiao y Fan 2008; Gas et al., 2009; Leitner et al., 2009). Además, en los últimos años, se ha documentado su participación en la regulación de importantes procesos del crecimiento y desarrollo (Beligni y Lamattina 2000; Pagnussat et al., 2003; He et al., 2004; Prado et al., 2004), resultando ser una molécula clave durante todo el ciclo vital de la planta.

Los organismos, dependiendo de su naturaleza, están en contacto con NO tanto externo (atmósfera y suelo) como interno (el óxido nítrico producido por el propio organismo). Las principales fuentes de producción de NO en la atmósfera, son la utilización de combustibles fósiles y los incendios (Lamattina y Polacco 2007). Por otro lado, el NO producido en los suelos representa un 20% de su producción global (Conrad 1996), viéndose incrementado en suelos fertilizados (Johansson 1984; Bremer 2006). En el suelo, el NO es generado por el ciclo del nitrógeno llevado a cabo por bacterias denitrificantes mediante la reducción de nitrito (NO_2^-) a NO (Conrad 1996). Sin embargo, su impacto sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas es todavía desconocido (Lamattina et al., 2003).

Por otro lado, el NO puede ser producido por el propio organismo y es el que tiene un papel más relevante sobre su fisiología. Una de las propiedades de la producción endógena de NO es que puede ser realizada tanto por mecanismos enzimáticos como no enzimáticos.

- Mecanismos no enzimáticos de producción de óxido nítrico.

Entre las vías no enzimáticas de producción de óxido nítrico destaca la reducción de NO_2 a NO que tiene lugar en condiciones de pH ácido (Caro y Puntarulo 1999) que se ve incrementada con la presencia de reductores como el ácido ascórbico o el glutatión (Bethke et al., 2004a). Otra ruta no enzimática de producción espontánea de óxido nítrico es la reducción mediada por luz, del NO_2 a NO en la que intervienen los carotenoides (Cooney et al., 1994; Durner y Klessig 1999). Cabe remarcar que las condiciones para la reducción no enzimática del NO_2 a NO se dan en el apoplasto, por sus características ácidas, y ha sido utilizada para explicar el efecto del NO_2 en la germinación (Beligni y Lamattina 2000; Bethke et al., 2004a)

- Mecanismos enzimáticos de producción de óxido nítrico.

En cuanto a las vías enzimáticas de síntesis de óxido nítrico, que aportan la mayoría del óxido nítrico al organismo, encontramos dos grupos bien diferenciados: La ruta dependiente de arginina y la ruta dependiente de nitrito.

- Ruta dependiente de arginina

El conocimiento que se tiene sobre este tipo de ruta viene heredado de la intensa investigación realizada en modelos animales que llevó a la identificación y caracterización de las óxido nítrico sintasas (NOS), enzimas que catalizan la síntesis de óxido nítrico (Bredt et al., 1990; Bredt y Snyder 1990). En células de mamíferos, la familia de NOS, compuesta por 3 isoformas altamente homólogas, es la fuente esencial de NO (Lamas et al., 1992). Todas las enzimas NOS catalizan la formación de óxido nítrico y L-citrulina a partir de L-arginina (Tayeh y Marletta 1989), mediante una reacción que requiere oxígeno y NADPH como cosustratos y la unión de un grupo hemo, tetrahidrobiopterina (H₄B), calcio, calmodulina, FAD y FMN como cofactores (Stuehr 1997). Las NOS se clasifican también en cuanto a su actividad que puede ser constitutiva (cNOS) o inducible (iNOS). Estas enzimas se han encontrado en varios compartimentos subcelulares, incluyendo la membrana plasmática, el retículo endoplásmico, la mitocondria y el citoplasma, en células animales. Esta compartimentalización es uno de los aspectos fundamentales que determinan su especificidad, ya que tal y como cabe esperar, el NO tendrá diferentes dianas dependiendo de donde se genere (Barouch et al., 2002).

En la búsqueda de enzimas con este tipo de propiedades en plantas se ha encontrado que varios tejidos producen L-citrulina a partir de L-arginina mediante un proceso que es dependiente de los cofactores típicos de NOS de mamíferos y son además inactivados por sus inhibidores (Delledonne et al., 1998; Barroso et al., 1999; Durner y Klessig 1999; Ribeiro et al., 1999; Corpas et al., 2001). Una evidencia más, acerca de la existencia de enzimas tipo-NOS en plantas fue la observación de la unión de anticuerpos producidos contra las NOS de mamíferos en germen de trigo, compartimentos citoplásmicos o nucleares de raíces de maíz, o peroxisomas y cloroplastos de guisante (Sen y Cheema 1995; Kuo et al., 1996; Barroso et al., 1999; Ribeiro et al., 1999; Corpas et al., 2001). Sin embargo, estos anticuerpos resultaron ser poco específicos (Lo et al., 2000; Butt et al., 2003) y ninguna de estas proteínas de plantas que reaccionan con los anticuerpos anti-NOS de mamíferos pudieron ser identificadas como NOS vegetales.

Continuando con el objetivo de identificar una NOS en plantas, el grupo del Dr. Klessig, en un extenso trabajo, consiguió purificar una proteína de tabaco que poseía actividad NOS (Chandok et al., 2003). Esta proteína cumplía todos los requisitos necesarios para ser una iNOS: tener una masa molecular muy similar a las NOS de animales, tener una actividad dependiente de H₄B, NADPH, FAD, y O₂, requerir Ca²⁺ y calmodulina (CaM) para su actividad, ser inhibida por los inhibidores de NOS animales (L-NMMA y aminoguanidina), tener dependencia de arginina o NOHA como sustratos y, por supuesto, poseer actividad NOS medida por tres métodos independientes (Chandok et al., 2003). Este trabajo definió el locus At4g33010 que codifica la proteína varP (una variante de la proteína P del complejo glicina descarboxilasa, GDC) como la iNOS de plantas (Chandok et al., 2003). Además, el silenciamiento del gen *varP* de tomate (*Le varP*) daba lugar a una disminución

en la producción de NO e incrementaba la susceptibilidad frente a *Pseudomonas syringae* DC 3000 (Chandok et al., 2004), reflejando la importancia de la proteína varP/iNOS en el establecimiento de la defensa frente a patógenos y corroborando los experimentos de Delledonne (Delledonne et al., 1998). Sin embargo, esta proteína no tenía ninguna homología con las iNOS de mamíferos, lo que resultaba muy interesante desde un punto de vista evolutivo.

Casi al mismo tiempo, el grupo del Dr. Crawford, identificó otra proteína tipo-NOS mediante una estrategia bioinformática (Guo et al., 2003). Se alinearon las secuencias de NOS animales y se compararon con las proteínas de plantas en busca de alguna que poseyera cierta similitud de secuencia con éstas. Sin embargo, no se encontró ninguna proteína similar a las NOS de animales en el genoma de *Arabidopsis thaliana* (Guo et al., 2003). No obstante, al ampliar la búsqueda a proteínas NOS atípicas de animales, encontraron una proteína tipo NOS atípica, del caracol *Helix pomatia* (Huang et al., 1997), que tenía un 16% de identidad con una proteína desconocida de plantas (Guo et al., 2003). Esta proteína de plantas pasó a denominarse AtNOS1 y presentaba actividad NOS con ciertas excepciones: pese a ser dependiente de NADPH, Ca^{2+} y CaM era independiente de FAD, FMN y H_4B lo que describía un comportamiento diferencial frente a las NOS animales (Guo et al., 2003). Un segundo nivel de evidencia descrita en el mismo trabajo era la baja acumulación de óxido nítrico que presentaban mutantes nulos para AtNOS1 (*nos1*) así como una actividad NOS reducida (20% respecto a plantas silvestres) en extractos de dichos mutantes (Guo et al., 2003). Como este gen presentaba una regulación transcripcional casi nula, se propuso que la enzima que codifica debía ser una NOS constitutiva de plantas (cNOS). En un trabajo posterior, se postuló que su actividad era esencial para el establecimiento de la defensa contra *Pseudomonas syringae* (Zeidler et al., 2004).

La descripción de estas dos proteínas supuso inicialmente un gran avance y permitió caracterizar diferentes papeles del NO en el crecimiento y desarrollo de plantas a través del estudio de sus mutantes (Guo et al., 2003; He et al., 2004; Guo y Crawford 2005). Sin embargo, más tarde, el grupo del Dr. Klessig se retractó de los artículos publicados sobre la proteína varP y su presunta actividad NOS (Klessig et al., 2004b; Klessig et al., 2004a). De la misma manera, dos años más tarde, se describió la falta de reproducibilidad en la detección de la actividad NOS de la proteína AtNOS1 (Zemojtel et al., 2006a). Sin embargo, dado que el mutante *nos1* presentaba una clara reducción en los niveles de NO, tanto en condiciones basales como en respuesta a inductores de su síntesis como el ácido abscísico (ABA) o los lipopolisacáridos (LPS), se sugirió que AtNOS1 debía intervenir en la producción de NO. Puesto que se desconocía si participaba de una forma directa o indirecta se re-nombró como AtNOA1 (proteína asociada con óxido nítrico 1) (Crawford et al., 2006).

Recientemente, las discrepancias sobre esta proteína continúan ya que se ha descrito que la proteína AtNOA1 no se localiza en la mitocondria, como se propuso inicialmente (Guo y Crawford 2005), sino en los cloroplastos (Flores-Perez et al., 2008). Además, se ha comprobado

que AtNOA1 es, en realidad, una GTPasa cíclica con dominios permutados (cGTPasa; (Moreau et al., 2008)) que posiblemente afecta al ensamblaje de ribosomas, interfiriendo con la síntesis de proteínas en los cloroplastos. Aunque la conexión entre este tipo de actividad y su posible función en la biosíntesis de óxido nítrico no es obvia, la sobre-expresión de *AtNOA1* conlleva un incremento en la producción de NO en diatomeas (Vardi et al., 2008) y en células de mamíferos (Zemojtel et al., 2006b; Parihar et al., 2008) pero no en plantas (Kato et al., 2008).

En conclusión, pese a detectar actividad NOS en extractos vegetales, no se ha conseguido identificar, hasta la fecha, ninguna proteína con actividad NOS en plantas. De todas formas, la detección de actividad NOS realizada habitualmente esta basada en la cuantificación del producto de su reacción, L-citrulina. Teniendo en cuenta que ha sido descrita la interferencia del arginosucinato en la detección de L-citrulina (Tischner et al., 2007), los trabajos realizados previamente deberían ser revisados y reinterpretados con cautela.

- Rutas dependientes de nitrito.

El nitrito puede reducirse hasta NO (Klepper 1987) y representa, por tanto, una fuente para su producción. En plantas, el nitrito es normalmente reducido hasta amonio por la acción de la Nitrito Reductasa (NiR) en el cloroplasto (Mifflin 1974). El potencial papel de la NiR en la producción de NO ha sido desestimado, ya que líneas transgénicas de tabaco que sobreexpresan una construcción en antisentido de *NiR*, en lugar de acumular menos NO producen una cantidad mayor (Morot-Gaudry-Talarmain et al., 2002). En cambio, otra enzima que puede reducir el nitrito es la Nitrato Reductasa (NR). Se trata de una enzima bi-funcional que puede reducir el nitrato a nitrito y, en menor proporción, el nitrito a NO (Harper 1981; Ryan et al., 1983; Dean y Harper 1988; Klepper 1990). La producción de NO a través de la actividad NR no sólo se da en plantas superiores (Rockel et al., 2002) sino que también tiene lugar en algas (Mallick et al., 1999; Sakihama et al., 2002), hongos (Takaya 2002) y bacterias (Gilberthorpe y Poole 2008). La producción de NO mediada por NR fue descrita inicialmente en las Nitrato Reductasas constitutivas de leguminosas (Harper 1981; Klepper 1987) y, posteriormente, en las Nitrato Reductasa de tipo inducible del citoplasma (Yamasaki et al., 1999; Yamasaki y Sakihama 2000). Además, la producción de óxido nítrico se reduce tras la aplicación de azida sódica, un conocido inhibidor de la actividad NR (Yamasaki 2000). Otra evidencia acerca de la producción de óxido nítrico mediada por NR es que utilizando nitrato marcado, $^{15}\text{N-NO}_3$, como sustrato de la NR se produce óxido nítrico marcado ($^{15}\text{N-NO}$) (Dean y Harper 1986). Cabe destacar que la enzima NR está finamente regulada (Campbell 1999). Tiene una vida media de algunas horas y requiere nitrato y luz para su actividad. Además, su actividad puede caer drásticamente por fosforilación y la subsiguiente unión de un dímero de proteínas 14-3-3 y puede revertirse mediante desfosforilación (Lillo et al., 2004). Esta modulación de la actividad NR *in vivo* se correlaciona muy bien con la producción de NO (Rockel et al., 2002; Lillo et al., 2004).

En *Arabidopsis thaliana* existen dos genes que codifican Nitrato Reductasas citoplasmáticas, At1g77760 para *NR1/NIA1* y At1g37130 para *NR2/NIA2*. Estos genes fueron identificados por el grupo del Dr. Crawford a partir de mutantes identificados en sendos rastreos en la búsqueda de mutantes resistentes a clorato, un análogo del nitrato que se metaboliza al producto tóxico clorito (Wilkinson y Crawford 1991; 1993). El mismo grupo aisló un doble mutante, *nia1nia2*, que presenta una delección en el gen *NR2/NIA2* y una mutación puntual que altera la unión del cofactor Molibdeno al enzima, en el gen *NR1/NIA1*, quedando la actividad NR de estas plantas reducida a un 0,5% de la actividad que presenta una planta silvestre (Wilkinson y Crawford 1993). Ha sido descrito que este mutante está afectado en la producción de NO, tanto a nivel basal como inducido (Desikan et al., 2002; Modolo et al., 2005; Yamamoto-Katou et al., 2006; Kolbert et al., 2008a; Seligman et al., 2008; Ribeiro et al., 2009), quedando probado el papel de las NR en la producción de NO. Hay que remarcar no obstante, que el mutante *nia1nia2* acumula alrededor de diez veces menos arginina que las plantas silvestres, lo que ha permitido sugerir que la menor producción de NO en dicho mutante podría ser el resultado también de una menor síntesis de NO por la vía dependiente de arginina (Modolo et al., 2005). Por último, cabe destacar que tanto las enzimas tipo NOS de animales como las NR de plantas poseen características comunes, siendo ambas flavoproteínas de la familia de las ferredoxina-NADPH reductasas (Lamattina et al., 2003). Incluso existen evidencias de la reducción de nitrito por parte de algunas NOS animales (Mikula et al., 2009).

Otra fuente de NO dependiente de la reducción de nitrito es la catalizada por la enzima Xantina Oxidoreductasa (XOR). Esta es, de nuevo, una enzima bi-funcional que se puede encontrar en la forma Xantina Deshidrogenasa (XDH) o en la forma, dependiente de O₂, Xantina Oxidasa (XO). Mientras que la forma XDH tiene preferencia por NAD⁺ sobre O₂ como aceptor de electrones, la forma XO tiene una actividad estrictamente dependiente de O₂ (Hesberg et al., 2004). Estas dos formas de la enzima se pueden interconvertir, reversiblemente mediante oxidaciones de residuos de cisteína (Stirpe y Della Corte 1969), o irreversiblemente por proteólisis (Amaya et al., 1990). La proteína XOR está implicada en el metabolismo de purinas, componentes nitrogenados estructurales de los ácidos nucleicos. Mediante su actividad, este enzima, convierte hipoxantina o xantina en urato, que es posteriormente transformado en urea para finalmente producir amonio (Stasolla et al., 2003; Zrenner et al., 2006). La enzima XOR contiene dominios para la unión de cofactor de molibdeno (MoCo), FAD y NADPH, y dos agrupaciones sulfoférricas Fe₂S₂, enmarcándose, al igual que las NOS de mamíferos y las NR de plantas, en la familia de flavoproteínas. Cualquiera de las dos formas activas del enzima, XDH o XO, reducen oxígeno molecular hasta superóxido y peróxido de hidrógeno, siendo esta propiedad una de las más estudiadas desde un punto de vista clínico.

Se ha propuesto que la actividad XOR puede producir NO en determinadas condiciones. Se ha demostrado la producción de NO tras incubar XOR con NADH y nitrato (Millar et al., 1997;

Millar et al., 1998) o nitrito (Zhang et al., 1997; Millar et al., 1998; Godber et al., 2000a; Godber et al., 2000b; Li et al., 2001) bajo condiciones de hipoxia. Así mismo, Godber y sus colaboradores observaron una reducción en la producción de óxido nítrico cuando los niveles de oxígeno aumentaban lo que es consistente con el incremento en la producción de superóxido y la reacción de éste con NO formando peroxinitrito (Godber et al., 2000a; Godber et al., 2000b). Hay grandes diferencias entre las dos formas del enzima XOR en la producción de peroxinitrito, siendo la forma XDH la que produce peroxinitrito mayoritariamente (Godber et al., 2000a; Godber et al., 2000b). No obstante, se ha propuesto que, en bajas tensiones de oxígeno y concentraciones de purinas, se pueden producir cantidades de NO equivalentes a las producidas por las NOS animales (Li et al., 2001; Harrison 2002). Toda esta información procede de trabajos realizados utilizando modelos animales, ya que la capacidad de la XOR de producir NO en plantas ha sido únicamente postulada (del Rio et al., 2002; del Rio et al., 2004).

En *Arabidopsis*, a diferencia de la mayoría de organismos, encontramos dos genes que codifican sendas proteínas XOR (At4g34890, *XOR1*; At4g34900, *XOR2*) con una identidad del 93% entre ellas, sugiriendo que son producto de una duplicación génica. Mientras que *XOR2* parece tener una expresión constitutiva, *XOR1* responde a diferentes factores de estrés como sequía, salinidad, senescencia forzada por oscuridad y frío, así como a ABA, aunque estos cambios de expresión no siempre se correlacionan con cambios en la actividad de la enzima (Hesberg et al., 2004). Finalmente, el uso de mutantes ha demostrado un papel crucial de XOR en el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis*, en especial durante la senescencia (Nakagawa et al., 2007; Brychkova et al., 2008).

Además de estas dos vías enzimáticas de producción de NO mediadas por NR o XOR y dependientes de nitrito, existen otras mucho menos estudiadas que incluyen la mediada por la Nitrito:NO-Reductasa (Ni-NOR) en la membrana plasmática de células de raíces de tabaco (Stohr et al., 2001) o la reducción de nitrito a NO en la mitocondria (Planchet et al., 2005).

Metabolismo del NO en plantas.

En las células vegetales existen diferentes sistemas de detoxificación/eliminación/inactivación del NO. Entre estos sistemas, destacan la unión del NO al glutatión (GSH) y a la hemoglobina (Hb) (Perazzolli et al., 2006; Lee et al., 2008). El NO y el glutatión (GSH) pueden formar nitrosoglutatión (GSNO) mediante una reacción, todavía desconocida, que podría ser dependiente de citocromo c (Basu et al., 2010). El GSNO puede funcionar como un reservorio intracelular de NO ya que puede descomponerse, liberando NO, mediante la acción de nitrosoglutatión reductasas (GSNOR). Estas enzimas juegan un papel muy importante en la homeostasis de NO en la célula (Gupta et al., 2011).

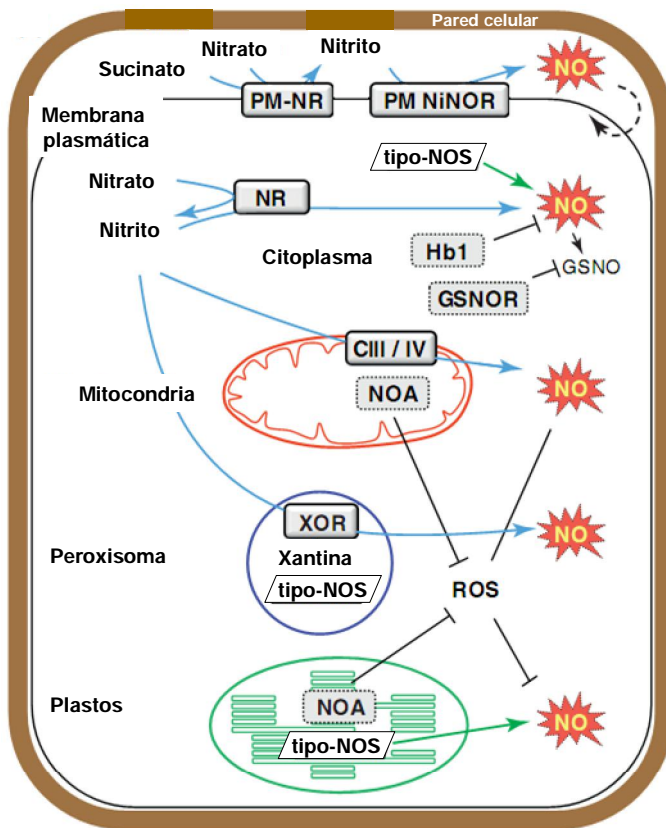


Figura 2. Síntesis de NO en plantas.

Esquema traducido de Gupta et al., 2011; mostrando las diferentes rutas de síntesis de NO y los compartimentos celulares donde se llevan a cabo.

Además, la correlación entre la actividad GSNOR y los procesos donde el NO tiene un papel importante es muy evidente, encontrando ejemplos muy claros en la defensa frente a bacterias y herbívoros (Diaz et al., 2003; Rusterucci et al., 2007), así como en el desarrollo de la raíz (Espunya et al., 2006). Por otro lado, la unión del NO a la hemoglobina (Hb) de plantas, aunque estudiada en menor medida, es también un mecanismo de inactivación/detoxificación de NO (Perazzolli et al., 2006). De la misma forma, la reacción del NO con el ión superóxido, produciendo peroxinitrito, representa también un sistema de eliminación celular de NO (Crow y Beckman 1995). Además de estos dos mecanismos, la interacción del NO con las proteínas, tanto con diferentes aminoácidos como con centros metálicos de las mismas puede representar también un mecanismo de inactivación/eliminación del NO. Que este tipo de procesos representen mecanismos fisiológicos de control de los niveles de NO, es todavía un campo por desarrollar.

En el presente capítulo, hemos tratado de identificar y caracterizar mutantes afectados en varias de las rutas de síntesis de NO conocidas en plantas para posteriormente utilizarlos en el análisis de la interacción del NO con otras hormonas y procesos de desarrollo.

RESULTADOS

Caracterización de mutantes de las principales vías de biosíntesis de NO.

Para caracterizar la vía de producción de NO a partir de nitrito mediada por nitrato reductasas, se procedió primero a identificar mutantes en cada uno de los genes *NR1/NIA1* (At1g77760) y *NR2/NIA2* (At1g37130) que codifican proteínas con actividad nitrato reductasa (Wilkinson y Crawford 1993). Haciendo uso de las colecciones públicas de mutantes de inserción de T-DNA seleccionamos líneas que tienen una inserción de T-DNA en cada uno de los genes *NR1/NIA1* y *NR2/NIA2* (Fig. 3). Estas son las líneas SALK_071547 para *NR1/NIA1* y SALK_088070 para *NR2/NIA2*. Tras seleccionar individuos con la inserción de T-DNA en homocigosis por PCR (Fig. 3), pasamos a analizar el nivel de los correspondientes transcritos en estos mutantes para determinar si son mutantes nulos. Mediante oligonucleótidos que flanquean la inserción de T-DNA (Fig. 3, Tabla M2) llevamos a cabo RT-PCR semicuantitativa para determinar el nivel de los transcritos en dichos mutantes. Como se muestra en la Figura 4, hemos obtenido mutantes nulos para los genes *NR1/NIA1* y *NR2/NIA2*. Por otro lado, debido a la posible redundancia de las dos proteínas sobre la producción de NO decidimos hacer uso del doble mutante, previamente caracterizado, *nia1nia2* (Wilkinson y Crawford 1993). Este mutante posee una delección en el gen *NR2/NIA2* así como una mutación puntual en el gen *NR1/NIA1* y posee una actividad NR por debajo del 1% de la actividad de una planta silvestre (Wilkinson y Crawford 1993). Estas mutaciones resultan en la ausencia de transcrito del gen *NR2/NIA2* (Fig. 6) y aunque el gen *NR1/NIA1* se transcribe normalmente (Fig. 6), codifica una proteína con un cambio de aminoácido Ala → Thr que reduce la actividad de esta proteína drásticamente (Wilkinson y Crawford 1993).

Por otro lado, en modelos animales, se ha propuesto que la actividad Xantina Oxido-Reductasa (XOR) dependiente de nitrito, puede ser responsable de la producción de NO bajo determinadas condiciones (Zhang et al., 1997; Millar et al., 1998; Zhang et al., 1998). En Arabidopsis, la XOR esta codificada por dos genes, *XOR1* (At4g34890) y *XOR2* (At4g34900) con una alta homología (Hesberg et al., 2004). Como ha sido postulado que este tipo de actividad puede ser también responsable de la producción de NO en plantas (del Rio et al., 2002; del Rio et al., 2004), obtuvimos mutantes de las colecciones públicas de inserciones de T-DNA nulos en ambos genes. Las líneas SALK_148366 y SAIL_722_C03 se llevaron a homocigosis, y las denominamos *xor1-1* y *xor2-1*, respectivamente (Fig. 3; Fig. 4; Fig. 6). Aunque los dos genes tienen patrones de expresión diferentes y a menudo no coincidentes (Hesberg et al., 2004), quisimos evitar la redundancia de estas proteínas, obteniendo el doble mutante *xor1-xor2-1* que no presenta transcrito para ninguno de los dos genes (Fig. 6) siendo, por tanto, un posible mutante sin actividad XOR.

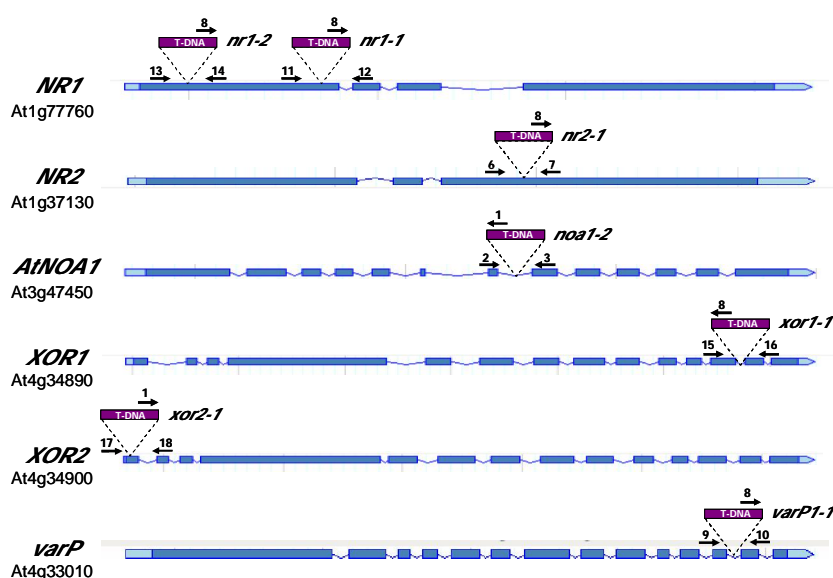


Figura 3. Esquema representando los diferentes mutantes (líneas de inserción de T-DNA) caracterizados en este trabajo. Se presenta el símbolo de cada gen junto a su locus (AGI) y la posición relativa de la mutación en cada caso. Los números representan los diferentes oligonucleótidos utilizados para genotipar cada línea y su secuencia se encuentra en la Tabla M2.

En cuanto a la ruta de producción de NO relacionada con la proteína AtNOA1, existe descrito un mutante nulo, *noa1*, que presenta una clara reducción de los niveles de NO (Guo et al., 2003). Para tratar de dar más solidez a estos resultados aislamos y caracterizamos un nuevo alelo mutante en este gen. En la colección Syngenta de mutantes de T-DNA encontramos una línea, SAIL_507_E11, con inserción en el locus At3g47450, correspondiente al gen *AtNOA1*. Tras seleccionar individuos homocigotos para la inserción, comprobamos que no presentaban niveles detectables de transcrito *AtNOA1* por RT-PCR semicuantitativa (Fig. 4), pasando a nombrar el mutante como *noa1-2* y el mutante descrito previamente como *noa1-1*.

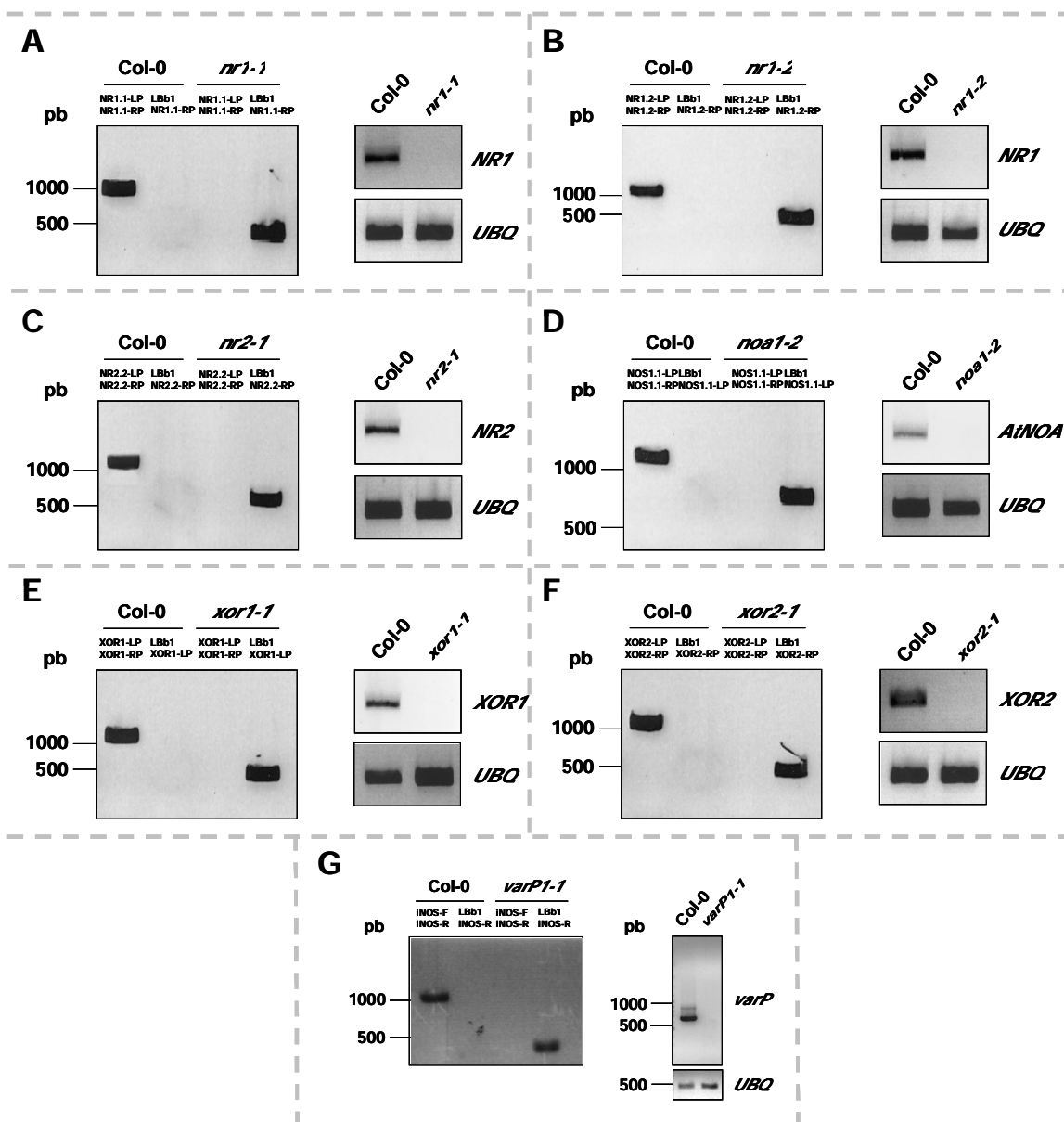


Figura 4. Identificación de mutantes nulos. (A-F) Se presentan los gels de agarosa teñidos con bromuro de etidio donde se separaron los diferentes productos de PCR tras usar los oligonucleótidos indicados sobre DNA genómico (panel izquierdo) o sobre cDNA, para comprobar el nivel transcrito (panel derecho). (G) Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (izquierda) y Southern-blot utilizando una sonda radiactiva correspondiente al gen *varP* (derecha).

Producción de NO en los diferentes mutantes.

Las fluoresceínas han sido muy utilizadas para la detección de NO en diferentes organismos, incluyendo las plantas, debido a su alta sensibilidad y a la simplicidad técnica (Planchet y Kaiser 2006). Una de estas fluoresceínas, el diacetato de diaminofluoresceína (DAF-FM DA) penetra en las células y reacciona con el NO convirtiéndose en un triazol que emite fluorescencia (con

máximos de excitación y emisión a 500 y 515 nm, respectivamente) y que es fácilmente detectable mediante fluorimetría o microscopía de fluorescencia. Ya que las raíces son un tejido carente de clorofilas y, por tanto, con muy poca autofluorescencia, han sido muy utilizadas para la detección de NO mediante fluoresceínas. De hecho, el análisis de la fluorescencia emitida por las diaminofluoresceínas en presencia de NO en las raíces es la técnica más utilizada para la detección de NO en plantas.

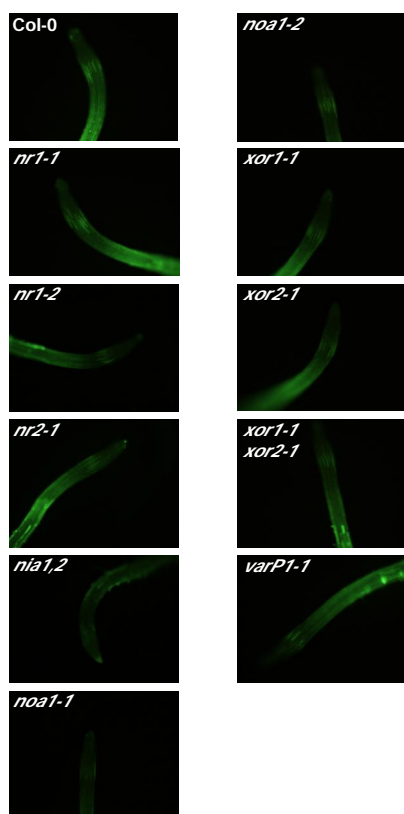


Figura 5. Determinación de la acumulación de NO en las raíces de los diferentes mutantes. Raíces de plántulas de 5 días teñidas con DAF-FM DA y visualizadas en el microscopio de fluorescencia. Se muestran imágenes representativas de los diferentes

Mediante la fluoresceína DAF-FM DA hemos caracterizado la producción de NO en los diferentes mutantes. Tras incubar las plántulas de los diferentes genotipos con DAF-FM DA y observar la producción de fluorescencia en las raíces mediante microscopía de fluorescencia, encontramos que solo se observaba una clara reducción en la producción de NO en los mutantes *nialnia2*, *noa1-1* y *noa1-2* (Fig. 5). En el caso de los demás mutantes no existe una clara reducción de los niveles de NO respecto al de plantas silvestres (Fig. 5). Estos datos ponen de manifiesto que el nuevo alelo *noa1-2*, como *noa1-1*, tiene una reducida producción de NO (Guo et al., 2003), lo que confirma la participación de la proteína AtNOA1 en la producción de NO en Arabidopsis. Por otro lado, los niveles de fluorescencia detectados en raíces de los mutantes simples *varP*, *xor1* y *xor2*, así como en el doble mutante *xor1xor2* no difieren significativamente de los detectados en

raíces de plántulas silvestres (Fig. 5), lo que indica que ni la vía de producción de NO dependiente de XOR ni la propuesta a través de la función de varP son funcionales en la producción de NO en raíces de Arabidopsis. De la misma manera, parece que la producción de NO en los mutantes sencillos *nr1-1*, *nr1-2* y *nr2-2* no está afectada si bien la producción de NO en el doble mutante *nialnia2* está reducida respecto a las plantas silvestres poniendo en evidencia el papel redundante de NR1/NIA1 y NR2/NIA2 en la producción de NO.

Obtención y caracterización del triple mutante *nia1nia2noa1-2*

Tras comprobar que las principales vías de síntesis de NO en Arabidopsis son las mediadas por NR1/NIA1, NR2/NIA2 y AtNOA1, y que ninguno de los mutantes analizados presentó una reducción total de la producción de NO, decidimos generar un mutante afectado en las tres proteínas que nos permitiese profundizar en el estudio de la biosíntesis de NO en Arabidopsis. Para ello, cruzamos el doble mutante *nia1nia2* con *noa1-2* y buscamos en la progenie F₂ individuos mutantes en los tres genes. Mediante genotipado por PCR, encontramos plantas homocigotas para las tres mutaciones (Fig. 6).

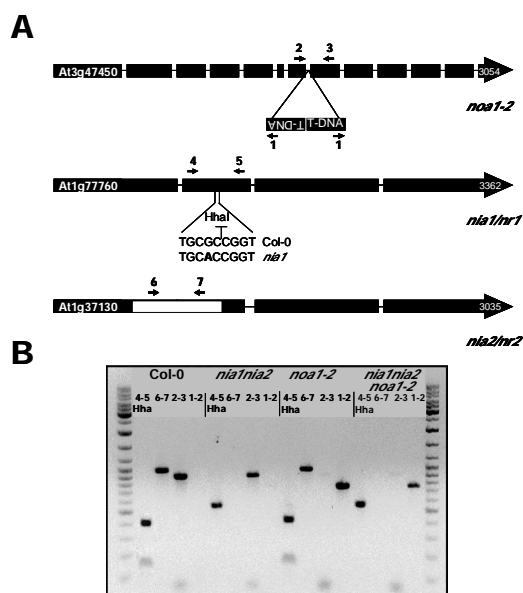


Figura 6. Generación y genotipado del triple mutante *nia1,2noa1-2*

A. Esquema representando la posición de la inserción de T-DNA en *AtNOA1*, la mutación puntual en *NIA1* y la delección en *NIA2*. Los números representan los diferentes oligonucleótidos utilizados para genotipar las plantas. Se indica también la posición de corte del enzima HhaI en la secuencia *NIA1* en plantas silvestres pero no en mutantes *nia1*. B. Gel teñido con bromuro de etidio donde se muestra un resultado típico del genotipado de los diferentes mutantes.

Estas plantas, al igual que sus genotipos parentales, eran mutantes nulos para *AtNOA1* y *NR2/NIA2*. Ya que *nia1* es una mutación puntual que no afecta a la transcripción del gen, los niveles del transcrito mutante de *NIA1* eran similares a los niveles endógenos de plantas silvestres (Fig. 7).

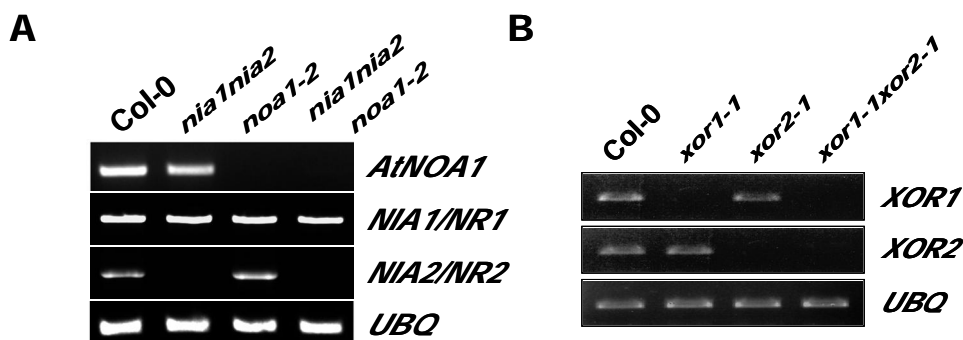


Figura 7. Análisis de la expresión de *AtNOA1*, *NIA1/NR1*, *NIA2/NR2*, *XOR1* y *XOR2* en los diferentes mutantes. Expresión de *AtNOA1*, *NR1* y *NR2* (A) y *XOR1* y *XOR2* (B) en los mutantes indicados mediante RT-PCR semicuantitativa. Se analizó la expresión de *Ubiquitina 10* (*UBQ*) como control.

Para comprobar si la mutación en los tres genes se traducían en una reducción de los niveles de NO se estudió la acumulación de NO en raíces de estos mutantes. Los niveles basales de fluorescencia dependiente de NO, que eran bajos en raíces no tratadas de individuos silvestres, se incrementaban de forma muy evidente tras tratar con diferentes compuestos como el ABA o el SA (Fig. 8). Dichos compuestos han sido descritos previamente como inductores de la síntesis de NO (Guo et al., 2003; Zottini et al., 2007). Nosotros encontramos que el ABA producía una mayor cantidad de NO y con una dinámica más rápida que el SA (Fig. 8). Además, la emisión de fluorescencia estaba asociada específicamente a la producción de NO ya que se observó una clara reducción en la emisión de fluorescencia en raíces

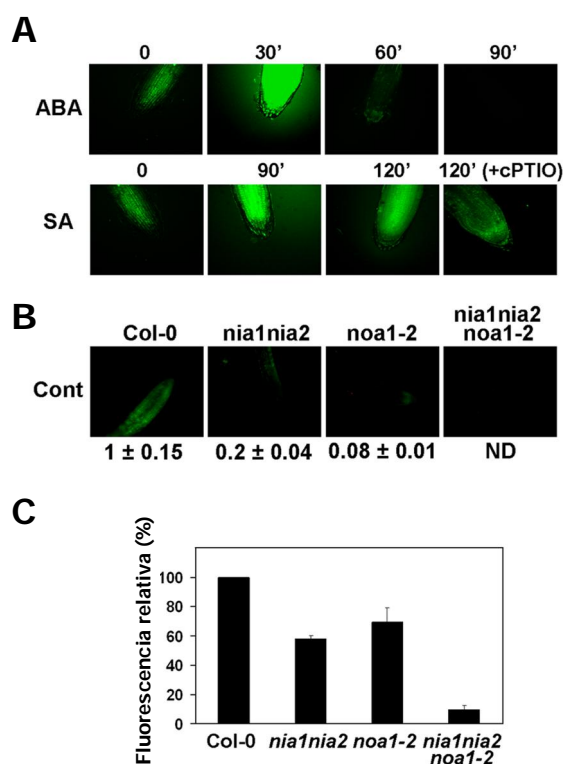


Figura 8. Producción de NO tras diferentes tratamientos o en los diferentes fondos genéticos deficientes en NO.

A. Producción de NO en raíces tratadas con 50 μ M ABA o 1mM SA durante los tiempos indicados. B. Producción de NO en las raíces de los diferentes mutantes deficientes en NO. C. Producción de NO en plántulas enteras de los diferentes genotipos medida tras la aplicación de DAF-2 mediante fluorimetría.

tratadas con SA en presencia del compuesto secuestrador de NO cPTIO (Fig. 8). Tras analizar la producción de NO en los mutantes deficientes en la síntesis de NO *nia1nia2*, *noa1-2* y *nia1nia2noa1-2* comprobamos que los niveles basales de acumulación de NO eran mucho menores en los mutantes *nia1nia2* y *noa1-2* que en raíces de plántulas silvestres, y por debajo de los límites de detección en el caso del triple mutante *nia1nia2noa1-2* (Fig. 8). Por tanto, el mutante *nia1nia2noa1-2* está muy afectado en la síntesis de NO en condiciones basales como resultado del bloqueo simultáneo de las rutas de síntesis de NO dependientes de las actividades NR/NIA y

AtNOA1. Ya que la biosíntesis de NO puede ser diferente en diferentes órganos de la planta (Kolbert et al., 2008a; Seligman et al., 2008) y para excluir un posible efecto dependiente del tejido estudiado (raíz) analizamos también la acumulación de NO en plántulas enteras midiendo el NO que difunde al medio, fuera de las células, con la diaminofluoresceína no permeable a las células, DAF-2 y midiendo posteriormente la fluorescencia asociada al triazol formado (Fig. 8C). Para evaluar si la producción de NO detectada en plántulas del mutante *nia1nia2noa1-2* era sintetizada biológicamente o químicamente, realizamos medidas con plántulas de los diferentes genotipos y las correspondientes plántulas inactivadas térmicamente, como control de la producción no enzimática de NO. Detectamos niveles similares de NO en todas las muestras correspondientes a plántulas inactivadas térmicamente que corresponde con la producción no enzimática de NO. Tras sustraer la producción de NO no enzimática, las plántulas *nia1nia2* y *noa1-2* acumularon un menor nivel de NO que las plántulas silvestres (Fig. 8C). Las plántulas *nia1nia2noa1-2* mostraron una reducción aditiva de NO hasta niveles por debajo de un 10% de los niveles detectados en plántulas silvestres (Fig. 8C).

Las plantas deficientes en la producción de NO muestran alteraciones en el desarrollo

Las plantas *nia1nia2noa1-2* muestran una reducción en el crecimiento vegetativo tanto en la parte aérea como en la raíz, resultando en un fenotipo aditivo de los correspondientes a los mutantes parentales *nia1nia2* y *noa1-2* (Fig. 9). El retraso en el crecimiento se observa ya en estadios tempranos del desarrollo. La aparición de las primeras hojas verdaderas tiene lugar más tarde en las plantas deficientes en la producción de NO que en los individuos silvestres, siendo este fenotipo aditivo en las plántulas del triple mutante (Fig. 9). Las plantas adultas del triple mutante son semi-enanas con una altura y un diámetro reducido del tallo, siendo el 25% y el 37% del tamaño de las plantas silvestres, respectivamente (Fig. 9). El fenotipo semi-enano de la parte aérea se correlaciona también con un reducido crecimiento de la raíz, 56%, 35% y 15% respecto a las raíces silvestres para *nia1nia2*, *noa1-2* y *nia1nia2noa1-2*, respectivamente. Esto causa una alteración en la proporción raíz-parte aérea en los mutantes deficientes en NO, siendo esta proporción en *nia1nia2noa1-2* alrededor de tres veces más pequeña que en los individuos silvestres ($0,33 \pm 0,02$ y $0,12 \pm 0,01$, respectivamente). La deficiencia en NO correlaciona también con el reducido tamaño y número de silicuas, así como con una mayor frecuencia de semillas abortadas, lo que resulta en una reducida producción de semillas por planta (Fig. 9).

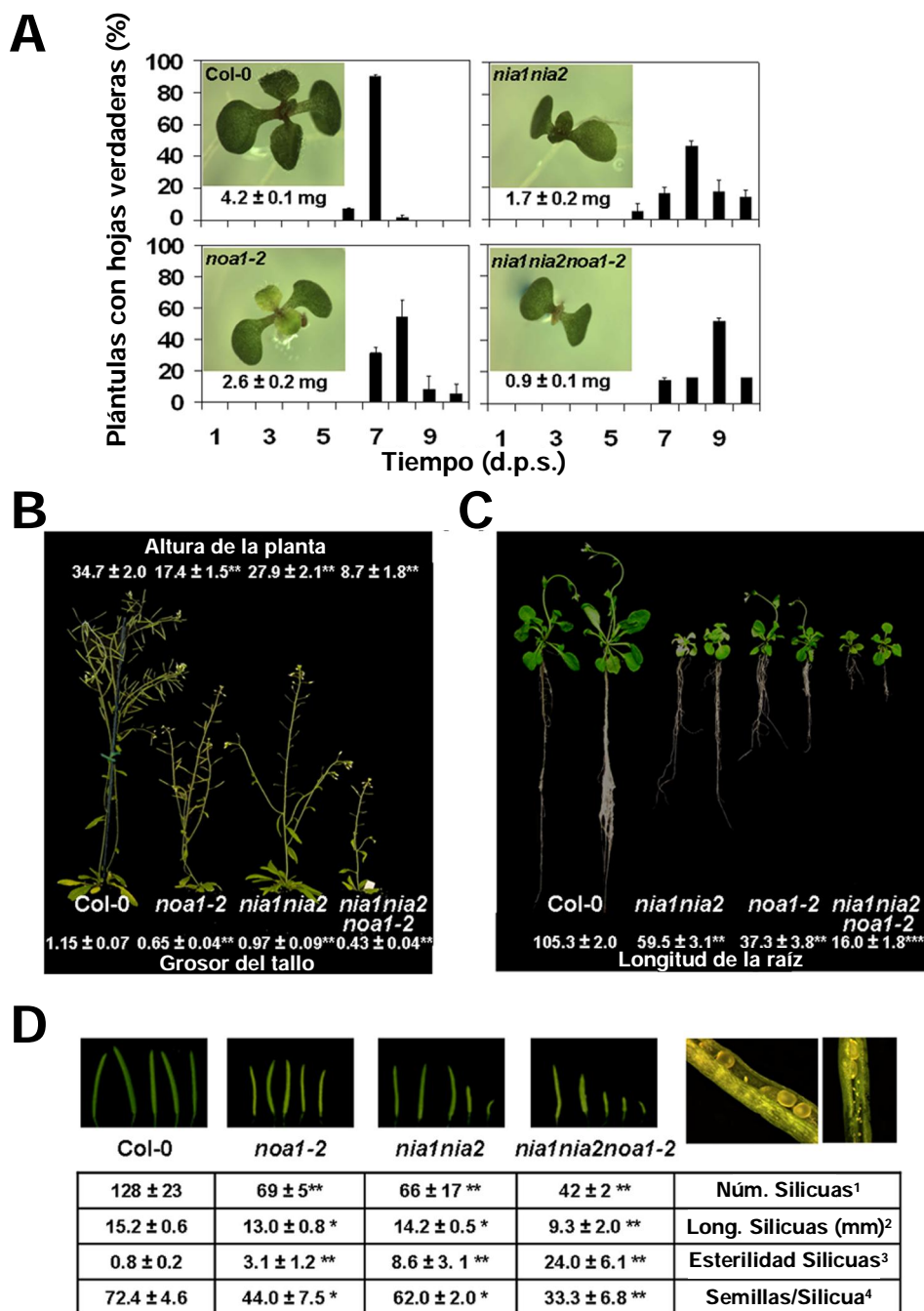


Figura 9. Diferentes fenotipos de los mutantes NO-deficientes. A. Frecuencia de plántulas con hojas verdaderas en función del tiempo post siembra en días (d.p.s.). Se incluye también el peso fresco en miligramos por plántula en cada mutante. B. La altura de la planta así como el grosor del tallo se midieron en plántulas cultivadas en tierra en condiciones de días largos. C. Longitud de la raíz principal de cada mutante en mm. D. Se muestra el número de silicuas por planta, su longitud, su tasa de esterilidad, así como el contenido en semillas por silicua junto con imágenes correspondientes a silicuas de los diferentes genotipos. Se incluye una vista en detalle de la aparición de abortos en silicuas del triple mutante. Los valores corresponden a la media ± desviación estándar y los asteriscos denotan una diferencia significativa en test-t (* p-valor < 0,05; ** p-valor < 0,01; *** p-valor < 0,0001).

Para determinar si el pequeño tamaño de las plántulas y la reducción del crecimiento de la raíz se debía a los niveles reducidos de NO, comparamos la longitud de la raíz principal y el peso de las plántulas de cada genotipo tratado o no tratado con el donador de NO, nitroprusiato sódico

(SNP). La figura 10 muestra que el peso fresco de las plántulas enteras y la longitud de sus raíces eran entre el 20% y el 40% más largas en los mutantes *nia1nia2* y *noa1-2* tratados con NO que en los controles no tratados. Este efecto era todavía más acusado en el caso del triple mutante *nia1nia2noa1-2* siendo sus raíces entre un 90% y un 95% más largas tras tratar las plántulas con NO (Fig. 10). Estos datos muestran que el NO exógeno puede complementar alguno de los fenotipos de desarrollo de los mutantes deficientes en NO, apuntando a un papel específico del NO en estos procesos.

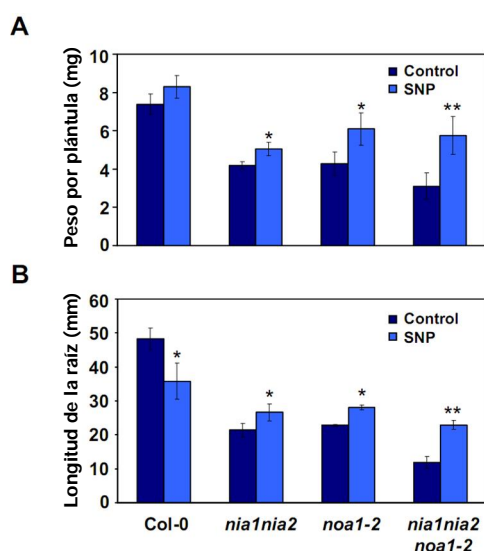


Figura 10. Complementación de alguno de los defectos en el desarrollo de los mutantes deficientes en NO mediante la aplicación de NO exógeno.

A. Peso por plántula de plántulas de 7 días tratadas o no con SNP. B. Longitud de la raíz en plántulas crecidas en vertical tratadas o no con SNP. Los valores son la media \pm desviación estándar. Los asteriscos denotan valores significativamente diferentes en un test-t (* p-valor < 0,05; ** p-valor < 0,01). La concentración de SNP utilizada fue de 100 μ M.

DISCUSIÓN

Las evidencias obtenidas acerca del papel del NO en la regulación de un amplio conjunto de procesos en plantas contrastan con un conocimiento limitado y controvertido acerca de su biosíntesis. Sin embargo, muchos de los datos descritos acerca de la producción de NO y su función están basados en la aplicación de donadores y secuestradores de NO y en el análisis de dianas que no están directamente relacionadas con NO (Floryszak-Wieczorek et al., 2006; Arasimowicz-Jelonek et al., 2011). En este capítulo, hemos tratado de aislar, identificar y caracterizar mutantes afectados en las diferentes vías enzimáticas de síntesis de NO en *Arabidopsis thaliana*. El uso de estos mutantes nos ha permitido y nos ayudará en el futuro a establecer el papel del NO generado endógenamente en diferentes procesos, lo que será, sin duda, más informativo que el uso de las estrategias farmacológicas mencionados anteriormente (Floryszak-Wieczorek et al., 2006; Arasimowicz-Jelonek et al., 2011). Primero, hemos confirmado la participación de la proteína AtNOA1 en la síntesis de NO mediante la caracterización de un nuevo alelo mutante. Este alelo, *noa1-2*, presenta al igual que *noa1-1*, una reducida producción de NO, poniendo de

manifiesto que esta proteína tiene un papel clave en la producción de NO. La reciente caracterización del homólogo de *AtNOA1* en *Nicotiana benthamiana* apoya nuestros datos ya que el silenciamiento de *NbNOA1* inducido por virus (VIGS) resulta en plantas de tabaco que acumulan menos NO (Kato et al., 2008). Sin embargo, no sabemos todavía como participa AtNOA1 en la producción de NO. La caracterización del mutante *rif1* plantea una posible función de AtNOA1/RIF1 en la correcta expresión de proteínas del plastoma en *Arabidopsis* (Flores-Perez et al., 2008). Así, el papel de AtNOA1 en la producción de NO puede estar íntimamente ligado a la función del cloroplasto (Flores-Perez et al., 2008) en lugar de la mitocondria (Guo y Crawford 2005). La reciente caracterización de AtNOA1 como una proteína de unión a GTP con un dominio circular permutado GTPasa (Moreau et al., 2008) indica un papel general de esta proteína en la función del ribosoma en la traducción de proteínas en el cloroplasto. Si existe una proteína concreta no traducida en los cloroplastos de *noa1-2* que controle la biosíntesis de NO o si el conjunto de proteínas no traducidas en los cloroplastos de *noa1-2* son las que repercuten en un menor contenido en NO en este mutante es un punto que no está resuelto todavía y que requiere de más trabajo.

Por otro lado, hemos confirmado también que la vía dependiente de las nitrato reductasas representa una contribución significativa a la producción de NO en *Arabidopsis thaliana*. En el doble mutante *nialnia2*, con una actividad nitrato reductasa prácticamente nula (Wilkinson y Crawford 1993), hemos detectado un menor contenido en NO que en plantas silvestres. El hecho de que mutantes sencillos en cada una de las nitrato reductasas presenten niveles de NO comparables a los de plantas silvestres apunta a un papel redundante de estas proteínas en la producción de NO en *Arabidopsis*. Así, cabría esperar que en mutantes afectados en una de las dos nitrato reductasas, hubiera una mayor actividad NR ejercida por la nitrato reductasa silvestre que corrigiera la actividad deficiente de la NR mutada. Ya que la actividad NR está finamente regulada, debe existir un mecanismo por el que se monitorice la actividad NR o los niveles de nitrato, ajustando su regulación para mantener un nivel correcto que permita el desarrollo normal de la planta, lo que sugiere un papel esencial de esta ruta en plantas. Esta hipótesis ha sido demostrada, al menos parcialmente, con el reciente descubrimiento del sensor de nitrato CHL1 (Ho et al., 2009).

Si bien las rutas de biosíntesis de NO dependientes de AtNOA1 y de la actividad NR parecen contribuir a la producción de NO en *Arabidopsis*, el posible papel de la actividad XOR no está tan claro. En animales, se ha descrito una producción de NO dependiente de nitrito y mediada por la actividad XOR (Zhang et al., 1997; Millar et al., 1998; Zhang et al., 1998). Además, existe también una interesante regulación mediante interacción proteína-proteína de las NOS de animales con las XOR (Tziomalos y Hare 2009), poniendo de manifiesto que no sólo la actividad, sino también la proteína XOR *per se* es importante para controlar los niveles de NO. Sin embargo, en *Arabidopsis*, ni mutantes sencillos en las dos xantinas oxidoreductasas ni un doble mutante *xor1-*

Ixor2-1 presentan una reducción clara en los niveles de NO en la raíz. Pese a que ambos genes, *XOR1* y *XOR2* son prácticamente idénticos, resultado probablemente de una duplicación génica, sus patrones de expresión son diferentes (Hesberg et al., 2004), apuntando a diferencias en sus regiones promotoras. Dichos genes se expresan de manera diferente en diferentes tejidos encontrando una mayor expresión en tejidos fotosintéticos que en raíces (Hesberg et al., 2004). Esto sugiere que quizás los niveles de proteínas XOR no sean muy importantes en raíces por lo que no sería de extrañar que no haya una diferencia significativa en los niveles de NO en las raíces del mutante *xor1-1xor2-1*. Así, si bien la actividad XOR o la propia proteína, participa de alguna manera en la producción de NO, sus mutantes deberían tener una menor acumulación de NO posiblemente en hojas o tejidos fotosintéticos más acentuada que en raíces. Sin embargo, la actividad XOR se regula también a nivel post-traducciona mediante la activación del holoenzima de manera que los niveles de proteína no siempre se correlacionan bien con los niveles de actividad (Hesberg et al., 2004). De hecho, pese a una diferencia importante en la transcripción de *XOR1* y *XOR2* en raíces y en hojas, la diferencia en actividad XOR no es tan importante. Así pues, se hace necesaria una caracterización más extensa de los niveles de NO en los diferentes tejidos y órganos de los mutantes sencillos *xor1-1* y *xor2-1* así como del doble mutante *xor1-1xor2-1*.

Ya que los mutantes *nia1nia2* y *noa1-2* presentaron una clara reducción en los niveles de NO y para obtener más información acerca de la contribución de ambas vías sobre la producción de NO en *Arabidopsis* obtuvimos el triple mutante *nia1nia2noa1-2* mediante el cruce de sus genotipos parentales. Encontramos un efecto aditivo en la reducción de NO en el triple mutante comparado con sus genotipos mutantes parentales. El análisis de la producción de NO en plántulas completas indicó que el mutante *nia1nia2noa1-2* producía todavía una cantidad residual de NO, alrededor del 10% del NO producido en plántulas silvestres. Esto puede ser explicado por la existencia de otra vía enzimática de producción de NO diferente de la mediada por las rutas AtNOA1 y NR. Esta ruta alternativa debe ser menos activa en raíces que en la parte aérea (Fig. 8). Si esta nueva vía de síntesis de NO esta relacionada con la actividad XOR es uno de los objetivos que estamos completando en el laboratorio. Sin embargo, ya que la aportación de esta nueva ruta es muy pequeña, alrededor de un 10%, hace muy difícil establecer de forma inequívoca la naturaleza de esta actividad mediante los métodos utilizados. La generación de un quintuple mutante *nia1nia2noa1-2xor1-1xor2-1* o de plantas transgénicas que silencien la expresión de las dos XORs (Nakagawa et al., 2007) en el fondo genético *nia1nia2noa1-2* aportará más información acerca de este fenómeno en un futuro. De todas formas, se hace necesaria la aplicación de metodologías alternativas que permitan cuantificar diferencias más sutiles en la producción de NO.

Mediante el aislamiento y caracterización del triple mutante *nia1nia2noa1-2* hemos podido establecer un importante papel del NO en procesos de desarrollo. Entre estos procesos destacan el desarrollo de la raíz, el crecimiento vegetativo y la fertilidad, donde el NO tendría un papel positivo. Esto fue comprobado mediante la complementación, al menos parcial, de la longitud de

la raíz y del desarrollo vegetativo, a través de la aplicación de NO a plantas *nia1nia2noa1-2*. Es importante mencionar también, que el papel positivo que ejerce el NO sobre el crecimiento de la raíz se puede derivar únicamente de los resultados obtenidos en los mutantes deficientes en NO ya que la aplicación de NO a plántulas silvestres tuvo un efecto negativo (Fig. 10). Estos resultados apuntan hacia una regulación muy fina de los procesos de desarrollo por parte del NO donde niveles tanto por encima, como por debajo, de los óptimos, resultan en un defecto en el desarrollo, como ocurre con el control del crecimiento de la raíz y tal y como ha sido descrito para algunas hormonas (Mussig et al., 2003; Gonzalez-Garcia et al., 2011).

La caracterización de los mutantes generados en este estudio aporta información acerca de las rutas enzimáticas de biosíntesis de NO en *Arabidopsis*, quedando claro que las rutas dependientes de AtNOA1 y de NR son las que tienen un papel más importante en la producción de NO, si bien no podemos descartar una ruta adicional de síntesis de NO todavía no caracterizada y, ciertamente, menos importante desde el punto de vista cuantitativo que las mediadas por AtNOA1 y NR/NIA. Como se mostrará en los siguientes capítulos, el estudio del comportamiento de estos mutantes en diferentes procesos de desarrollo y de estrés aportará más información acerca de la participación de cada una de las rutas de producción de NO en estos procesos siendo una herramienta muy útil en el estudio del papel regulador del NO en plantas.

**CAPÍTULO 2: INTERACCIÓN ENTRE EL NO Y EL ABA EN
PROCESOS DE DESARROLLO Y RESPUESTA A ESTRÉS**

INTRODUCCIÓN

Interacción entre el NO y el ABA en procesos de desarrollo

Junto a la función del NO en las respuestas frente a factores de estrés de tipo biótico (Delledonne et al., 1998; Bolwell 1999; Wendehenne et al., 2004; Leitner et al., 2009), su función en la adaptación frente a estreses de tipo abiótico ha sido muy estudiada en los últimos años (Lamattina et al., 2003; Graziano y Lamattina 2007; Zhao et al., 2007; Ribeiro et al., 2009; Gemes et al., 2011; Zhang et al., 2011).

El ácido abscísico (ABA) es la hormona que controla mayoritariamente las respuestas frente a factores de estrés de tipo abiótico teniendo un papel esencial en la adaptación frente a la sequía, las bajas temperaturas y la salinidad, entre otras (Schroeder y Nambara 2006; Sirichandra et al., 2009) Además, el ABA, ejerce un papel importante en la regulación del desarrollo en plantas (Chen et al., 2008a; Zhang et al., 2010; Shkolnik-Inbar y Bar-Zvi 2010) siendo clave en el control de la germinación de las semillas (Holdsworth et al., 2008a; Holdsworth et al., 2008b). El ABA, es un sesquiterpeno que se sintetiza a partir de la ruta de síntesis de xantoxina, localizada en los cloroplastos, que es convertida a aldehído abscísico y finalmente a ácido abscísico (ABA) en el citoplasma (Cutler y Krochko 1999; Gonzalez-Guzman et al., 2002). Por otro lado, el ABA, se cataboliza, mayoritariamente, por medio de proteínas de la familia de los citocromos P450 CYP707A, que lo convierten en ácido faseico (Kushiro et al., 2004; Saito et al., 2004) o ácido neofaseico (Okamoto et al., 2011), aunque su conjugación reversible con glucosa también ha sido descrita (Dietz et al., 2000; Hartung et al., 2002; Nambara y Marion-Poll 2005; Lee et al., 2006).

En los últimos años, ha existido una gran polémica en cuanto a su percepción ya que han sido descritos una serie de receptores que han sido descartados en trabajos posteriores (Razem et al., 2006; Shen et al., 2006; Gao et al., 2007; Liu et al., 2007; Razem y Hill 2007; Guo et al., 2008; McCourt y Creelman 2008; Risk et al., 2008). En la actualidad, los receptores de ABA que han sido aceptados son: GTG1 y GTG2, dos proteínas de membrana acopladas a proteínas G (Pandey et al., 2009), la subunidad H de la magnesio quelatasa cloroplástica CHLH, (Shen et al., 2006; Wu et al., 2009; Shang et al., 2010), y las proteínas codificadas por la familia génica PYR/PYL/RCAR (Ma et al., 2009; Park et al., 2009). Parece que las proteínas GTG1 y GTG2 ejercen su función a nivel de la membrana plasmática integrando las señales comunicadas por el ABA exógeno y transduciéndolas a través de segundos mensajeros intracelulares (Pandey et al., 2009). En cuanto a la proteína CHLH, pese a que no parece estar conservada (Muller y Hansson 2009), se cree que se localiza en la membrana del cloroplasto, con el extremo C-terminal orientado hacia el citoplasma (Shang et al., 2010), donde interacciona tanto con el ABA como con una serie de factores de transcripción que funcionan como reguladores negativos de la señalización del ABA (Wu et al., 2009; Shang et al., 2010). De todas formas, la interacción con estos factores de transcripción en el

citoplasma, así como su localización cloroplástica hacen de esta proteína un receptor poco común. Además, su transcripción esta bajo el control del reloj circadiano mediante la acción de TOC1 (Legnaioli et al., 2009). En cambio, los receptores PYR/PYL/RCAR se localizan en el citoplasma y el núcleo y, tras unir ABA, inactivan protein-fosfatasa de tipo 2C que son fuertes represores de la señalización del ABA, permitiendo así una correcta señalización de esta hormona (Gosti et al., 1999; Merlot et al., 2001; Saez et al., 2004; Rubio et al., 2009; Park et al., 2009; Fujii et al., 2009; Cutler et al., 2010). Las estructuras a detalle atómico de varios miembros de esta familia han sido descritas recientemente, lo que representa un nivel de detalle acerca de su modo de acción sin precedente en el campo del ABA (Nishimura et al., 2009; Weiner et al., 2010; Peterson et al., 2010; Melcher et al., 2010). Además, la resolución de la estructura de diferentes PYR/PYLs/RCARs unidos a ABA pone claramente de manifiesto el papel de estas proteínas como receptores de ABA (Santiago et al., 2009; Weiner et al., 2010). Esta información ha sido integrada en la red de señalización de ABA conocida previamente permitiendo la simplificación del modo de acción del ABA pudiendo reconstituir el módulo principal de señalización del ABA *in vitro* (Fujii et al., 2009), lo que sin duda, abre nuevas puertas a la aplicación biotecnológica de toda esta información (Dupeux et al., 2011; Liang et al., 2011).

Entre los procesos regulados por el ABA, los más estudiados son la germinación de las semillas y el cierre estomático, procesos en los que el NO parece tener también un papel clave (Desikan et al., 2004; Neill et al., 2008).

La germinación de las semillas es un proceso altamente regulado donde se integran señales endógenas y exógenas que conducen a la selección del momento idóneo para la germinación y posterior desarrollo de la planta. Una de las particularidades de las semillas ha sido la adquisición, durante el transcurso de la evolución, de un estado fisiológico referido como dormición (Finch-Savage y Leubner-Metzger 2006). La dormición se puede definir como un bloqueo en la germinación de una semilla viable bajo condiciones favorables (Bewley 1997). Este bloqueo de la germinación ha sido adquirido para garantizar la germinación solo en condiciones donde se pueda asegurar una nueva generación (Hilhorst 1990b; a; Li y Foley 1996; Bewley 1997). Por tanto, una semilla debe pasar de un estado durmiente a otro no durmiente para iniciar la germinación. No obstante, dependiendo de las condiciones, esta transición se puede revertir pasando al estado durmiente de nuevo (Finkelstein et al., 2008). Estas transiciones responden tanto a señales endógenas como exógenas que son integradas en rutas de señalización dependientes de diferentes hormonas y reguladores del crecimiento (Holdsworth et al., 2008a). Entre las hormonas, el ABA se presenta como el integrador fundamental de la germinación. Su papel en este proceso es el de inducir y mantener la dormición, inhibiendo, por tanto, la germinación (Koornneef et al., 2002; Gubler et al., 2005). Otra hormona que actúa en este proceso es el ácido giberélico y las estructuralmente asociadas giberelinas (GA) que tiene un papel opuesto al del ABA, siendo la proporción ABA:GA lo que determina la salida del estadio de dormición y la inminente

germinación de la semilla (Finch-Savage y Leubner-Metzger 2006). Una alta proporción ABA:GA se traduce en ausencia de germinación mientras que altos niveles de GAs promueven la germinación (Finch-Savage y Leubner-Metzger 2006).

De forma paralela, el NO, ha sido caracterizado como un regulador de la dormición y de la germinación de semillas (Bethke et al., 2004b; Bethke et al., 2006a; Bethke et al., 2006b; Libourel et al., 2006; Sarath et al., 2006; Bethke et al., 2007). A este respecto, la mayoría del trabajo realizado se ha llevado a cabo mediante aproximaciones farmacológicas basadas en la aplicación de NO exógeno mediante donadores de NO o, excepcionalmente, de NO gaseoso (Keeley y Fotheringham 1998). Grubisic y colaboradores (1992) utilizaron nitroglicerina como donador de NO y sus análogos incapaces de liberar NO, triacetato de glicerol y glicerol. El tratamiento con nitroglicerina promueve la germinación de semillas de *P. tormentosa* mientras que sus análogos son totalmente inefectivos (Grubisic et al., 1992). Sin embargo, uno de los donadores de NO más utilizados es el nitroprusiato sódico (SNP) (Beligni y Lamattina 2000; Bethke et al., 2004b; Bethke et al., 2006a; Bethke et al., 2006b). A través de la aplicación de SNP, el NO es capaz de romper la dormición de *Arabidopsis thaliana*, algunas herbáceas y cebada (Bethke et al., 2004; Sarath et al., 2006). Originalmente, se describió que el NO es capaz de romper la dormición de las semillas pero no de semillas tratadas con ABA (Bethke et al., 2004b). Sin embargo, un trabajo posterior más completo concluyó que el NO era capaz de romper la dormición incluso de semillas imbibidas en ABA (Bethke et al., 2006a). Además, existen evidencias de que parte de este proceso se realiza en conexión con el etileno ya que embriones de manzana tratados con SNP son capaces de romper su dormición, mientras que un tratamiento conjunto de SNP y un inhibidor de la síntesis de etileno no favorecía la germinación (Gniazdowska et al., 2007). Recientemente, se ha descrito que la capa de aleurona es el determinante de la dormición y es el tejido de la semilla donde el NO junto con el ABA y las GAs ejercen su función (Bethke et al., 2007).

Aunque no queda duda de la actividad fisiológica del NO en la regulación de la ruptura de la dormición promocionando la germinación, su señalización en este proceso es todavía desconocida. Últimamente, se ha descrito el control de los niveles de ABA por NO como una parte de su señalización (Liu et al., 2009b). El NO regula tanto el transcrito como la acumulación de la proteína CYP707A2, encargada de la degradación de ABA (Liu et al., 2009b). El NO producido en la semilla, previo a la ruptura de la dormición, es capaz de incrementar la acumulación de la proteína CYP707A2 (Liu et al., 2009b). A su vez, los niveles de ABA disminuyen tras la producción de NO en la semilla en un individuo silvestre pero no en el mutante *cyp707a2* (Liu et al., 2009b). Este mutante es incapaz de romper la dormición y de degradar ABA tras la aplicación exógena de NO (Liu et al., 2009b). Así pues, el NO puede reducir los niveles de ABA de las semillas mediante la activación de este enzima para romper la dormición y permitir la germinación.

Interacción entre el ABA y el NO en la regulación del cierre estomático

La disponibilidad de agua es uno de los principales factores ambientales que afectan al correcto crecimiento de las plantas. Un déficit hídrico por un tiempo prolongado se traduce en pérdidas económicas importantes en las cosechas. Entre los efectos más importantes se encuentran la reducción en la fotosíntesis y en el metabolismo en general que se traduce en una parada en el crecimiento (Chaves et al., 2009; Skirycz et al., 2011a; Skirycz et al., 2011b). Así, la existencia de un conjunto de respuestas que promuevan una mayor tolerancia frente a la deshidratación es crítica para las plantas. Una de las respuestas más importante tras la percepción de la reducción del contenido en agua del suelo es el incremento en la síntesis y el transporte de ABA, que conduce rápidamente al cierre de estomas minimizando así la pérdida de agua (Sirichandra et al., 2009).

Los estomas están formados por una pareja de células de guarda, células epidérmicas especializadas que controlan el intercambio gaseoso y la evapo-transpiración de agua entre la planta y el ambiente (Sirichandra et al., 2009). Estas células, a través de la ganancia o pérdida de turgencia, dejan expuesto un poro que conecta el ambiente exterior con el interior de la estructura de la hoja. Bajo circunstancias de deshidratación, la planta responde con un incremento en los niveles y el transporte de ABA, a través de transportadores ABC (Kang et al., 2010; Kuromori et al., 2010; Kuromori y Shinozaki 2010), que se traduce en un movimiento coordinado de iones y agua a través de la membrana plasmática de las células de guarda. Esto produce una ganancia de turgencia de estas células y el concomitante cierre de este poro para evitar la transpiración y por ende la pérdida de agua. Controlar la apertura/cierre de este poro se hace indispensable para la supervivencia de las plantas frente a condiciones desfavorables (revisado por Sirichandra et al., 2009). Si bien las células de guarda controlan la apertura y cierre estomático en respuesta a fitohormonas (como el ABA) y varias señales ambientales como la luz, la temperatura o el ozono, en los últimos años se ha propuesto que diferentes especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) podrían actuar como mediadores de la señalización del ABA (Zhang et al., 2001; Kwak et al., 2003). Entre estas especies, las que tienen un papel más importante en el cierre estomático son el H₂O₂ y el NO (Desikan et al., 2004).

Parece claro que el NO es uno de los intermediarios del cierre estomático inducido por ABA. Por un lado, el NO liberado por los donadores SNP y SNAP es capaz de cerrar los estomas de *Vicia faba*, mientras que el tratamiento con el secuestrador de NO, cPTIO, previene, aunque no totalmente, el cierre estomático promovido por ABA (García-Mata y Lamattina 2001). Además, el SNP y otro donador de NO como el nitrosoglutatión (GSNO) son capaces de inducir el cierre de estomas en *Arabidopsis thaliana* y *Pisum sativum*, siendo este proceso dependiente de dosis (Desikan et al., 2002; Neill et al., 2002a). Sin embargo, esto es así para un rango de

concentraciones de NO por encima del cual se provoca una reapertura de los estomas, indicando una compleja señalización del NO en este proceso (Magalhaes et al., 2005).

Otros estudios han puesto de manifiesto que las células de guarda son capaces de sintetizar NO y que se requiere de este NO para llevar a cabo el cierre estomático inducido por ABA (Desikan et al., 2002; Guo et al., 2003). La eliminación de NO mediante incubación con secuestradores como el PTIO o el cPTIO atenúa el cierre estomático inducido por ABA (Desikan et al., 2002; Garcia-Mata y Lamattina 2002; Neill et al., 2002a). Sin embargo, estos secuestradores no impiden el cierre estomático dependiente de ABA por completo por lo que se puede pensar que exista una vía para el cierre estomático dependiente de ABA e independiente de NO.

En cuanto a la fuente de producción de NO en las células de guarda existe cierta controversia. Se han adoptado diferentes estrategias para contestar a esta pregunta. Por un lado se han utilizado inhibidores de las NOS de mamíferos, como L-NAME, con probados efectos sobre la producción de NO en plantas (Barroso et al., 1999). La aplicación de este inhibidor se traduce en una reducción de los niveles de NO y del cierre estomático inducido por ABA en guisante (Neill et al., 2002a). Sin embargo, en *Arabidopsis thaliana*, el tratamiento con L-NAME no inhibe el cierre estomático mediado por ABA ni reduce los niveles de NO (Desikan et al., 2002). Esto no deja de ser sorprendente ya que ha sido probado por multitud de grupos el efecto de L-NAME (y de otros inhibidores de las NOS de mamíferos) sobre la producción de NO en *Arabidopsis thaliana* (Delledonne et al., 1998; Guo et al., 2003; Zhang et al., 2006; Zhang et al., 2007a; Romanov et al., 2008; Besson-Bard et al., 2009).

Al utilizar inhibidores de las NR, Desikan y colaboradores (2002) probaron la función de la actividad de este enzima en la producción de NO mediada por ABA y su correspondiente efecto sobre el cierre estomático. De esta manera, al incubar fracciones epidérmicas de hojas de *Arabidopsis thaliana* con tungstato, un conocido inhibidor de la actividad NR, los estomas no producían NO y eran incapaces de cerrarse tras aplicar ABA (Desikan et al., 2002). Además, la aplicación de tungstato no impedía el cierre estomático promovido por SNP, H₂O₂ u oscuridad, indicando que los efectos del tungstato son fisiológicamente relevantes (Desikan et al., 2002). Además, mediante una aproximación genética basada en el uso del doble mutante *nia1nia2* se comprobó que en este mutante no hay síntesis de NO en las células de guarda en respuesta a ABA y que tampoco se cerraban sus estomas en respuesta a esta hormona (Desikan et al., 2002). No obstante, los autores indican que no son capaces de observar un fenotipo de marchitamiento o una deshidratación acentuada en este mutante, lo que sería de esperar en una planta incapaz de cerrar los estomas por ABA (Desikan et al., 2002). Un trabajo posterior más detallado concluyó que el NO tiene un papel en el cierre estomático de plantas bien hidratadas pero no en plantas sometidas a una deshidratación previa (Ribeiro et al., 2009). Así, plantas turgentes del doble mutante *nia1nia2*, no pueden cerrar sus estomas cuando se aplica ABA, tal y como se había descrito previamente (Desikan et al., 2002), pero lo hacen perfectamente si se aplica ABA a plantas que han sufrido un

proceso de deshidratación previo (Ribeiro et al., 2009). Curiosamente, la aplicación de NO mediante SNP en plantas bien hidratadas, pese a provocar el cierre de estomas, no resulta en un mayor contenido de agua en la planta al final de los experimentos de deshidratación (Ribeiro et al., 2009). De la misma forma, la aplicación de cPTIO, pese a que impide el cierre de estomas mediado por ABA en plantas bien hidratadas, tampoco resulta en un menor contenido en agua como sería de esperar (Ribeiro et al., 2009).

Se disponen de algunas evidencias farmacológicas y genéticas en cuanto a la señalación por la que el NO regula el cierre estomático aunque su mecanismo se desconoce en su mayor parte. Así, mutantes afectados en la biosíntesis de ABA, como el mutante *aba1-1*, responde menos que una planta silvestre al cierre de los estomas de plantas turgentes mediado por NO (Ribeiro et al., 2009). Estos datos sugieren que una parte de la señalización del NO depende de la biosíntesis de ABA mientras que, por otro lado, el NO puede regular el cierre de estomas de manera independiente a la acumulación de la hormona (Ribeiro et al., 2009). En cuanto a la posición del NO dentro de la ruta de señalización de ABA, existen algunas evidencias que posicionan al NO en los pasos iniciales de esta ruta. Los mutantes de ganancia de función insensibles al ABA, *abi1-1* y *abi2-1*, no responden al NO en el cierre estomático (Desikan et al., 2002; Ribeiro et al., 2009; Dubovskaya et al., 2011). Además, el mutante *abi1-1* tampoco responde a cGMP, un segundo mensajero del NO, en el cierre estomático (Dubovskaya et al., 2011). Por tanto, se puede afirmar que el NO actúa por encima de las fosfatasas PP2C ABI1 y ABI2 en la regulación del cierre estomático. A la luz de la reciente descripción de los receptores solubles de ABA, PYR/PYL/RCAR, puede postularse la hipótesis de que el NO este actuando directamente sobre estos receptores mediante la regulación de su transcripción o bien modificando su función mediante la modificación post-traduccional de los mismos.

Por otro lado, hay abundante información bibliográfica que sustenta que el NO parece ejercer su función en el cierre estomático a través de tres vías principalmente: la producción de GMP cíclico (cGMP), la producción de ADP-ribosa cíclica (cADPR) y la liberación de calcio.

Ruta dependiente de cGMP:

Se han descrito algunos resultados contradictorios en el posible papel del cGMP en el cierre estomático. Si bien el cGMP parece necesario para la apertura de estomas inducida por auxinas (Cousson 2001), existen resultados que prueban que el cGMP es requerido para la inducción del cierre estomático mediado por ABA y NO (Neill et al., 2002a; Dubovskaya et al., 2011). Además, la inhibición de la actividad guanilato ciclasa (GC), reponsable de la formación de cGMP, resulta en una reducción tanto de la apertura de los estomas mediada por auxinas como del cierre estomático inducido por NO (Cousson 2001; Neill et al., 2002a; Dubovskaya et al., 2011). Sin embargo, la aplicación del donador permeable de cGMP, 8-Br-cGMP, no es capaz de inducir el cierre estomático (Neill et al., 2002a; Lyudmila et al., 2011). Estos resultados indican que la

producción de cGMP es necesaria pero no suficiente para el cierre estomático (Neill et al., 2002a; Neill et al., 2002b; Dubovskaya et al., 2011). Por tanto, el cGMP debe actuar junto con otros mensajeros en la regulación del movimiento estomático dependiente de NO. Es necesario determinar otros factores que junto al cGMP medien su señalización donde el calcio puede tener un papel muy importante (Dubovskaya et al., 2011).

cADPR y calcio:

El calcio es una molécula esencial en la señalización del ABA en los estomas siendo necesaria para una respuesta total al ABA aunque el cierre estomático en ausencia de calcio también ha sido descrito (Webb et al., 2001; Roelfsema y Hedrich 2010). Tanto la entrada de calcio desde el espacio extracelular como la liberación desde los reservorios intracelulares son requeridos para una correcta respuesta a ABA (MacRobbie 2000). Recientemente, se ha caracterizado que el Ca^{2+} extracelular es percibido por un receptor acoplado a la membrana plasmática de las células de guarda (Han et al., 2003) y que conduce a un incremento del Ca^{2+} intracelular (Allen y Schroeder 2001). Sin embargo, parece que debe existir otro sistema que perciba el Ca^{2+} extracelular, siendo la calmodulina, un buen candidato para ejercer esta función (Li et al., 2009). La calmodulina extracelular (ExtCaM) se encuentra localizada en la pared celular de las células de guarda y, cuando su actividad es inhibida, se promueve la apertura de estomas bajo condiciones de luz mientras que se inhibe el cierre estomático inducido por oscuridad en *V. fabia* y *A. thaliana* (Chen et al., 2004), probando así el posible papel de ExtCaM en el cierre estomático. Se ha probado también que el Ca^{2+} extracelular, a través de su percepción por ExtCaM, desencadena una ruta de señalización que incluye a la subunidad β de la proteína G (Li et al., 2009a). Esta a su vez, promueve la activación de la producción de H_2O_2 dependiente de AtrbohD/F que promueve la síntesis de NO dependiente de AtNOA1 para, finalmente, provocar el cierre estomático (Li et al., 2009). Se ha descrito también que el cGMP, cuya acumulación se activa tras la producción de NO inducida por H_2O_2 , desencadena la liberación de Ca^{2+} citoplasmático (Dubovskaya et al., 2011). Este proceso puede estar mediado por proteínas que interactúan con cGMP como las nucleósido-difosfato kinasas (NDPKs) (Dubovskaya et al., 2011). Por otro lado, la liberación del calcio intracelular puede darse por otras dos vías alternativas. Una de ellas dependiente de vesículas sensibles a inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) y otra sensible a los niveles de cADPR. La cADPR es capaz de promover un cierre parcial de los estomas de *Commelina communis*, donde el tratamiento con un antagonista del cADPR o con un inhibidor de su síntesis (como la nicotinamida) reducen el cierre estomático y el flujo de iones a través de la membrana plasmática de la vacuola provocados por el ABA (Leckie et al., 1998; MacRobbie 2000). En guisante, el cierre de estomas inducido por ABA o por NO se atenúa tras la aplicación de nicotinamida (Neill et al., 2002a). Además, la activación de la expresión de la ADPR ciclasa de *Aplysia* induce un incremento en los niveles de cADPR y un cierre parcial de estomas en

Arabidopsis thaliana (Neill et al., 2002a; Dodd et al., 2007). Todos estos datos ponen de manifiesto la posible conexión entre el NO y la producción de segundos mensajeros como parte fundamental de la señalización del NO en el cierre estomático.

RESULTADOS

El NO ha sido caracterizado como un regulador de la dormición, la germinación, el cierre de estomas y el daño oxidativo, procesos donde el ABA ejerce un papel clave (Bethke et al., 2004b; Bethke et al., 2006a; Bethke et al., 2007; Qiao y Fan 2008). Sin embargo, la mayoría de trabajos realizados al respecto fueron llevados a cabo mediante aproximaciones farmacológicas basadas en la aplicación de donadores de NO, muchos de los cuales liberan productos diferentes al NO que interfieren con su análisis (Bethke et al., 2004b; Bethke et al., 2006a; Bethke et al., 2007). Si bien existen trabajos apoyando la función de NR/NIA y AtNOA1 en las interacciones ABA-NO (Desikan et al., 2002; Guo et al., 2003; Bethke et al., 2007), es necesario un análisis en detalle de la función de estas vías de síntesis de NO en la regulación de la función del ABA en estos procesos. Como se comentó en detalle en el capítulo anterior, la pérdida de función simultánea de los genes *NIA1/NR1*, *NIA2/NR2* y *AtNOA1*, supone una drástica reducción de los niveles de NO en plántulas de *Arabidopsis*. El triple mutante y sus genotipos parentales, son una herramienta muy interesante para estudiar desde un punto de vista genético, la interacción entre el NO y el ABA.

La producción de NO activada por ABA esta comprometida en los mutantes NO deficientes

El ABA es un fuerte inductor de la producción de NO (Guo et al., 2003) y, si bien las principales vías de síntesis de NO parecen ser las dependientes de las actividades NR/NIA y AtNOA1 (Moreau et al., 2010), no existía evidencia de la aportación conjunta de estas vías de síntesis en la producción de NO dependiente de ABA. Para obtener esta información, se determinó la acumulación de NO en raíces de plántulas silvestres y los mutantes de cada una de estas rutas, *nial1,2* y *noa1-2*, así como la combinación de ambas, *nial1,2noa1-2*, en condiciones basales o tras tratar las plántulas con ABA. Los niveles de

NO en raíces de plántulas no tratadas resultaron estar muy reducidos en el caso de *nia1,2* y *noa1-2* e indetectables en el triple mutante *nia1,2noa1-2* (Fig. 11).

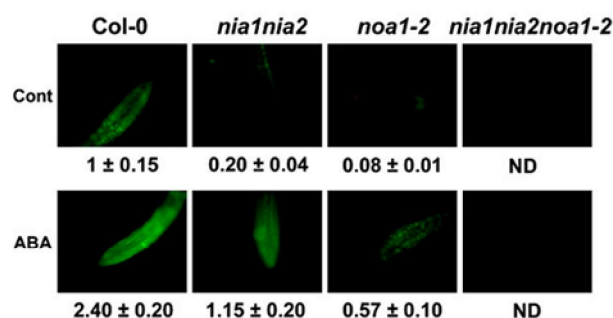


Figura 11. Producción de NO en raíces de los diferentes mutantes deficientes en NO tras la aplicación de ABA.

Plántulas de los diferentes mutantes fueron teñidas con la fluoresceína DAF-FM DA y tratadas (ABA), o no (Cont), con 50 μ M ABA durante 30 minutos. Se indica la cuantificación de la fluorescencia en cada caso como la media \pm error estándar. ND, no detectado.

Cuando se trataron las plántulas con ABA, las raíces de las plántulas silvestres mostraron un incremento en la fluorescencia asociada a NO tal y como esta descrito (Guo et al., 2003). Sin embargo, en el caso de los mutantes los niveles de NO tras la aplicación de ABA fueron claramente menores que los detectados en raíces silvestres (Fig. 11). Esta reducción fue todavía más evidente en el caso del triple mutante donde no se detectó fluorescencia asociada a la producción de NO, quedando claro que ambas vías cooperan en la producción de NO activada por ABA (Fig. 11). En conclusión, como resultado del bloqueo simultáneo de las rutas dependientes de NIA/NR y AtNOA1, el triple mutante está afectado tanto en la producción basal de NO como en la inducida por ABA.

Interacción entre el NO y el ABA en el control de la dormición, la germinación y el establecimiento de plántula

El ABA inhibe la germinación y es esencial para la adquisición y el mantenimiento de la dormición (Koorneef et al., 2002; Gubler et al., 2005). Para determinar la posible conexión entre el ABA y el NO en la regulación de estos procesos, se contabilizó la germinación, cada 24 horas y durante 6 días consecutivos, de semillas durmientes de Col-0 y de los mutantes deficientes en NO, tras su siembra y cultivo sin previa estratificación en placas MS. Mientras que las semillas durmientes del genotipo silvestre presentaron un 20% de germinación dos días después de su siembra, los mutantes deficientes en NO apenas alcanzaron un 5% (Fig. 12A). Además, mientras que las semillas silvestres alcanzan su máximo potencial de germinación (80%) 5 días después de la siembra, las semillas de los mutantes *noa1-2*, *nia1,2* y *nia1,2noa1-2* alcanzan tan sólo un 65%, 25% y menos de un 10% de germinación 6 días después de la siembra, respectivamente. Para determinar si la mayor dormición de las semillas de plantas NO deficientes se debe a una reducida

acumulación de NO, semillas durmientes de todos los genotipos se mantuvieron en un ambiente enriquecido en NO y su germinación se contabilizó 5 días después de la siembra. Todos los genotipos deficientes en la producción de NO mostraron una reversión de su fenotipo de dormición tras ser tratadas con NO (Fig 12A, panel derecho). Sin embargo, mientras las semillas *noa1-2* germinaron como las semillas silvestres tras aplicar NO, las semillas de *nia1nia2* y de *nia1nia2noa1-2* no revertieron totalmente su dormición (Fig. 12A, panel derecho). De todas formas, el tratamiento con NO permitió germinar al 40% de las semillas del mutante *nia1nia2noa1-2* en contraste con el 6% de germinación que alcanzan estas semillas en ausencia de NO exógeno en las condiciones estudiadas (Fig. 12A, panel derecho).

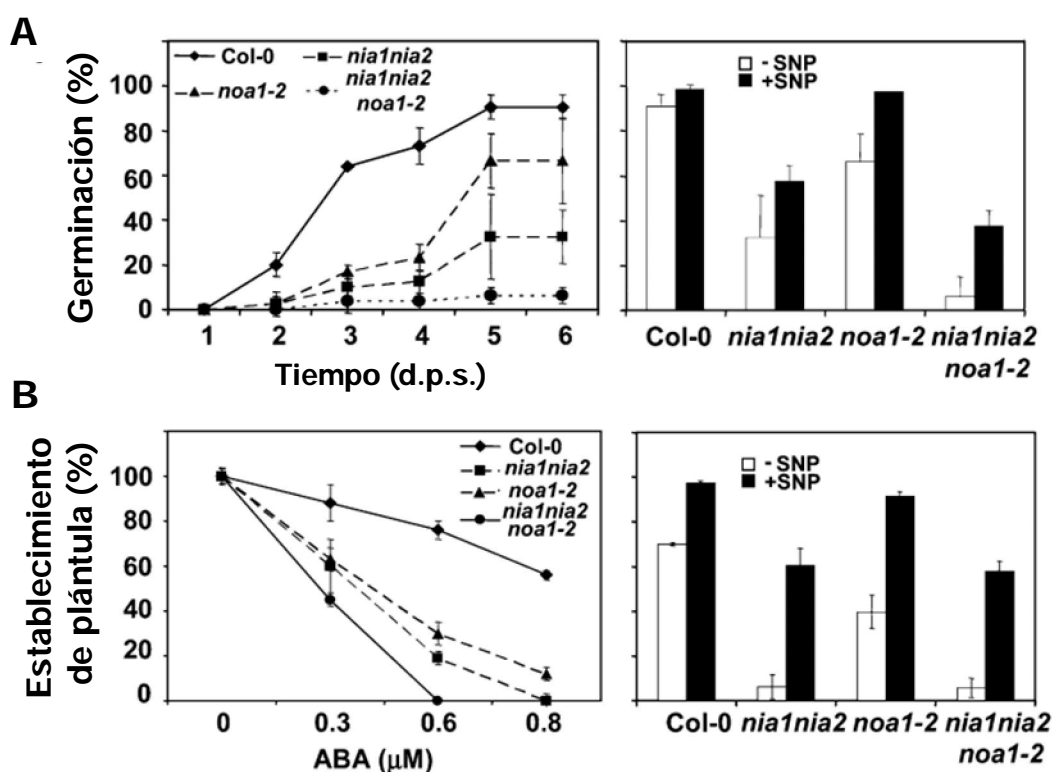


Figura 12. Los mutantes deficientes en la producción de NO son hipersensibles a ABA.

A. Porcentaje de germinación de semillas frescas (durmientes) de los diferentes mutantes sembradas sin estratificación en placas MS a lo largo de los días post siembra. (d.p.s). Ensayos realizados en presencia (+SNP, barras negras) o en ausencia (-SNP, barras blancas) de NO liberado por una solución de 100 μM SNP (derecha). La germinación se contabilizó a los 5 d.p.s. y se representa la media \pm error estándar de tres experimentos independientes con al menos 200 semillas por experimento. B. Porcentaje de plántulas con cotiledones verdes y expandidos en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de ABA. Las semillas se sembraron tras estratificarlas tres días a 4 $^{\circ}\text{C}$ y el establecimiento se determinó a 12 d.p.s. (izquierda). Ensayos similares realizados en medio MS con 0,5 μM ABA en presencia (+SNP, barras negras) o ausencia (-SNP, barras blancas) de NO liberado de una solución 100 μM SNP (derecha). Los valores representan la media \pm error estándar.

Ya que el ABA se mantiene a niveles altos en semillas durmientes y mutantes hipersensibles a esta hormona tienen una dormición muy acusada (Finkelstein et al., 2008), nos preguntamos si la reducida germinación de semillas durmientes de los mutantes NO deficientes se

debía a una mayor sensibilidad a esta hormona. Se realizaron ensayos de sensibilidad a ABA contabilizando el establecimiento de plántulas de los diferentes genotipos en concentraciones crecientes de ABA. Todos los mutantes deficientes en NO mostraron hipersensibilidad a ABA en este tipo de ensayo con una hipersensibilidad más acentuada en el caso del triple mutante (Fig. 12B). A una concentración de 0,6 μM de ABA, alrededor del 80% de las semillas silvestres y solo un 35% y un 20% de las semillas de *noa1-2* y *nia1nia2*, respectivamente, presentaban cotiledones verdes y expandidos (Fig. 12B). Además, las semillas del triple mutante mostraban un 100% de inhibición del establecimiento a la misma concentración de ABA (Fig. 12B), sugiriendo que las rutas de síntesis de NO mediadas por NIA/NR y AtNOA1 son aditivas en términos de la inhibición del establecimiento de plántula producido por el ABA. De nuevo, la aplicación de NO exógeno, alivió la inhibición del establecimiento de plántula ejercido por el ABA (Fig. 12B, panel derecho). Esta reversión fue casi total en el caso del mutante *noa1-2* y suficiente para incrementar el establecimiento del 10% al 60% en los mutantes *nia1,2* y *nia1,2noa1-2* (Fig. 12B, panel derecho).

Este efecto aditivo se observó también cuando se realizó el mismo tipo de ensayo, contabilizando en este caso la germinación de las semillas silvestres y mutantes con el tiempo en presencia de 0,5 μM ABA (Fig. 13). Debido al conocido papel que ejerce el contenido en azúcares sobre la germinación y la señalización de ABA (revisado por (Graham 2008)) llevamos a cabo ensayos de germinación y establecimiento de plántula en medios suplementados con ABA en presencia o ausencia de sacarosa en el medio (Fig. 14). Sin embargo, no encontramos ningún efecto diferencial en la inhibición de la germinación o establecimiento ejercido por el ABA entre los mutantes deficientes en NO en medios con o sin sacarosa (Fig. 14).

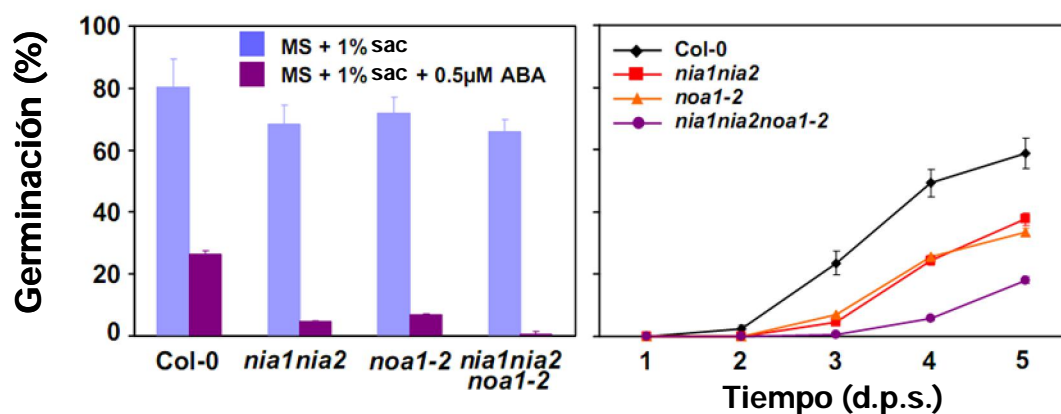


Figura 13. Los mutantes deficientes en la producción de NO son hipersensibles al ABA en germinación.

Germinación 3 días post siembra de semillas estratificadas de los diferentes mutantes en ausencia (barras azules) o presencia (barras violetas) de 0,5 μM ABA (izquierda). La germinación de las mismas semillas en presencia de 0,5 μM ABA fue contabilizada durante 5 días consecutivos (derecha). Los valores son media \pm desviación estándar.

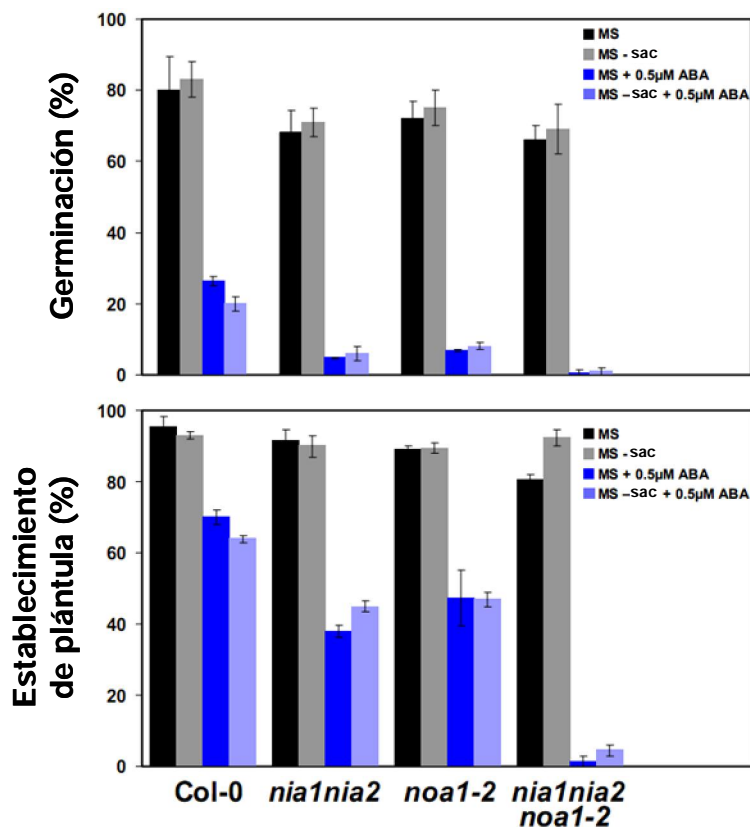


Figura 14. El contenido en sacarosa no afecta la sensibilidad a ABA de los mutantes deficientes en la producción de NO.

Las semillas de los diferentes genotipos se estratificaron y sembraron en los medios indicados y el % de germinación y establecimiento determinado 3 ó 12 días tras la germinación, respectivamente. Los valores representan media \pm desviación estándar. sac, sacarosa 1%.

Ya que la inhibición de la germinación ejercida por estrés osmótico es un proceso dependiente de ABA, procedimos a evaluar, en que medida, la deficiencia en NO puede alterar la germinación en un medio suplementado con NaCl o Manitol. La tabla I muestra que las semillas de los mutantes deficientes en NO son más sensibles a la inhibición de la germinación mediada por estrés osmótico que las semillas silvestres, siendo las semillas de los mutantes *nia1nia2* y *nia1nia2noa1-2* más sensibles que las semillas del mutante *noa1-2* (Tabla I).

Tabla I. Efecto del tratamiento con sal o manitol en la germinación de semillas silvestres y de mutantes deficientes en NO.

	Col-0	<i>nia1nia2</i>	<i>noa1-2</i>	<i>nia1,2noa1-2</i>
Control	100	96 \pm 2	100	96 \pm 3
Manitol	77.97 \pm 2.67	15.1 \pm 0.94	51.98 \pm 1.19	14.13 \pm 2.05
NaCl	50.77 \pm 6.88	1.94 \pm 0.99	14.64 \pm 4.81	0

Semillas de los mutantes deficientes en NO y de plantas silvestres se sembraron en medio MS con 1% (p/v) sacarosa (Control) o en el mismo medio suplementado con 150 mM NaCl o 250 mM Manitol. Los valores de porcentaje representan la media de cuatro experimentos independientes \pm error estándar.

Análisis de la expresión de genes de respuesta a ABA en los mutantes deficientes en NO

Los mutantes hipersensibles a ABA presentan una expresión elevada de los genes de respuesta a ABA (Saez et al., 2006) Rubio et al., 2009). Para determinar si los mutantes deficientes en NO presentan este mismo fenotipo molecular, se monitorizó mediante PCR cuantitativa la expresión de los genes inducibles por ABA, *RD29b* (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki 1993) y *RAB18* (Jeannette et al., 1999). La tabla II muestra que todos los mutantes NO deficientes presentan alrededor de dos veces más expresión de estos genes que las plantas silvestres. Además, tras tratar con ABA, el triple mutante mostró 2 veces más inducción de estos genes que el silvestre (Tabla II). Sin embargo, mientras que los mutantes *nia1nia2* y *noa1-2* presentan unas inducciones mayores que las del silvestre, no son tan altas como las del mutante *nia1nia2noa1-2* (Tabla II). Estos datos sugieren que la modulación por NO de la sensibilidad a ABA no es exclusiva de las semillas pudiendo ser también funcional en plántulas o en plantas adultas

Tabla II. Niveles de expresión de genes de respuesta a ABA en plántulas de los mutantes deficientes en NO.

Tratamiento	Gen	Genotipo			
		Col-0	<i>nia1nia2</i>	<i>noa1-2</i>	<i>nia1nia2noa1-2</i>
Control	<i>RD29b</i>	1	2.39 \pm 0.44	2.10 \pm 0.45	2.65 \pm 0.37
	<i>RAB18</i>	1	1.74 \pm 0.14	1.95 \pm 0.42	2.17 \pm 0.21
ABA	<i>RD29b</i>	1	1.31 \pm 0.05	1.25 \pm 0.10	2.33 \pm 0.15
	<i>RAB18</i>	1	1.65 \pm 0.25	1.63 \pm 0.15	2.05 \pm 0.20

Los valores son media de tres réplicas biológicas independientes \pm error estándar y se muestran como valores relativos a aquellos detectados en el silvestre Col-0. Los valores han sido normalizados con los de la *Actina 2/8*.

La deficiencia en NO confiere resistencia a la deshidratación

Ya que las plantas deficientes en la producción de NO muestran hipersensibilidad al ABA, analizamos la posibilidad de que dichas plantas tuvieran un fenotipo de resistencia a la deshidratación dependiente de ABA. Plantas silvestres y diferentes mutantes deficientes en NO se sometieron a déficit hídrico dejando de regar durante 28 días. Tras dicho periodo de sequía, las plantas deficientes en NO mostraron una clara resistencia a la deshidratación, con un efecto muy marcado en plantas *nia1nia2noa1-2* (Fig. 15). Mientras que las plantas silvestres mostraron efectos de deshidratación dramáticos, las plantas del triple mutante permanecieron verdes y con apenas síntomas evidentes de deshidratación (Fig. 15A). La pérdida de peso debida a la transpiración fue significativamente más lenta en los mutantes que en las plantas silvestres, siendo las plantas del triple mutante las que mostraban una pérdida de peso más baja de acuerdo con el fenotipo de extrema resistencia a la deshidratación observado (Fig. 15A,B). Por otro lado, mientras que sólo el 42% de las plantas silvestres sobrevivieron al tratamiento de sequía tras restaurar el riego, el 100% de las plantas mutantes sobrevivieron (Fig. 15A).

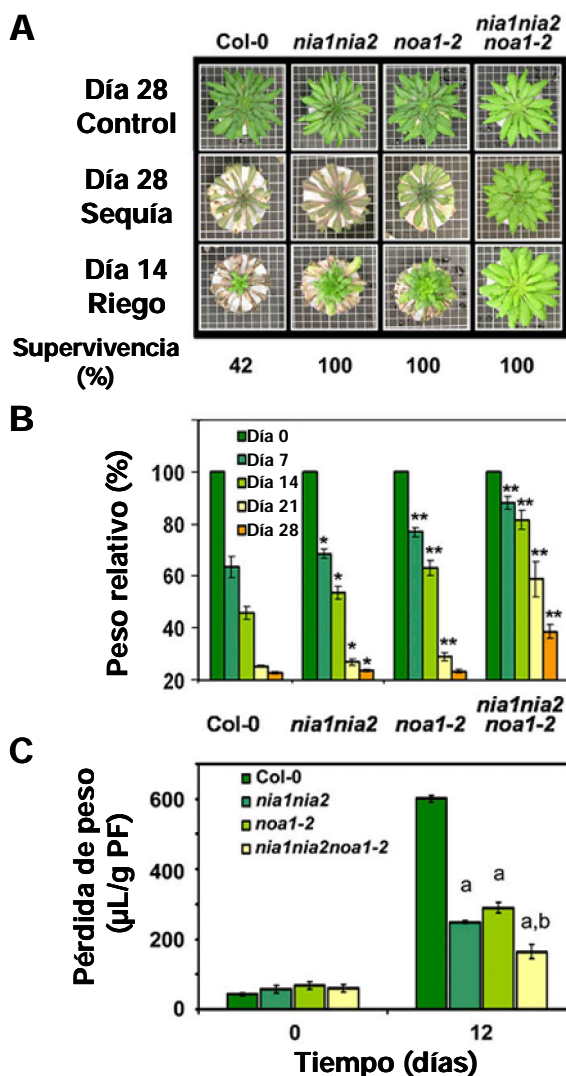


Figura 15. Resistencia al déficit hídrico de los mutantes deficientes en NO.

A. Apariencia de los diferentes genotipos crecidos en días cortos, 28 días después de dejar de regar y 14 días tras restaurar el riego. La supervivencia se estimó como el porcentaje de plantas que desarrollaron nuevas hojas 14 días después de restaurar el riego. Las plantas (10 plantas por experimento y tres experimentos independientes) se cultivaron en sustrato Jiffy7 bajo condiciones de días cortos. B. Pérdida en peso fresco relativo de las mismas plantas que en A. El peso total se midió antes y cada 7 días después de cesar el riego hasta el día 28. C. Cuantificación de la pérdida de agua por evapotranspiración en plantas dejadas de regar durante 12 días. Los datos son la media del agua perdida en 10 hojas de 10 plantas diferentes. a, p-valor < 0,001 comparando el silvestre con los demás genotipos. b, p-valor < 0,005 comparando *nia1nia2* y *noa1-2* con *nia1nia2noa1-2*, valores obtenidos mediante test-t. Se presentan las medias \pm error estándar. *, p-valor < 0,05; **, p-valor < 0,005 mediante test-t.

Además, se realizó un experimento detallado de pérdida de agua comparando el peso fresco de hojas deshidratadas y turgentes de plantas sometidas a un tratamiento de deshidratación tal y como ha sido previamente descrito (Sáez et al., 2006). Bajo estas condiciones experimentales, *noa1-2* y *nia1nia2* mostraron una reducida pérdida de agua, reteniendo alrededor de dos veces más agua que las hojas silvestres (Fig. 15C). Este fenotipo fue incluso más fuerte en el caso de las hojas de *nia1nia2noa1-2*, las cuales retuvieron 4 veces más agua que las plantas silvestres bajo el mismo periodo de deshidratación (Fig. 15C). Estos resultados manifiestan de nuevo el papel aditivo de las rutas NR/NIA y AtNOA1 en la resistencia a la deshidratación, lo que está de acuerdo con la aditiva hipersensibilidad a ABA de los diferentes mutantes deficientes en NO descrita anteriormente.

Para estudiar si la resistencia a la sequía de las plantas NO deficientes es debida a efectos directos en la regulación del cierre estomático, procedimos a medir la apertura de estomas de plantas silvestres y *nia1nia2noa1-2* en diferentes condiciones y mediante tres técnicas independientes pero complementarias. En primer lugar, se analizó el cierre estomático tras tratar con ABA midiendo la apertura de los estomas directamente. Tras tratar plántulas con 50 μ M ABA los estomas del mutante *nia1nia2noa1-2* estaban más cerrados que los de plántulas silvestres, sugiriendo que los estomas de *nia1nia2noa1-2* se cierran más eficientemente en respuesta a ABA (Fig. 16A,B). A concentraciones saturantes de 150 μ M ABA, los estomas de plantas silvestres y mutantes se comportan igual (Fig. 16A, B). De forma complementaria, los estomas de *nia1nia2noa1-2* se cerraron más que los silvestres tras el mismo tratamiento de deshidratación (Fig. 16C). Ya que el ABA regula también la apertura de los estomas por luz (Roelfsema y Hedrich 2005), se analizó este proceso en plántulas silvestres y *nia1nia2noa1-2*. Los estomas del triple mutante se abren en respuesta a la luz al igual que los estomas silvestres (Fig. 16D). Esta apertura estomática se inhibió por ABA en plántulas silvestres pero el efecto fue significativamente más acusado en el triple mutante (Fig. 16D), lo que, de nuevo, apoya la hipersensibilidad al ABA mostrada por *nia1nia2noa1-2*. Además, la inhibición de la apertura estomática se previno mediante un tratamiento con el quelante de calcio permeable BAPTA/AM o el secuestrador de NO, cPTIO, en plantas silvestres pero no en el mutante *nia1nia2noa1-2* (Fig. 16D).

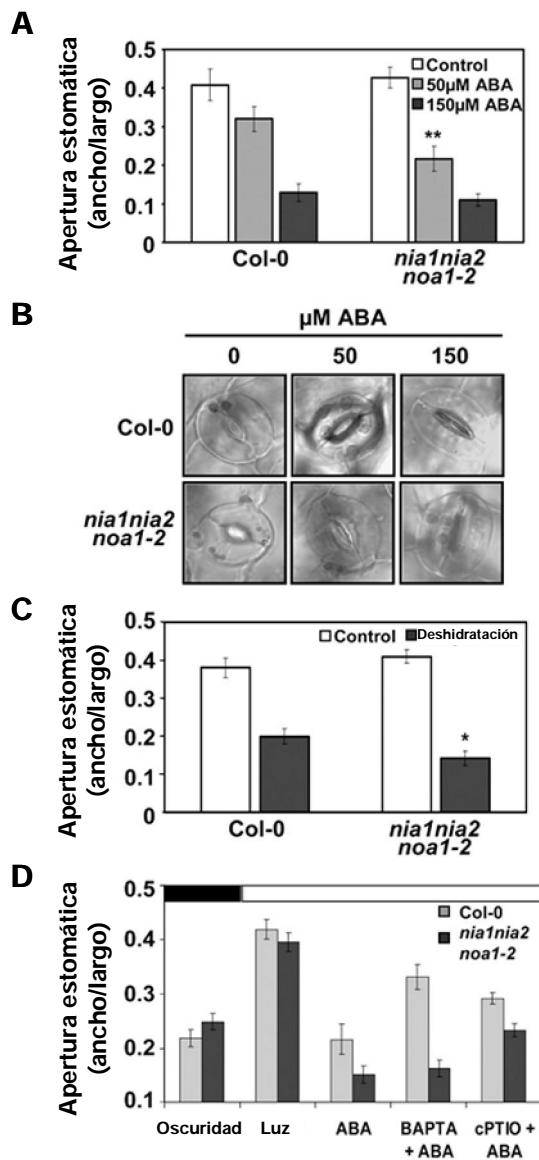


Figura 16. El mutante *nia1nia2noa1-2* presenta una apertura estomática reducida.

A. El cierre estomático mediado por ABA en los diferentes genotipos fue testado en plántulas con los estomas pre-abiertos durante 2,5 horas bajo iluminación, y después incubados durante 2,5 horas en las concentraciones de ABA indicadas. Los datos representan la media \pm error estándar de 40 estomas medidos por experimento. El experimento se repitió dos veces con los mismos resultados. B. Imágenes de microscopía confocal mostrando estomas de diferentes genotipos en diferentes condiciones usados para la cuantificación de A. C. Apertura estomática en condiciones control (barras blancas) o de deshidratación (barras grises). La deshidratación se llevó a cabo colocando las plántulas durante 5 minutos en una cabina de flujo. D. Inhibición por ABA de la apertura estomática inducida por luz. Las plántulas se mantuvieron en oscuridad en tampón de apertura 2,5 h y después se trataron 0,5 h con 50 μ M ABA, 250 μ M BAPTA-AM o 250 μ M cPTIO como se indica en Materiales y Métodos, pasándolas a luz posteriormente. La apertura estomática se midió justo antes de la transferencia a luz (Oscuridad) o 2,5 h tras pasar las plántulas a luz. *, p-valor < 0,05; **, p-valor < 0,005 calculado mediante test-t.

Para confirmar los resultados obtenidos, realizamos medidas de la apertura estomática utilizando un método no invasivo para minimizar la producción de NO derivada del daño mecánico. Para ello, analizamos la conductancia estomática que era menor en las plantas *nia1nia2noa1-2* que en las silvestres tras ser sometidas a 7 y 14 días de ausencia de riego (Fig. 17A). Además, como la medida del potencial hídrico puede ser utilizado para monitorizar el estatus hídrico de la plantas, debido al menos en parte al cierre estomático, procedimos a medir el potencial hídrico de hojas (LWP, del inglés Leaf Water Potential) de plantas silvestres y *nia1nia2noa1-2*. Después de 7 días tras dejar de regar las plantas, no se observó ninguna diferencia significativa en LWP de acuerdo con la ausencia de síntomas de deshidratación obvios en las plantas (Fig. 17B). Sin embargo, tras 14 días de sequía, las plantas silvestres mostraron tanto un fenotipo claro de deshidratación como una pronunciada bajada de su potencial hídrico (Fig. 17B). En cambio, sólo se observó una pequeña bajada del LWP en las plantas *nia1nia2noa1-2*,

correlacionándose muy bien con la ausencia de un fenotipo debido al déficit hídrico en estas plantas (Fig. 17B).

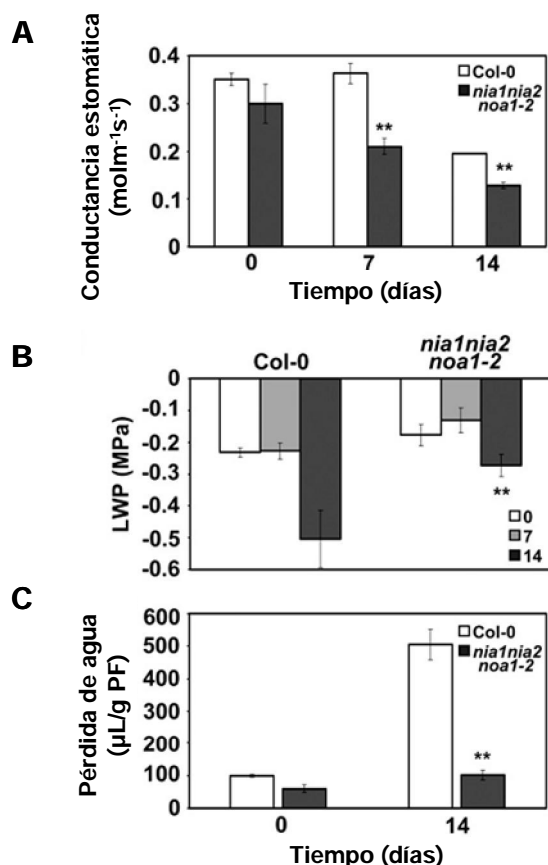


Figura 17. Conductancia estomática, potencial hídrico (LWP) y pérdida de peso de plantas silvestres y *nia1nia2noa1-2* tras diferentes periodos de sequía.

A. Conductancia estomática de hojas de los diferentes genotipos tras diferentes tiempos después de cesar el riego. Se muestran las medias de 18 réplicas \pm error estándar. El experimento se repitió dos veces con resultados similares. B. LWP de plantas dejadas de regar durante los tiempos indicados. Los valores representan la media \pm desviación estándar de seis réplicas independientes. C. Ensayo de pérdida de peso (media \pm desviación estándar) realizado sobre las mismas plantas usadas en A. **, p-valor < 0,001 mediante test-t.

DISCUSIÓN

El NO ejerce diferentes funciones en diferentes procesos durante todo el ciclo vital de las plantas. Si bien su papel en la defensa frente a diferentes interacciones planta-patógeno ha sido descrito en profundidad (Leitner et al., 2009), su papel frente a otros tipos de estrés está menos documentada y se sigue estudiado activamente en la actualidad (Chehab et al., 2009; Molassiotis et al., 2010; Ramirez et al., 2010). Existe un claro papel del NO en la regulación de la germinación (Beligni y Lamattina, 2000) pero no ha sido hasta hace unos pocos años que se ha determinado que este papel se lleva a cabo mediante su interacción con una de las hormonas más relacionadas con la respuesta a estrés, en concreto a estrés de tipo abiótico, como el ABA (Bethke et al., 2004b; Bethke et al., 2006a; Bethke et al., 2007). Sin embargo, muchos de los trabajos relacionando en ABA y el NO han sido llevados a cabo mediante la aplicación de compuestos químicos que estimulan o reprimen la producción de NO o mediante donadores o secuestradores de NO sintetizados en laboratorio (Beligni y Lamattina 2000; Bethke et al., 2004b; Bethke et al., 2006a;

Bethke et al., 2007). Son muy pocos los trabajos que han estudiado la regulación que ejerce el NO en procesos relacionados con el ABA utilizando mutantes en la síntesis de NO. En este capítulo, hemos descrito el papel de cada una de las principales vías enzimáticas de síntesis de NO, la dependiente de la actividad AtNOA1 y la dependiente de la actividad NR/NIA, en la interacción con el ABA en procesos como la dormición, la germinación y la resistencia a la deshidratación.

De acuerdo con el papel propuesto del NO disminuyendo la sensibilidad a ABA en la germinación (Bethke et al., 2006a), las semillas de los mutantes NO deficientes fueron más durmientes y mostraron una mayor sensibilidad al ABA en la inhibición de la germinación. Este efecto fue más severo en el caso de las semillas del mutante *nia1nia2noa1-2* que en sus genotipos parentales, sugiriendo que hay una correlación entre los niveles endógenos de NO y la sensibilidad a ABA. De acuerdo con esto, los mutantes deficientes en NO presentaron niveles elevados de genes de la respuesta a ABA, como *RAB18* y *RD29b*.

La alterada sensibilidad a ABA es probablemente la causa de la resistencia a la deshidratación que tienen las plantas deficientes en NO, en especial las plantas *nia1nia2noa1-2*. El ABA promueve el cierre de estomas y previene su apertura (Neill et al., 2008). El NO ha sido descrito como un componente de la ruta de señalización del ABA que regula el cierre estomático (Desikan et al., 2002; Guo et al., 2003; Garcia-Mata y Lamattina 2007). Debido a que las plantas deficientes en NO son resistentes a la sequía, la reducida pérdida de agua de los mutantes NO deficientes puede ser debida a una hipersensibilidad a ABA, dando lugar a una mayor inhibición de la apertura y un cierre más eficiente por ABA de los estomas. De hecho, hemos encontrado una hipersensibilidad del mutante *nia1nia2noa1-2* en el cierre de estomas estimulado por deshidratación o el tratamiento con ABA, así como en la inhibición por ABA de la apertura de estomas estimulada por la luz. Consecuentemente, las hojas de las plantas *nia1nia2noa1-2* muestran una menor conductancia estomática, una drástica reducción de la pérdida de agua por transpiración y la ausencia de una alteración significativa del potencial hídrico de las hojas tras un periodo de ausencia de riego. Estos datos sugieren que la regulación de la apertura estomática mediada por ABA no requiere necesariamente de la biosíntesis *de novo* de NO a través de las rutas NR/NIA o AtNOA1. Estos resultados contrastan con los de Desikan et al. (2002) que propone que la vía de síntesis dependiente de NR/NIA es esencial para el cierre estomático mediado por ABA. Sin embargo, tal y como describen en su trabajo, los autores no pudieron detectar un fenotipo de marchitamiento en el mutante *nia1nia2* tal y como sería de esperar de una planta que no puede cerrar los estomas en respuesta a ABA (Desikan et al., 2002). Este hecho sugiere que el ABA puede cerrar los estomas de manera independiente a NO. Esto, esta de acuerdo también con el mayor cierre estomático detectado en el doble mutante *nia1nia2* o en los mutantes sencillos *nia1* o *nia2* sometidos a deshidratación (Ribeiro et al., 2009). Además, la inhibición de la apertura de los estomas mediada por ABA no está afectada en el mutante *nia1nia2noa1-2* de acuerdo con los datos publicados para plantas *nia1nia2* (Desikan et al., 2002). Así, nuestros datos sugieren que los

mutantes deficientes en NO presentan un cierre estomático y una inhibición de la apertura más eficientes debido a su hipersensibilidad a ABA. Este proceso está mediado esencialmente por una ruta independiente de la biosíntesis *de novo* de NO, tal y como se demuestra por la ausencia de producción de NO en estomas de *nia1nia2noa1-2* que se cierran perfectamente en respuesta a ABA (Fig. 18,16).

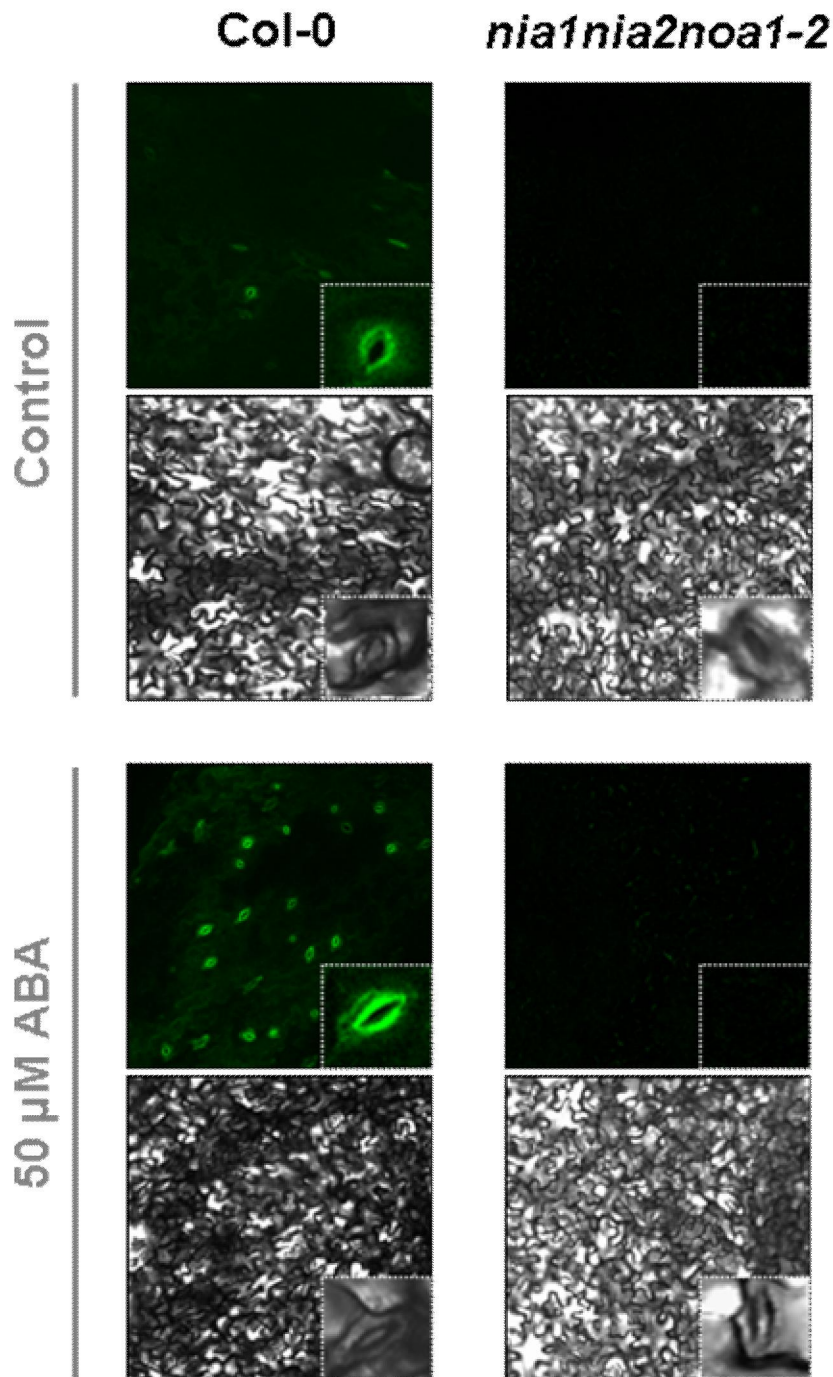


Figura 18. Acumulación de NO en células de guarda.

Se muestran imágenes de hojas tratadas o no con 50 μM ABA 30 min, teñidas con DAF-FM DA, obtenidas con el microscopio confocal. Las ampliaciones representan el mismo estoma bajo campo oscuro (arriba) o campo claro (abajo).

Además, hemos comprobado que la aplicación de un secuestrador de NO, como el cPTIO, previene la inhibición de la apertura de estomas que ejerce el ABA, aunque no totalmente, tal y como se había descrito previamente (García-Mata y Lamattina, 2007; Ribeiro et al., 2009), mientras que la ausencia constitutiva de NO, en las plantas *nia1nia2noa1-2* no lo previno. Por otro lado, aunque se ha descrito que cambios endógenos en los niveles de calcio juegan un papel importante en la inhibición de la apertura estomática por ABA (Roelfsema y Hedrich, 2005) y nuestros datos apoyan esto en plantas silvestres, hemos encontrado que este proceso es independiente de calcio en el mutante *nia1nia2noa1-2*. Así, parece que la reducida acumulación de NO en el triple mutante hace que los estomas no respondan al tratamiento con el quelante de calcio, BAPTA/AM (Fig. 16C). Entonces, se puede postular que el NO es necesario para la señalización de ABA dependiente de calcio, tal y como se ha descrito previamente (Li et al., 2009a; Dubovskaya et al., 2011). Sin embargo, mediante los experimentos realizados no podemos discriminar si el papel del NO tendría lugar por encima o por debajo de la liberación de calcio. De todas formas, el papel positivo del calcio en el cierre de estomas es difícilmente conciliable con el papel negativo del NO si estos dos segundos mensajeros operan en la misma ruta. Así, el fenotipo de insensibilidad al quelante de calcio en las plantas NO deficientes se puede explicar de una manera más sencilla a través de la hipersensibilidad a ABA de estas plantas. Además, esta hipersensibilidad, debe tener lugar mediante elementos de la señalización de ABA independientes de calcio, como pueden ser las quinasas independientes de calcio, cuyo ejemplo más claro es OST1 (Mustilli et al., 2002; Merlot et al., 2002). Si esta hipótesis es cierta, esperaríamos una mayor expresión/actividad de OST1 (u otras quinasas independientes de calcio), en el triple mutante que podría explicar su hipersensibilidad a ABA en el cierre estomático, y que ésta sea independiente de calcio.

Este trabajo, propone que las vías NR/NIA y AtNOA1 contribuyen mayoritariamente a la producción de NO tras la aplicación de ABA en *Arabidopsis*. Varios fenotipos relacionados con la respuesta a ABA encontrados en las plantas deficientes en NO indican un papel negativo del NO en la regulación de la sensibilidad a ABA. Así, en plantas silvestres, el ABA promueve la síntesis de NO a través de las rutas NR/NIA y AtNOA1, que modulará negativamente la respuesta a ABA, probablemente para evitar una respuesta exagerada que podría ser perjudicial para la planta (Fig. 19). En condiciones donde la producción de NO dependiente de ABA esta comprometida, las células vegetales no disponen de este freno a la respuesta a ABA, así que la respuesta es más fuerte, lo que correlacionaría muy bien con una potenciación de las respuestas mediadas por ABA en el triple mutante (Fig. 19). En el laboratorio estamos interesados en identificar las dianas moleculares responsables de esta mayor sensibilidad al ABA y, por ende, en la regulación cruzada ABA-NO en los procesos de germinación y cierre estomático. Si las dianas del NO son las

fosfatasa de tipo 2C o los propios receptores del ABA es una pregunta que requiere de más trabajo que se está realizando actualmente.

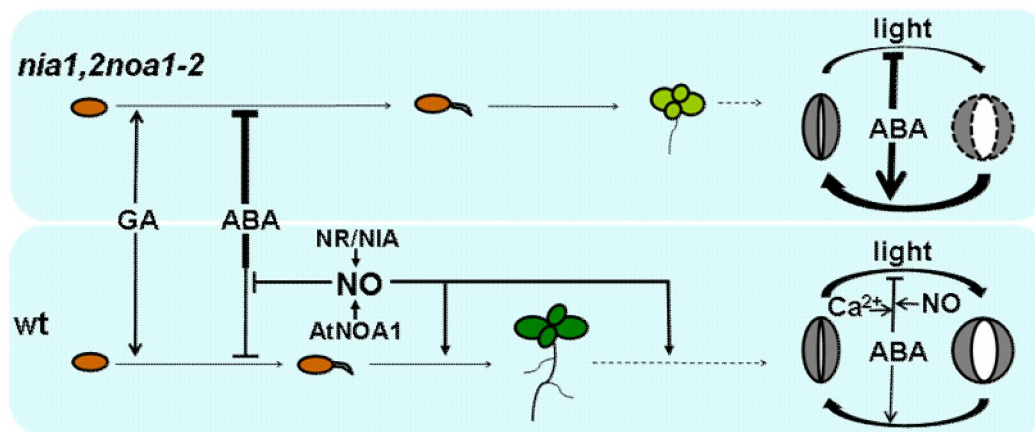


Figura 19. La deficiencia en NO resulta en una sensibilidad incrementada al ABA durante todo el desarrollo.

El NO producido por las vías dependientes de la NR/NIA y AtNOA1 regula la germinación, el desarrollo post-germinativo y el cierre de estomas a través de la modulación de la sensibilidad a ABA. Las flechas y las líneas romas indican efectos o positivos, respectivamente. El grosor de las líneas es proporcional a la magnitud del efecto regulatorio en cada caso.

**CAPÍTULO 3: INTERACCIÓN NO-GIBERELINAS EN EL
DESARROLLO REGULADO POR LUZ**

INTRODUCCIÓN

Uno de los primeros estímulos que debe interpretar una planta tras germinar es la presencia/ausencia de luz y su dirección para crecer hacia ella. Tras la germinación, las semillas, en condiciones naturales, se pueden encontrar con dos escenarios: el primero, donde la semilla después de la dispersión ha quedado enterrada bajo el suelo, y un segundo escenario, donde la semilla se encuentra en la superficie. En el primer caso, debido a la falta de luz, la semilla, una vez germinada, activa rápidamente la elongación y el crecimiento celular para alcanzar la superficie donde la fuente de luz activará su metabolismo autótrofo. Este tipo de crecimiento se estimula por la falta de luz y se caracteriza por una elongación muy rápida del hipocotilo, unos cotiledones cerrados y no expandidos, la presencia de una estructura en forma de gancho que protege el meristemo, la ausencia de clorofilas y la baja expresión de los genes de respuesta a luz (Alabadí et al., 2004). En el segundo caso, las plantas no necesitan acelerar la elongación de sus células en busca de la luz, así que utilizan su energía para expandir los cotiledones, acumular clorofilas y activar la expresión de genes que se regulan por luz, condiciones que le permiten consolidar el metabolismo autótrofo (Alabadí et al., 2004). Al desarrollo temprano que se da en ausencia de luz se lo conoce como escotomorfogénesis mientras que cuando el desarrollo tiene lugar en condiciones de iluminación el desarrollo es fotomorfogénico (Neff et al., 2000).

Las plantas requieren, por tanto, de una maquinaria que le permita discriminar entre la presencia o la ausencia de luz. Pero además, puesto que su supervivencia depende de la disponibilidad de luz, las plantas poseen un sistema de percepción de luz extremadamente sofisticado que les permite monitorizar continuamente las condiciones de luz haciendo pequeños ajustes fisiológicos y en el desarrollo para su propio beneficio (Mathews 2006). Este sistema de percepción de luz está formado por diferentes fotorreceptores que han evolucionado para detectar las longitudes de onda de la luz en los rangos del UV/azul (< 400nm) y del rojo/rojo lejano (> 700nm) (Jiao et al., 2007; Kami et al., 2010). Existen cuatro grupos de fotorreceptores: los tres clásicos, donde se incluyen los fitocromos, los criptocromos y las fototropinas y un “nuevo” conjunto de receptores de luz azul (Zeitlupes, ZTLs), que son proteínas F-Box que contienen un dominio LOV (del inglés, Light-Oxygen-Voltage), así como repeticiones tipo Kelch (Möglich et al., 2010). Por último, recientemente se ha descrito una proteína rica en residuos de triptófano, UVR8, que podría actuar como un receptor de luz UV-B (Rizzini et al., 2011). Se ha postulado que esta proteína funciona de manera diferente a los fotorreceptores descritos anteriormente, siendo los residuos de triptófano de esta proteína los que ayudan a la percepción de la luz UV-B (Rizzini et al., 2011).

Dentro de los grupos de fotorreceptores, los fitocromos, que perciben la luz en la longitud de onda del rojo y el rojo lejano, están codificados, en *Arabidopsis thaliana*, por cinco genes (desde *PHYA* hasta *PHYE*). Éstos, regulan aspectos como la germinación, la fotomorfogénesis, la huida

de la sombra, la floración y muchas otras respuestas adaptativas (Clack et al., 1994). Por otro lado, los criptocromos y las fototropinas, son receptores de luz azul. En *Arabidopsis thaliana* existen dos criptocromos convencionales CRY1 y CRY2 (Ahmad y Cashmore 1993; Lin et al., 1998) que regulan diferentes respuestas a la luz azul como la fotomorfogénesis y la floración, entre otras (Ahmad y Cashmore, 1993; Lin et al., 1998). Además, encontramos un tercer miembro de este grupo de fotorreceptores, CRY3, también llamado CRY-DASH (*Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis* y *Homo*), con función todavía desconocida (Brudler et al., 2003; Kleine et al., 2003) aunque recientemente se le han atribuido funciones de reparación del DNA debidas a la iluminación con luz UV/azul (Huang et al., 2006; Selby y Sancar 2006; Pokorny et al., 2008). Las fototropinas, codificadas en *Arabidopsis thaliana* por los genes *PHOT1* y *PHOT2*, son responsables del reconocimiento de la dirección de la luz azul (Christie et al., 1998; Jarillo et al., 2001b; Kagawa et al., 2004), y regulan principalmente los movimientos regulados por la luz como los fototropismos, el movimiento de los cloroplastos o la apertura de estomas, así como otras respuestas dependientes de la luz azul como la expansión de las hojas, la inhibición de la elongación del hipocotilo y la promoción del crecimiento bajo intensidades de luz débiles (Christie y Briggs 2001; Harberd 2006). Por último, existe una “nueva” familia de receptores de luz azul, denominados ZTLs, compuesta por tres miembros: ZTL1/ADO1/LKP1/FKL2 (del inglés ZEITLUPE1, ADAGIO1, LOV KELCH PROTEIN1 y FKF-LIKE 2) (Kiyosue y Wada 2000; Somers et al., 2000; Jarillo et al., 2001a), LKP2/ADO2 y FKF1/ADO3 (del inglés, FLAVIN-BINDING KELCH DOMAIN F-BOX PROTEIN 1/ADAGIO 3) (Nelson et al., 2000; Schultz et al., 2001). Estas tres proteínas contienen un sitio de unión a mononucleótido de flavina (FMN) necesario para la absorción de luz azul (Imaizumi et al., 2003). Las proteínas ZTLs regulan el reloj circadiano, la floración y la señalización por luz azul (Mas et al., 2000; Schultz et al., 2001; Kiba et al., 2007).

Estos son los cuatro grupos fundamentales que forman parte de la maquinaria de percepción de la luz en las plantas, si bien se han descrito receptores para la luz verde y para la UV-B (Folta y Maruhnich 2007; Jenkins 2009; Rizzini et al., 2011).

Una vez se ha percibido la luz (calidad, dirección e intensidad) su información se tiene que transformar en ajustes en el crecimiento y desarrollo de la planta. En este proceso juegan un papel crucial las proteínas que interaccionan con los fotorreceptores (Bae y Choi 2008). Tomando como ejemplo el de los fitocromos, las proteínas que interaccionan con los fitocromos se encargan de controlar la localización de estos fotorreceptores (Hiltbrunner et al., 2005; Hiltbrunner et al., 2006), su acumulación (Seo et al., 2004; Mira-Rodado et al., 2007; Chen et al., 2010a), y la transmisión de la información aportada por la luz (Kim et al., 2003; Saijo et al., 2003; Seo et al., 2003; Bauer et al., 2004; Park et al., 2004; Jang et al., 2005). De las más de 20 proteínas que interaccionan con los fitocromos (Bae y Choi., 2008), cabe destacar el grupo de proteínas conocidas como factores que interaccionan con los fitocromos (del inglés *Phytochrome-Interacting*

Factors, PIFs), que regulan multitud de respuestas dependientes de luz (Zhu et al., 2000; Shen et al., 2005; Oh et al., 2007), y COP1, un regulador clave de la fotomorfogénesis (Deng et al., 1991; Seo et al., 2003; Seo et al., 2004).

Las proteínas PIF (PIF1, PIF3, PIF4, PIF5, PIF6 y PIF7) forman parte de la familia de factores de transcripción bHLH (Heim et al., 2003; Toledo-Ortiz et al., 2003; Bae y Choi 2008) y se unen preferiblemente a cajas G (CACGTG) (Huq y Quail 2002), en los promotores de sus genes diana. Su función más estudiada es la inhibición de la fotomorfogénesis en oscuridad, siendo muy importantes en la promoción del crecimiento etiolado (Leivar y Quail 2011). Estos factores de transcripción no solo responden al estímulo lumínico, sino que también se regulan por el reloj circadiano (Yamashino et al., 2003; Kidokoro et al., 2009), teniendo también un papel importante en la respuesta adaptativa de las plantas frente a altas temperaturas (Koini et al., 2009; Stavang et al., 2009). Estas proteínas se regulan tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional, de manera que son rápidamente degradadas en presencia de luz por el sistema ubiquitina-proteasoma (Al-Sady et al., 2006; Shen et al., 2007; Lorrain et al., 2008), aunque, conviene resaltar, que sus niveles no se ven reducidos por completo sino que existe una regulación fina para mantener niveles muy reducidos pero detectables de estas proteínas (Leivar y Quail, 2011). Así, una vez que estas proteínas interactúan con el fitocromo en el núcleo, son fosforiladas por una quinasa todavía desconocida y marcadas con ubiquitina por una E3 ubiquitina ligasa también desconocida. Estas modificaciones promueven su posterior degradación por el proteasoma 26S, donde HEMERA, una proteína con homología a la proteína de unión a ubiquitina RAD23, juega un papel importante (Al-Sady et al., 2006; Shen et al., 2007; Lorrain et al., 2008, Chen et al., 2010). La interacción, fosforilación y degradación tiene lugar en unos complejos nucleares denominados “*speckles*”, en un tiempo medio de tan solo 15-20 minutos (Chen et al., 2010; Leivar y Quail, 2011). Además, los niveles de las proteínas PIF vuelven de nuevo a sus niveles máximos en oscuridad, lo que permite un control sobre sus genes diana en las transiciones diarias de oscuridad-luz (Nozue et al., 2007). El primer PIF identificado, PIF3, se identificó por su capacidad de interactuar con el fitocromo B (Ni et al., 1998). Se sabe que PIF3 interactúa con la forma foto-activada del fitocromo B mediante una secuencia conservada en los PIF denominada APB (del inglés, Active Phytochrome B Binding motif) aunque esta proteína, al igual que PIF1, puede interactuar también con la forma foto-activada del fitocromo A, mediante el motivo APA, lo que hace a estas dos proteínas diferentes del resto de PIFs (Khanna et al., 2004; Al-Sady et al., 2006). Para controlar la expresión de sus genes diana, los PIF pueden unirse a DNA tanto en forma de homo- como de hetero-dímeros (Castillon et al., 2007), siendo la formación de homodímeros la situación más generalizada (Castillon et al., 2007). Por otro lado, también pueden formar dímeros con otros factores de transcripción no pertenecientes al grupo de los PIF (Fairchild et al., 2000; Duek y Fankhauser 2003), e incluso con proteínas que no son factores de transcripción (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008; Gallego-Bartolome et al., 2010), lo que resulta, en ocasiones, en la

eliminación de su capacidad de activar/reprimir la transcripción (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008; Hornitschek et al., 2009). La pérdida de función de diferentes PIFs resulta en un menor crecimiento del hipocotilo en condiciones de iluminación con luz roja, lo que se pensó que estaba causado por una hipersensibilidad a luz roja de estos mutantes (Al-Sady et al., 2008; Leivar et al., 2008a). De acuerdo con esto, se ha comprobado que PIF3 y PIF4 controlan negativamente los niveles de acumulación de PHYB mediante el papel de COP1, que actúa como E3 ubiquitin ligasa, etiquetando la forma fotoactivada del fitocromo B con ubiquitina y favoreciendo su posterior degradación por el proteasoma (Leivar et al., 2008a; Jang et al., 2010). Sin embargo, el análisis de diferentes combinaciones de mutantes *pi1*, en especial, el cuádruple mutante *pi1pi3pi4pi5* (*pi1Q*), ha establecido que los fenotipos de los mutantes sencillos *pi1*, pueden ser explicados por el papel positivo que tienen los PIF sobre el desarrollo escotomorfogénico, más que por una hipersensibilidad a luz roja. Esto se pone claramente de manifiesto, con el fenotipo fotomorfogénico que presenta el mutante *pi1Q* en oscuridad (Leivar et al., 2008b; Leivar et al., 2009).

Cuando la información ha sido transducida por los fotorreceptores y transmitida por las proteínas que interaccionan con ellos, las plantas modulan su crecimiento de manera acorde a la información percibida. Para ello, se modula tanto la síntesis como la señalización de algunas fitohormonas (Nemhauser 2008; Alabadi y Blázquez 2009; Lau y Deng 2010). Parece que las giberelinas, los brasinoesteroides y las auxinas son las hormonas que tienen un papel más importante en el control del desarrollo por luz aunque también se ha descrito un papel de otras hormonas como el etileno, las citoquininas y el ABA (Nemhauser 2008; Alabadi y Blázquez, 2009; Lau y Deng, 2010). De forma general, las hormonas que promueven el crecimiento como las giberelinas, los brasinoesteroides y las auxinas reprimen la fotomorfogénesis (Nemhauser et al., 2003; Alabadi et al., 2004; Cluis et al., 2004; Woodward y Bartel 2005; Achard et al., 2007; Lee et al., 2007). En relación con el control hormonal de la fotomorfogénesis, el papel de las giberelinas ha sido uno de los más estudiados y, recientemente, se ha descrito un modelo para la interacción entre las giberelinas y la luz en la regulación del desarrollo temprano de *Arabidopsis thaliana* (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008).

Las giberelinas (GAs) son un conjunto de diterpenos tetracíclicos que se sintetizan por una compleja red de transformaciones químicas que tienen lugar entre los plastos, el retículo endoplasmático y el citosol (Buchanan et al., 2000), y constituyen una de las cinco hormonas clásicas (auxinas, citoquininas, etileno, ABA y GAs) (Buchanan et al., 2000). Las GAs controlan multitud de aspectos que influyen tanto en el crecimiento y el desarrollo como en la adaptación y la supervivencia a factores de estrés de tipo biótico y abiótico (Richards et al., 2001; Sun y Gubler 2004; Achard et al., 2006; Achard et al., 2008a; Achard et al., 2008b; Alabadi et al., 2008; de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008; Navarro et al., 2008). De las más de 100 giberelinas identificadas, solo GA₁ y GA₄ son las principales giberelinas activas (Schomburg et al., 2003), por

lo que es necesaria una regulación muy fina para determinar los niveles de GAs activas en el momento y la localización precisa. Los puntos clave de su ruta de biosíntesis son los catalizados por las Giberelina-20-oxidases (GA20ox) y las GA3ox (Chiang et al., 1995; Phillips et al., 1995), mientras que la desactivación de las mismas se produce principalmente por las GA2ox (Thomas et al., 1999; Schomburg et al., 2003; Rieu et al., 2008). En los últimos años, se han descrito dos nuevos mecanismos para la desactivación de las GAs activas mediante epoxidación (Zhu et al., 2006) o metilación (Varbanova et al., 2007). Los niveles de GAs activas se controlan por retroregulación de los genes de los últimos pasos de su síntesis o de su inactivación, de manera que mutantes deficientes en la síntesis o señalización de GAs tienen niveles elevados de los genes de su síntesis (GA20ox y GA3ox) y bajos de los de su inactivación (GA2ox), y viceversa (Yamaguchi 2008).

La señal comunicada por las GAs se percibe en la célula mediante la unión a su receptor soluble, GID1, descrito inicialmente en arroz, donde hay una única isoforma (Ueguchi-Tanaka et al., 2005) y, posteriormente, en *Arabidopsis thaliana*, donde hay tres isoformas diferentes, GID1a/GID1b/GID1c, con funciones tanto solapantes como independientes (Griffiths et al., 2006; Nakajima et al., 2006; Suzuki et al., 2009). Una vez que se ha establecido la unión GA-GID1, se reclutan a este complejo otros miembros de función muy relevante en la ruta de señalización de GAs, como son las proteínas DELLA (Griffiths et al., 2006; Willige et al., 2007). Una vez formado el complejo GA-GID1-DELLA, se facilita la unión de la F-Box SLY1, que forma parte del complejo SCF E3 ubiquitina-ligasa SCF^{SLY1/GID2} (Sasaki et al., 2003; Griffiths et al., 2006; Willige et al., 2007). Ésta, promueve la ubiquitinación y posterior degradación de las proteínas DELLA por la vía dependiente del proteasoma 26S (Sasaki et al., 2003; Harberd 2003; Dill et al., 2004; Fu et al., 2004). Este proceso permite la liberación de la represión que ejercen las proteínas DELLA en el crecimiento (Harberd 2003), permitiendo así la respuesta a GAs.

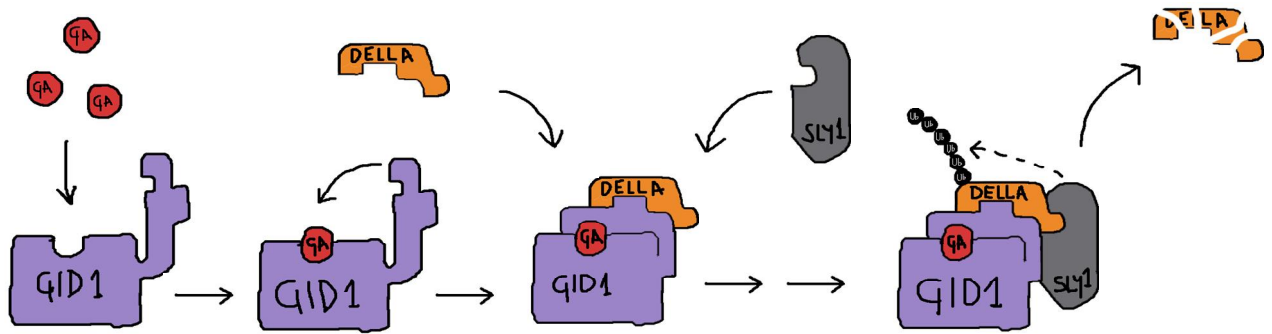
Sin embargo, existe también una ruta de señalización de GAs independiente de la degradación de las proteínas DELLA, ya que el mutante *sly1* puede germinar en presencia de una alta acumulación de la proteína RGL2, la proteína DELLA responsable de la inhibición de la germinación (Ariizumi y Steber 2007). Además, la expresión ectópica de GID1 puede complementar el fenotipo de *sly1 gid2* sin la necesidad de la degradación de proteínas DELLA (Ariizumi et al., 2008). Estos resultados indican una ruta alternativa en la promoción del crecimiento y desarrollo dirigido por GAs sin la necesidad de la degradación de las proteínas DELLA por SLY1/GID2, seguramente mediante el secuestro de las proteínas DELLA a través de su interacción con el receptor GID1.

Las proteínas DELLA son pues componentes principales de la vía de señalización de GAs (Silverstone et al., 1998; Richards et al., 2001). Mientras que en arroz solo se ha encontrado una proteína DELLA, Slender Rice 1 (SLR1) (Ikeda et al., 2001), en *Arabidopsis thaliana*, las proteínas DELLA están formadas por cinco miembros, todos pertenecientes a la familia de

proteínas GRAS (Peng et al., 1997; Silverstone et al., 1998; Lee et al., 2002). Son GAI (del inglés, GA-insensitive), RGA (del inglés, repressor of *gal-3*, RGL1, RGL2 y RGL3 (del inglés, RGA-Like 1, 2, 3), que realizan la misma función en diferentes procesos del crecimiento y desarrollo debido a la modulación de su perfil de expresión gobernado por sus promotores más que por su función molecular (Gallego-Bartolomé et al., 2010). Estas proteínas son unos fuertes represores del crecimiento y desarrollo (Harberd, 2003) que pueden ser utilizadas por las plantas para sobrevivir a factores de estrés de tipo biótico y abiótico (Achard et al., 2006; Achard et al., 2008a; Achard et al., 2008b; Navarro et al., 2008). Dentro de la familia GRAS, estas proteínas se diferencian del resto por que poseen, en su extremo N-terminal, un dominio DELLA, acrónimo de los primeros 5 aminoácidos que forman parte de este dominio, que les permite interactuar con el receptor GID1 (Ueguchi-Tanaka et al., 2007; Willige et al., 2007; Murase et al., 2008). Las versiones de estas proteínas donde el dominio DELLA es eliminado, son incapaces de interactuar con el receptor GID1 y no son degradadas por la ruta ubiquitina-proteasoma (Willige et al., 2007). Se ha descrito recientemente que un dominio próximo, VHYNP, parece tener también un papel importante en este proceso (Liu et al., 2010).

En los últimos años, se ha descrito el papel central que ejercen las proteínas DELLA en la señalización de la regulación del desarrollo por luz, clarificando la función de las GAs en la represión de la fotomorfogénesis. La modulación de los niveles de GAs, y como consecuencia, de la acumulación de las proteínas DELLA, puede alterar la respuesta fotomorfogénica tanto a nivel fenotípico como a nivel molecular (Alabadí et al., 2004; Achard et al., 2007). Al minimizar la síntesis de GAs mediante diferentes estrategias, como la aplicación de un inhibidor de la síntesis de GAs como el Paclobutrazol (PAC), o el uso de mutantes en su biosíntesis como *gal-3*, se produce una acumulación de proteínas DELLA que provoca una respuesta fotomorfogénica en oscuridad (Alabadí et al., 2004; Achard et al., 2007). Además, eliminando las proteínas DELLA en un fondo donde no se sintetizan GAs (*gal-3 cuádruple DELLA*) este efecto se revierte totalmente (Achard et al., 2007). Este modelo, se ha completado recientemente, con el descubrimiento de la interacción física entre algunas proteínas DELLA y algunos miembros de la familia de las proteínas PIF (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008) u otros factores de transcripción de la familia bHLH (Gallego-Bartolomé et al., 2010), demostrando que las GAs actúan de una forma coordinada con la luz. Bajo condiciones de iluminación, la síntesis de GAs es baja, lo que conlleva altos niveles de proteínas DELLA que interactúan con PIF3 y PIF4 impidiendo su unión a los promotores de sus genes diana, y, por tanto, reprimiendo la escotomorfogénesis y promoviendo la fotomorfogénesis (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008). Al contrario, la síntesis de GAs aumenta en condiciones de oscuridad, lo que conlleva la degradación por el proteasoma de las proteínas DELLA, el consiguiente aumento de PIF3 y PIF4 libres y su unión a los promotores de sus genes diana activando el crecimiento típico de la escotomorfogénesis (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008).

A



B

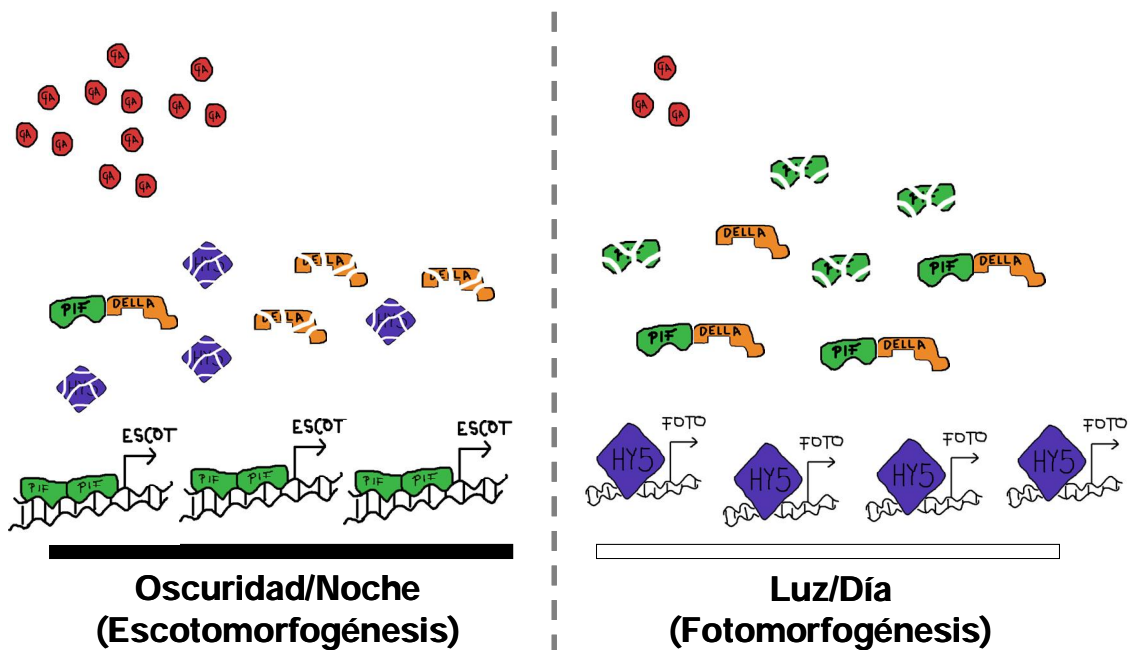


Figura 20. Esquema representando la percepción de las giberelinas por su receptor y su interacción con otros componentes en la regulación del proceso de des-etiolación.

A. Las giberelinas (GA) se unen a su receptor GID1 provocando un cambio conformacional de la proteína que, por un lado atrapa a la molécula de GA dentro del receptor, y por otro, forma una nueva superficie de contacto para la interacción con los represores de la señalización de GAs, las proteínas DELLA. Una vez formado este complejo GA-GID1-DELLA, la conformación de la proteína facilita la interacción con la E3 ubiquitin ligasa SLY1. SLY1, que forma parte de un complejo SCF^{SLY1}, ubiquitina (Ub) a la proteína DELLA, lo que provoca su posterior degradación por el proteasoma, liberando su efecto negativo sobre la señalización de GAs y permitiendo una correcta transducción de la señal. B. En situaciones de oscuridad existe una elevada cantidad de GAs que promueven la degradación de las DELLA. Los PIF, estables en oscuridad, se encontrarán en forma libre y serán capaces de dimerizar y activar la escotomorfogénesis (ESCOT). El factor de transcripción HY5 se degrada en oscuridad a través de COP1 (no representado). Cuando las plantas pasan a condiciones de iluminación, los niveles de GAs caen drásticamente, se acumulan las DELLA y secuestran a los PIF que hayan evitado su degradación por luz. Así mismo, puesto que COP1 se degrada en luz, existirá un conjunto de proteínas HY5 que activaran sus genes diana promoviendo así la fotomorfogénesis (FOTO).

Además, los factores de transcripción PIFs no son los únicos que regulan este proceso, ni las únicas dianas de la señalización por GAs. Se ha descrito que las GAs modulan negativamente la acumulación de la proteína HY5, un factor de transcripción clave para la promoción de la fotomorfogénesis. Aunque este fenómeno no está todavía definido por completo a nivel molecular, COP1, la proteína encargada de degradar HY5, podría ser el punto de regulación modulado por las GAs (Alabadí et al., 2008), si bien, no se tiene todavía una evidencia clara de la acumulación de esta proteína en un fondo deficiente en la síntesis de GAs o en mutantes de su señalización.

Además de las hormonas, existen otras moléculas como el NO que parecen cumplir una función señalizadora en la regulación del desarrollo por luz. En trabajos iniciales, se describió que la aplicación del donador de NO, nitroprusiato sódico (SNP), promueve la activación de genes de respuesta a luz (Bowler et al., 1994b; Bowler et al., 1994a) a través de la producción de cGMP, un segundo mensajero del NO, que junto al calcio/calmodulina, es indispensable para la señalización por luz dependiente de fitocromos (Bowler et al., 1994a; Bowler et al., 1994b; Neuhaus et al., 1997). El NO podría ser, por tanto, una de las moléculas que descifre la información de la luz después de ser percibida por los fitocromos. De acuerdo con esto, se describió que el NO inhibe la elongación de los hipocotilos crecidos en oscuridad y promueve la fotomorfogénesis en plántulas de girasol y de *Arabidopsis thaliana* (Beligni y Lamattina 2000). El NO es capaz también de activar genes regulados por luz y de incrementar el contenido en clorofilas (Beligni y Lamattina, 2000).

De acuerdo con estos datos, el NO tendría un papel opuesto al de las GAs en la regulación del desarrollo por luz. Esta interacción antagonista entre las GAs y el NO ha sido descrita en otros procesos como la muerte celular programada de la capa de aleurona de semillas de cereales o la transición a la floración (Beligni et al., 2002; He et al., 2004). Sin embargo, también han sido descritas sinergias GAs-NO en otros procesos como la germinación (Bethke et al., 2007; Finch-Savage et al., 2007). El papel del NO en la respuesta a luz, al igual que las GAs, puede estar relacionado con la elongación celular. Las GAs promueven el crecimiento regulando la elongación celular (Nitsan y Lang 1966; Loy y Liu 1974; Cowling et al., 1998) a través de la degradación de las proteínas DELLA. Además, la endodermis parece ser el tejido responsable de la regulación del crecimiento de la raíz por GAs (Ubeda-Tomas et al., 2008), si bien se ha descrito también el control de la división celular regulado por GAs en el meristemo de la raíz (Achard et al., 2009; Ubeda-Tomas et al., 2009). En este tejido, las DELLA promueven una expresión elevada de proteínas que bloquean el ciclo celular reprimiendo la división, que se restaura en presencia de GAs (Achard et al., 2009; Ubeda-Tomas et al., 2009). En la parte aérea, las GAs también regulan la elongación celular a través de los PIFs aunque se desconoce el tipo celular implicado y las dianas de su acción (de Lucas et al., 2008). Entre las posibles dianas, los genes que codifican proteínas para la maquinaria de reciclaje de la pared celular así como proteínas de transferencia de lípidos que ayudan con la remodelación de la membrana plasmática, parecen ser necesarios para la

elongación celular (de Lucas et al., 2008). En cuanto al NO, también parece tener un papel en la elongación celular, actuando de manera negativa en la elongación del tubo polínico y las células del mesocotilo en monocotiledóneas (Zhang et al., 2003; Prado et al., 2004; Reichler et al., 2009). De todas formas, el papel del NO en la elongación parece ser algo más complejo ya que también se ha descrito un papel positivo sobre la elongación/crecimiento de los pelos radiculares (Lombardo et al., 2006). En modelos animales, se cree que el NO afecta negativamente a la elongación celular (Trimm y Rehder 2004; Yamada et al., 2006; Tornieri y Rehder 2007). Por otro lado, también se tienen evidencias de la participación del NO en procesos de división celular, controlando el ciclo celular (Otvos et al., 2005; Correa-Aragunde et al., 2006), lo que podría eventualmente afectar a procesos de elongación/crecimiento celular mediante mecanismos de compensación (Horiguchi et al., 2006; Shin et al., 2007).

En este trabajo tratamos de averiguar el papel del NO en la regulación del desarrollo por luz así como su interacción con la señalización de GAs. También estamos interesados en saber si PIFs y DELLAs son elementos comunes en la señalización de estas dos moléculas regulando la fotomorfogénesis y la elongación celular reprimida por la luz.

RESULTADOS

El mutante deficiente en NO, *nia1,2noa1-2* presenta hipocotilos largos en luz

A pesar del retraso general en el crecimiento detectado en el triple mutante *nia1,2noa1-2* (ver capítulos anteriores), observamos que sus hipocotilos crecen más alargados que los de plántulas silvestres en luz blanca bajo condiciones fotoperiódicas de días largos. Así, cinco días después de la germinación, los hipocotilos del triple mutante midieron el doble que los de las plántulas silvestres (Fig. 21A). Este mayor crecimiento, no fue el resultado de un efecto general de la deficiencia en NO sobre el crecimiento del hipocotilo ya que los hipocotilos de las plántulas del triple mutante y de individuos silvestres presentaron la misma elongación en condiciones de oscuridad (Fig. 21A). Además, este efecto sobre el crecimiento parecía específico del hipocotilo ya que las raíces del mutante presentaron un comportamiento opuesto. El triple mutante presentó una raíz mucho menor que la de plantas silvestres en condiciones de iluminación pero no en condiciones de oscuridad (Fig. 21B). El fenotipo diferencial, tanto en hipocotilos como en raíces, en condiciones de luz pero no en oscuridad sugería que el NO podría regular procesos de desarrollo en conexión con la luz. Además, el mutante *nia1,2noa1-2* es totalmente capaz de reprimir la fotomorfogénesis en condiciones de oscuridad, indicando que el NO no es esencial para la regulación del desarrollo escotomorfogénico. Sin embargo, el triple mutante presenta alteraciones tanto en la elongación del hipocotilo como en la de la raíz en presencia de luz, apuntando a un requerimiento del NO en la activación del programa de fotomorfogénesis. Centrándonos en el fenotipo de elongación del hipocotilo, comprobamos primero si la deficiencia en la respuesta fotomorfogénica del mutante afectado en la síntesis de NO era general en todas las calidades de luz, o específica de alguna de ellas. Para ello, medimos el crecimiento del hipocotilo, en todos los mutantes deficientes en la biosíntesis de NO en condiciones de luz azul, roja lejana y roja cinco días tras la germinación. Las luces azul y roja lejana reducen la elongación del hipocotilo de la misma forma en mutantes NO-deficientes que en plántulas silvestres (Fig. 21C). Sin embargo, bajo condiciones de luz roja, los mutantes deficientes en NO presentaron hipocotilos más alargados que los de las plántulas silvestres, siendo el efecto ligero en el mutante *nia1,2*, más acentuado en *noa1-2* y aditivo en el caso de *nia1,2noa1-2* (Fig. 21C). Además, el efecto fue dependiente del tiempo y también de la intensidad de la luz aplicada (Fig. 22).

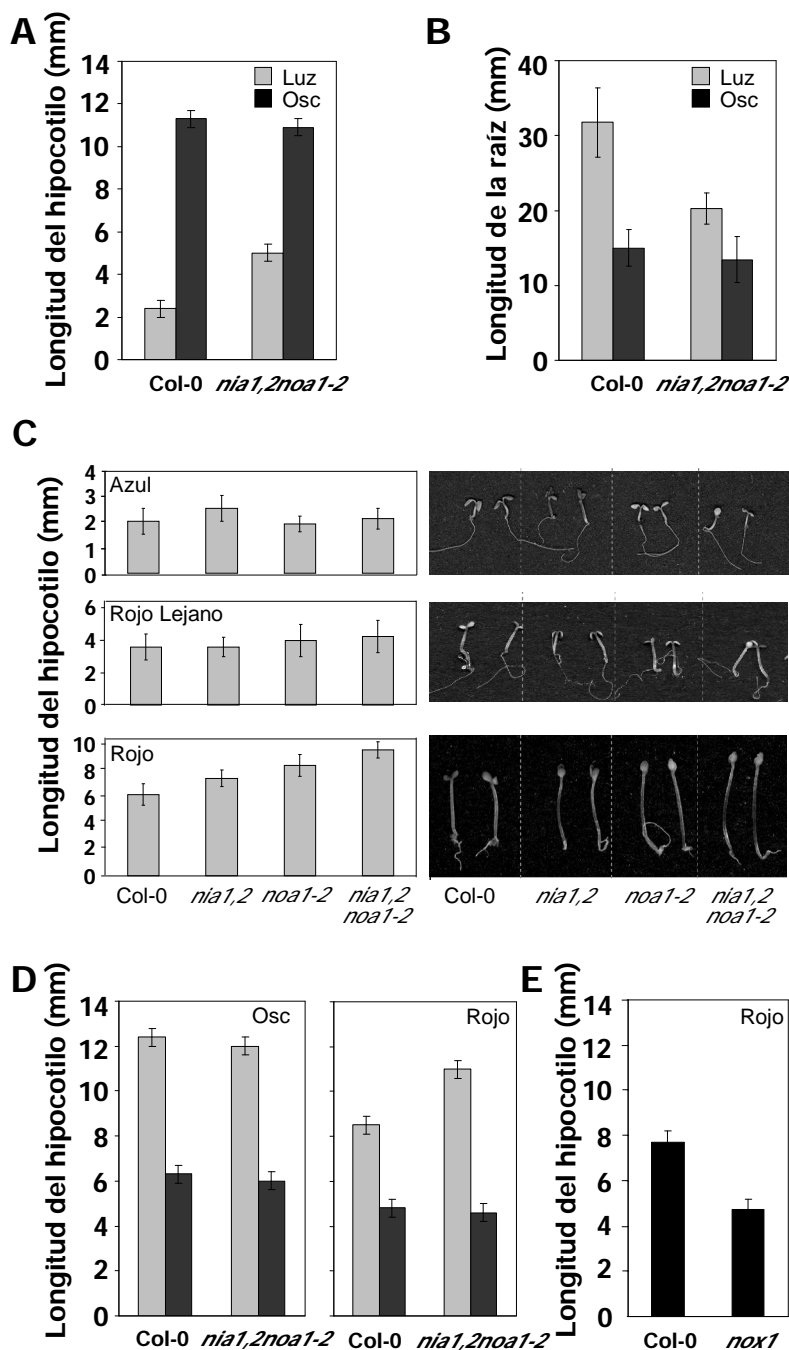


Figura 21. Longitud del hipocotilo y la raíz en plantas deficientes en NO bajo diferentes condiciones.

A. Longitud del hipocotilo (A) y la raíz (B) de plantas silvestres y deficientes en NO bajo luz blanca (gris claro) o en oscuridad (gris oscuro). Las longitudes del hipocotilo y de la raíz se midieron 5 y 10 días tras la germinación, respectivamente. C. Longitud del hipocotilo de plántulas de 5 días crecidas en luz azul ($16,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), rojo lejano ($5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) o rojo ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A la derecha se muestran individuos representativos de las plántulas que se utilizaron para hacer las medidas. D. Longitud del hipocotilo en plantas tratadas ($250 \mu\text{M}$ SNP, gris oscuro) o no tratadas (gris claro) con el donador de NO SNP, en condiciones de oscuridad o luz roja. E. Tamaño del hipocotilo de plántulas Col-0 y *nox1* crecidas en luz roja durante 5 días. Los valores representan las medias \pm error estándar de tres experimentos independientes, midiendo al menos 20 plántulas en cada experimento.

Mientras que las plántulas silvestres empezaron a detener su crecimiento tras cinco días en luz roja, el triple mutante continuó creciendo a su tasa máxima (Fig. 22). De la misma forma, bajo una intensidad de $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, las plántulas silvestres inhibieron su crecimiento un 40%,

mientras que esta inhibición fue de un 25% a un 5% en plántulas de *nia1,2*, *noa1-2* o *nia1,2noa1-2*, respectivamente (Fig. 22). De acuerdo con estos datos y tal y como ha sido descrito previamente, el tratamiento con el donador de NO resultó en la inhibición de le elongación del hipocotilo, complementando totalmente el fenotipo de hipocotilos elongados del triple mutante (Fig. 21D; Beligni y Lamattina, 2000). Además, el mutante *nox1* que acumula un mayor contenido endógeno de NO (He et al., 2004), presentó una reducción del tamaño del hipocotilo en condiciones de luz roja (Fig. 21E). Estos datos indican inequívocamente que el NO regula el tamaño del hipocotilo (Fig. 21) y además, validan la utilización de SNP como donador de NO en este proceso, ya que tiene un efecto muy similar al de la producción endógena de NO (Fig. 21).

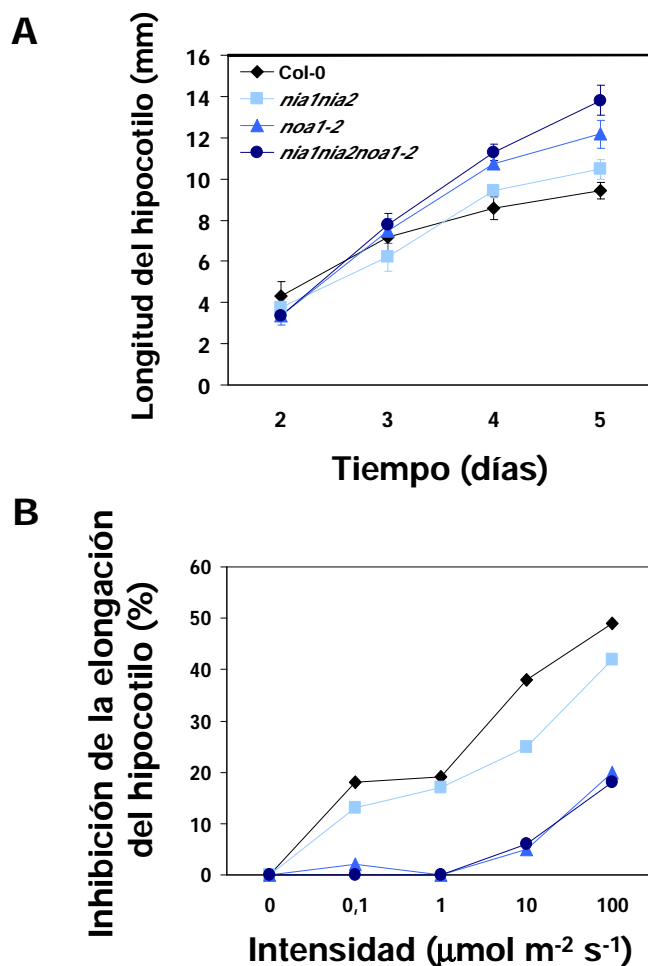


Figura 22. Longitud del hipocotilo en función del tiempo y de la intensidad de luz en los diferentes mutantes deficientes en NO.

A. El tamaño del hipocotilo fue medido a los tiempos indicados de crecimiento en luz roja. B. Inhibición de la elongación de los hipocotilos a las diferentes intensidades de iluminación indicadas y a los cinco días después de la germinación. Los valores representan media \pm error estándar.

El NO reduce la expresión de los genes *PIFs* y provoca la acumulación de las proteínas DELLA para regular el tamaño del hipocotilo

La reducida inhibición de la elongación del hipocotilo que encontramos en los mutantes deficientes en NO únicamente bajo condiciones de iluminación con luz roja sugiere que la percepción o la señalización de la luz roja están afectadas en dichos mutantes. Ya que la luz roja se percibe, principalmente, mediante el Fitocromo B (PHYB) (Bae y Choi, 2008), estudiamos si la deficiencia en NO impide la correcta acumulación de esta proteína. Mediante anticuerpos específicos contra PHYB, comprobamos que el mutante *nia1,2noa1-2* acumula niveles normales de PHYB bajo condiciones de oscuridad, condiciones donde los niveles de acumulación de dicha proteína son máximos (Fig. 23;(Leivar et al., 2008a). Sin embargo, bajo condiciones de iluminación con luz roja, el triple mutante presentó niveles reducidos de PHYB (Fig. 23). Además, los hipocotilos del mutante *phyB* respondieron igual que los hipocotilos silvestres, al tratamiento con SNP, tanto en condiciones de oscuridad como de luz roja (Fig. 23C). Parece entonces que es la señalización dependiente de PHYB la que está alterada en el triple mutante, ya que de no ser así cabría esperar un defecto en todas las respuestas dependientes de PHYB en el mutante *nia1,2noa1-2*. Ambos mutantes, *nia1,2noa1-2* y *phyB*, comparten algunos fenotipos como hipocotilos alargados bajo luz roja, hojas con un menor contenido en clorofilas, bajas tasas de transpiración, mayor acumulación de antocianinas y una ramificación reducida (Tabla 3 y sus referencias). Sin embargo, la mayor elongación de los peciolo, de los pelos radiculares y del tallo así como el fenotipo de floración temprana en condiciones fotoperiódicas de días cortos, características del mutante *phyB*, no se observaron en el mutante *nia1,2noa1-2* (Tabla 3). El hecho de que no se observen todos los fenotipos del mutante *phyB* en el mutante *nia1,2noa1-2* y que el mutante *phyB* responda a la inhibición de la elongación del hipocotilo por NO, sugiere que los mutantes deficientes en NO están afectados en la señalización por debajo de PHYB más que en la función de PHYB en la percepción de la luz roja.

Ya que las plántulas *nia1,2noa1-2* acumularon tres veces más antocianinas que las plántulas silvestres en luz (Fig. 24C) y dado que muchos de los genes que codifican los enzimas de la síntesis de antocianinas y flavonoides son dianas de PIF3 (Shin et al., 2007), el NO podría interferir con la señalización dependiente de PHYB a través de PIF3. Además, se ha descrito que PIF3 y PIF4, regulan negativamente la acumulación de PHYB en condiciones de luz roja (Al-Sady et al., 2008; Leivar et al., 2008a), lo que esta de acuerdo con los niveles reducidos de PHYB que encontramos en el triple mutante en luz roja. (Fig. 23).

Tabla III. Análisis comparativo de los fenotipos de los mutantes *phyB* y *nia1,2noa1-2*.

Los fenotipos analizados en las referencias citadas fueron comparados con los encontrados en el mutante *nia1,2noa1-2* (ver capítulos anteriores).

Caracter	<i>phyB</i>	<i>nia1,2noa1-2</i>	Referencia
Hipocotilos elongados	Si	Si	Reed et al., 1993
Peciolos largos	Si	Si	Reed et al., 1993
Menos clorofilas	Si	Si	Reed et al., 1993
Tallos alargados	Si	No	Reed et al., 1993
Raíz reducida	Si	Si	Correll and Kiss, 2005
Pelos radiculares alargados	Si	No	Reed et al., 1993
Floración temprana	Si	No	Reed et al., 1993; Guo et al., 1998
Transpiración reducida	Si	Si	Boccalandro et al., 2009
Ramificación reducida	Si	Si	Reed et al., 1993
Germinación reducida	Si	Si	Shinomura et al., 1994

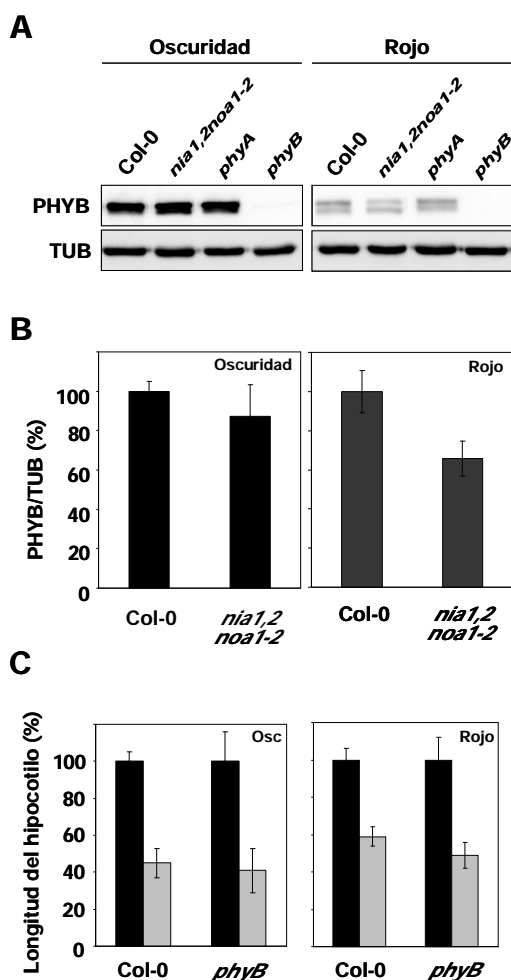


Figura 23. Niveles de la proteína PHYB en diferentes mutantes y comportamiento del mutante *phyB* en respuesta al NO.

A. Western-blot con anticuerpos anti-PHYB de muestras de los distintos genotipos mantenidos durante 3 días en oscuridad o en luz roja ($7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Se muestra la hibridación con el anticuerpo anti-Tubulina como control de carga. B. Cuantificación de la acumulación de PHYB normalizada a la cantidad de Tubulina y expresada como los niveles relativos a los de Col-0. Los valores son la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar. C. Tamaño relativo del hipocotilo de plántulas Col-0 y *phyB* tratadas (gris) o no (negro) con $250 \mu\text{M}$ SNP bajo condiciones de oscuridad o luz roja. Los valores representan las medias \pm error estándar de tres experimentos independientes, midiendo al menos 20 plántulas en cada experimento. Los asteriscos representan una diferencia significativa (p-valor $< 0,05$ por test-t).

Apoyando esta hipótesis, hemos encontrado que el triple mutante presenta niveles de transcrito *PIF3* más elevados que los detectados en plántulas silvestres, y esta mayor expresión se detectó también para otros bHLH del grupo de los PIFs como *PIF1* y *PIF4* (Fig. 24A). Consecuentemente, los niveles de expresión de estos genes *PIFs* se vieron significativamente reducidos tras la aplicación de SNP (Fig. 24A). Además, como se podría esperar de plántulas con una función incrementada de estos *PIFs* (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008), las plántulas *nia1,2noa1-2* tienen una respuesta alterada tanto a GA₃ como al inhibidor de la biosíntesis de GAs, Paclobutrazol (PAC) (Fig. 24B,D). Tanto plántulas silvestres como *nia1,2noa1-2* reducen el tamaño de sus hipocotilos tras la aplicación de PAC, pero el triple mutante presentó una clara hiposensibilidad a PAC en todas las concentraciones estudiadas (Fig. 24B). También se observó una alteración en la sensibilidad a GAs en el triple mutante. Mientras que los hipocotilos de plántulas *nia1,2noa1-2* alcanzaron su tamaño máximo con una aplicación de 1 μM GA₃, las plántulas silvestres necesitaron de una aplicación de 5 μM GA₃ para alcanzar el mismo tamaño (Fig. 24D). Por otro lado, los hipocotilos de plántulas que sobreexpresan PIF3 (*PIF3OX*) son ligeramente más sensibles a la inhibición del tamaño del hipocotilo por NO (Fig. 24E,F). En contraposición, un cuádruple mutante *pi1pi3pi4pi5* (*pi1Q*) fue casi totalmente insensible a la inhibición de la elongación del hipocotilo provocada por el NO (Fig. 24E,F). Todos estos datos sugieren que existe una función incrementada de las proteínas PIF en el mutante deficiente en NO y además, que los PIF son dianas del NO en la regulación del tamaño del hipocotilo.

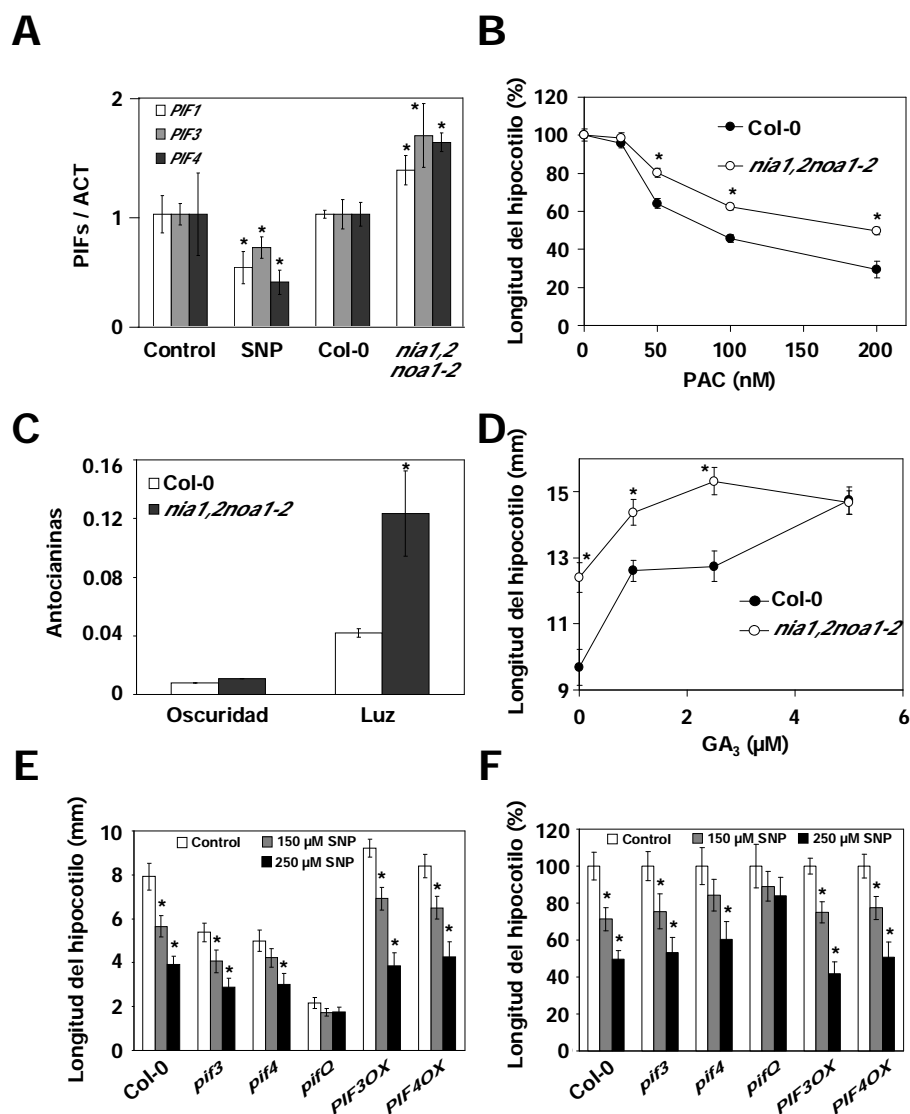


Figura 24. Conexión funcional entre el NO, las giberelinas y los PIF.

A. Niveles de expresión de *PIF1*, *PIF3* y *PIF4* en hipocotilos de plántulas no tratadas (Control) o tratadas (SNP) con 1mM SNP durante 2 horas, así como en plántulas Col-0 o *nia1,2noa1-2* no tratadas. B. Longitud del hipocotilo de los genotipos indicados (media ± error estándar) en plántulas cultivadas bajo las concentraciones indicadas de PAC. C. Niveles de antocianinas en Col-0 y *nia1,2noa1-2* en oscuridad o luz blanca expresados como unidades arbitrarias de absorbancia a 530 nm. D. Tamaño de los hipocotilos de plántulas de Col-0 y *nia1,2noa1-2* (media ± error estándar) tratadas con las concentraciones de GA₃ indicadas. E y F, Tamaño total y relativo, respectivamente, de los hipocotilos de plántulas de los diferentes genotipos tratadas o no con SNP. Todos los experimentos se realizaron bajo luz roja excepto cuando se indica lo contrario. Los valores son medias de tres experimentos independientes ± error estándar. Los asteriscos representan diferencias significativas con p-valor < 0,05 cuando se comparan con el control o con el genotipo silvestre.

La actividad de las proteínas PIF en la regulación del tamaño del hipocotilo es controlada por su asociación con las proteínas DELLA (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008), cuyos niveles son regulados a través de su degradación proteolítica mediada por las GAs (Dill et al., 2004; Achard et al., 2007; (Harberd et al., 2009). La sensibilidad alterada a GAs y PAC del triple mutante así como la función incrementada de los PIF que encontramos en el mutante, pueden ser

explicadas también por niveles reducidos de las proteínas DELLA en los mutantes deficientes en NO. Para comprobar el posible papel regulador del NO en la acumulación de las DELLA, plantas transgénicas que expresan una versión de la proteína DELLA, RGA, fusionada traduccionalmente a GFP, bajo el control de su propio promotor (*pRGA::GFP-RGA*) fueron tratadas con SNP. De acuerdo con la degradación de las DELLA mediada por GAs (Dill et al., 2004; Achard y Genschik 2009), la fluorescencia asociada a GFP-RGA desapareció tanto en raíces como en hipocotilos de plántulas tratadas con GA₃ (Fig. 25A,B). Al contrario, plántulas tratadas con SNP exhibieron un incremento significativo en los niveles de fluorescencia asociada a GFP-RGA en los núcleos (Fig. 25A). El incremento en GFP-RGA tras el tratamiento con SNP, se comprobó también por Western-blot de plántulas enteras mediante anticuerpos contra GFP (Fig. 25A). Además, para comprobar si los niveles endógenos de NO pueden controlar la acumulación de la proteína RGA, se introgresó la línea *pRGA::GFP-RGA* en el fondo *nia1,2noa1-2*. En la figura 25B se muestra la dinámica de la acumulación de la proteína GFP-RGA en diferentes fondos genéticos, tras pasar plántulas de oscuridad a luz. La fluorescencia GFP-RGA se detectó dos horas después de pasar las plántulas *pRGA::GFP-RGA* en el fondo silvestre a luz (Fig 25B). Sin embargo, no se detectó dicha acumulación en las plántulas en fondo deficiente en NO (Fig. 25B). Cuatro horas tras pasar las plántulas a luz, la proteína GFP-RGA empezó a acumularse en el fondo *nia1,2noa1-2*, siendo sus niveles significativamente menores que los que se acumularon en plántulas transgénicas del fondo silvestre (Fig. 25B). Estos datos sugieren que el NO es necesario para la correcta acumulación de la proteína RGA en respuesta al estímulo lumínico, y que las plantas deficientes en NO contienen niveles reducidos de RGA en determinadas situaciones, como son las transiciones diarias oscuridad-luz. En contraposición, las plántulas *pRGA::GFP-RGA* en el fondo *ga1-3* (Stavang et al., 2009), acumularon niveles máximos de GFP-RGA incluso en oscuridad (Fig. 25B) debido a la ausencia de giberelinas de este mutante (Achard et al., 2007).

Por otra parte, hemos comprobado que este efecto no es específico de RGA sino que es similar en el resto de DELLAs. Haciendo uso de líneas transgénicas *35S::TAP-DELLA* (Feng et al., 2008), hemos analizado los niveles de las cinco proteínas DELLA tras el tratamiento con NO y/o GA₃. Como se muestra en la Figura 25C, existe una mayor acumulación de todas las proteínas DELLA en respuesta a NO. Al contrario, comprobamos que la aplicación de GA₃ provocaba la degradación de las mismas (Fig. 25C), tal y como está descrito en la literatura.

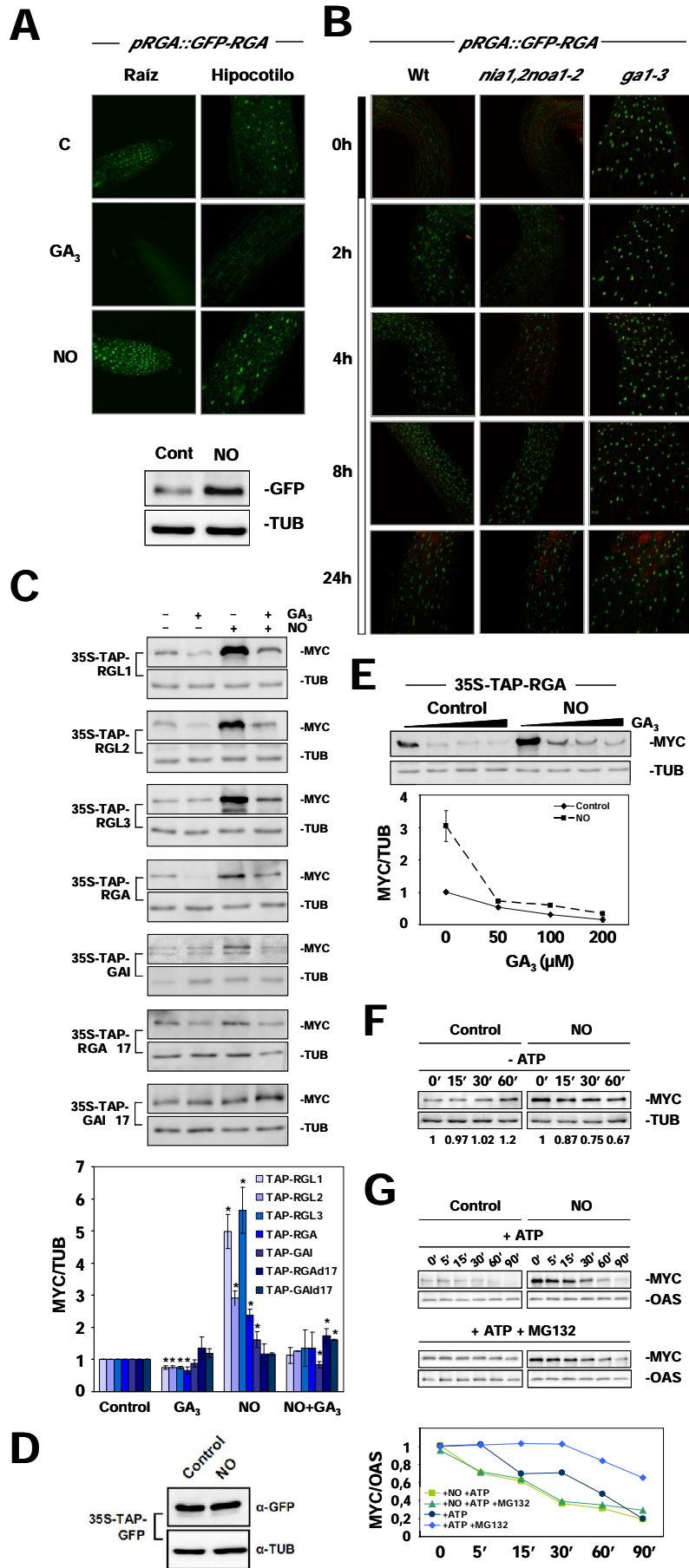


Figura 25. Efecto del NO en la acumulación de las proteínas DELLA.

A. Los niveles de GFP-RGA fueron visualizados en las raíces y los hipocotilos de plántulas *pRGA::GFP-RGA* tanto sin tratar (C, Control) como tras un tratamiento de 2 h con 50 μM GA_3 y/o 250 μM SNP, como fuente de NO (NO) mediante microscopia confocal. Los niveles de GFP-RGA y el control de carga, Tubulina (TUB) fueron analizados mediante Western-blot. B. Acumulación de la proteína GFP-RGA en la línea *pRGA::GFP-RGA* en los fondos genéticos, silvestre (Wt), *nial,2noal-2* y *gal-3a* a diferentes tiempos tras pasar las plántulas de oscuridad (barra negra vertical) a luz (barra blanca vertical). C. Análisis de los niveles de TAP-DELLAs tras el tratamiento con SNP (NO) y/o GA_3 durante 2,5 h detectados mediante anticuerpos anti-MYC. Se presenta la hibridación con TUB como control de carga. Los valores normalizados con los de TUB y referidos a los valores del control no tratado fueron cuantificados y se presentan como valores medios \pm desviación estandar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican valores significativos tras un test-t, p-valor < 0,05. D. Efecto del tratamiento con SNP (NO) en la acumulación de la proteína TAP-GFP. E. Degradación de TAP-RGA inducida por GAs en plantas no tratadas (Control) y tratadas con NO (NO, como se indica en el panel C). Las concentraciones de GA_3 utilizadas durante 2,5 h fueron 0, 50, 100 y 200 μM . Los valores normalizados con la TUB fueron cuantificados y se muestran como la media \pm error estandar de tres experimentos independientes. E y F. Ensayos de degradación *in vitro* en ausencia (E) o presencia (F) de ATP y el inhibidor del proteasoma MG132. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por los tiempos y tratamientos indicados. Se utilizó anti-MYC para detectar TAP-RGA y TUB o anti-OAS-TL A1 (OAS) como control de carga. El ATP y el MG132 fueron utilizados a 10mM y 100 μM , respectivamente. Los niveles de proteína detectados en el panel F se cuantificaron y normalizaron con los de OAS y se presentan en la gráfica correspondiente.

Además, el pre-tratamiento con el donador de NO y la aplicación posterior de GA_3 no previno la degradación de las DELLA mediada por GAs (Fig. 25C), sugiriendo que el NO no está modificando las proteínas DELLA haciéndolas resistentes a la degradación por el proteasoma. Hemos confirmado esta idea monitorizando la acumulación de TAP-RGA tras la aplicación de diferentes concentraciones de GA_3 en plantas pre-tratadas, o no, con el donador de NO (Fig. 25E). La proteína TAP-RGA fue degradada eficientemente tanto en plantas tratadas con NO como en plantas no tratadas (Fig. 25E). De hecho, la degradación de TAP-RGA por GA_3 parece ser más eficiente en plántulas pre-tratadas con NO. Entonces, exploramos si la degradación de las DELLA en plántulas tratadas con NO esta mediada por la actividad dependiente de ATP del proteasoma mediante un sistema *in vitro* descrito previamente (Wang et al., 2009a). La Figura 25F, G muestra que no existe degradación de TAP-RGA en ausencia de ATP en plántulas no tratadas con NO mientras que la degradación es evidente en las plántulas tratadas con NO, sugiriendo que la proteína TAP-RGA en estos extractos puede ser degradada también por un mecanismo independiente del proteasoma. Sin embargo, tanto TAP-RGAs no tratadas, como tratadas con NO, son progresivamente degradadas en el tiempo en extractos con ATP, siendo las últimas más susceptibles a degradación (Fig. 25F, G). Además, el inhibidor del proteasoma MG132 retardo la degradación de TAP-RGA en controles no tratados pero solo hasta cierto límite en muestras tratadas con NO (Fig. 25G), sugiriendo de nuevo que existe una degradación independiente del proteasoma en las plántulas tratadas con NO. Este mecanismo alternativo de degradación puede también explicar la degradación más eficiente que observamos en plántulas tratadas con NO en respuesta a GA_3 (Fig. 25E) o en ausencia de ATP (Fig. 25F). Por otro lado, comprobamos que el tratamiento con el dador de NO, SNP, no provocaba una mayor acumulación de proteína TAP-GFP en líneas *35S::TAP-GFP* (Fig. 25D).

El NO provoca la acumulación de DELLAs mediante la represión de *SZY1*

Los hipocotilos de plántulas silvestres cultivadas en luz roja bajo cantidades crecientes de NO se vieron progresivamente acortados (Fig. 26). A concentraciones de 0.5 mM SNP, la elongación del hipocotilo fue de en torno al 10% de la elongación de plántulas no tratadas (Fig. 26A). El acortamiento del hipocotilo con cantidades crecientes de SNP se correlacionó muy bien con la acumulación de las DELLA, siendo GAI la proteína DELLA menos sensible a NO (Fig. 26B). Además, la inhibición de la elongación del hipocotilo ejercido por el NO bajo condiciones de luz roja es parcialmente dependiente de la función de las DELLA (Fig. 26C). El doble mutante *rgagai* presenta una ligera reducción de la respuesta a NO que se convierte en una insensibilidad mucho más pronunciada en el cuádruple mutante DELLA, *4della*, que tiene mutados todos los genes que codifican proteínas DELLA menos *RGL3* (Achard et al., 2006), y también en el mutante en las cinco DELLAs, *5della* (Fig. 26C). En el rango de concentraciones de SNP utilizadas, la longitud de los hipocotilos de los mutantes *4della* y *5della* fue siempre un 20-35% mayor que los de plántulas silvestres (Fig. 26C). Estos datos sugieren que el NO regula el tamaño del hipocotilo a través de la función de las DELLA. Sin embargo, incluso a las dosis más bajas de SNP utilizadas, alrededor de un cuarto del efecto del NO se ejerce a través de un mecanismo independiente de las DELLA. Este dato pone de manifiesto que las DELLA no son la única diana de la acción del NO en el control del crecimiento, lo que está de acuerdo con la regulación transcripcional que ejerce el NO sobre *PIF1*, *PIF3* y *PIF4*, propuesta anteriormente.

Para identificar el mecanismo por el cual el NO promueve la acumulación de las proteínas DELLA, se analizaron distintos niveles de regulación. En primer lugar, el incremento en proteínas DELLA, puede ser el resultado de la activación transcripcional de los genes que codifican las proteínas DELLA por NO. Pese a que se observó la acumulación de dichas proteínas en las líneas *35S:TAP-DELLA* donde no existe un control transcripcional por NO ya que la expresión de las DELLA está dirigida por el promotor constitutivo 35S, decidimos medir los niveles de expresión de los genes que codifican las proteínas DELLA, ya que en plantas *pRGA::GFP-RGA* el NO sigue teniendo el mismo efecto. La cuantificación de los transcritos mediante qPCR de hipocotilos de plántulas silvestres expuestas a NO no reveló ningún cambio en los transcritos de dichos genes (Fig. 27).

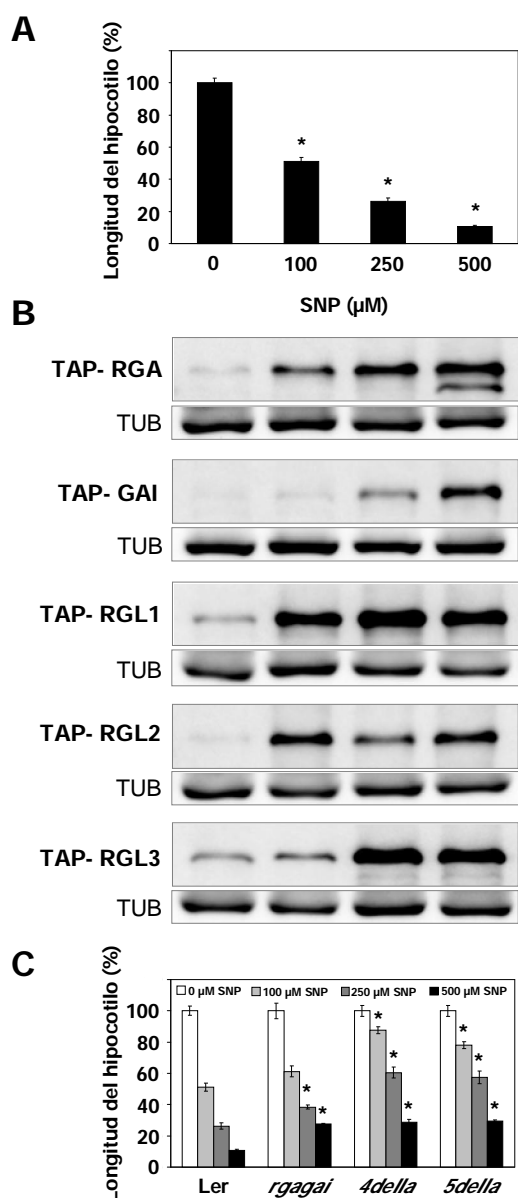


Figura 26. Efecto del NO en la elongación del hipocotilo y en el contenido en proteínas DELLA en luz roja.

Longitud del hipocotilo de plantas silvestres, Ler (A) y los mutantes *rga-2Agai-16*, cuádruple (*Adella*) y quintuple della (*5della*) (C) tratadas con las concentraciones de SNP indicadas, durante tres días. Los valores son medias de tres experimentos independientes \pm error estándar. B. Acumulación de las proteínas TAP-DELLA tras el tratamiento con las mismas concentraciones de SNP utilizadas en A. Se utilizaron anticuerpos anti-MYC para detectar las diferentes proteínas TAP-DELLA y anti-TUB para detectar tubulina como control de carga.

Tampoco se observaron cambios significativos en los transcritos de estos genes en el mutante deficiente en NO, *nia1,2noa1-2* cuando se comparó con plantas silvestres (Fig. 27). Solo se observó un cambio en la transcripción de *RGL1* en el triple mutante pero estaba aumentado y no reprimido como sería de esperar. Otra posibilidad que contemplamos fue que el NO estuviera regulando la biosíntesis o el catabolismo de GAs, de forma que la aplicación de NO resultara en niveles más bajos de GAs que no degradarían las proteínas DELLA, resultando en su acumulación o en la situación contraria en el caso del mutante *nia1,2noa1-2*. Se midieron los niveles de los transcritos de genes de la biosíntesis o de la degradación de GAs en hipocotilos de plántulas expuestas a NO o en el mutante *nia1,2noa1-2* (Fig. 28). Sin embargo, pese a que encontramos alguna diferencia en la transcripción de algunos de estos genes no encontramos un efecto claro que explicara la exagerada acumulación de las proteínas DELLA en las diferentes líneas transgénicas

analizadas, sugiriendo que el NO promueve la acumulación de las proteínas DELLA sin interferir con los niveles de GAs en Arabidopsis.

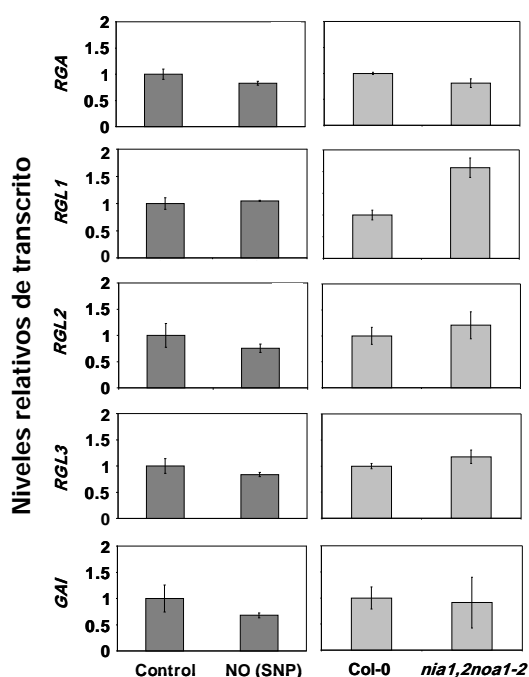


Figura 27. Efecto del NO sobre los transcritos de los genes que codifican las proteínas DELLA.

Se realizó qRT-PCR a partir de RNA extraído de hipocotilos de plantas silvestres tratadas (NO (SNP)) o no (Control) con 1 mM SNP durante 2h, y de plantas *nia1,2noa1-2* no tratadas. Los valores son la media \pm error estándar de tres experimentos independientes.

La acumulación/degradación de las proteínas DELLA está controlada por el complejo GID1-DELLA-SLY1 a través de un proceso en el que tras la percepción de las GAs por su receptor GID1, se reclutan las proteínas DELLA, y se ubiquitinan posteriormente por la E3 ubiquitin ligasa SLY1. Entonces, la proteína DELLA ubiquitinada es susceptible de ser degradada por el proteasoma. En este complejo existen diferentes componentes que podrían ser potenciales dianas de la regulación por NO. En primer lugar comprobamos que ni el tratamiento con NO ni la deficiencia en NO del mutante *nia1,2noa1-2* provocaban una diferencia en la expresión de los genes *GID1a*, *GID1b*, *GID1c*, con la excepción de *GID1b* que se regula por NO pero no puede explicar el fenotipo de acumulación de DELLAs (Fig. 29A). Sin embargo, al analizar el comportamiento de los dobles mutantes *gid1a,b*, *gid1a,c* y *gid1b,c* observamos que algunos de ellos no respondían a NO en el acortamiento del tamaño del hipocotilo, sugiriendo que estas proteínas están de alguna forma regulando la respuesta a NO (Fig. 29C,E). En cambio, *SLY1* se modula transcripcionalmente por NO de manera que el tratamiento con NO provoca una clara represión de dicho gen y la deficiencia de NO promueve su inducción (Fig. 29B). De acuerdo con

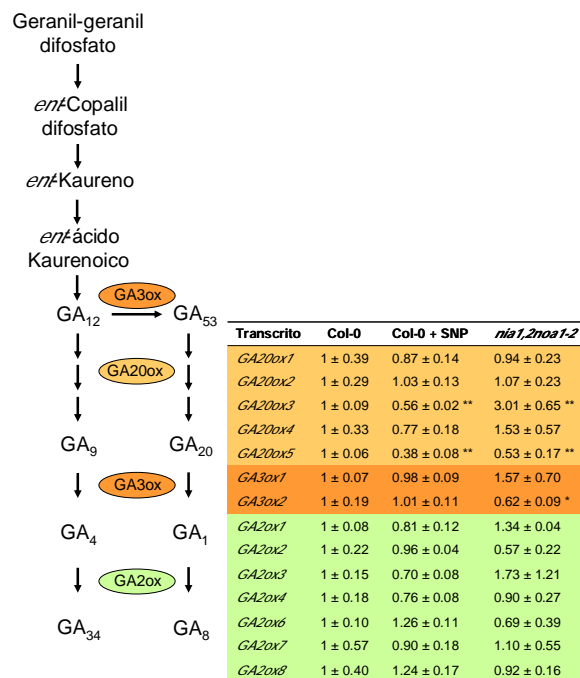


Figura 28. Efecto del NO sobre los transcritos de genes de la biosíntesis y degradación de giberelinas.

Se realizó qRT-PCR a partir de RNA extraído de hipocotilos de plantas silvestres tratadas (NO (SNP)) o no (Control) con 1 mM SNP durante 2h, y de plantas *nia1,2noa1-2* no tratadas. Los valores son la media \pm error estándar de tres experimentos independientes.

esto, el mutante *sly1-10* resultó menos sensible al NO en la reducción del tamaño del hipocotilo, mientras que la ganancia de función de *SLY1* en el mutante *sly1-D* resultó en una sensibilidad algo más acentuada a NO (Fig. 29D, F). Estos datos sugieren que el NO regula la acumulación de las proteínas DELLA y su papel en el alargamiento del hipocotilo mediante la regulación de la expresión de *SLY1*.

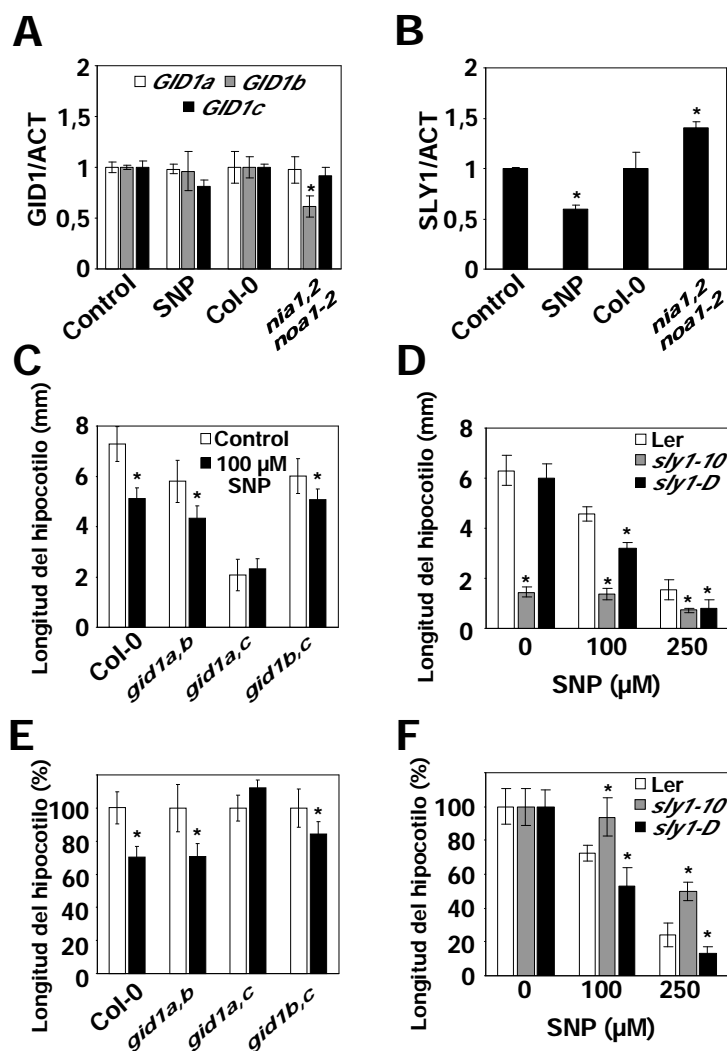


Figura 29. Conexión funcional entre el NO y los componentes de la señalización de las giberelinas GID1 y SLY1.

A y B. Análisis de los transcritos de genes *GID1* y *SLY1* en hipocotilos de plántulas silvestres tratadas (SNP) o no (Control) con 1 mM SNP, junto con los no tratados del mutante *nia1,2noa1-2* y su fondo genético silvestre Col-0. Los valores son la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. C y E. Longitud del hipocotilo total y relativa, respectivamente, de Col-0 y varias combinaciones de dobles mutantes *gid1* en plántulas de tres días no tratadas (barras blancas) y tratadas (barras negras) con 100 μ M SNP. D y F. Longitud del hipocotilo total y relativa, respectivamente, de Col-0 y la pérdida de función *sly1-10* y la ganancia de función *sly1-D*, a las concentraciones de SNP indicadas. C-F. Los valores son la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos representan diferencias significativas con un p-valor $<$ 0,05 mediante test-t.

La producción de NO responde a transiciones oscuridad-luz y es regulada negativamente por GAs

Para que el papel propuesto del NO tenga una relevancia en el proceso de des-etiolación, necesita de un apoyo fisiológico. Hemos estudiado si la transición de oscuridad a luz, que promueve el programa de des-etiolación, es acompañada por una producción de NO endógeno en *Arabidopsis*. Mediante la fluoresceína DAF-FM DA, se midieron los niveles de NO en plántulas silvestres en condiciones de oscuridad y una hora después de pasar las plántulas de oscuridad a luz roja. Se detectaron niveles muy bajos de fluorescencia asociada a NO en las plántulas crecidas en oscuridad pero se vieron incrementados significativamente al pasar las plántulas a luz roja (Fig 30A). Sin embargo, este incremento en los niveles de NO no tuvo lugar en el mutante *nial,2noa1-2* ni en el mutante *phyB* (Fig. 30A). De manera interesante, el mutante deficiente en GAs, *ga1-3*, presentaba niveles de NO en oscuridad mayores que los detectados en plántulas silvestres (Fig. 30A), sugiriendo que tal vez las GAs ejercen una regulación negativa sobre los niveles de NO en el hipocotilo. Además, no se detectó un incremento en la acumulación de NO en el mutante *ga1-3* tras pasarlo a luz roja (Fig. 30A). Apoyando la idea de que las GAs controlan los niveles de NO, tanto plántulas silvestres como mutantes *ga1-3* presentaron una reducción de sus niveles de NO tras tratarlas con GAs (Fig. 30B). En cambio, el mutante *gai-1D* no alteró sus niveles endógenos de NO tras el tratamiento con GAs (Fig. 30B).

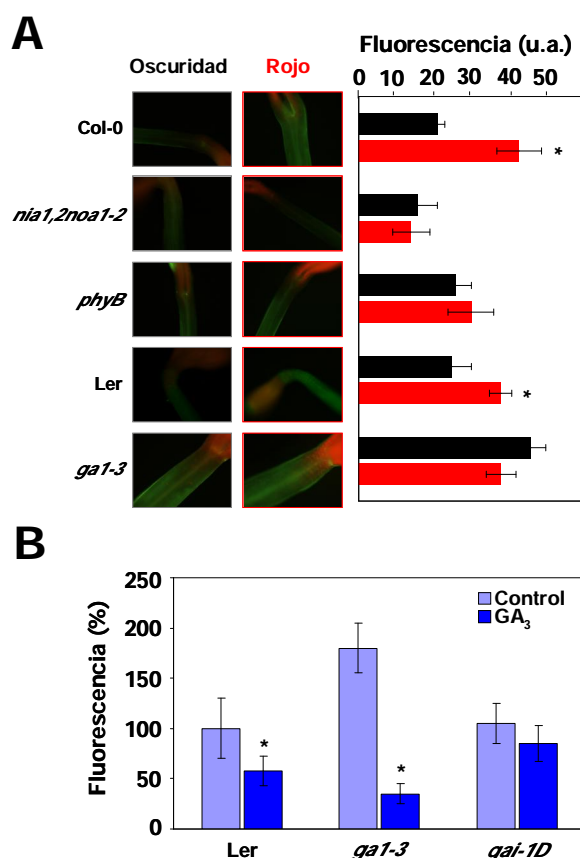


Figura 30. Niveles de NO en los hipocotilos de diferentes genotipos en condiciones de oscuridad y tras la transferencia a la luz.

A. Detección de NO en plántulas de 5 días crecidas en oscuridad (oscuridad) y tras pasar las plántulas 1 h a luz roja (Rojo). B. Niveles de NO en plántulas de Ler, *ga1-3* y *gai-1D* crecidas en oscuridad, tras tratar (GA₃) o no (Control) con 50 μM GA₃ durante 2,5 horas. Los valores son relativos a lo detectados en el silvestre en condiciones control. El panel derecho de A y el panel B muestran la cuantificación de tres experimentos independientes como la media ± error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas, p-valor < 0,05 comparando con los controles en oscuridad (A) o no tratados (B) mediante test-t.

DISCUSIÓN

Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno tiene importantes papeles en la regulación del desarrollo de las plantas siendo características de transiciones del desarrollo (Gapper y Dolan 2006; Tsukagoshi et al., 2010). Estas moléculas tienen funciones documentadas regulando la adaptación a cambios en temperatura (Allakhverdiev et al., 2008) o luz (Li et al., 2009b), condiciones que regulan procesos del desarrollo como la germinación y el establecimiento (Bailly et al., 2008), la elongación del hipocotilo (Stavang et al., 2009), la floración (Ye et al., 2000; Kumar y Wigge 2010), la senescencia foliar (Jing et al., 2008) y la formación de tubérculos (Agrawal et al., 2008). Entre las especies reactivas producidas en respuesta a cambios ambientales, el NO ha sido el centro de atención durante los últimos años como una molécula señalizadora en respuestas tanto defensivas (Romero-Puertas et al., 2004; Wendehenne et al., 2004; Hong et al., 2008) como de desarrollo (He et al., 2004; Lopez-Bucio et al., 2006). Así, tanto las especies reactivas de oxígeno (ROS) como el NO han sido postulados como importantes reguladores del desarrollo (Foreman et al., 2003; Prado et al., 2004; Carol et al., 2005; Hu et al., 2005; Gapper y Dolan 2006; Tsai et al., 2007; Muller et al., 2009; Tsukagoshi et al., 2010) posiblemente por su conexión con la señalización de diferentes hormonas (Pagnussat et al., 2003; Garcia-Mata y Lamattina 2007; Liu et al., 2009b; Bahin et al., 2011). Se ha descrito que la aplicación de un donador de NO a plántulas etioladas de *Arabidopsis* promueve la des-etilación e inhibe la elongación del hipocotilo (Beligni y Lamattina, 2000). Además, un tratamiento térmico a 45°C da lugar a una fuerte producción de NO y a la concomitante inhibición del crecimiento del hipocotilo (Lee et al., 2008). Además, el mutante *hot 5-1*, afectado en una S-nitrosoglutatión reductasa que moviliza el aducto de NO del S-nitrosoglutatión, se mostró susceptible a altas temperaturas, acumuló mayores niveles de NO que plantas silvestres y presentó un fenotipo des-etiolado en oscuridad (Lee et al., 2008), siendo este fenotipo dependiente de la mayor acumulación de NO de este mutante (Lee et al., 2008). De acuerdo con esto, hemos encontrado que las plántulas del triple mutante, *nia1,2noa1-2*, que presentan una marcada reducción de los niveles de NO, tienen hipocotilos más largos en condiciones de iluminación con luz roja y no bajo condiciones de luz roja lejana o azul. Estos datos están de acuerdo con los descritos para un mutante impedido en la activación de la expresión de *NIR1A* (Lin y Cheng 1997). Además, tal y como se presenta en este capítulo, un mutante que acumula más NO presenta hipocotilos más cortos que el silvestre bajo las mismas condiciones (Fig. 21). Todas estas evidencias apuntan a un papel positivo del NO en la promoción de la fotomorfogénesis. Sin embargo no se conocía hasta el momento el mecanismo molecular por el que el NO regula la fotomorfogénesis.

La observación de que el triple mutante presentaba hipocotilos alargados únicamente en condiciones de iluminación con luz roja, y ya que el PHYB es el fotorreceptor principal que media

la des-etiolación en luz roja (de Lucas et al., 2008), sugería en primera instancia, que el PHYB podría ser una diana del efecto del NO. Tras comparar los fenotipos del mutante *phyB* con los del mutante *nial,2noa1-2*, y tras comprobar que, el triple mutante es capaz de producir una cantidad de proteína PHYB en oscuridad similar a la detectada en plantas silvestres y que el mutante *phyB* responde normalmente a NO, pensamos que la señalización dependiente de PHYB estaba alterada en el triple mutante. Esta hipótesis esta de acuerdo con los datos publicados anteriormente sobre el papel del segundo mensajero de NO, cGMP, en el control de la señalización del fitocromo relacionada con diferentes procesos como el desarrollo del cloroplasto (Bowler et al., 1994a, Bowler et al., 1994b). Es importante señalar que tras comparar los efectos de la aplicación de NO en la elongación del hipocotilo bajo condiciones de oscuridad o bajo iluminación con luz roja hemos encontrado esencialmente los mismos resultados (Fig. S1). Esto sugiere que el NO en oscuridad puede regular los mismos componentes que en luz roja. Existen diferentes componentes de señalización por debajo del PHYB, pero quizás su interacción con los factores de transcripción PIFs sea una de las más tempranas (Bae y Choi, 2008). El hecho de que el triple mutante presentara hipocotilos más largos y acumulara mayores niveles de antocianinas apuntaba a una mayor expresión de los genes *PIF*, particularmente de *PIF3*, es este mutante. Aunque HY5, otro componente esencial en la promoción de la fotomorfogénesis, esta también relacionado con la síntesis de antocianinas (Shin et al., 2007), no esperamos una mayor expresión de este factor de transcripción en el triple mutante, ya que ello llevaría al fenotipo opuesto de sus hipocotilos. Además, la reducida acumulación de PHYB en el triple mutante bajo condiciones de luz roja encaja muy bien con una mayor expresión de PIF3 en este mutante, debido al papel negativo descrito de PIF3 y PIF4 en la regulación de los niveles de PHYB (Leivar et al., 2008a; Jang et al., 2010). Hemos demostrado que la expresión de *PIF3* junto a *PIF1* y *PIF4* es reprimida por NO encontrándose, por tanto, inducida en el mutante NO-deficiente. De manera interesante, se ha descrito la interacción entre HY5, HYH y PIF4 en la regulación de la activación por luz de *NR2 NIA2* (Jonassen et al., 2009a; Jonassen et al., 2009b). Estos datos sugieren la existencia de una regulación entre NR/NIA y los PIFs como potencial mecanismo de integración del desarrollo por luz y NO.

Aunque se ha propuesto que el NO puede regular el tamaño del hipocotilo (Beligni y Lamattina 2000; Tonon et al., 2010) no se había descrito ningún mecanismo molecular que lo explicase. Hemos identificado los PIFs como importantes reguladores de los fenotipos de la elongación del hipocotilo presentes en plantas deficientes en NO. Además, hemos encontrado que el mutante *pifQ* es casi completamente insensible a la aplicación de NO en la inhibición de la elongación del hipocotilo. Sin embargo, ni *pif3* ni *pif4* mostraron este fenotipo de resistencia al NO, probablemente debido a la redundancia de los diferentes PIF en el control del tamaño del hipocotilo mediado por NO. De todas formas, la actividad de los PIF está finamente regulada mediante heterodimerización (Hornitschek et al., 2009) y/o a través de la interacción con otras

proteínas, como las DELLA, inhibiendo su actividad (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008). La regulación negativa de la función de los PIF por NO (Fig. 24A) está acompañada de una acumulación de las proteínas DELLA (Fig. 25). Se dispone de claras evidencias que prueban la interacción física de PIF3 y PIF4 con diferentes miembros de la familia DELLA, como RGA y GAI, resultando en la reducción de su capacidad de activar la expresión de sus genes diana (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008; Gallego-Bartolomé et al., 2010). Tras la transición de oscuridad a luz, la producción de NO da lugar a la represión de la transcripción de algunos *PIFs* y a un incremento en los niveles de DELLAs, resultando en un conjunto muy pequeño de PIFs que puedan mantener la escotomorfogénesis. Pero, ¿cual es el mecanismo por el que el NO provoca la acumulación de las DELLA? Primero, comprobamos que las plántulas tratadas con NO eran capaces de degradar las proteínas DELLA en respuesta a la aplicación con GAs (Fig. 25). De manera sorprendente, las plantas tratadas con NO degradaban las DELLA de manera más eficiente en respuesta a GAs que las plantas control no tratadas (Fig. 25). Este mecanismo, lejos de ser inusual, opera en otras condiciones donde tiene lugar una acumulación exagerada de DELLAs debida a una expresión alterada de genes clave (Silverstone et al., 2007; Willige et al., 2007; Richter et al., 2010), o a la inhibición de la biosíntesis de giberelinas mediante PAC (Muangprom et al., 2005). Tras realizar ensayos *in vitro* podemos proponer que esto se debe a un mecanismo de degradación independiente del proteasoma (Fig. 25). Entonces, exploramos la posibilidad de que el NO regulara la transcripción de los genes que codifican las proteínas DELLA (Fig. 27). Sin embargo, el NO no afectó a ninguno de estos genes, ni en tratamientos exógenos con SNP, ni en el mutante deficiente en NO (Fig. 27). Eventualmente, el NO podría controlar la biosíntesis y el metabolismo de GAs para modular los niveles de DELLA. Tras un extensivo análisis de la expresión de los genes de la biosíntesis, *GA20ox* y *GA3ox* y del catabolismo, *GA2ox*, de giberelinas, solo el gen *GA20ox3* cumplió los requisitos para poder ser una diana del NO en el control de la homeostasis de GAs, ya que se regula negativamente por NO exógeno y esta inducido en el mutante *nia1,2noa1-2* (Fig. 28). Sin embargo, podemos anticipar que cambios en los contenidos de GAs, en el triple mutante o tras el tratamiento con NO, en el caso en el que los hubiera, deberían estar restringidos a un órgano, tejido o a un conjunto de células limitado, pero no a toda la plántula, ya que las plantas *nia1,2noa1-2* no presentan ningún fenotipo general característico de plantas que sobreproduzcan GAs, sino más bien al contrario. Las plantas *nia1,2noa1-2* son semi-enanas y presentan una menor longitud del tallo produciendo una menor cantidad de semillas con una dormición muy marcada. Una mayor acumulación de GAs en el hipocotilo del triple mutante podría explicar su fenotipo de hipocotilos elongados y la menor acumulación de DELLAs, pero realizar estas medidas es técnicamente muy difícil a si que se deberían desarrollar nuevas tecnologías o sensores para poder completar este propósito en un futuro.

A pesar del posible papel del NO en la regulación de la homeostasis de GAs, el NO ciertamente regula la señalización de GAs a través de la modulación de la abundancia de las DELLA (Fig. 25 y 26). Ya que los niveles de acumulación de las DELLA están regulados a través de su degradación por la ruta ubiquitina-proteasoma dependiente del complejo $GID1-SCF^{SLY1}$, exploramos si este módulo era una de las dianas de la regulación por NO. Primero, comprobamos que el NO no regula la expresión de los genes *GID1a*, *GID1b* y *GID1c*, que codifican las diferentes isoformas del receptor GID1 de Arabidopsis. Sin embargo, el doble mutante *gid1a,c*, afectado en las isoformas de GID1 más relacionadas con el control del tamaño del hipocotilo (Griffiths et al., 2006; Stavang et al., 2009), mostró un fenotipo de resistencia al NO (Fig 29). En segundo lugar, la represión de *SLY1* por NO y la inducción de este gen encontrada en el mutante *nia1,2noa1-2* (Fig. 29), puede explicar muy bien el control de la acumulación de las proteínas DELLA por NO. Además, el mutante *sly1-10* fue parcialmente insensible a la aplicación de NO en condiciones de luz roja (Fig. 10). El hecho de que mutantes en los genes que codifican las proteínas DELLA, los receptores GID1 y la E3 ubiquitin ligasa SLY1 se comporten como parcialmente insensibles a NO, sugiere claramente que el complejo GID1-DELLA-SLY1 es una diana de la regulación del tamaño del hipocotilo mediado por NO. Resulta interesante que el mutante *sly1-10*, respondió de forma diferente a la aplicación de NO en condiciones de oscuridad o de iluminación con luz roja (Fig. 29). El hecho de que el mutante *sly1-10* responda como plántulas silvestres a la aplicación de NO en oscuridad pero no en luz roja sugiere que el control transcripcional de *SLY1* por NO es funcional sólo en condiciones de luz roja. En cambio, los genes *PIFs* parecen ser las dianas más importantes del NO en oscuridad. El mutante *pifQ* es casi insensible a la aplicación de NO, sugiriendo que los PIF deben tener un papel clave en la regulación negativa que ejerce el NO sobre el módulo básico de señalización de GAs. La interacción funcional negativa entre el NO y las GAs en el control de la fotomorfogénesis es potenciada por el efecto negativo de las GAs sobre la biosíntesis de NO, como se demostró por la mayor acumulación de NO en plántulas *gal-3*, que puede ser revertida mediante la aplicación de GA_3 (Fig 30).

Con todos estos datos se puede proponer un modelo integrando la función del NO, GAs, DELLAs y PIFs en el control de la fotomorfogénesis, como se muestra en la figura 31. La transición de oscuridad a luz da lugar a una reducción en la biosíntesis de GAs y a un incremento en los niveles de NO. Esta situación provoca una mayor acumulación de las proteínas DELLA como resultado de una menor interacción funcional del complejo GID1-GA-DELLA-SLY1. Estos niveles altos de DELLAs permiten su interacción con factores de transcripción, como los PIF, cuya transcripción se reprime por NO. El papel de las DELLA secuestrando estos factores de transcripción e impidiendo la activación de sus genes diana junto con la represión transcripcional de los *PIFs* ejercida por el NO, dará lugar al bloqueo de la elongación del hipocotilo, entre otros procesos característicos de la fotomorfogénesis. En el mutante *nia1,2noa1-2*, los niveles de NO

son muy bajos, minimizándose el control negativo sobre la expresión de los *PIFs*. Al mismo tiempo, la ubiquitinación de las DELLA mediada por SLY1 y su posterior degradación debe estar aumentada en condiciones de baja acumulación de NO, dando lugar a una menor cantidad de DELLAs. Como resultado, el mayor contenido en PIFs libres y/o su función incrementada en el mutante *nia1,2noa1-2*, podría ser responsable de los hipocotilos alargados que presenta este mutante en condiciones de iluminación (Fig. 21).

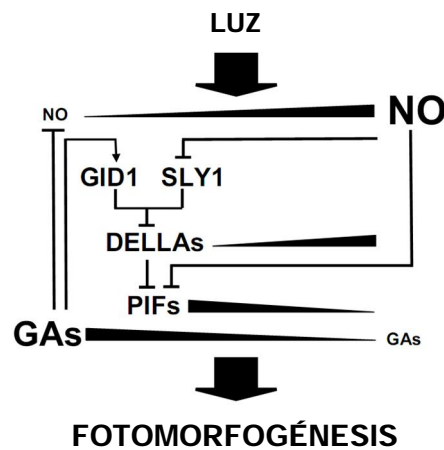


Figura 31. Esquema integrando las funciones antagonistas del NO y las GAs en el control de la fotomorfogénesis a través del balance entre las DELLAs y los PIFs.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

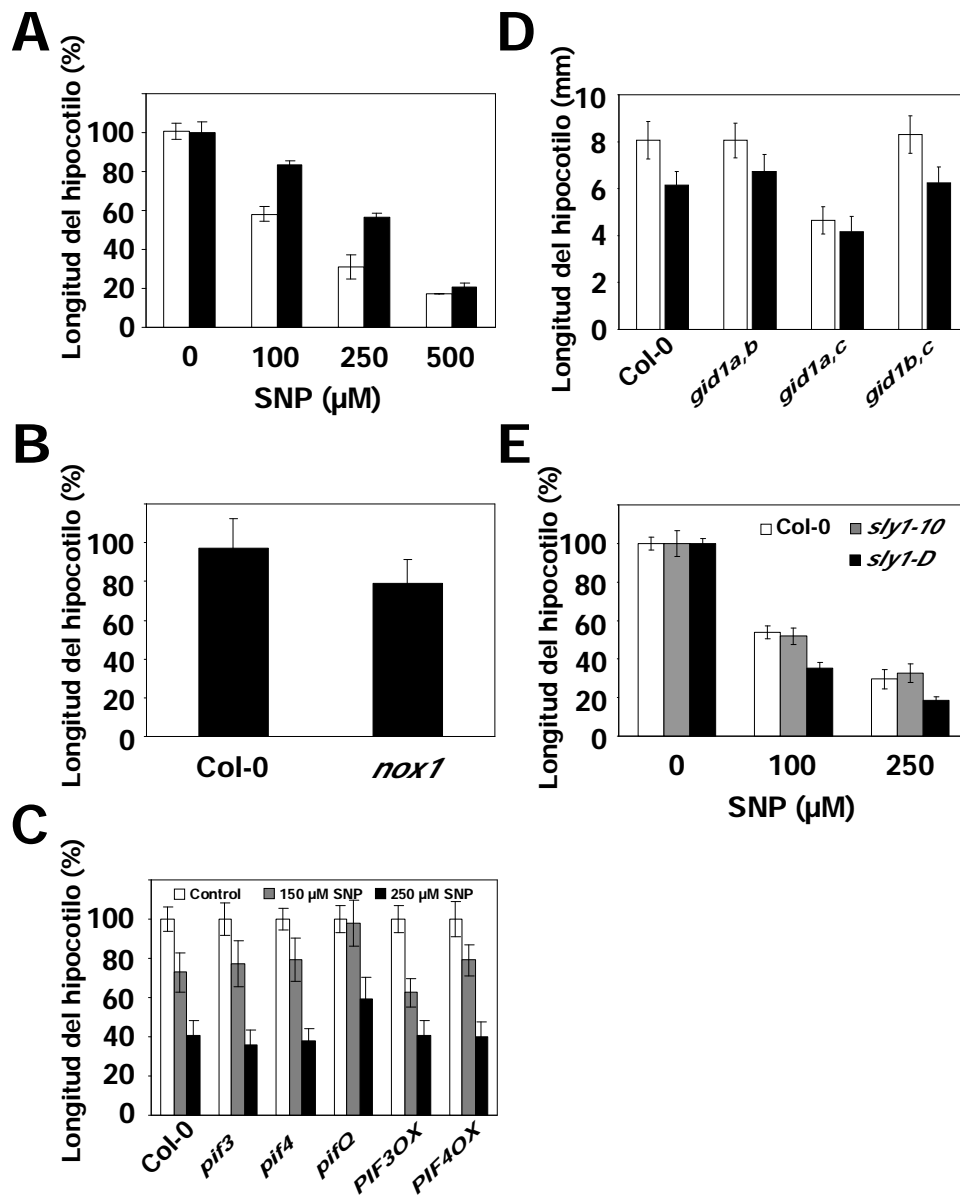


Figura S1. Experimentos correspondientes a las figuras 1, 3, 5 y 6 realizados en oscuridad.

**CAPÍTULO 4: MODO DE ACCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO:
NITRACIÓN DE PROTEÍNAS**

ACCIÓN REGULADORA DEL ÓXIDO NÍTRICO A TRAVÉS DE LA NITRACIÓN DE PROTEÍNAS EN *Arabidopsis thaliana*

INTRODUCCIÓN

El NO, a pesar de su naturaleza reactiva, actúa como molécula señalizadora en numerosos procesos biológicos de organismos pertenecientes a reinos tan dispares como bacterias, hongos, animales y plantas. Se ha comprobado que el NO juega un papel importante durante todo el ciclo de vida de las plantas. Esto lo hace, en gran medida, a través de su interacción con las diferentes hormonas y reguladores del crecimiento (Hu et al., 2005; Lopez-Bucio et al., 2006; Chen et al., 2010b; Romera et al., 2011). El NO participa en la señalización de hormonas tan importantes para el desarrollo de las plantas como las auxinas, las citoquininas, el etileno, el ácido abscísico y las giberelinas, entre otras (Bethke et al., 2004b; Jovanovic et al., 2005; Lindermayr et al., 2006; Tun et al., 2008; Romanov et al., 2008; Flores et al., 2008). Por otro lado, estas mismas hormonas promueven la síntesis de NO, lo que representa un punto adicional de control sobre la señalización de hormonas (Tun et al., 2001; Neill et al., 2002a; Pagnussat et al., 2002; Pagnussat et al., 2003; Bright et al., 2006; Zottini et al., 2007; Kolbert et al., 2008b; Kolbert y Erdei 2008). Si bien se conocen determinados ejemplos de la regulación de procesos fisiológicos de dichas hormonas que tienen como intermediario el NO, se desconoce, en gran medida, su modo de acción.

El NO, a diferencia de las hormonas y otros reguladores del crecimiento, actúa a través de dos niveles de regulación posiblemente conectados, la regulación de la expresión génica y la modificación post-traducciona de proteínas. Esto convierte al NO en un regulador muy versátil (Bruckdorfer 2005). Es capaz de interactuar directamente con las proteínas modificando tanto su actividad, su localización, su estabilidad o su interacción con otras proteínas, y, como consecuencia de estas modificaciones o independientemente de las mismas, es capaz de alterar el transcriptoma y regular diferentes vías de señalización. Esta característica supone un importante punto de control sobre la modulación de las funciones celulares ya que las proteínas son las encargadas de realizar las diferentes tareas que resultan en un correcto desarrollo del organismo. Si bien se han centrado muchos esfuerzos en comprender como se regula la transcripción de los diferentes genes que las codifican, existen otros niveles de control sobre las proteínas, que pueden llevar a cambios en su localización, estabilidad o actividad. Estos niveles de control, al ser posteriores al de la transcripción de los genes y a su traducción, tienen un impacto más directo y rápido sobre la función de estas proteínas.

Para que una modificación post-traducciona pueda actuar como un elemento de señalización fisiológicamente relevante debe cumplir determinados criterios. La modificación debe ser específica y reversible, preferiblemente mediante una reacción enzimática. Su formación debe

tener lugar en una escala de tiempo fisiológica, a menudo por acción de una reacción enzimática. Finalmente, la modificación debe resultar en un cambio de la actividad de la diana, ya sea activándola o inactivándola (Gow et al., 2004). El ejemplo clásico de modificación post-traducciona es la fosforilación de proteínas ya que ocurre en secuencias específicas, su formación es catalizada por quinasas y su eliminación es favorecida por fosfatasas (Krebs y Fischer 1964; Fischer y Krebs 1966). Así mismo, la fosforilación puede dar lugar a la activación o la inhibición de la actividad o la función de la proteína diana (Krebs y Fischer 1964; Fischer y Krebs 1966).

Gracias a los avances realizados en modelos biológicos diferentes a las plantas, está bien documentado que el NO es un mediador de diferentes modificaciones post-traduccionales (Gow et al., 2004). Estas modificaciones son la unión a centros metálicos de las proteínas, la nitrosilación de grupos tiol y amina, la nitración de residuos de tirosina, triptófano y fenilalaninas, así como la oxidación de grupos tiólicos o de tirosinas (Gow et al., 2004). No obstante, por su posible efecto en señalización, han sido dos las modificaciones post-traduccionales más estudiadas en modelos animales: la nitrosilación de cisteínas, que produce S-nitrosotioles y la nitración de tirosinas, que da lugar a nitrotirosinas.

Nitrosilación de cisteínas (S-nitrosilación)

Debido a su capacidad redox, el NO puede reaccionar con diferentes regiones nucleofílicas de las proteínas que incluyen aminas, anillos aromáticos, alcoholes y azufre reducido (tioles) (Gow et al., 2004). Si bien este tipo de reacción ha sido considerada históricamente como tóxica, recientemente ha pasado a centrar la atención de diferentes grupos de investigación por su posible relevancia fisiológica. Desde que se definió la formación de nitrosotioles (SNO) mediante la reacción del NO con el grupo tiol de la cisteína (Stamler et al., 1992c; Stamler et al., 1992a; Stamler et al., 1992b), han sido descritas numerosas proteínas susceptibles de este tipo de modificación. Estas proteínas cubren un rango amplio de actividades, incluyendo quinasas, canales iónicos, factores de transcripción, proteínas estructurales y proteasas entre otras (Stamler et al., 2001). La reciente caracterización de esta modificación post-traducciona ha revelado que cumple todos los requisitos para ser considerada como un componente de señalización relevante en condiciones fisiológicas, ya que tiene lugar en motivos consenso de las proteínas (Stamler et al., 1997), es favorecida por la actividad de proteínas conocidas, como la ceruloplasmina y la hemoglobina (Gow y Stamler 1998; Inoue et al., 1999), puede ser reversible por la acción de SNO reductasas (Liu et al., 2001) y, finalmente, su impacto sobre las proteínas se traduce tanto en su activación como en su inhibición (Lei et al., 1992; Kim et al., 1999; Kim 1999; Sun et al., 2001). Por tanto, se ha propuesto que la S-nitrosilación representa un modo de señalización fisiológicamente relevante tanto en plantas como en animales (Gupta 2011).

La identificación de proteínas que sufren este tipo de modificación y la caracterización de los procesos controlados por las mismas son escasos en el campo de la biología vegetal, ya que es un tema que ha sido abordado recientemente. El análisis global de proteínas mediante técnicas proteómicas ha identificado un conjunto relativamente amplio de dianas susceptibles de ser nitrosiladas en *Arabidopsis thaliana* (Lindermayr et al., 2005; Romero-Puertas et al., 2008). Entre éstas, se incluyen proteínas que actúan tanto en señalización como en la regulación del metabolismo central (Lindermayr et al., 2005; Romero-Puertas et al., 2008). Ha sido comprobado que la nitrosilación de la metionina adenosiltransferasa reduce la actividad del enzima afectando negativamente a la síntesis de etileno (Lindermayr et al., 2006), y que la nitrosilación de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa resulta en una inhibición del enzima y del metabolismo del carbono (Holtgreffe et al., 2008; Palmieri et al., 2010). También se ha descrito un importante papel de esta modificación post-traducciona en situaciones de estrés, especialmente en el establecimiento de la respuesta inmune. Así, la nitrosilación de AtSABP3 impide la unión del ácido salicílico (SA) a esta proteína y su correcta señalización, bloqueando la activación de la respuesta a patógenos dependiente de SA (Wang et al., 2009b). Además, la nitrosilación de NPR1, un regulador clave en la respuesta inmune en plantas, provoca la oligomerización de esta proteína impidiendo su entrada al núcleo y su posterior activación de los genes de respuesta a patógenos necesaria para establecer la defensa frente a diferentes patógenos (Tada et al., 2008). Sin embargo, el tratamiento con un donador de NO promueve la entrada de NPR1 al núcleo y la nitrosilación de NPR1, así como la del factor de transcripción TGA1, incrementando tanto la afinidad entre estas dos proteínas para la formación de dímeros, como la afinidad del factor de transcripción por sus secuencias dianas en el DNA (Lindermayr et al., 2010). Estos estudios confirman la posibilidad de que el NO regule procesos de defensa dependientes de SA mediante la nitrosilación de proteínas clave (Gupta 2011). También ha sido descrita la nitrosilación de otros factores de transcripción, como AtMYB2, con un importante papel en la señalización de ABA, aunque en este caso, la nitrosilación de este factor de transcripción impide su unión a los promotores de sus genes diana, resultando en un papel negativo del NO en la señalización del ABA (Serpa et al., 2007).

Nitración de tirosinas (Y-nitración)

Además de la nitrosilación de cisteínas, la nitración de tirosinas es la segunda modificación post-traducciona mediada por NO más estudiada en biología debido a su relación con procesos autoinmunes y neurodegenerativos en modelos animales y con la respuesta a estrés en plantas y otros organismos (Reynolds et al., 2007; Lee et al., 2008).

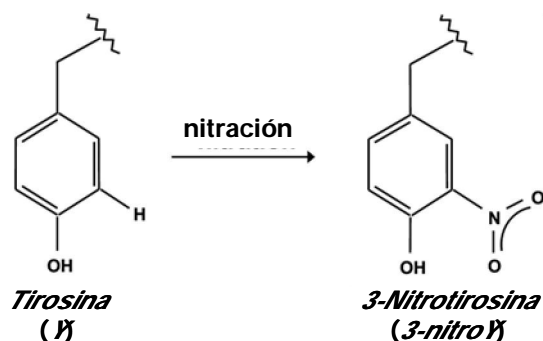


Figura 32. Diagrama representando la posición de la nitración en el anillo aromático de la tirosina.

La nitración de tirosina es una modificación covalente que resulta tras la adición de un grupo nitró (NO₂) en uno de los dos carbonos *orto* equivalentes del anillo aromático de los residuos de tirosina (Ischiropoulos 2003) (Fig.1), donde el NO actúa como fuente de nitrógeno (Ischiropoulos 1998). Las rutas químicas que dan lugar a la nitración de los residuos de tirosina, tanto *in vitro* como *in vivo*, han indicado que varias especies nitrantes como el dióxido de nitrógeno, el peroxinitrito o el ácido nitroso, pueden ser generadas *in vivo* tanto de forma simultánea como a diferentes tiempos dependiendo del tipo celular y el estímulo (Ischiropoulos 2003; Gaupels et al., 2011). Una vez generadas estas especies reactivas del nitrógeno (RNS), la nitración de proteínas puede ser producida tanto enzimática, como espontáneamente. Una gran abundancia de evidencias sugiere que la mieloperoxidasa, la peroxidasa eosinófila, la mioglobina y los citocromos P450 catalizan la oxidación de nitrito a dióxido de nitrógeno que es capaz de nitrar residuos de tirosina (van der Vliet et al., 1997; Wu et al., 1999; Brennan et al., 2002). Además, la mieloperoxidasa puede catalizar la nitración de proteínas por peroxinitrito, el producto de reacción entre el NO y el superóxido (Floris et al., 1993).

Por otro lado, la nitración no enzimática de tirosinas incluye los intermediarios de la reacción entre el peroxinitrito y el dióxido de carbono (Fig. 2) (Gow et al., 1996; Lyman et al., 1996) y la acidificación del nitrito que tiene como producto el ácido nítrico, un agente capaz de nitrar residuos de tirosina (Knowles et al., 1974). Tanto la nitración enzimática como la no enzimática son procesos suficientemente rápidos como para considerar que pueden producirse en una escala de tiempo fisiológica (Ischiropoulos 2003).

Los resultados de estrategias proteómicas, al igual que el desarrollo de numerosas técnicas analíticas e inmunológicas, han revelado que la nitración de tirosinas está limitada a un grupo reducido de proteínas (Gole et al., 2000; Aulak et al., 2001; Turko et al., 2003). La nitración de proteínas es una modificación post-traduccional poco frecuente (de 1 a 5 nitrotirosinas por cada 10000 residuos de tirosina), lo que sugiere que esta modificación es muy específica (Radi 2004). Aunque la proximidad de estas proteínas al sitio de generación de RNS es parte de la selectividad de este proceso, la nitración *in vivo* de proteínas abundantes y solubles como la actina (Aslan et al., 2003) sugiere la existencia de un mecanismo bioquímico y biofísico adicional que explique la selectividad de la nitración de determinadas proteínas (Ischiropoulos 2003).

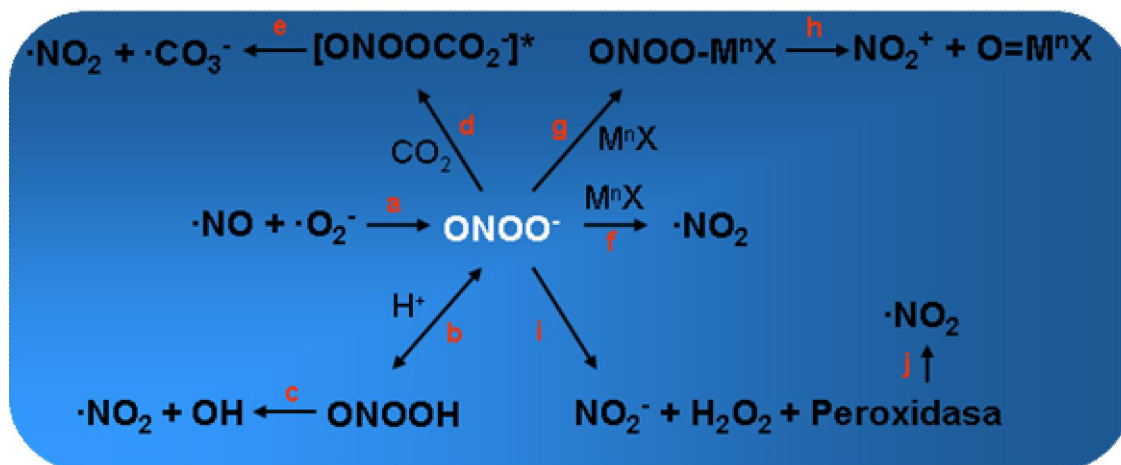


Figura 33. Rutas de nitración dependientes de peroxinitrito (ONOO·).

Adaptado de Reynolds et al., 2007. El ONOO· es generado tras la reacción de $\cdot\text{NO}$ con $\cdot\text{O}_2^-$ (esquema a). Una vez formado, el ONOO· puede dirigir reacciones de oxidación de uno o dos electrones que resultan en la formación de intermediarios reactivos (b-j). En la mayoría de casos, la nitración de proteínas tiene lugar a través de un mecanismo de combinación de radicales libres por el que un radical tirosilo ($\cdot\text{Tyr}$) se combina con $\cdot\text{NO}_2$ para formar 3-nitroY. Sin embargo, a través de un mecanismo no radicalario, un metal de transición ($\text{M}^{\text{n}}\text{X}$)-ONOO se descompone para formar el ión nitronio (NO_2^+). Este ión puede atacar directamente residuos de tirosina (g,h).

De forma homóloga a la fosforilación, se ha intentado determinar la existencia de secuencias en las proteínas que favorezcan su nitración (Elfering et al., 2004; Liu et al., 2011). Sin embargo, hasta la fecha, no hay evidencias claras que prueben la existencia de una única secuencia o de secuencias consenso requeridas para la nitración de tirosinas. Un mecanismo más probable para la explicación de la selectividad de la nitración de tirosinas puede ser la presencia de microambientes en la estructura secundaria o terciaria de la proteína que favorezcan su modificación. Así, la presencia de la tirosina diana en la proximidad de una carga negativa y su orientación expuesta al solvente, son dos características consistentes en muchos de los sitios de nitración descritos hasta la fecha (Ischiropoulos 2003). Sin embargo, se requiere del análisis estructural de mutaciones puntuales en dichas proteínas para establecer la importancia de estas características en la selectividad de la nitración de determinados residuos de tirosina.

En cuanto a la reversibilidad del proceso de nitración existen evidencias que implican diferentes procesos que dan lugar a la eliminación de la nitración de la proteína o de la proteína en sí. Las proteínas nitradas pueden volver a su estado normal mediante una actividad denominada denitrasa, que elimina el grupo nitro de la tirosina sin degradar o hidrolizar la proteína. Este tipo de actividad ha sido detectada en extractos de diferentes tejidos y organismos y es sensible a altas temperaturas, a tripsina y se mantiene tras pasar el extracto por filtros de 10 KDa, indicando una posible naturaleza proteica de la actividad (Kamisaki et al., 1998; Kuo et al., 1999; Schopfer et al., 2003; Irie et al., 2003). Sin embargo, la enzima o enzimas implicadas en dicha actividad son todavía desconocidas.

Alternativamente, las proteínas nitradas son detectadas y eliminadas mediante la acción de diferentes proteasas o por la activación de la ubiquitinación y posterior degradación de proteínas por el proteasoma (Ischiropoulos y al-Mehdi 1995; Souza et al., 2000; Kotamraju et al., 2003). Además, la persistencia de la forma nitrada de determinadas proteínas da lugar a una respuesta inmune en modelos animales. Anticuerpos frente a estas proteínas modificadas y no frente a las no modificadas son generados por el organismo para su posterior procesamiento. Recientemente, se ha demostrado que algunos péptidos nitrados desencadenan una fuerte respuesta inmune en ratones incapaces de establecer el mismo tipo de respuesta frente a los péptidos nativos (Birnboim et al., 2003). Estos hechos sugieren que la nitración de proteínas puede inducir una respuesta inmune frente a proteínas del propio organismo, teniendo una influencia importante sobre los desórdenes autoinmunes e inflamatorios.

Por otro lado, el efecto más estudiado de la nitración es la modulación de la actividad y/o función de las proteínas diana. Ha sido descrito extensamente que la nitración es capaz tanto de reducir como de incrementar la actividad de diferentes proteínas (Fujita et al., 2009; Zaragoza et al., 2009; Sharov et al., 2009; Curry-McCoy et al., 2009; Zhou et al., 2009; Xu et al., 2009; Fujisawa et al., 2009; Barbosa-Sicard et al., 2009), así como su localización (Yakovlev et al., 2010) o su interacción con otras proteínas (Kasina et al., 2005; Mallozzi et al., 2009; Li et al., 2010), representando un mecanismo muy eficiente en el control de la señalización celular. Además, puesto que la nitración puede tener lugar de manera espontánea, es un mecanismo muy rápido de respuesta y adaptación de la célula que no requiere de transcripción y traducción de proteínas.

En conjunto, la nitración de tirosinas parece ser un proceso específico que puede tener lugar a través de una amplia variedad de mecanismos bajo una escala de tiempo fisiológicamente relevante. Además, la identificación de la actividad denitrasa abre la posibilidad a la reversibilidad de este proceso. Estas características junto al indudable impacto sobre la actividad de las proteínas sugiere que se trata de una modificación post-traduccional con relevancia en la señalización de procesos fisiológicos.

Nitración de proteínas en plantas

Como ocurre con la nitrosilación de proteínas, gran parte de la información acerca de la nitración de tirosinas ha sido obtenida en modelos animales. Sin embargo, recientemente, se han descrito diferentes trabajos enfocados a caracterizar este tipo de modificación en plantas (Valderrama et al., 2007; Romero-Puertas et al., 2007; Corpas et al., 2008; Chaki et al., 2009b; Chaki et al., 2009a; Bechtold et al., 2009; Cecconi et al., 2009; Corpas et al., 2009). Parece que las hemoglobinas de plantas pueden facilitar la nitración *in vitro* de proteínas tal como ocurre en modelos animales (Sakamoto et al., 2004). De la misma forma, la nitración de proteínas ocurre en

respuesta a situaciones de estrés o tras la aplicación de peroxinitrito en plantas (Saito et al., 2006; Valderrama et al., 2007; Chaki et al., 2009a; Cecconi et al., 2009). Por otro lado, el número de proteínas nitradas identificadas en plantas es mucho menor que en modelos animales (Corpas et al., 2007). Basándose en la detección por Western-blot de proteínas separadas en geles bidimensionales mediante un anticuerpo que detecta 3-nitrotirosina y la posterior identificación de las proteínas inmunoreactivas, se han identificado 12 proteínas de *Arabidopsis* que ven incrementado su patrón de nitración en respuesta a la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* (Cecconi et al., 2009) y 21 proteínas de girasol que sufren el proceso de nitración bajo condiciones fisiológicas en ausencia de estrés (Chaki et al., 2009b). La gran mayoría de las proteínas identificadas regulan procesos del metabolismo como la RuBisCO, la Fructosa bifosfatasa y la S-adenosyl-homocisteína hidrolasa. Proteínas similares a 14-3-3 y calmodulina son las únicas identificadas con una potencial función en señalización (Chaki et al., 2009b). Curiosamente, ninguna de las proteínas nitradas identificadas tras la infección por *Pseudomonas syringae* se encuentra enmarcada dentro de las proteínas de respuesta a estrés (Cecconi et al., 2009), lo que se podría esperar tras el bien establecido papel del NO y de las especies reactivas de nitrógeno causantes de la nitración en las interacciones planta-patógeno (Delledonne et al., 1998; Saito et al., 2006; Besson-Bard et al., 2008a; Chaki et al., 2009a). Desgraciadamente, debido al reducido número de proteínas identificadas, no podemos especular acerca de la función de las proteínas nitradas en plantas y si estas regulan mayoritariamente el metabolismo, la señalización o la respuesta a estrés en modelos vegetales. Además, la falta de la identificación, mediante espectrometría de masas, del sitio de nitración en estas proteínas, es decir, la tirosina o tirosinas que sufren la modificación, solo nos permite hablar de estas proteínas como posibles proteínas nitradas y nos hace interpretar con cautela los resultados obtenidos mediante estos métodos.

Debido a la poca información acerca de las dianas de nitración en plantas, de la ausencia de identificación inequívoca de sitios de nitración, y del escaso análisis del impacto de la nitración de estas proteínas sobre su actividad, hemos desarrollado un método para el aislamiento, identificación y caracterización de proteínas nitradas en *Arabidopsis*.

RESULTADOS

Detección y purificación de proteínas nitradas *in vivo* en Arabidopsis

La nitración de proteínas es un fenómeno común en diferentes sistemas biológicos que tiene lugar de forma dependiente de la producción de NO (Bruckdorfer et al., 2005). En animales, la nitración tiene lugar preferentemente en la posición 3 del anillo aromático de los residuos de tirosina (Y) y puede ser detectada mediante anticuerpos contra 3-nitrotirosina (3-nitroY) (Franze et al., 2004). Hemos encontrado proteínas en extractos crudos de Arabidopsis que reaccionan con el anticuerpo anti 3-nitroY en todo el rango de pesos moleculares (Fig. 34A).

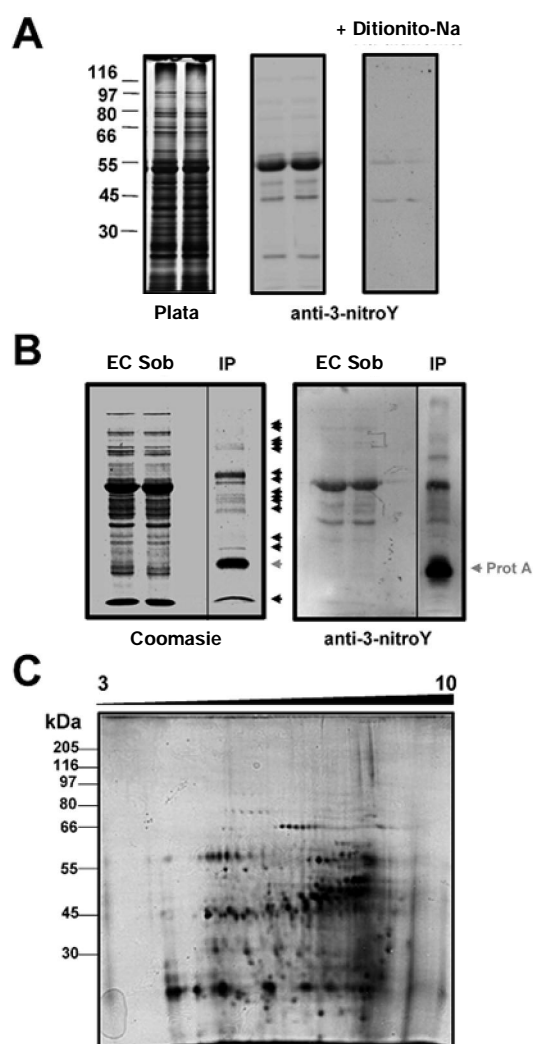


Figura 34. Detección e inmunoprecipitación de proteínas nitradas en Arabidopsis.

A. Extractos crudos de proteínas (10 µg por carril) se separaron en geles de 10% SDS-PAGE. El panel de la izquierda muestra el gel teñido con plata junto con la posición del marcador de pesos moleculares. El panel central muestra el Western-blot con anticuerpos anti-3-nitroY, y el panel de la derecha un duplicado del western donde se trató la membrana con 100 mM de ditionito sódico durante 30 min antes de la incubación con el anticuerpo anti-3-nitroY. B. Inmunoprecipitación de proteínas nitradas. El extracto crudo (EC) de proteínas se inmunoprecipitó con anticuerpos anti-3-nitroY. El sobrenadante (Sob) y la correspondiente fracción inmunoprecipitada (IP) se separaron en geles SDS-PAGE monodimensionales por duplicado y fueron teñidos con Coomassie (izquierda) o transferidos a una membrana e incubados con anticuerpos anti-3-nitroY (derecha). Las proteínas inmunoprecipitadas están marcadas con una flecha negra y la proteína A liberada tras la elución con una flecha gris. C. Gel 2D, en el rango de pH 3 – 10 en la primera dimensión y con 10% SDS-PAGE en segunda dimensión, donde se separaron 100 µg de proteínas inmunoprecipitadas, y se teñió con plata.

Además, la especificidad de la reacción del anticuerpo con los residuos de 3-nitroY de dichas proteínas se comprobó mediante la reducción de las proteínas con ditionito sódico, que reduce los residuos de 3-nitroY a 3-aminoY, tal como se ha descrito previamente (Miyagi et al., 2002), y que conlleva a la ausencia de reacción del anticuerpo con las proteínas mencionadas anteriormente (Fig. 34A). Una vez validada la especificidad del anticuerpo, se utilizó, junto con proteína A-agarosa, para inmunoprecipitar proteínas que contuvieran 3-nitroY en extractos crudos de plántulas de *Arabidopsis*. En la Figura 33B se muestra que un pequeño conjunto de proteínas presentes en los extractos crudos, menos de 20 bandas detectadas mediante la tinción con Coomassie, pudieron ser recuperadas en la fracción inmunoprecipitada. Se comprobó también que estas proteínas reaccionaban en Western-blot con los anticuerpos anti-3-nitroY (Fig. 34B) observando un enriquecimiento moderado de proteínas nitradas en la fracción inmunoprecipitada (Fig. 34B). Teniendo en cuenta la baja resolución de los geles monodimensionales y para intentar definir de forma más exacta el número y complejidad de las proteínas inmunoprecipitadas, éstas se separaron mediante electroforesis bidimensional (2-DE) y se visualizaron mediante la tinción con plata, resultando en la separación de alrededor de 450 spots con puntos isoeléctricos (pI) que comprendían desde pI 3 hasta pI 10 (Fig. 34C).

Ya que la nitración de proteínas requiere de la formación del agente nitrante, peroxinitrito, y puesto que éste es derivado de la reacción del NO con el ión superóxido (Fig 35), comprobamos en primer lugar, que tal y como ha sido descrito, existe una producción simultánea de ión superóxido y NO en condiciones fisiológicas en ausencia de estrés (Foreman et al., 2003; Gapper y Dolan 2006; Valderrama et al., 2007; Sandalio et al., 2008; Tsukagoshi et al., 2010). Para ello, teñimos raíces de plántulas silvestres con Azul de Nitrotetrazolio (NBT), que produce un color azulado en presencia de ión superóxido, y con la fluoresceína específica de NO, DAF-FM DA.

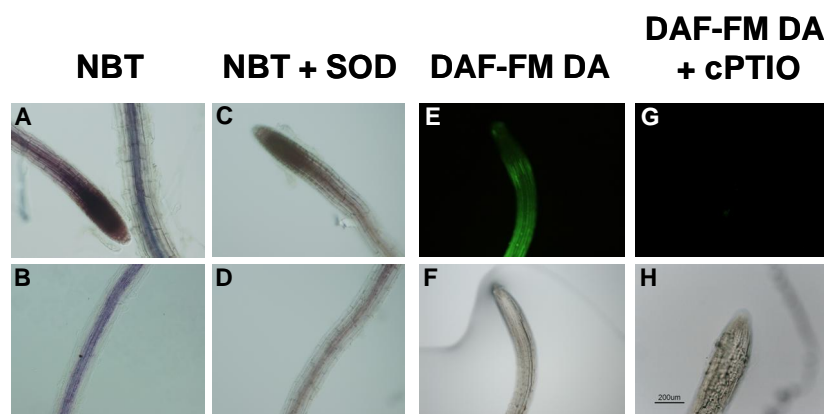


Figura 35. Detección de superóxido y NO en raíces de plántulas silvestres crecidas en condiciones estándar.

A,B. Se muestran diferentes zonas de raíces teñidas con NBT. C,D. Las raíces se trataron con 10 U/mL de superóxido dismutasa (SOD) antes de la tinción con NBT. Tinción de las raíces con DAF-FM DA en raíces pre-tratadas (G,H) o no (E,F) con cPTIO. Se muestran las raíces en fotos tomadas bajo iluminación UV (E,G) o en campo claro (F,H).

Así, comprobamos que existe una producción de ión superóxido y de NO en condiciones basales que se puede revertir mediante la aplicación del enzima Superóxido Dismutasa (SOD) o del secuestrador cPTIO para el ión superóxido y el óxido nítrico, respectivamente (Fig. 35). Posteriormente, analizamos de que manera cambios en la producción de NO pueden alterar el patrón en la nitración de proteínas (Fig. 36). Ha sido descrito que la aplicación exógena de ácido salicílico (SA) activa la producción de NO en raíces de *Arabidopsis* (Zottini et al., 2007, Fig. 36A). Mediante la tinción fluorescente con la fluoresceína no permeable y específica de NO, DAF-2, encontramos que el tratamiento con SA induce la síntesis de NO en plántulas completas de *Arabidopsis* y no solo en raíces (Fig. 36B). Además, la acumulación de NO se incrementó al menos hasta 24 horas tras el tratamiento con SA (Fig. 36B). La especificidad de la detección por el NO fue comprobada mediante la cuantificación de la fluorescencia tras añadir el secuestrador de NO cPTIO en presencia de SA, lo que provocó una clara bajada en la fluorescencia (Fig. 36A, B).

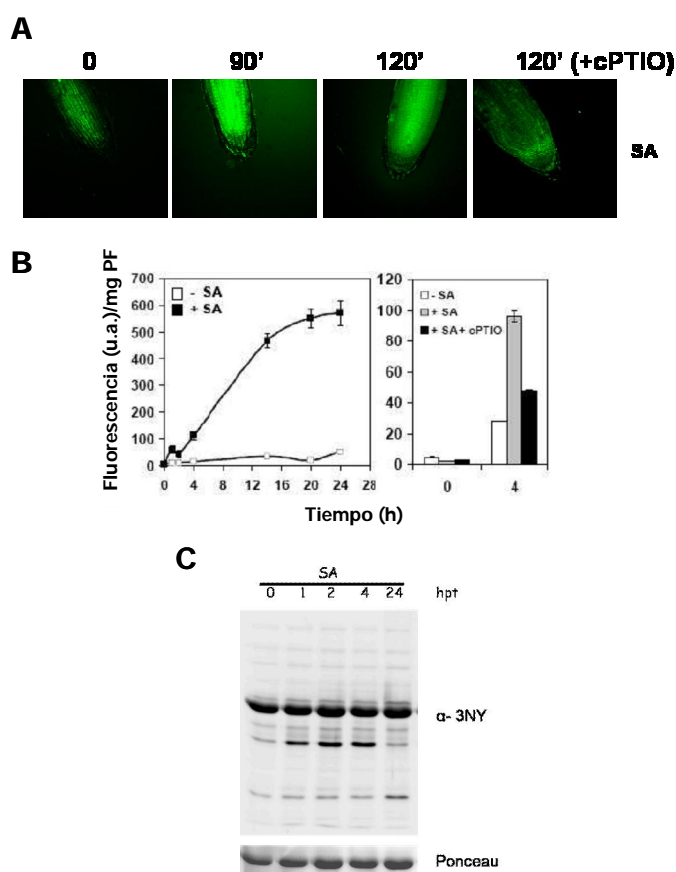


Figura 36. La producción de NO inducida por el SA se acompaña de un cambio en el patrón de proteínas nitradas.

A. Detección de la producción de NO, mediante la fluoresceína DAF-FM DA, en raíces de plántulas tratadas con 1 mM SA por los tiempos indicados. B. Detección de la fluorescencia asociada a la producción de NO a diferentes horas tras el tratamiento con SA (+SA, izquierda) y 4 horas tras un tratamiento control (-SA), 1 mM SA (+SA) o 1 mM SA + 250 μ M cPTIO (+SA+cPTIO) (derecha) mediante la fluoresceína no permeable DAF-2. La fluorescencia se midió por triplicado con ayuda de un fluorímetro. C. Western-blot con anticuerpos anti-3-nitro-Y (α -3NY) a diferentes horas después del tratamiento (hpt) con 1 mM SA.

Mediante análisis por Western-blot encontramos un cambio en el patrón de las proteínas nitradas en respuesta a SA, entre dos y cuatro horas después de tratar con la hormona (Fig. 36C). Esto indica que el patrón de proteínas nitradas es dinámico y responde a estímulos que promueven la producción de NO, pudiendo tener un potencial papel señalizador, tal y como ocurre en modelos animales.

Identificación de proteínas potencialmente nitradas

Para poder identificar potenciales dianas de nitración *in vivo* en *Arabidopsis*, la fracción inmunoprecipitada se analizó mediante espectrometría de masas (MS) siguiendo dos estrategias diferentes y complementarias. En primer lugar, se llevó a cabo un análisis tipo “*shotgun*”, basado en la utilización de metodologías de identificación masiva de proteínas (Steen y Mann 2004). En este caso se utilizó la cromatografía líquida para separar los diferentes péptidos provenientes de la mezcla compleja de proteínas y la posterior identificación de los mismos mediante espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS) que, junto con un último paso de búsqueda bioinformática, permiten asignar los diferentes péptidos identificados a diferentes proteínas con un alto nivel de probabilidad (Steen y Mann, 2004). De esta forma, analizamos la fracción inmunoprecipitada mediante los anticuerpos anti-3-nitroY y, una vez comparados los datos obtenidos por MS con la base de datos de SwissProt, especificando *Arabidopsis* como el organismo de estudio, se identificaron 127 proteínas con una puntuación estadísticamente significativa en el algoritmo desarrollado por MASCOT (score), mayor o igual a 35 y al menos dos péptidos identificados por asignación (Tabla III). Entre las proteínas identificadas, el 35% tienen homólogos previamente descritos como nitrados en organismos modelo diferentes de las plantas (Tabla S1), lo que sugiere que la aproximación es útil para la identificación de proteínas nitradas.

Tabla IV. Proteínas inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-3-nitro-Y e identificadas en plántulas de *Arabidopsis thaliana* mediante LC-MS/MS. Aquellas proteínas que han sido descritas previamente como nitradas en plantas han sido marcadas con * (Chaki *et al* 2009b) o § (Ceconi *et al* 2009). AGI, Iniciativa del Genoma de Arabidopsis, n.r., no redundantes.

SwissProt	AGI	Descripción	Score Mascot	Péptidos identificados (n.r.)	Mejores péptidos (Score de Ion)
ATPB_ARATH	AtCg00480	ATP sintasa, subunidad beta	1150	23	R.FVQAGSEVSALLGR.M (85) K.IGLFGGAGVVGK.T (80)
METE_ARATH	At5g17920	Metionina sintasa 1	1014	27	K.DEALFSANAAALASR.R (97) K.MLAVLEQNILWVNPDCGLK.T(91)
G3PB_ARATH	At1g42970	GAPDH B, cloroplástica	884	22	K.IVDNETISVDGK.L (85) R.KDSPLEVVLNDSGGVK.N (75)
G3PA_ARATH	At3g26650	GAPDH A, cloroplástica	831	18	R.VPTPNVSVVDLVVQVSK.K (68) K.KVIITAPGK.G (60)
RCA_ARATH	At2g39730	§ RuBisCo activasa, cloroplástica	761	20	R.GLAYDTSDDQDITR.G (81) R.VQLAETYLSQAALGDANADAIGR.G (72)

GOX1_ARATH	At3g14415	Glicolato oxidasa1	670	16	R.AASAAGTITLSSWATSSVEEVAST GPGIR.F (101) K.DIQWLQTITNMPILVK.G (58)
GOX2_ARATH	At3g14420	Glicolato oxidasa2	651	16	R.AASAAGTITLSSWATSSVEEVAST GPGIR.F (101) R.IPVFLDGGVR.R (52)
SAHH1_ARATH	At4g13940	* Adenosil homocisteinasa 1	581	18	K.VALLHLGK.L (55) R.DSAAVFAWK.G (54)
PGKH_ARATH	At1g56190	Fosfoglicerato kinasa, cloroplástica	542	14	K.LASLADLYVNDAFGTAHR.A (77) K.FAAGTEAIANK.L (75)
ATPA_ARATH	AtCg00120	§ ATP sintasa subunidad alfa	504	12	R.EAYPGDVFYLHSR.L (64) R.EQHTLIYDDLK.Q (62)
EFTU_ARATH	At4g20360	Factor de elongación Tu, cloroplástico	491	13	K.KYDEIDAAPEER.A (72) R.SYTVTGVEMFQK.I (54)
G3PC_ARATH	At3g04120	GAPDH C, citosólico	479	13	R.VPTVDVSVVDLTVR.L (71) K.KVVISAPSK.D (52)
CAHC_ARATH	At3g01500	Anhidrasa carbónica 1, cloroplástica	475	13	K.YGGVGAIEYAVLHLK.V (64) R.EAVNVSLANLLTYPFVR.E (60)
EF1A_ARATH	At1g07940	Factor de elongación 1-alfa	450	11	R.EHALLAFTLGVK.Q (103) K.FHINIVVIGHVDSGK.S (82)
ACT7_ARATH	At5g09810	Actina-7	448	12	K.SEYDESGPSIVHR.K (75) K.NYELPDGQVITIGAER.F (57)
ACT2_ARATH	At3g18780	Actina-2	430	12	K.NYELPDGQVITIGAER.F (57) K.AGFAGDDAPR.A (52)
KPPR_ARATH	At1g32060	Fosforibuloquinasa cloroplástica	418	13	R.LDELIYVESHLSNLSTK.F (55) K.ILVIEGLHPMFDER.V (52)
RUBB_ARATH	At1g55490	Subunidad larga, RuBisCO	389	13	R.GYISPYFVTDSEK.M (71) K.YEDLMAAGIIDPTK.V (52)
CAH2_ARATH	At5g14740	Anhidrasa carbónica 2	379	11	R.EAVNVSLANLLTYPFVR.E (60) K.VENIVVIGHSACGGIK.G (59)
TBA6_ARATH	At4g14960	Tubulina, cadena alfa-6	358	11	R.AVFVDLEPTVIDEVR.T (67) R.LVSQVISSLTASLR.F (50)
METK1_ARATH	At1g02500	S-adenosil metionina sintetasa 1	334	11	R.FVIGGPHGDAGLTGR.K (73) K.IIIDTYGGWGAHGGGAFSGK.D (64)
RUBA_ARATH	At2g28000	Subunidad larga, alfa, RuBisCO	331	11	K.VVNDGVTIAR.A (60) K.TNDSAGDGTTTASILAR.E (56)
METK2_ARATH	At4g01850	S-adenosil metionina sintetasa 2	326	11	R.FVIGGPHGDAGLTGR.K (73) K.IIIDTYGGWGAHGGGAFSGK.D (64)
GLNA2_ARATH	At5g35630	§ Glutamina sintasa, cloroplástica/ mitocondrial	314	10	K.VSGEVPWFGIEQEYTLQONVK.W (76) K.HETASIDQFSWGVANR.G (42)
SGAT_ARATH	At2g13360	Serina-glioxilato aminotransferasa	306	10	R.AALDLIFEEGLENIIAR.H (61) K.VFFDWNDYLK.F (42)
RBS1A_ARATH	At1g67090	Cadena pequeña 1A RuBisCO, cloroplástica	299	9	K.LPLFGCTDSAQVLK.E (71) K.EVDYLIR.N (46)
TBA3_ARATH	At5g19770	Tubulina cadena alfa-3/alfa-5	284	8	R.AVFVDLEPTVIDEVR.T (67) R.LISQISSLTTSR.F (65)
PORB_ARATH	At4g27440	Protoclorofilida reductasa B	263	12	R.LLLDDLK.K.S (53) K.GYVSETESGKR.L (46)
RBS1B_ARATH	At5g38430	Cadena pequeña 1B RuBisCO, cloroplástica	254	7	K.LPLFGCTDSAQVLK.E (71) K.EVDYLLR.N (46)
ILV5_ARATH	At3g58610	Cetoácido reductoisomerasa, cloroplástica	240	9	K.VSLAGYEEYIVR.G (44) K.APVSLDFETSVFK.K (43)
TBB4_ARATH	At5g44340	Tubulina cadena beta-4	226	8	K.LAVNLIPFPR.L (54) R.YLTASAVFR.G (35)
HSP71_ARATH	At5g02500	* Proteína de choque térmico 1, 70 kDa	217	10	R.MVNHFVQEFK.R (40) K.ATAGDTHLGGEDFDNR.M (35)
F16P1_ARATH	At3g54050	Fructosa-1,6- bisfosfatasa	214	10	R.TLLYGGIYGYPR.D (58) R.VLDIQPTEIHQR.V (42)
TBB2_ARATH	At5g62690	Tubulina cadena beta-2/beta-3	203	9	K.LAVNLIPFPR.L (54) R.AVLMDDLEPGTMDSLR.S (35)
TBB1_ARATH	At1g75780	Tubulina cadena beta-1	193	8	K.LAVNLIPFPR.L (54) R.AVLMDDLEPGTMDSLR.S (35)

PGMP_ARATH	At5g51820	Fosfoglucomutasa, cloroplástica	173	9	K.SLPTKPIEGQK.T (30) K.LPFFEVPTGWK.F (26)
P2SAF_ARATH	At5g23120	Factor de estabilidad/ensamblaje del Fotosistema II HCF136	172	8	R.ADGGLWLLVR.G (40) K.GTGITEEFEEVPVQSR.G (34)
HSP73_ARATH	At3g09440	* Proteína de choque térmico 3, 70 kDa	172	7	R.MVNHFVQEFK.R (40) K.ATAGDTHLGGEDFDNR.M (35)
APX1_ARATH	At1g07890	L-ascorbato peroxidasa 1, citosólica	161	5	K.EGLLQLVSDK.A (44) K.QMGLSDKDIVALSGAHTLGR.C (35)
MTDH_ARATH	At4g39330	Probable Manitol deshidrogenasa	139	5	K.NYGGYSENVVDQR.F (47) K.NYGGYSENVVDQR.F (34)
CD48A_ARATH	At3g09840	Proteína de control de la división celular de 48 A	120	6	R.KGDILFLVR.G (29) R.IVSQLLTMDGLK.S (29)
GME_ARATH	At5g28840	GDP-manosa 3,5-epimerasa	112	5	R.SFTFIDECVEGVLR.L (43) K.KLPIHHIPGPEGVR.G (31)
GBLP_ARATH	At1g18080	Proteína de unión a Guanin nucleótido, subunidad beta	103	4	R.LWDLAAGVSTR.R (42) K.DGVVLLWDLAEGK.K (27)
CLPP_ARATH	AtCg00670	Clp proteasa ATP-dependiente	99	2	R.SPGEGDTSWVDIYNR.L (70) R.TGKPIWVISEDMER.D (30)
GCST_ARATH	At1g11860	Aminometiltransferasa, mitocondrial	99	5	K.GGDVSWHIHDER.S (25) R.AEGGFLGADVILQQLK.D (24)
AAT5_ARATH	At4g31990	Aspartato aminotransferasa, cloroplástica	98	5	K.ATAELLFGAGHPVIK.E (27) R.VATIQLSGTGSRLR.L (24)
ACA9_ARATH	At3g21180	ATPasa 9 de transporte de Ca, membrana plasmática	98	7	R.VAIDSMAN.N (28) R.QAALVLNASRR.F (21)
RH56_ARATH	At5g11200	DEAD-box RNA helicasa ATP-dependiente 56	97	5	K.LSEMEKNR.K (30) K.VSVFYGGVNIK.I (25)
ENO_ARATH	At2g36530	Enolasa	96	6	K.AGAVVSGIPLYK.H (30) K.LAMQEFMILPVGAASF.K.E (30)
MRP7_ARATH	At3g13100	Proteína asociada a la resistencia de multidrogas 7	86	7	R.YGPHLPMVLRGLTCTFR.G (20) R.GIEAGWLK.K (17)
AFB3_ARATH	At1g12820	F-Box de señalización de auxinas 3	84	6	R.LWILDSIGDK.G (23) R.LMSCAPQLVDLGVGSYENEPDPESF AK.L (17)
PDX13_ARATH	At5g01410	Proteína de biosíntesis de piridoxal	79	4	K.VGLAQMLR.G (43) R.NMDDDEVFTFAK.K (14)
PDX11_ARATH	At2g38230	Proteína de biosíntesis de piridoxal	75	3	K.VGLAQMLR.G (43) K.IAAPYDLVVQTK.E (20)
EFTM_ARATH	At4g02930	Factor de elongación Tu, mitocondrial	75	2	R.GSALSALQGTNDEIGR.Q (49) K.LMDAVDEYIPDPVR.V (26)
MDR11_ARATH	At3g28860	Proteína de resistencia a multidrogas 11 (glicoproteína -P 19)	73	6	K.SSVIAMIER.F (24) R.AVLKNPTVLLLDDEATSALDAESECVLQEALERLMR.G (22)
MDHP_ARATH	At3g47520	Malato deshidrogenasa, cloroplástica	70	3	K.DVNVVVIPAGVPR.K (35) K.LFGVTTLDVV.R.A (22)
SR54C_ARATH	At5g03940	Partícula de reconocimiento de señal de 54 kDa, cloroplástica	70	5	R.GVKPDQQLVK.I (16) R.QEDAEDLQKK.I (16)
MDHG1_ARATH	At5g09660	Malato deshidrogenasa,	70	3	R.TGAEEVYQLGPLNEYER.I (31) K.LLGVTTLDVAR.A (30)

		glioxisomal			
TAF1B_ARATH	At3g19040	Subunidad 1-B del factor de iniciación de la transcripción TFIID	69	7	R.ENLKQLNSDARGR.L (20) K.EIGTPICQMKKILK.E (17)
TYW23_ARATH	At4g04670	Proteína de síntesis de tRNA de wibutosina	69	5	R.ADPLNILNDVWR.L (24) K.RVIIAIRCSIR.M (15)
CATA3_ARATH	At1g20620	Catalasa-3	69	3	R.LGPNYLQLPVNAPK.C (32) K.GFFEVTHTDISNLTCADFLR.A (28)
KASC1_ARATH	At5g46290	3-oxoacil-[proteína portadora de acilo] sintasa I, cloroplástica	68	3	K.LLGSGESISLIDR.F (53) R.ADGLGVSSCIER.C (9)
ATPG1_ARATH	At4g04640	Cadena 1 de la ATP sintasa gamma, cloroplástica	68	2	R.ALQESLASELAAR.M (52) R.ASSVSPLQASLREL.R.D (16)
GRP7_ARATH	At2g21660	Proteína de unión a RNA rica en glicina 7	66	1	R.ALETAFAQYGDVIDSK.I (66)
FDH_ARATH	At5g14780	Formato deshidrogenasa, mitocondrial	66	5	R.QAVVDVAVESGHIGGYSGDVWDPO PAPK.D (18) R.LQMAPELEK.E (17)
HSP83_ARATH	At5g56010	* Proteína de choque término 81-3	62	5	K.GIEVLYMVDAIDEYAIGQLK.E (21) K.EGQNDIFYITGESK.K (16)
TGA2_ARATH	At5g06950	Factor de transcripción TGA2	61	4	K.LTQLEQELQR.A (19) R.LQTLQQMIR.V (15)
TCPA_ARATH	At3g20050	Subunidad alfa de la proteína 1 del complejo T	61	6	R.NKIHPTSIISGYR.L (19) R.GANDYMLDEMER.A (15)
CAPP3_ARATH	At3g14940	Fosfoenolpiruvato carboxilasa 3	60	4	K.LLVSEDLWAFGEKLR.A (22) K.RLVSDLGK.S (15)
WRK19_ARATH	At4g12020	Factor de transcripción WRKY 19	60	6	K.CTYLGCPSKRK.V (19) K.LCQVEGCQKGAR.D (16)
THI4_ARATH	At5g54770	Enzima de biosíntesis de tiazol, cloroplástica	59	2	K.HAALFTSTIMSK.L (33) K.ALDMNTAEDAIVR.L (26)
OMT1_ARATH	At5g54160	Quercetina 3-O-metiltransferasa 1	59	2	K.NPEAPVMLDR.I (34) K.VLMESWYHLK.D (25)
IF5A2_ARATH	At1g26630	Factor de iniciación de la traducción de eucariotas (eIF-5A)	59	2	K.LPTDDGLTAQMR.L (33) K.CHFVAIDIFTAK.K (26)
PKL_ARATH	At2g25170	Factor de remodelación de la cromatina PICKLE	58	6	K.GLLHPYQLEGLNFLR.F (19) K.AYKSNHRLK.T (14)
Y1934_ARATH	At1g09340	Proteína cloroplástica no caracterizada	57	3	K.SSLSAEGFDVVYDINGR.E (26) R.FIGLFLSR.I (16)
VIN3_ARATH	At5g57380	Proteína de insensibilización a la vernalización 3	56	5	R.GIVNRLSSGVHVQKLCSQAMEALD K.V (27) R.NEIMKIICAEMGKER.K (14)
PME4_ARATH	At2g47030	Pectinesterasa-4 (proteína 1 tipo VANGUARD1)	54	6	K.AVQGCQSTSDKASCVK.T (16) K.NTAGPMGHQAAAIRVNGDRAVIFN CR.F (12)
APT1_ARATH	At1g27450	Adenina fosforibosiltransferasa 1 (APRT 1)	54	3	R.AIIIDDLIATGGTLAAAIR.L (35) K.DTIALFVDR.Y (15)
DRL19_ARATH	At1g63350	Putativa proteína de resistencia At1g63350	54	4	R.NAELQRLCLCGFCSKSLTTSYR.Y (17) K.MCLLYCALFPEDAK.I (16)
FABG_ARATH	At1g24360	3-oxoacil-[proteína portadora de acilo] reductasa, cloroplástica	54	3	K.WGTIDVVVNNAGITR.D (25) K.ILGTIPLGR.Y (19)
BSL1_ARATH	At4g03080	Ser/Thr-protein	53	4	K.IICMHGGIGR.S (16)

		fosfatasa BSL1			R.HGAASVGIRIYVHGGLR.G (16)
PER9_ARATH	At1g44970	Peroxidasa 9	52	3	K.AYAEDELRFFQQFAK.S (26) K.EPRMAASLLR.L (13)
UPL1_ARATH	At1g55860	E3 ubiquitin-protein ligase UPL1	52	5	K.LLSDIVLMYSHGTSVILR.R (20) R.LIDFDNKKAYFR.S (16)
HDA5_ARATH	At5g61060	Histona deacetilasa 5	51	3	R.KVGLIYDETMCK.H (24) K.LQLAGVSQR.C (18)
HAC12_ARATH	At1g16710	HAC12, Histona acetiltransferasa	51	5	K.LTTHPSLADQNAQNK.E (14) K.ASGQSDFSGNASK.D (13)
MRP14_ARATH	At3g59140	Proteína asociada a la resistencia a multidroga 14	50	7	R.IATFLEAPELQGGERRR.K (16) R.VVAVENPTKPKV.E (11)
ASHH2_ARATH	At1g77300	Histona-lisina N-metiltransferasa ASHH2	50	6	K.ILPRPRPR.M (13) K.SPSENGSHLIPNAKKAK.H (13)
ATM_ARATH	At3g48190	Ser/Thr-proteína quinasa ATM (PI3Kc_related)	47	8	R.RVLLQILGCEKCTMQHLLQSASLLR.K (14) K.QIPMAQLHENEGRK.S (11)
FBX10_ARATH	At1g51290	Putativa F-box 10	47	4	R.LVICCYDETQQVYIYIVRR.N (16) K.YVIGYDNKK.R (14)
PSBP1_ARATH	At1g06680	Proteína intensificadora de la evolución de oxígeno 2-1, cloroplástica	45	3	K.TNTDFLPYNGDGFK.V (25) K.EIEYPGQVLR.F (12)
CHLD_ARATH	At4g18480	Magnesio-quelatasa subunidad D, cloroplástica	45	3	K.IYKAGMSLLVIDTENK.F (26) R.VAAVGIATQFQERCNEVFR.M (22)
FBK38_ARATH	At2g29800	Putativa F-box/Kelch	44	3	K.MANFGGKLVILGCYR.S (20) R.HLRNMKR.D (16)
GLYM_ARATH	At4g37930	Serina hidroximetiltransferasa, mitocondrial	44	4	R.GFVEEDFAK.V (22) K.VLEAVHIASNK.N (11)
SCP37_ARATH	At3g52010	Serina carboxipeptidasa 37	44	3	K.AIHANTTK.L (19) K.KLPGQPSGVSR.Q (18)
COL14_ARATH	At2g33500	Proteína tipo Constans 14	44	3	K.LCLPCDQHVHSANLLSR.K (20) K.SNNIPAAIHSK.S (14)
SYV_ARATH	At1g14610	Valil-tRNA sintetasa	43	7	K.SDLFKADAK.S (16) K.INLDILRVVGYR.Q (13)
DRP1D_ARATH	At2g44590	Proteína relacionada con la dinamina-1D	43	3	R.MQCAKRLELYK.K (22) R.MGSEYLAK.L (14)
VATB_ARATH	At1g76030	ATP sintasa subunidad B, vacuolar	43	3	R.NIFQSLDLAWTLR.I (16) R.KFVMQAYDTR.N (15)
SIZ1_ARATH	At5g60410	Proteína E3 SUMO-ligasa SIZ1	42	5	K.WQPCICK.N (15) R.HRSLNKICILCAGK.N (12)
HAC2_ARATH	At1g67220	HAC2, Histona acetiltransferasa	42	4	R.ACTGCYTKNRTL.R.H (16) K.LGTVVDDIIEPMKCDER.S (11)
TMK1_ARATH	At1g66150	Putativo receptor tipo quinasa TMK1	42	4	K.GNDPCTNWIGIACSNGNITVISLEK.M (18) K.VVNLTNHLLQGPVPVFK.S (12)
SYM_ARATH	At4g13780	Probable metionil-tRNA sintasa	42	3	R.LVEGSCPFEQCNYDSAR.G (26) K.CKVCQNTPR.I (12)
WEE1_ARATH	At1g02970	Proteína quinasa tipo-Wee1	41	3	R.AMPPCLK.N (19) K.LPLLPGHSLQLQLLK.T (15)
ARR12_ARATH	At2g25180	Regulador de la respuesta de dos componentes	41	5	-.MTVEQNLEALDQFPVGM.R.V (17) R.HCQYHVTTTNAQK.A (9)
CESA4_ARATH	At5g44030	Subunidad catalítica 4 de la Celulosa sintasa A	41	4	K.KAGAMNAMVR.V (22) K.SSLMSQKNFEKR.F (12)
AUR2_ARATH	At2g25880	Ser/Thr-proteína quinasa Aurora-2	41	3	R.LYGYFYDQKR.VYLYAVR.G (18) M.LYQAASEAAQK.R (14)
Y1838_ARATH	At1g18380	Proteína no caracterizada	41	3	R.YIMEDKACR.R (32) R.SSDSDEGCMKYAEIPMLR.S (8)

		At1g18380			
2AAA_ARATH	At1g25490	Ser/Thr-proteína fosfatasa 2A subunidad reguladora A alfa	41	4	R.LAGGEWFAAR.V (17) R.RAAASNLGK.F (11)
FBK84_ARATH	At4g19865	Proteína F-box/kelch At4g19865	40	3	K.IEFGNVNEMCAYDTKLCK.W (20) K.IYVMGGCQGLKDEPWAEVNTK.T (10)
MSH3_ARATH	At4g25540	Proteína de reparación de DNA MSH3	40	4	R.LVNAGYKIGVVK.Q (17) R.LVNAGYK.I (13)
DCDA1_ARATH	At3g14390	Diaminopimelato descarboxilasa 1, cloroplástica	39	1	R.DAAVLMIEYIDEIR.R (39)
GL25_ARATH	At5g26700	Probable proteína tipo germina, subfamilia 2-5	39	3	R.IDYAPNGLNPPHVHPR.A (17) K.LPGLNTLGLSMSR.I (14)
CYSK1_ARATH	At4g14880	Cisteína sintasa (OAS-TL A)	39	3	K.IDGFVSGIGTGGTITGAGK.Y (21) R.IGFSMISDAEK.K (15)
MRP13_ARATH	At1g30410	Proteína de resistencia a multidroga 13	39	4	R.KKYNCVLGLLACYCVVEPVLR.L (22) R.SVLIKQEER.E (14)
ERG11_ARATH	At5g24150	Escualeno monooxigenasa 1,1	39	3	R.RLLQPLSNLGNQAQK.I (18) R.LFGLAMKMLVPHLK.A (13)
DPOLA_ARATH	At5g67100	Subunidad catalítica de la DNA polimerasa alfa	38	4	K.NGCNVLSIENSERALLNRLFLELNK.L (14) R.KRSGILSHFTVVR.N (13)
CWP17_ARATH	At2g06850	Proteína de pared celular de 23 kDa	38	3	-.IPCRKAIDVPFGTR.Y (19) R.KAIDVPFGPR.Y (13)
MOCOS_ARATH	At1g16540	Sulfurasa del cofactor de Molibdeno (ABA3)	38	7	K.LLKSLSLTPSAIWMHTTSLSIYVK.K (12) R.YEIDEKR.Q (10)
ALA11_ARATH	At1g13210	ATPasa transportadora de fosfolípidos 11	38	5	K.SLTYALEDDFKK.K (18) R.SMAMRSNGSSLVGDDLDVVVDQS GPK.I (10)
TAP1_ARATH	At1g70610	Proteína tipo transportador de péptidos antigénicos 1, cloroplástica	38	3	R.GCFFGIANMILVKRMR.E (16) R.QRIGYVVGQEPK.L (12)
AGO1_ARATH	At1g48410	Argonauta	37	2	R.INLLDEEVGAGGQR.R (36) R.GYGQPPQQQQYGGPQEQYQGRG.R (4)
FBK19_ARATH	At1g32430	Putativa proteína F-box/Kelch At1g32430	37	2	K.VEVRELTLNPNGLK.A (22) R.CIKLEVNEPSLDFLGIGYDNNK.R (14)
LUMI_ARATH	At4g02560	LUMINIDEPENDE NS	37	2	K.KHMLGSNPNSYNK.E (21) K.HDSSTHPYWNQNK.R (18)
CAPP1_ARATH	At1g53310	Fosfoenolpiruvato carboxilasa 1	36	2	K.LEELGSVLTSLDPGDSIVIAK.A (23) K.GIAAGLQNTG.- (14)
WBC16_ARATH	At3g55090	Probable proteína homóloga al complejo white-brown 16	36	2	K.TIIGDEGHR.G (29) R.ILFYLCLLLGSKNK.R (8)
CNGC4_ARATH	At5g54250	Canal iónico activado por nucleótidos cíclicos 4	36	3	R.IGLTCGGR.R (36) R.GVDECEMVQNLPEGLR.R (5)
U496I_ARATH	At2g18630	Proteína UPF0496 At2g18630	36	2	K.INSEYTEHLSSYER.A (21) K.YEKVVRGQK.E (13)
ARFM_ARATH	At1g34170	Factor de respuesta a Auxinas 13	36	2	K.FVDAMNNNYIVGSR.F (20) K.FVDAMNNNYIVGSR.F (16)
CYSKM_ARATH	At3g59760	Cisteína sintasa, mitochondrial (OAS-TL C)	35	3	K.IQGIGAGFIPK.N (15) R.IGYSMVTDAEQKGFISP GK.S (15)

Para validar nuestra identificación proteómica, llevamos a cabo la detección de varias de las proteínas identificadas mediante anticuerpos específicos en las muestras inmunoprecipitadas. Para ello seleccionamos algunas proteínas identificadas con score MASCOT mayor de 200, como la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), anhidrasa carbónica (CA) o fructosa-1,6-bifosfatasa (FBPasa) y otras con un score medio como la proteína de unión a RNA rica en glicina 7 (GRP7, score 66), el factor de remodelación de cromatina de tipo CHD3, PICKLE (PKL, score 58), y también la proteína O-acetilserina-tiol-liasa A1 (OAS-TL A1) que se identificó con uno de los scores más bajos (35) en este análisis. Todos los anticuerpos reaccionaron con proteínas en las muestras inmunoprecipitadas con anti-3-nitroY (Fig. 37) validando la identificación proteómica. En la Figura 37 se puede observar que para algunas proteínas como GAPDH o PKL que no muestran señal en el sobrenadante de la inmunoprecipitación, la mayoría de la proteína está asociada con la fracción inmunoprecipitada. Al contrario, la inmunoprecipitación es mucho menos eficiente para proteínas como FBPasa o CA, las cuales muestran una cantidad de proteína similar en el sobrenadante y en el extracto crudo, sugiriendo que las formas nitradas correspondientes no deben ser abundantes en la población total de los extractos crudos. La mayoría de proteínas analizadas presentaron un

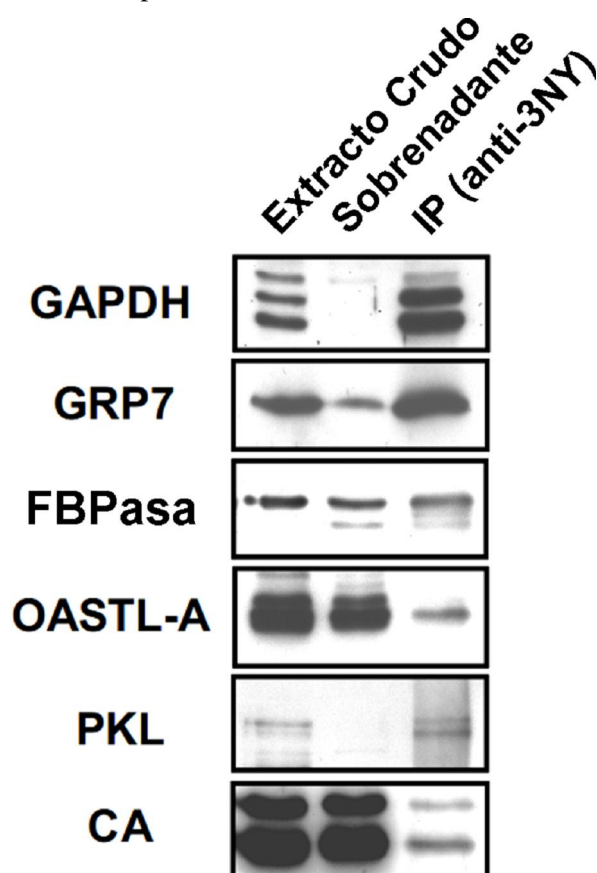


Figura 37. Validación de la identificación proteómica.

Los extractos crudos de proteínas fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-3-nitroY (anti-3NY). El extracto crudo, el sobrenadante y la fracción inmunoprecipitada se separaron, se transfirieron a membrana y se incubaron con anticuerpos contra las proteínas gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), proteína rica en glicina 7 (GRP7), fructosa bifosfatasa (FBPasa), O-acetilserina (tiol) liasa A1 (OASTL-A), Pickle (PKL) y anhidrasa carbónica (CA). Los carriles correspondientes al extracto crudo y al sobrenadante están cargados con un 1% de la proteína total utilizada para la inmunoprecipitación.

patrón complejo de bandas por Western-blot tanto en los extractos crudos como en las fracciones inmunoprecipitadas (Fig. S4). Esto puede deberse a diferentes modificaciones post-traduccionales de dichas proteínas o simplemente a reacciones inespecíficas de los anticuerpos. A pesar de identificar un buen número de proteínas, no encontramos ningún péptido nitrado que tuviera un espectro de MS/MS con un score suficientemente alto como para asignar algún sitio de nitración. Por tanto, las proteínas identificadas anteriormente solo pueden ser denominadas como putativamente nitradas. Para solucionar esto, y ya que la cantidad de proteína requerida para poder identificar sitios de nitración es siempre una limitación del método, las proteínas teñidas más abundantes en geles 2-DE resultantes de separar las proteínas inmunoprecipitadas, fueron extraídas de los geles, digeridas con tripsina y analizadas mediante espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF. En la tabla IV se muestran las proteínas identificadas, sus score MASCOT, el número de péptidos no redundantes identificados y la correspondiente cobertura de secuencia. Se identificaron 22 proteínas con un score MASCOT mayor de 59 que se consideró como estadísticamente significativo en el análisis.

Tabla V. Proteínas putativamente nitradas identificadas por MALDI-TOF.

Las muestras inmunoprecipitadas se separaron mediante geles 2-DE y se identificaron mediante MALDI-TOF como se describe en materiales y métodos. Se presenta la descripción, el identificador AGI, la masa teórica (Mr Teor), la masa experimental (Mr Exper), el score MASCOT, el número de péptidos no redundantes identificados (Péptidos n.r.) y la cobertura de secuencia para cada una de las proteínas identificadas.

Descripción	AGI	Mr Teor	Mr Exper	Mascot Score	Péptidos (n.r.)	Cobertura (%)
Ribulosa bisfosfato carboxilasa, cadena larga	AtCg00490	52.9	53.4	348	20	41
Ribulosa bisfosfato carboxilasa/oxigenasa activasa	At2g39730	52.0	52.3	251	14	50
Serina Hidroximetiltransferasa	At4g13930	51.7	52.1	238	11	25
Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, citosólica	At3g04120	36.9	37.0	176	11	49
Proteína tipo chaperona	At5g55220	61.7	62.1	120	11	27
Proteína motor de microtúbulos	At5g60930	145.2	44.4	101	17	11
Probable proteína de 125 Kda relacionada con la quinesina	At2g36200	119.3	120.4	81	23	26
Anhidrasa Carbónica cloroplástica	At3g01500	37.4	37.8	78	9	34
Hipotética proteína de 213.7 kDa ycf1.2	AtCg01130	213.7	214.6	77	25	12
Proteína de reparación de DNA RAD50	At2g31970	152.8	153.6	73	22	20
Putativa proteína de la matriz nuclear 1 (NMCP1-like)	At5g65770	121.2	121.8	70	21	17

Descripción	AGI	Mr Teor	Mr Exper	Mascot Score	Péptidos (n.r.)	Cobertura (%)
DNA topoisomerasa 1	At5g55300	102.8	103.2	69	19	18
Tim9	At3g46560	10.7	10.9	67	8	78
Proteína 60S ribosomal L3-1 (Protein EMBRYO DEFECTIVE 2207)	At1g43170	44.5	44.7	65	11	23
Proteína de la familia Glicosil hidrolasa 1	At5g25980	53.4	54.3	64	7	28
Proteína 7 de unión a RNA rica en glicina (GRP7)	At2g21660	16.8	16.9	64	9	78
Gliceraldehido-3-fosfato reductasa C-2	At1g13440	36.9	36.9	63	8	22
Putativa Transcetolasa	At3g60750	79.9	80.3	62	12	34
ARA-4	At2g43130	24.0	24.1	61	10	50
Probable proteína nuclear de unión a GTP 1	At1g50920	76.8	77.3	60	17	25
Probable manitol reductasa	At4g39330	38.9	39.3	59	8	26
AIG1	At1g33960	40.1	40.3	59	13	34
Factor de procesamiento rico en Arginina/serina RSP40	At4g25500	40.1	40.3	59	12	60

Desafortunadamente, no pudimos obtener ningún péptido nitrado con un espectro de MS/MS con suficiente score como para ser asignado con seguridad. Sin embargo, 6 de las 22 proteínas identificadas mostraron espectros de MALDI-TOF correspondientes a péptidos potencialmente nitrados con una ratio señal/ruido por encima de 25, valor significativo en dicho análisis. La identificación de péptidos nitrados y sus formas no modificadas, junto con el tamaño de los péptidos identificados (7 aminoácidos) hacen la identificación más fiable (Stevens et al., 2008). La Tabla V muestra la identidad de estas proteínas y los péptidos nitrados correspondientes con su valor de señal/ruido, la masa molecular del péptido modificado y no modificado encontrado en el mismo análisis y el correspondiente desplazamiento en masa correspondiente a la modificación de Y a nitroY. Tres de estas seis proteínas (Rubisco, Rubisco activasa y Transcetolasa) tenían péptidos nitrados que contenían una sola Y así que el desplazamiento en masa de +45 Dalton (Da) se podía asignar a dicha tirosina como un putativo sitio de nitración. En el caso de la Serina hidroximetiltransferasa, el péptido nitrado contenía dos residuos de tirosina y un desplazamiento de +90 Da lo que es compatible con dos sitios de nitración en dichas tirosinas.

Tabla VI. Putativos péptidos nitrados identificados por MALDI-TOF a partir de proteínas separadas mediante 2-DE.

Proteínas inmunoprecipitadas con anti-3-NY se separaron en geles 2-DE y, tras tinción con Deep-Purple las proteínas más abundantes se identificaron mediante MALDI-TOF como se describe en Materiales y Métodos. Los identificadores de la iniciativa del genoma de Arabidopsis (AGI) de cada proteína identificada se incluyen junto a la secuencia del péptido nitrado correspondiente. Subrayados aparecen los residuos susceptibles de nitración y caracteres en negrita indican una asignación de nitración inequívoca. Se muestra el Error (diferencia entre las masas calculadas y las experimentales), la ratio Señal/Ruido, la masa molecular relativa (Mr) observada para los péptidos modificados y los respectivos no modificados, que aparecieron en la misma búsqueda Mascot. Valores entre paréntesis indican la ausencia del péptido no modificado. Se muestra también el Desplazamiento, en Daltons, y las modificaciones de los péptidos correspondientes con sus incrementos en masa entre paréntesis. Aquellas proteínas que han sido previamente reportadas como nitradas en plantas han sido marcadas con * (Chaki et al., 2009b) o ** (Cecconi et al., 2009).

Descripción	AGI	Secuencia del Péptido	Error	Señal/Ruido	Mr (obs) (no modificado)	Mr (obs)	Desplazamiento	Modificación
Rubisco activasa**	At2g39730	³⁵¹ R.VYDDEVR.K ₃₅₉	0.01	110	895.34	940.41	+45	Nitro-Y (+45)
		⁷² R.GLA ^Y DTSDDQ QDITR.G ₈₈	-0.05	25	1697.66	1744.66	+47	2 Deaminación (+2) Nitro-Y (+45)
Serina Hidroximetil transferasa	At4g13930	¹⁶⁰ K.VNFTTGYIDY DKLEEK.A ₁₇₇	0.03	60	1934.83	2025.92	+91	Deaminación (+1) 2 Nitro-Y (+90)
Transcetolasa, putativa*	At3g60750	³³³ K.ANSY ^S VHGAA LGEKEVEATR.N ₃₅₄	0.15	57	(2090.15)	2135.15	(+45)	Nitro-Y (+45)
Gliceraldehido-3-fosfato reductasa, citosólica	At3g04120	³¹³ K.LVSWYDNEW GYSSR.V ₃₂₈	-0.06	50	1761.72	1806.72	+45	Nitro-Y (+45)
Probable manitol deshidrogenasa	At4g39330	¹³³ K.NYGGYSENIV VDQR.F ₁₄₈	-0.04	27	1613.63	1658.70	+45	Nitro-Y (+45)
Rubisco, cadena larga, precursor**	AtCg00490	²³⁶ K.GHYLNATAGT CEEMIK.R ₂₅₃	0.04	25	(1794.84)	1839.84	(+45)	Nitro-Y (+45)

Finalmente, para las otras dos proteínas, una GAPDH citosólica y una putativa Manitol deshidrogenasa, los péptidos nitrados contuvieron dos residuos de tirosina y un desplazamiento de +45 Da, correspondiente a un solo evento de nitración así que no se puede proponer un sitio de nitración inequívoco para estas proteínas (Tabla V).

Tras este análisis, se comprobó si los residuos de Y presentes en los péptidos nitrados cumplían los diferentes criterios para ser considerados como dianas de nitración, basados en las características comunes de los péptidos nitrados identificados en diferentes trabajos (Souza et al., 1999; Ischiropoulos 2003; Chaki et al., 2009b). Estos son, la proximidad a un aminoácido básico en la secuencia primaria, la exposición del anillo aromático de la Y a la superficie de la proteína, la localización de la Y en un bucle, su asociación con un residuo cargado negativamente en su proximidad en la estructura terciaria de la proteína, y la localización de la proteína en un compartimento subcelular que produzca agentes nitrantes (Souza et al., 1999; Ischiropoulos 2003;

Chaki et al., 2009b). Con la excepción de la Rubisco activasa, de la que se carece de algún modelo estructural depositado en las bases de datos, las estructuras de las proteínas se modelaron como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Todos los residuos de Y posiblemente nitrados se encuentran suficientemente cerca de un residuo cargado negativamente (a menos de 10 Amstrongs (Å) de la Y diana) y todos ellos tienen aminoácidos básicos flanqueando el residuo de Y (Tabla VI). Sin embargo, solo la Y337 y la Y135 de la Transcetolasa y la putativa Manitol deshidrogenasa, respectivamente, se encontraron en bucles y muchas de estas proteínas mostraron un índice de Área Accesible al Solvente (ASA) por debajo de 70 (Tabla VI), teniendo una baja probabilidad de estar expuestas al solvente.

Tabla VII. Características estructurales de las potenciales Y dianas de nitración en las proteínas identificadas por MALDI-TOF.

Se indica la anotación de la proteína y su código AGI junto con la posible Y nitrada. Los diferentes parámetros fueron calculados como se indica en Materiales y Métodos. El Área Accesible al Solvente (ASA) se calculó con el programa NetSurfP (Petersen et al., 2009)

Proteína/AGI	Posible Y Nitrada	Distancia a Asp(D)/Glu€	Amino ácidos básicos próximos en la secuencia primaria	Bucle	ASA
Rubisco activasa_ At2g39730	Y353	(sin modelo)	R351, R358, K359	(sin modelo)	5.45
	Y76		R72		79.13
Serina Hidroximetil transferasa_ At4g13930	Y167	5.99 Å a E342	K160, K172, K176	No	62.38
	Y170	5.04 Å a D197	K160, K172, K176	No	23.35
Transcetolasa, putativa_ At3g60750	Y337	9.01 Å a D268	K333, H340, K347	Si	66.16
Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, citosólica_ At3g04120	Y318	6.08 Å a D319	K313, R327	No	7.35
	Y324	6.61 Å a E321	K313, R327	No	19.17
Probable Manitol deshidrogenasa_ At4g39330	Y135	4.31 Å to E8	K133, R147	Si	34.66
	Y138	3.75 Å tu D53	K133, R147	No	13.55
Rubisco cadena larga, precursor_ AtCg00490	Y239	6.33 Å a E158	K236, H238, K252, R253	No	6.37

En cuanto a la proximidad de las proteínas al sitio de generación de especies nitrantes, la localización de todas las proteínas ha sido descrita en sitios previamente caracterizados como sitios de producción de NO y superóxido en plantas, como el apoplasto, la mitocondria y el cloroplasto (Corpas et al., 2001; Bethke et al., 2004a; Gupta et al., 2005; Jasid et al., 2006; Flores-Perez et al., 2008; Igamberdiev y Hill 2009). Además, el hecho de que algunos de los residuos de Y identificados como posiblemente nitrados estén altamente conservados en proteínas funcionalmente homólogas de otros organismos (Fig. S2), confiere una potencial relevancia

funcional a esta modificación post-traduccional como un mecanismo regulatorio de su actividad o función.

Para comprobar esto, estudiamos el impacto de un donador de peroxinitrito, como SIN-1, en la actividad de la proteína GAPDH. Así, confirmamos que el tratamiento de plantas con SIN-1 da lugar a la inhibición de la actividad GAPDH (Fig. 38). A pesar de los esfuerzos realizados para identificar sitios de nitración *in vivo* en las proteínas inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-3-nitroY, no hemos podido identificar ningún espectro de MS/MS correspondiente a ningún péptido nitrado. Esto puede explicarse por dos razones. Primero, la forma nitrada de las proteínas que se identificaron pudo ser muy poco abundante en las muestras analizadas haciendo la identificación por MS/MS extremadamente difícil. Segundo, la ausencia de péptidos nitrados identificados pudo ser el resultado de su naturaleza inestable bajo las condiciones utilizadas para el procesamiento de las muestras por MS. En cuanto a esto, ha sido descrito que el grupo nitro asociado a residuos de tirosina puede ser reducido a un grupo amino (Sarver et al., 2001; Tsumoto et al., 2010). Cuando se analizaron los datos obtenidos en los experimentos de espectrometría de masas correspondientes a los spots de los geles 2-DE, buscando la modificación post-traduccional aminoY en vez de nitroY, encontramos un espectro de MS/MS correspondiente al péptido LVSWYDNEWGYSSR (masa monoisotópica del péptido 1776,7631; score del ion 43; valor “*expect*” (0,00088) de la proteína GAPDH. Este péptido tiene un desplazamiento de masa de +15 Da compatible con una aminación en la Y318 (Fig. 38).

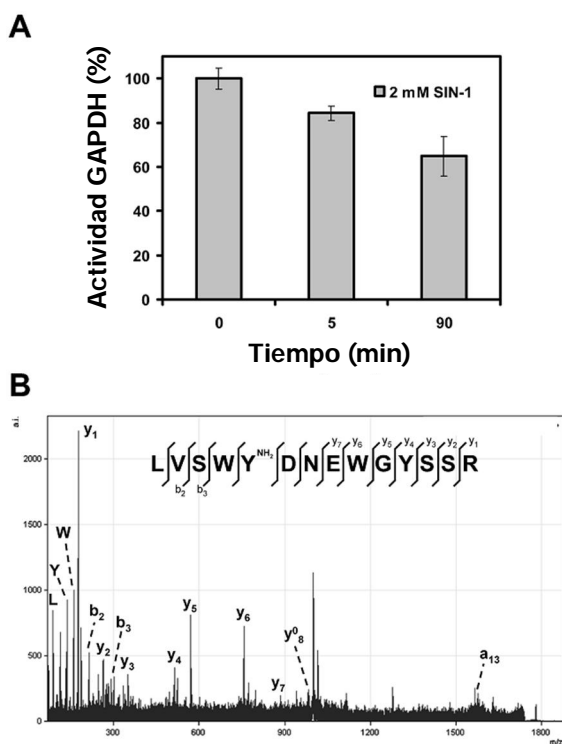


Figura 38. Efecto de la nitración de GAPDH.

A. Se midió la actividad GAPDH en plantas de Arabidosis tratadas con el donador de peroxinitrito, SIN-1, tras los tiempos indicados como se describe en Materiales y Métodos. Las medidas de actividad se realizaron por triplicado, representando los valores medios \pm desviación estándar. B. Espectro de MS/MS correspondiente al péptido aminado de la GAPDH, LVSWY*DNEWGYSSR. Se señalan los picos detectados de las series y y b así como los iones imonio de L, Y y W.

Este dato sugiere que de las dos tirosinas que encontramos como potenciales dianas de nitración en GAPDH (Tabla V), parte de la 3-nitroY318 puede haberse reducido a 3-aminoY318

en las condiciones del análisis por espectrometría de masas. Como la reducción puede darse en cualquiera de los residuos de nitroY, re-analizamos los datos de LC-MS/MS buscando la modificación aminoY y encontramos 51 posibles péptidos que contenían 3-aminoY con score de ión por encima de 15 que correspondían con 47 proteínas diferentes (Tabla S2). La comparación de las búsquedas con nitroY y con aminoY resultó en solo 5 péptidos con ambas modificaciones en el mismo residuo pero todos ellos tenían score de ión por debajo de 10, sugiriendo que la reducción parcial de nitroY puede reducir la abundancia de ambas modificaciones haciendo la identificación mediante MS todavía más difícil.

El análisis de ontología génica apunta a enzimas del metabolismo primario y proteínas estructurales del citoesqueleto como dianas generales de nitración en Arabidopsis

Usando las herramientas de ontología génica (GO), ProfCom, para el análisis de las proteínas identificadas como potencialmente nitradas, encontramos que la mayoría de las proteínas identificadas se localizan en orgánulos subcelulares asociados a membranas. Existe una sobrerrepresentación significativa de proteínas de la membrana de los tilacoides y del estroma de los cloroplastos, peroxisomas, mitocondrias y apoplasto entre las proteínas identificadas (Tabla VII). Cabe remarcar que estos orgánulos han sido todos ellos descritos como sitios donde se produce NO y superóxido en plantas (Corpas et al., 2001; Bethke et al., 2004a; Gupta et al., 2005; Jasid et al., 2006; Flores-Perez et al., 2008; Antonov et al., 2008; Igamberdiev y Hill 2009). En cuanto a la función molecular, las herramientas de GO apuntan a proteínas del citoesqueleto así como a proteínas con actividad ATPasa asociada al transporte de moléculas a través de la membrana plasmática como dianas generales de la nitración de proteínas en Arabidopsis (Tabla VII). Muchas de las proteínas identificadas están relacionadas con procesos biológicos como las respuestas a temperatura, luz o cadmio (Tabla VII). Además, más del 60% de las proteínas identificadas en nuestro análisis proteómico están relacionadas con el metabolismo primario. Entre estas proteínas, encontramos siete enzimas de la ruta de gluconeogénesis que dan lugar a la síntesis de sacarosa, así como cinco enzimas de la ruta de salida del ciclo de Calvin que da lugar a hidroxipiruvato (Tabla III). Aún más destacado, tres de los cuatro enzimas que participan en el ciclo de la síntesis de metionina se encontraron también en las muestras inmunoprecipitadas (Tabla III). Todos estos datos indican que las dianas de la nitración de proteínas, en condiciones basales, son, mayoritariamente, las proteínas estructurales y los enzimas del metabolismo primario.

Tabla VIII Enriquecimiento en categorías de Ontología Génica (GO) entre las proteínas**nitradas.**

El grupo de proteínas nitradas identificadas (Set A, dos proteínas de las 127 identificadas no estaban presentes en la base de datos) fue comparado con todo el genoma (Set B) con la herramienta ProfCom (<http://webclu.bio.wzw.tum.de/profcom/>; (Antonov et al., 2008) usando bases de datos de Arabidopsis.

Valor-P	SET A estadística	SET A tamaño	SET B estadística	SET B tamaño	Categoría y código	Nombre de categoría
Compartimento Celular						
2.1e-10	13	125	248	27072	<u>GO:0009535</u>	membrana del tilacoide
2.8e-10	10	125	114	27072	<u>GO:0005777</u>	peroxisoma
3.5e-09	11	125	200	27072	<u>GO:0009570</u>	estroma
9.6e-09	10	125	169	27072	<u>GO:0048046</u>	apoplasto
6.5e-08	18	125	866	27072	<u>GO:0005739</u>	mitocondria
Función Molecular						
2.4e-07	5	125	25	27072	<u>GO:0005200</u>	constituyente estructural del citoesqueleto
8.1e-06	6	125	98	27072	<u>GO:0042626</u>	actividad ATPasa acoplada a movimiento transmembrana de sustancias
Proceso Biológico						
1.8e-21	20	125	177	27072	<u>GO:0009409</u>	respuesta a frío
5.7e-08	8	125	107	27072	<u>GO:0009416</u>	respuesta a estímulo lumínico
1.1e-05	6	125	103	27072	<u>GO:0009408</u>	respuesta a calor
7.6e-05	6	125	150	27072	<u>GO:0046686</u>	respuesta a cadmio

Identificación del sitio de nitración de la Metionina Sintasa 1

Para solucionar la baja abundancia de las formas nitradas de las proteínas que podemos encontrar *in vivo*, una de las proteínas identificadas como potencialmente nitrada en nuestra

búsqueda, la 5-metiltetrahidropteroltriglutamato-homocisteina-S-metiltransferasa o Metionina sintasa 1 (AtMS1), se expresó etiquetada con 6 Histidinas (6xHis) en bacteria. La proteína se expresó a niveles altos tras 5 horas de inducción con IPTG. Tras examinar la expresión de la proteína en extractos crudos de la bacteria inducida mediante Western-blot con anticuerpos anti-His, se procedió a purificar la proteína mediante columnas de níquel. Tras purificar la proteína, se dividió en dos partes equivalentes nitrando una de las fracciones *in vitro* mientras que la otra se sometió a un tratamiento control. La eficiencia de la nitración se comprobó mediante Western-blot con anticuerpos anti-3-nitroY. No se detectó ninguna banda que reaccionara con el anticuerpo en el caso del tratamiento control mientras que una señal muy intensa se detectó en el tratamiento nitrante (Fig. 39A). Ambas muestras presentaron niveles comparables de la proteína recombinante como se pone de manifiesto en el Western-blot anti-His (Fig. 39A). Se realizó un duplicado del gel y se tiñó con Coomassie y la banda correspondiente a la proteína recombinante AtMS1 nitrada y no nitrada se recortó del gel, se digirió con tripsina y se analizó mediante LC-MS/MS. Encontramos el mismo péptido, YLFAGVVDGR, de la proteína no nitrada (masa molecular 1096,58; score MASCOT 85) y la nitrada (masa molecular 1141,54; score MASCOT 53), mostrando un desplazamiento de masa de 44,96 Da equivalente al típico desplazamiento correspondiente a una nitración (Fig. 39C). El espectro de MS/MS del péptido nitrado contiene la mayoría de los picos correspondientes a las series de iones γ y b junto con el correspondiente ión imonio nitrado de la Y287 (Fig. 39B). Estos datos permitieron la identificación inequívoca de un sitio de nitración en la proteína AtMS1 en el residuo Y287.

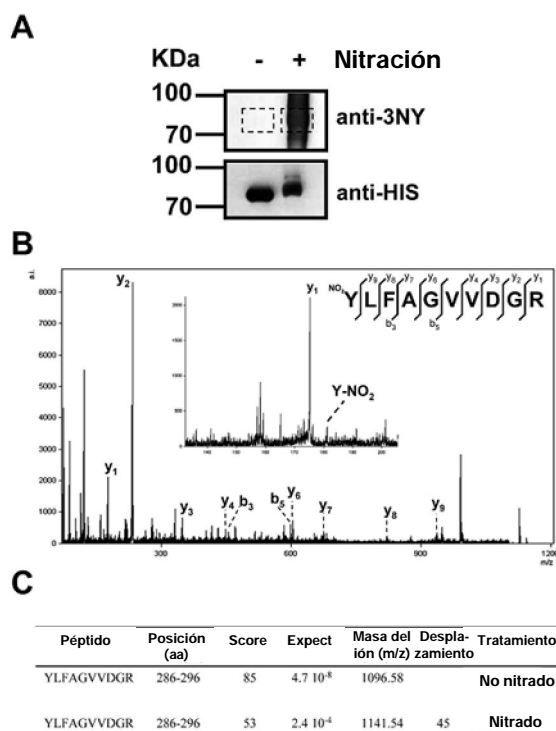


Figura 39. Identificación del sitio de nitración de la Metionina Sintasa 1 de Arabidopsis.

A. La misma cantidad de proteína (5 μ g) fue nitrada (+) o no (-), separada por SDS-PAGE, transferida a membrana e incubada con anticuerpo anti-3-NY. Tras revelar, se eliminó el anticuerpo unido y se rehibridó la membrana con anticuerpo anti-histidina (anti-HIS). Se muestra la posición de los marcadores de peso molecular. B. Espectro de MS/MS del péptido nitrado Y*LFAGVVDGR de AtMS1. La serie de iones γ y b se muestra junto con la ampliación del espectro mostrando el ión imonio de la Y nitrada. C. Tabla resumiendo los datos de MS correspondientes al péptido nitrado y no nitrado de AtMS1.

Si esta modificación post-traducciona altera la actividad enzimática de AtMS1, su localización subcelular u otras posibles modificaciones post-traduccionales requiere más trabajo que se realizará en un futuro. De todas formas, la Y287 está conservada dentro de las Metioninas Sintetas de plantas pero no en levaduras (Fig. S3A), y está localizada en un bucle de la parte externa de la proteína lejos de los sitios de unión del 5-metiltetrahydropteroylglutamato (THG) y de la homocisteína al centro catalítico (Fig. S3B). La Y287 forma un puente de hidrógeno con dos residuos cercanos, T262 y F264, que pueden tener un papel importante en el mantenimiento del correcto plegamiento de la proteína pero que no tienen un papel importante en la unión del sustrato ni de la función del cofactor. Sin embargo, ha sido descrito que la actividad metionina sintasa se regula por NO. El tratamiento con NO reduce la actividad metionina sintasa en diferentes sistemas modelo tanto *in vitro* (Brouwer et al., 1996; Nicolaou et al., 1996; Nicolaou et al., 1997) como *in vivo* (Danishpajoo et al., 2001), sugiriendo que la nitración en tirosina puede ser responsable de la reducción de la actividad mediada por NO de este enzima.

DISCUSIÓN

Aunque en la última década se han publicado varios trabajos sobre aproximaciones proteómicas para la identificación de proteínas nitradas en mamíferos (Aulak et al., 2001; Suzuki et al., 2005; Sultana et al., 2006; Hong et al., 2007; Zhang et al., 2007b), los primeros dos trabajos centrados en esta área, en plantas, no han sido publicados hasta mediados del 2009 (Cecconi et al. 2009; Chaki et al. 2009b). En estos trabajos, ambos grupos describen el uso de anticuerpos anti-3-nitroY para la detección de proteínas posiblemente nitradas por Western-blot y su posterior identificación por MALDI-TOF/TOF, identificando 8 y 21 proteínas, respectivamente (Cecconi et al. 2009; Chaki et al. 2009b). Sin embargo, no se identificó ningún péptido nitrado y por lo tanto, ningún sitio de nitración, en ninguno de estos dos trabajos, probablemente por el bajo nivel de nitración que se da en condiciones de ausencia de estrés (Chaki et al. 2009b), y por las limitaciones técnicas (Cecconi et al. 2009) tal y como argumentan los autores. En este trabajo, hemos puesto a punto una metodología proteómica para purificar e identificar proteínas nitradas *in vivo* en residuos de Y de *Arabidopsis thaliana*. El método se basa en la purificación de proteínas nitradas mediante inmunoprecipitación con anticuerpos anti-3-nitroY bien caracterizados anteriormente (Schmidt et al., 2003; Gokulrangan et al., 2007) y la posterior identificación de las proteínas por LC-MS/MS. Este procedimiento ha sido utilizado con éxito en la identificación de proteínas nitradas de mamíferos anteriormente (Turko et al., 2003; Zhan y Desiderio 2009; Liu et al., 2009a). El método es suficientemente sensible como para identificar 127 proteínas potencialmente nitradas en plántulas de Arabidopsis. Estos resultados, están en el rango de los mejores métodos proteómicos para la identificación de proteínas nitradas descritos en modelos animales (Suzuki et

al., 2005; Sultana et al., 2006; Hong et al., 2007; Zhang et al., 2007b), y representa la descripción más extensa del proteoma nitrado hasta la fecha en plantas. Mediante una búsqueda bibliográfica pudimos comprobar que alrededor del 35% de las proteínas identificadas en este trabajo han sido descritas como nitradas en otros organismos diferentes a las plantas (Tabla S1 y sus referencias), lo que apoya la utilidad de este método para identificar proteínas potencialmente nitradas. Además, el 50% y el 28% de las proteínas identificadas como posiblemente nitradas en los otros dos trabajos en modelos vegetales (Cecconi et al. 2009; Chaki et al. 2009b), respectivamente, han sido también identificadas en nuestro trabajo. Por otro lado, hemos validado algunas de nuestras identificaciones mediante la detección de las correspondientes proteínas en Western-blot con anticuerpos específicos (Fig. 37). Aunque la metodología presentada en este trabajo parece ser suficientemente fiable y robusta para ser considerada como un buen punto de partida para la caracterización de las proteínas nitradas de plantas, no encontramos ningún sitio inequívoco de nitración por MS/MS. Debido a la baja abundancia de los residuos de Y en las proteínas y a que los residuos nitrados de tirosina están restringidos a uno o dos por proteína (Abello et al., 2009), es de esperar un número muy pequeño de eventos de nitración. Así las proteínas más abundantes de geles 2-DE de muestras inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-3-nitroY se analizaron en la búsqueda de Y nitradas. De esta manera, identificamos péptidos nitrados de las proteínas GAPDH, RuBisCO; RuBisCO activasa, Manitol deshidrogenasa y Transcetolasa (Tabla V). Las identificaciones están basadas en los datos de huella peptídica obtenida por MALDI-TOF ya que no se encontró ningún espectro MS/MS de fragmentación que incluyera algún péptido nitrado. Se seleccionaron solo los péptidos con una ratio señal/ruido ≥ 25 y una diferencia entre la masa calculada y la experimental menor de 0.15 Da. Además, el análisis *in silico* de los péptidos nitrados mostró que la mayoría de ellos cumplían muchos de los criterios para ser considerados como dianas de nitración (Tabla VI). El análisis de Ontología Génica (GO) de las proteínas identificadas mostró una sobre-representación de proteínas localizadas en cloroplastos, peroxisomas, mitocondria y apoplasto, compartimentos subcelulares descritos previamente como sitios de producción de agentes nitrantes en plantas (Jasid et al. 2006; Flores-Pérez et al. 2008; Corpas et al. 2001; Bethke et al. 2004a; Gupta et al. 2005 e Igamberdiev y Hill 2009). Estos datos apoyan la idea propuesta anteriormente de que la proximidad de las proteínas al sitio de generación de agentes nitrantes supone un determinante de su nitración (Ischiropoulos 2003).

Además, la relevancia funcional de esta modificación post-traducciona l en dichas dianas es también apoyada por el hecho de que la mayor parte de los residuos de Y identificados como potencialmente nitrados están conservados en la secuencia de aminoácidos de proteínas homólogas de otros organismos (Fig. S2), apoyando así un posible efecto funcional de esta modificación. En el caso de la GAPDH, los dos residuos identificados como nitrados en el péptido LVS^WY*DNE^WGY*SSR no solamente están conservados en la GAPDH de conejo, sino que han sido identificados como nitrados en el péptido correspondiente de conejo LIS^WY*DNE^FGY*SNR

y, además, su nitración resulta en una pérdida completa de la actividad de dicha proteína (Palamalai y Miyagi 2010). Los modelos estructurales de GAPDH de rata y Arabidopsis solapan bastante, sobretodo en las Y nitradas (Fig. 40). Además, tal y como se ha descrito en levadura y en mamíferos (Buchczyk et al., 2000; Palamalai y Miyagi 2010), la actividad GAPDH de Arabidopsis también se inhibe por peroxinitrito (Fig. 38A).

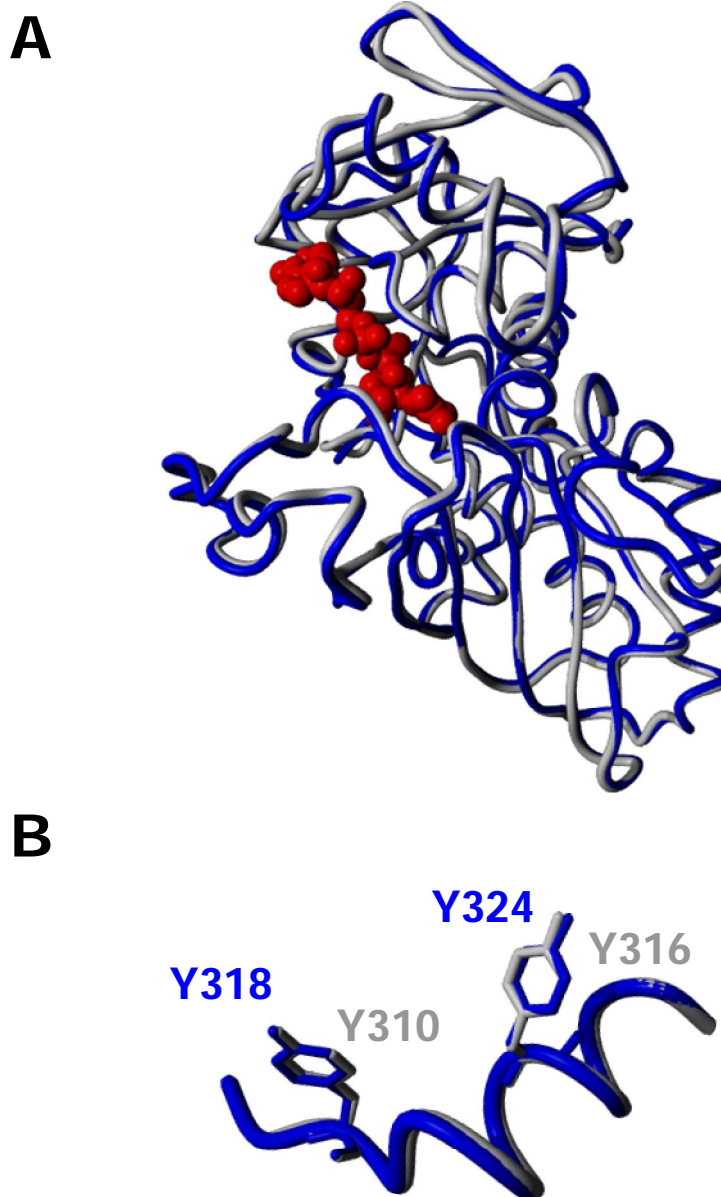


Figura 40. El alineamiento estructural de los modelos de la GAPDH de Rata y Arabidopsis muestra una clara conservación.

A. Alineamiento estructural de la proteína GAPDH completa de Rata (gris) y Arabidopsis (azul) con NAD unido (rojo).
B. Detalle mostrando el alineamiento de las Y310 y Y316 de la GAPDH de Rata (gris) y las Y318 y Y324 de Arabidopsis (azul).

Resulta interesante, que varias proteínas, que participan junto con GAPDH en la conversión gluconeogénica de malato a sacarosa, han sido también identificadas como posiblemente nitradas en este trabajo, sugiriendo un posible papel regulatorio de la nitración de Y en esta ruta metabólica. Entre las posibles proteínas nitradas, encontramos también tres enzimas relacionadas con la síntesis de metionina: la 5-metil-tetrahidropteril-triglutamato-homocisteinametiltransferasa, también denominada como metionina sintasa, la S-adenosilmetionina sintetasa 1 y la 2 y la S-adenosilhomocisteinasa 1. Ha sido descrito previamente que el NO puede inhibir la actividad metionina sintasa de mamíferos mediante la reacción con el cofactor cobalamina (Brouwer et al., 1996; Nicolaou et al., 1996; Nicolaou et al., 1997; Danishpajoo et al., 2001). De todas formas, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo, este modo de acción del NO es compatible con el mecanismo de control de la actividad metionina sintasa por nitración de Y clave de la proteína. Además, el hecho de que no solo un paso clave sino que la mayoría de las enzimas relacionadas con la síntesis de metionina sean dianas potenciales de nitración en *Arabidopsis* sugiere que la nitración de Y pueda representar un nivel importante de regulación para controlar la síntesis de este aminoácido en plantas. Además, la nitración de las S-adenosilmetionina sintasas 1 y 2 puede representar un importante punto de control sobre la síntesis de etileno. En cuanto a esto, ha sido descrito que la nitrosilación en cisteínas de la S-adenosilmetionina sintasa 1 resulta en una reducida actividad del enzima y en una menor producción de etileno en *Arabidopsis* (Lindermayr et al. 2006).

El hecho de que ni en este trabajo ni en los dos trabajos publicados previamente sobre la identificación de proteínas nitradas en plantas (Cecconi et al. 2009; Chaki et al. 2009b) se haya identificado ningún sitio de nitración de manera inequívoca necesita de una discusión en profundidad. Se sabe que la nitración de Y es una modificación post-traducciona muy poco abundante comparada con otras modificaciones post-traduccionales como la fosforilación (Abello et al. 2009). Además, es muy posible que en condiciones de ausencia de estrés, donde se producen cantidades muy pequeñas de NO y de ión superóxido y, por lo tanto, donde se producen pequeñas cantidades de peroxinitrito, se pueda esperar una baja abundancia de la nitración de Y. En cualquier caso, ya que la metodología presentada en este trabajo enriquece las muestras en proteínas que contengan 3-nitroY deberíamos esperar la identificación de péptidos nitrados por MS/MS. Una búsqueda en la bibliografía sobre la identificación de proteínas nitradas en diferentes organismos nos indica que solo se ha identificado un número muy pequeño de sitios de nitración, comparado con el número de proteínas nitradas identificadas, sugiriendo la existencia de dificultades técnicas asociadas a los análisis basados en MS de esta clase de modificación. Una posible explicación de la ausencia de nitroY en las muestras puede estar relacionada con las alteraciones producidas por los tratamientos que se realizan antes del análisis por espectrometría de masas o durante la ionización de los péptidos. Ha sido descrito que el tratamiento de proteínas nitradas con el reductor DTT acompañado por una temperatura elevada, como la que se usa para la

digestión de las proteínas con tripsina, puede reducir los residuos de nitroY a aminoY o a otras especies relacionadas (Soderling et al., 2007). Además, las energías de ionización utilizadas por los sistemas MALDI o ESI son demasiado agresivas para los residuos nitrados, habiendo sido documentada la descomposición fotoquímica inducida por láser de residuos de nitroY a aminoY durante los análisis de tipo MALDI (Sarver et al., 2001). Por tanto, la conversión de nitroY a aminoY durante el procesamiento de las muestras antes y durante el análisis MS puede explicar la ausencia de la detección de péptidos nitrados mediante MS/MS. Para validar esta hipótesis buscamos en nuestros datos proteómicos la modificación aminoY. Seleccionando aminoY como modificación variable en el análisis MASCOT de los datos en los experimentos de MALDI-TOF/TOF, encontramos un espectro de MS/MS correspondiente a un péptido que contenía aminoY correspondiente a la proteína GAPDH (Fig. 38B). Concretamente, encontramos un péptido que contenía aminoY318, sugiriendo que de los dos residuos de Y que encontramos como posiblemente nitrados en GAPDH (Tabla V), parte del residuo nitroY318 ha sufrido una reducción a aminoY318 durante las condiciones del análisis MS. Además, aunque no encontramos ningún espectro más de MS/MS correspondiente a péptidos con aminoY, encontramos alrededor de 50 péptidos que contenían potencialmente aminoY con un score MASCOT de ión mayor de 15 (Tabla S2). Esto confirma la hipótesis de que la ausencia de la identificación de péptidos nitrados en este trabajo, y probablemente en otros, puede ser debida a la conversión de nitroY a aminoY. Esta conclusión lleva a proponer la idea de buscar nitroY y aminoY como modificaciones variables en trabajos futuros donde se quieran identificar sitios de nitración en las proteínas. Eventualmente, la reducción de todos los residuos de nitroY a aminoY mediante un reductor como el ditionito sódico antes del análisis MS puede representar una ventaja en el análisis proteómico buscando directamente aminoY, o bien derivatizando la aminoY (por ejemplo con biotina) y buscando posteriormente los péptidos derivatizados por MS (Ghesquiere et al., 2009; Abello et al., 2010).

El método proteómico descrito en este trabajo representa una herramienta para identificar proteínas que sufren nitración en Y *in vivo* en plantas. La aplicación de esta metodología, con las mejoras descritas anteriormente, al análisis de diferentes procesos biológicos en plantas permitirá la identificación de proteínas nitradas en Y así como su sitio de nitración. Debido a la baja abundancia y a la limitada estabilidad de esta modificación post-traducciona, los datos obtenidos sugieren que tras la identificación de dianas de nitración *in vivo*, la confirmación de los sitios de nitración y las consecuencias funcionales deben ser realizadas mediante ensayos *in vitro* con cantidades mucho mayores de proteína modificada. Esto se ha puesto claramente de manifiesto con el estudio del impacto de la nitración sobre el enzima OAS-TL A1 que hemos realizado en colaboración con el grupo de Cecilia Gotor (IBVF, Sevilla). El impacto de la nitración en la actividad de esta proteína, identificada en primera instancia en este trabajo, mediante aproximaciones tanto *in vitro* como *in vivo* ha permitido describir la Y diana de la nitración, así como el mecanismo por el que dicha nitración reduce la actividad del enzima, representando el

primer trabajo en el que se ha identificado un sitio inequívoco de nitración con impacto funcional caracterizado en una proteína de plantas (Alvarez et al., 2011). En cualquier caso, las proteínas identificadas en este trabajo pueden representar nuevos nodos de un nuevo nivel de regulación todavía por explorar, llevado a cabo a través de la modificación post-traducciona l de proteínas mediada por NO. La caracterización en profundidad de las proteínas nitradas identificadas en este trabajo aportará más información sobre las características reguladoras del NO en muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas así como en procesos de respuesta a estrés.

DATOS SUPLEMENTARIOS

Tabla S1. Proteínas identificadas como putativamente nitradas en Arabidopsis y los correspondientes homólogos funcionales identificados como nitrados en otros sistemas diferentes a las plantas.

Se muestran las proteínas identificadas por LC-MS/MS en Arabidopsis (izquierda), los homólogos funcionales en otros sistemas (centro) y la referencia correspondiente (derecha).

Proteína identificada (AGI locus)	Proteína (Organismo)	Referencias
TCPA_ARATH (At3g20050)	subunidad alfa TCP-1 complejo-T polipéptido 1 (Rata; Humano)	Suzuki et al., 2005 Guesquière et al., 2009
G3PB_ARATH (At1g42970)	Gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasas (Humano; Rata)	Sultana et al., 2006 Guesquière et al., 2009
G3PA_ARATH (At3g26650)		
G3PC_ARATH (At3g04120)		
ATPA_ARATH (AtCg00120)	ATP sintasas (Humano ; Ratón)	Casoni et al., 2005; Sultana et al., 2006; Zhang et al., 2007
ATPB_ARATH (AtCg00480)		
ATPG1_ARATH (At4g04640)		
VATB_ARATH (At1g76030)		
CAHC_ARATH (At3g01500)	Anhidrasas Carbónicas (Humano)	Sultana et al., 2006
CAH2_ARATH (At5g14740)		
ENO_ARATH (At2g36530)	Enolasa (Ratón; Humano)	Casoni et al., 2005; Sultana et al., 2006
CATA3_ARATH (At1g20620)	Catalasa (Ratón)	Ghosh et al., 2006
PGKH_ARATH (At1g56190)	3-fosfoglicerato kinasa (Levadura; Humano)	Bacharach et al., 1977 Guesquière et al., 2009
ACA9_ARATH (At3g21180)	Ca-ATPasa (Rata)	Knyushko et al., 2005
HDA5_ARATH (At5g61060)	Histona deacetilase HDAC2 (células de mamífero)	Ito et al., 2004
ACT7_ARATH (At5g09810)	Actinas (células de mamífero; Ratón)	Casoni et al., 2005; Zhang et al., 2007
ACT2_ARATH (At3g18780)		
TBA6_ARATH (At4g14960)	Tubulinas (Cerdo; Humano; células de mamífero; Ratón)	Fiore et al., 2006; Zhang et al., 2007
TBA3_ARATH (At5g19770)		
TBB4_ARATH (At5g44340)		
TBB2_ARATH (At5g62690)		
TBB1_ARATH (At1g75780)		
GLNA2_ARATH (At5g35630)	Glutamina sintasa (Rata; Ratón)	Görg et al., 2006; Zhang et al., 2007
TYW23_ARATH (At4g04670)	t-RNA sintetasas (Humano)	Guesquière et al., 2009
SYV_ARATH (At1g67220)		
SYM_ARATH (At4g13780)		
HSP83_ARATH (At5g56010)	Proteína de choque térmico 90 (células de mamífero, Ratón)	Zhang et al., 2007
HSP71_ARATH (At5g02500)	Proteína de choque térmico 71-kDa (Ratón)	Casoni et al., 2005; Zhang et al., 2007
HSP73_ARATH (At3g09440)		
AAT5_ARATH (At4g31990)	Aspartato aminotransferasa (Vaca; Ratón)	DiCola et al., 1976; Zhang et al., 2007
MDHP_ARATH (At3g47520)	Malato:NADP+ oxidoreductasas (Paloma; Ratón, Humano)	Chang et al., 1980; Zhang et al., 2007 Guesquière et al., 2009
MDHG1_ARATH (At5g09660)		
RH56_ARATH (At5g11200)	RNA helicasa ATP-dependiente (Humano)	Guesquière et al., 2009
FBX10_ARATH (At1g51290)	Proteínas F-Box (Humano)	Guesquière et al., 2009
FBK84_ARATH (At4g19865)		
FBK19_ARATH (At1g32430)		
EF1A_ARTH (At1g07940)	Factor de Elongación 1-alfa (Humano)	Guesquière et al., 2009
PGMP_ARATH (At5g51820)	Fosfoglucomutasa (Conejo)	Layne et al., 1979
2AAA_ARATH (At1g25490)	Ser/Thr-protein fosfatasa (Humano)	Guesquière et al., 2009
IF5A2_ARATH (At1g26630)	Factor de iniciación de la traducción eucariótico (Humano)	Guesquière et al., 2009
PGKH_ARATH (At1g56190)	PGK1 (Ratón)	Zhang et al., 2007
WBC16_ARATH (At3g55090)	Transportador ABC (Humano)	Guesquière et al., 2009
GBLP_ARATH (At1g18080)	Proteína beta de unión a guanina (Humano; Ratón)	Guesquière et al., 2009 Zhang et al., 2007
DRP1D_ARATH (At2g44590)	Dinamina (Ratón)	Zhang et al., 2007
SCP37_ARATH (At3g52010)	Carboxipeptidasa (Vaca)	Zisapel 1978

Figura S2. Los potenciales sitios de nitración de GAPDH, Serina Hidroximetiltransferasa, Transcetolasa, Rubisco (subunidad grande) y Rubisco activasa están conservados en plantas y otros organismos.

En amarillo se muestra el péptido identificado como nitrado por MALDI-TOF y en negrita las Y conservadas dentro de ese péptido.

Gl i ceral dehi do-3- fosfato deshi drogenasa

Arabidopsis	DAKAGIALSDKFV KLVS W YDNE W YSSRV VDLIVHMSKA- 338
Nicotiana	DAKAGIALSKNFV KLVS W YDNE W YSSRV IDLICHMASVA 326
Oryza	DAKAGIALNDNFV KLVA W YDNE W YSNR VIDLIRHMAKTQ 337
Rattus	DAGAGIALNDNFV KLIS W YDNE Y YSNR VVDLMAYMASKE 333
Mus	DAGAGIALNDNFV KLIS W YDNE Y YSNR VVDLMAYMASKE 333
Homo	DAGAGIALNDHFV KLIS W YDNE F YSNR VVDLMAHMASKE 335
Escherichia	DAKAGIALNDNFV KLVS W YDNE T YSNK VLDLIAHISK-- 331
Saccharomyces	DASAGIQLSPKFV KLVS W YDNE Y YSTR VVDLVEHIAKA- 332

** *** * . : ***** : ***** ** . : ***** : : .

Seri na Hi droxi meti l transferasa

Arabidopsis	TSGGKKISATSIYFESLPY KVNFTTGYIDYDKLEEKAL DFRPKLLICGGSAYPRDWDYAR 200
Oryza	TAGGKKISATSIYFESLPYKVSAAAT GYIDYEKLEEKAL DFRPKLLICGGSAYPRDWDYAR 200
Rattus	TDK-KKISATSIFFESMPYKVPD TYIN YDQLEENASLFHPKLI IAGTSCYSRNLDYAR 410
Mus	TDK-KKISATSIFFESMPYKVP PETGYIN YDQLEENASLFHPKLI IAGTSCYSRNLDYAR 207
Homo	TDK-KKISATSIFFESMPYKVPD TYIN YDQLEENASLFHPKLI IAGTSCYSRNLEYAR 213
Nicotiana	TDT-KKISAVSIFPETMPYRLNE STGYID YDQLEKSATLFHPKLI IAGTSCYSRNLEYAR 243
Saccharomyces	TEN-RKISAVSTYFESFPYRVNP ETGYID YDTLEKNALYRPKVLVAGTSAYCRLDYKR 204
Escherichia	----SPVNFSGKLYNIVPY GID-ATGHIDYADLEKQAKEHKPKMI IGGFSAYSQVVDWAK 185

: . . : : ** : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * *

Transketol asa

Arabidopsis	VKNGNTGYDEIRAAI KEAKTVTDKPTLIKVT TTIGYGS PNKANSYSVHGAALGEKEVEAT 352
Nicotiana	VKNGNTGYDEIRAAI KEAKTVTDKPTMIKVT TTIGFGSPNKANS YSVHGSALGAKEVEAT 355
Oryza	VKNGNDGYDEIRAAI KEAKAVTDKPTLIKVT TTIGFGSPNKANS YSVHGSALGTKEVEAT 355
Saccharomyces	VDKGDDMESISSALEKAKL SKDKPTIIKVT TTIGFGSLQQG-TAGVHGSALKADDDVKQL 275
Escherichia	EIDG-HDPQAVKEA ILEAQSVKDKPSLI ICRTVIGFGSPNKAGKEEAHGAPLGE _{EE} VALA 272
Rattus	VDGH-----SVEELCKAF GQAKHQPTAII AKTFKGRGITGIEDKEAWHGKPLPKN----- 297
Mus	VDGH-----SVEELCKAF GQAKHQPTAII AKTFKGRGITGIEDKEAWHGKPLPKN----- 265
Homo	VDGH-----SVEELCKAF GQAKHQPTAII AKTFKGRGITGVEDKESWHGKPLPKN----- 265

: : . . . : * * * * * : * * * * *

Rubi sco (subuni dad grande)

Clamidomonas	LSAKNYGRAVYECLRGGLD FTKDD ENVNSQPFMRWRDRFLFVAEAIYKAQ AETGEVKGHY 239
Micromonas	LSAKNYGRAVYECLRGGLD FTKDD ENVNSQPFMRWRDRFLFVAEAIYKAQ AETGEIKGHY 177
Arabidopsis	LSAKNYGRAVYECLRGGLD FTKDD ENVNSQPFMRWRDRFLFCAEAIYK QAETGEIKGHY 239
Oryza	LSAKNYGRAVYECLRGGLD FTKDD ENVNSQPFMRWRDRFVFC A EAIYK QAETGEIKGHY 239
Nicotiana	LSAKNYGRAVYECLRGGLD FTKDD ENVNSQPFMRWRDRFLFCAEALYKAQ AETGEIKGHY 239
Espinaca	LSAKNYGRAVYECLRGGLD FTKDD ENVNSQPFMRWRDRFLFCAEALYKAQ AETGEIKGHY 239
Nostoc	LSAKNYGRAVYECLRGGLD FTKDD ENINSAPFQ RWRDRFLFVA DAITKAQ AETGEIKGHY 240

***** ***** : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

Clamidomonas	LNATAGTCEEMMKRA VCAKELGVP IIMHDYLTGGFTANTSLAIYCRDNGLLLLH IHRAMHA 299
Micromonas	LNVTAA TSEEMIKR TVCAKELGLPIVMHDYITGGFTANTSLSLYCRDHGLLLH IHRAMHA 237
Arabidopsis	LNATAGTCEEMIKR AVFA RELGVP IVMHDYLTGGFTANTSLSHYCRDNGLLLLH IHRAMHA 299
Oryza	LNATAGTCEEMIKRA VFA RELGVP IVMHDYLTGGFTANTSLAHYCRDNGLLLLH IHRAMHA 299
Nicotiana	LNATAGTCEEMIKRA VFA RELGVP IVMHDYLTGGFTANTSLAHYCRDNGLLLLH IHRAMHA 299
Espinaca	LNATAGTCEEMIKRA VFA RELGVP IVMHDYLTGGFTANTTSLSHYCRDNGLLLLH IHRAMHA 299
Nostoc	LNVTAP TCEEML KRAEYAKELQ PI IIMHDYLTAGFTANNTLAR WCRD NGLLLLH IHRAMHA 300

* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

Rubi sco acti vase

Clamidomonas	ARV YDDM VRQWITDTGV DKIG QQLVNAR--QKVAMPK VSMD LNVLIKY GKSL VDEQENVK 380
Micromonas	ARV YDDK VREWIRETGIEAMGPLLV NP KRGSKVT FEP PRMSLDILLQ YGKAL EMEQENVK 384
Arabidopsis	ARV YDDEVR KFV ESL GV EIKR LVNSRE-GPPVFEQ PEM TY EKL MEYGN NLM VQE QENVK 408
Espinaca	ARV YDDEVR KWVNSVGV DN VGKLVNSKD-GPPVFEQ PEM TLQ KL MEYGN NLM VQE QENVK 406
Nicotiana	ARV YDDEVR KWVSGTG IEIK GD KL NSFD-GPPTFEQ PKM T IEK LLEYGN NLM VQE QENVK 412
Oryza	ARV YDDEVR KWVSD TG VENIG KR LVNSRE-GPPEFEQ PKM T IEK LMEYGY ML VQE QENVK 399
Nostoc	SRI YDI QIRDF IHK VGF ERIS LRV VNS LE-APPEFK KPDF SLAHL IESGN LV LGE QQRVD 281

* : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * .

Figure S3. Análisis del grado de conservación y de la estructura de las Metionina Sintetas.

A. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de diferentes Metioninas Sintetas. En amarillo se resalta el péptido nitrado identificado y en negrita sombreado de gris la Y nitrada. B. Estructura de AtMS1 donde se indica la posición de la tirosina nitrada, Y287, formando puentes de hidrógeno con T262 y F264. Se indica en verde la molécula de ácido (2S)-2-[[4-[(2-amino-4-ceto-1H-pteridin-6-il)metilamino]benzoil]amino]glutárico (THG), en amarillo la hidroxocobalamina (HC) y en naranja el Zinc (Zn).

A

Metionina sintetas

AtMS1	ELESTLSGLN-VLVET YFADIPAEAYKTLTSLKGVTAFGFDLVRGKTLDLVKAG-FPEG	285
AtMS2	ELESTLSGLN-VLVET YFADIPAEAYKTLTSLKGVTAFGFDLVRGKTIDLIKSG-FPQG	285
StMS	DLESSLSGLN-VLVET YFADVPAEAFKTLTALKGVTAFGFDLVRGQTLELIKSS-FPSG	285
GmMS	ELAPALSGLN-VLVET YFADIPAEAYKTLTSLNGVTAYGFDLVRGNTLDLIKGG-FPSG	285
OsMS	ELESALSGLN-VLIET YFADIPAEAYKTLTSLNSVTAYGFDLIRGSKTLDLVKSAGFPSG	286
HvMS	ELESTLSGLN-VLVET YFADVPAESYKTLTSLSSVTAYGFDLERGKTLELVKSG-FPAG	285
ZmMS	ELESSFSGLN-VLIET YFADIPAEAYKTLTSLSGVTAYGFDLIRGAKTLDLIRSS-FPSG	285
MET6	YFGEQ-SNLPKITLATYFGTVVFN-LDAIKGLP-VAALHVDVFRAP EQFDEVVAA-IGNK	292
NcMS	AIAAAGDAVPKVVVATYFGDIVHN-FDVLPAFSGAAGLHVDLVRNPEQLEPVLKQ-LGPN	288
	: . . . : : *** . : : . . . : : . . . * : : : : :	
AtMS1	KVLFAGVVDGR NIWANDFAASLSTLQALEGIVGKDKLVVSTSCSLLHTAVDLINETKLD	345
AtMS2	KVLFAGVVDGR NIWANDLAASLITLQSLQSLGKDKLVVSTSCSLLHTAVDLINETKLD	345
StMS	KVLFAGVVDGR NIWANDLAASLALLQSLGKDKLVASTSCSLLHTAVDLINETKLD	345
GmMS	KVLFAGVVDGR NIWANDLAASLTTLQSLGKDKLVVSTSSSLLHTAVDLVNETKLD	345
OsMS	KVLFAGVVDGR NIWADDLAASLTTLESLEAIVGKDKLVVSTSCSLMHTAVDLVNETKLD	346
HvMS	KVLFAGVVDGR NIWADDLAASLTLQSLAIVGKDKLVVSTSCSLMHTAVDLVNETKLD	345
ZmMS	KVLFAGVVDGR NIWADDLAASLSTLHSLAIVAGKDKLVVSTSCSLMHTAVDLVNETKLD	345
MET6	QTLVSVGIVDGRNIWKNDFKKSSAIVNKAIEKLGADR VVVATSSSLLHTPVDLNNETKLD	352
NcMS	QILSAGVVDGRNIWKNDFAKSL EILQTAVKALGSERVIVATSSSLLHTPHTLASEKPLS	348
	: * . :***** : : * : . * : : : : * : : : : * . : **	

B

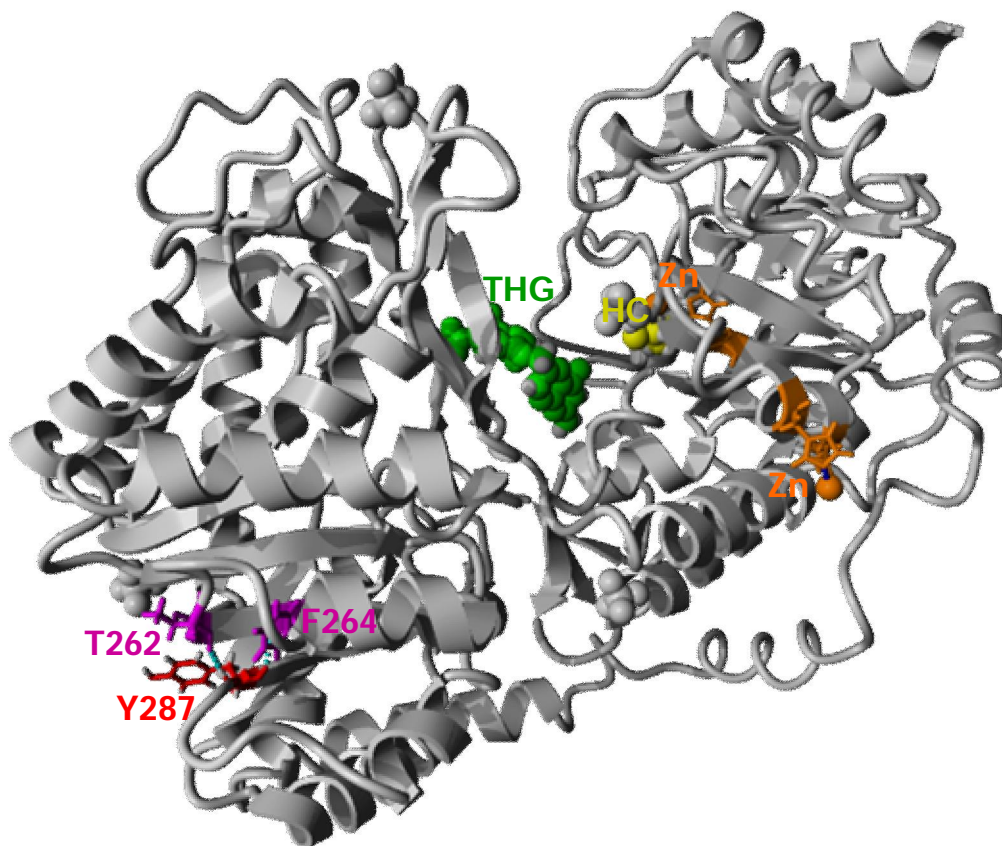
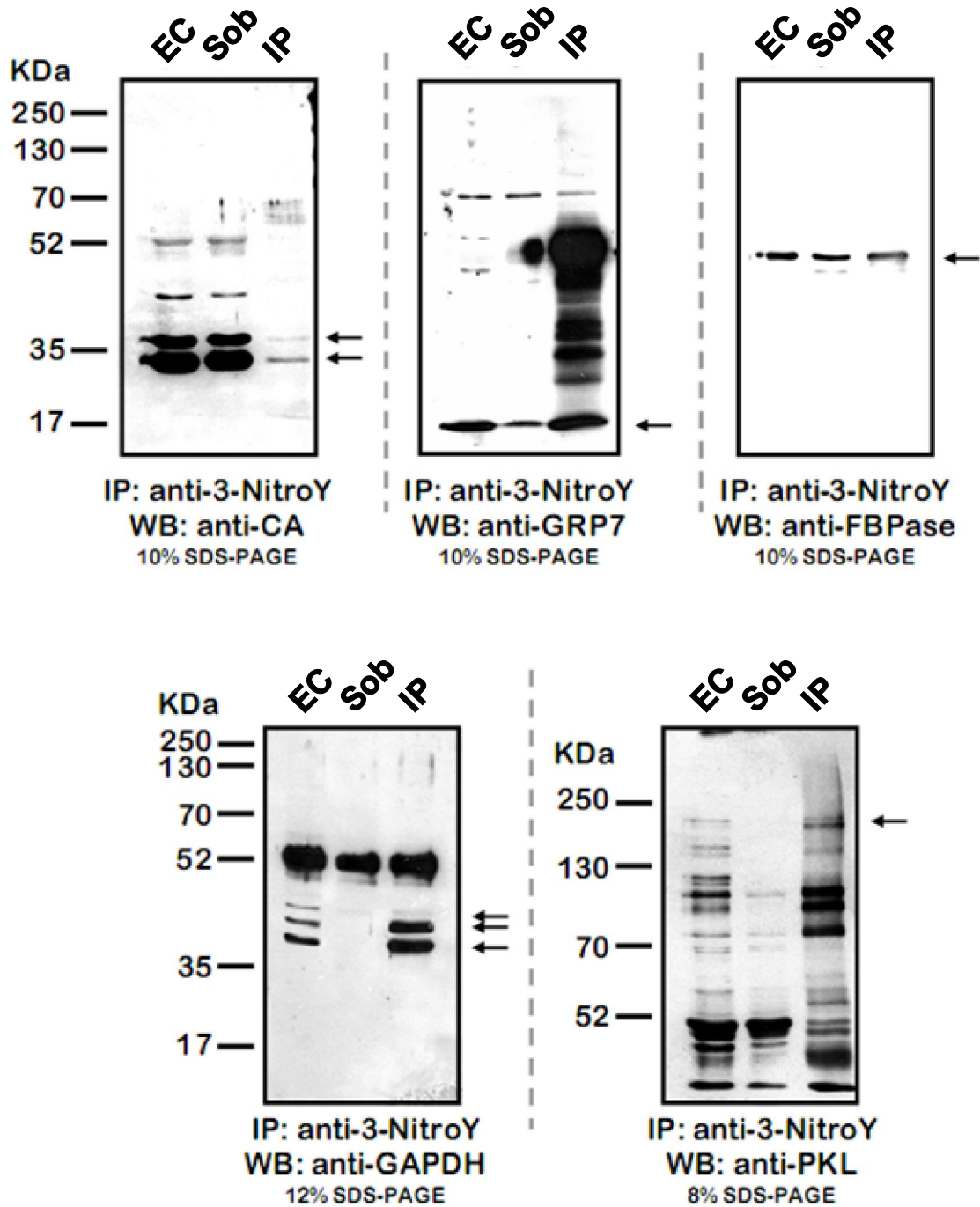


Figure S4. Confirmación de las identificaciones de las muestras inmunoprecipitadas.

Se muestran las imágenes de los gels completos correspondientes a la Figura 37.



CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Mediante el análisis de los niveles de NO en mutantes afectados en su biosíntesis hemos identificado la ruta dependiente de la actividad NR y de la proteína AtNOA1 como las principales vías de síntesis de NO en *Arabidopsis*.
2. La hipersensibilidad al ABA de mutantes deficientes en la producción de NO en procesos como la dormición, la germinación, el establecimiento de plántula y el cierre estomático nos permite proponer un papel negativo del NO en la señalización de ABA.
3. Tras analizar los mutantes afectados en la síntesis de NO en condiciones de oscuridad y luz, hemos descrito el mecanismo molecular por el que el NO regula positivamente la fotomorfogénesis. Este mecanismo actúa a dos niveles: por un lado, el NO regula negativamente la expresión de genes *PIF*, y, por otro, modula positivamente la acumulación de proteínas DELLA mediante la regulación transcripcional de *SLY1*. Además, hemos comprobado que las giberelinas regulan negativamente los niveles de NO asegurando así un fenotipo etiolado en oscuridad.
4. El uso de anticuerpos que detectan la nitración de tirosinas junto a dos aproximaciones proteómicas diferentes y complementarias nos han permitido describir el conjunto más extenso, hasta la fecha, de proteínas potencialmente nitradas *in vivo* en *Arabidopsis*. Además, mediante la identificación del sitio inequívoco de nitración en una de estas proteínas, la Metionina Sintasa 1, y del impacto de la nitración en la actividad de la proteína GAPDH hemos comprobado que el método es válido para la identificación de proteínas nitradas, y que este tipo de modificación post-traducciona l tiene, al igual que en modelos animales, un impacto sobre la función de las proteínas

Materiales y Métodos

1. Material biológico y condiciones de cultivo.

1.1. Plantas: *Arabidopsis thaliana*

Se utilizó como sistema experimental la planta modelo *Arabidopsis thaliana* por su utilidad para el análisis genético y molecular. Los ecotipos silvestres empleados fueron Columbia-0 (Col-0) y Landsberg erecta (Ler) (Nottingham Arabidopsis Stock Center). Además de los mutantes y líneas transgénicas generadas en este trabajo se utilizaron los siguientes mutantes y/o líneas transgénicas cedidas por diferentes laboratorios: *pRGA::GFP-RGA*, *sly1-10*, *sly1-1D*, *ga1-3* (Tai-Ping Sun, fondo Ler); *35S::TAP-RGL1*, *35S::TAP-RGL2*, *35S::TAP-RGL3*, *35S::TAP-RGA*, *35S::TAP-GAI*, *35S::TAP-GAI 17*, *35S::TAP-RGA 17*, *5della* (Xing-Wang Deng, fondo Ler); *35S::TAP-GFP* (Vicente Rubio, fondo Col-0); *phyA*, *phyB* (NASC, fondo Col-0), *Adella* (NASC, fondo Ler); *noa1-1*, (Nigel Crawford, fondo Col-0); *pit3-3*, *pit4-2*, *pit1-1pit3-3pit4-2pit5-3* (*pitQ*) (Peter Quail, fondo Col-0); *gid1a,b*, *gid1a,c*, *gid1b,c* (Steve Thomas, fondo Col-0); *PIF3OX* (Giltso Choi, fondo Col-0); *PIF4OX* (Christian Fankhauser, fondo Col-0); *pRGA::GFP-RGA/ga1-3* (David Alabadí, fondo Ler).

El cultivo *in vitro* de *Arabidopsis* se llevó a cabo en placas Petri con 4,4 gr/L de medio MS estéril (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 10 gr/L de sacarosa y con pH 5,7 ajustado previamente a la adición del agar (8 gr/L). En el caso de cultivo *in vitro* en medio líquido, se utilizaron placas de 6 y 24 pocillos (Costar) conteniendo 1 mL de medio MS estéril (4,4 gr/L) suplementado con 5 gr/L sacarosa. En cada pocillo se colocaron alrededor de 12 semillas refrescando el medio al octavo día. Finalmente, los tratamientos se realizaron tres días después, cuando las plántulas tenían 11 días.

Para cultivar las plantas *in vitro* las semillas fueron esterilizadas con hipoclorito sódico al 30 % (v/v) y el surfactante Tween-20 al 0,02 % (v/v), manteniendo agitación constante durante 10 min. y realizando a continuación cinco lavados con agua miliQ estéril. Alternativamente, las semillas se esterilizaron mediante la exposición a cloro gaseoso derivado de una solución de hipoclorito sódico y ácido clorhídrico, durante 4 horas. Con el fin de favorecer y sincronizar la germinación, las semillas se estratificaron al menos 3 días a 4 °C antes de cultivarlas *in vitro* con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (día largo, DL) y 21-23 °C de temperatura. Para los experimentos en las diferentes calidades de luz, las semillas se mantuvieron, tras la estratificación, alrededor de 6 h en luz blanca ($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), seguido por 18 h de oscuridad, antes de pasar las placas a la calidad de luz pertinente. Las intensidades de las diferentes calidades de luz fueron de $16 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para la luz azul, $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para la luz roja lejana y

20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para la luz roja, a no ser que se indique lo contrario. Las diferentes calidades de luz se consiguieron mediante LEDs (Percival Sci., USA).

El cultivo en tierra tanto de semillas, estratificadas previamente, como de plántulas se realizó sobre un sustrato Jiffy-7 (grupo Jiffy) y se llevó a cabo en cámaras con un fotoperiodo de DL o con un fotoperiodo de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad (día corto, DC). En todos los casos las plantas se iluminaron con luz blanca suministrada por tubos fluorescentes con una intensidad de 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y la temperatura osciló entre 20 y 22 °C a lo largo del día manteniendo una humedad relativa en torno al 60 %.

1.1.1. Mutantes generados en este trabajo.

Con el objetivo de conseguir plantas con los niveles de óxido nítrico reducidos, se aislaron mutantes de las posibles vías de síntesis varP (iNOS)-dependiente, AtNOA1-dependiente, NR-dependiente y XOR-dependiente. Todas las líneas utilizadas se obtuvieron del banco de semillas de Nottingham (NASC). Todos los mutantes, se encuentran en el fondo Col-0.

En el caso de mutantes sencillos, las semillas procedentes del banco de semillas (mezcla de T₂ y T₃), se cultivaron en tierra y se analizaron un mínimo de 24 plantas para buscar mutantes homocigotos para la inserción de T-DNA mediante PCR con oligonucleótidos específicos. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados se encuentra descrita en la Tabla M2 (página 137). En el caso de encontrar mutantes en homocigosis, se comprobó el nivel de transcrito para el gen mutado, en cada uno de los casos, mediante RT-PCR semicuantitativa.

Para la obtención del doble mutante *xor1xor2*, se cruzaron plantas *xor1-1* con plantas *xor2-1*. Las semillas obtenidas de los cruces se sembraron en tierra y se comprobó mediante PCR que ambas mutaciones se encontraban en heterocigosis. Las semillas de estas plantas se recogieron por separado y se sembró un número de plantas F₃ elevado (100 plantas) que nos permitiera tener la probabilidad de encontrar al menos una planta doble mutante. Como las plantas no presentaron fenotipo, se procedió al análisis por PCR de toda la población. No se encontraron plantas homocigotas para las dos mutaciones así que se recogieron semillas de una planta homocigota para la mutación en *XOR1* y heterocigota para la mutación en *XOR2*. Al analizar por PCR la descendencia (>50 individuos) de esta planta, se encontró una planta doble mutante *xor1xor2*. A continuación se confirmó en la descendencia el nivel de transcrito de *XOR1* y *XOR2* mediante RT-PCR semicuantitativa.

Nombre	Mutante	Gen mutado	Fondo	Tipo	Num. Stock	Donante	Referencia
<i>varP1-1</i>	Sencillo	At3g33010	Col-0	T-DNA	N610091	SALK_110091	Este trabajo
<i>noa1-1</i>	Sencillo	At4g47450	Col-0	T-DNA		Nigel Crawford	1
<i>noa1-2</i>	Sencillo	At4g47450	Col-0	T-DNA	N821383	SAIL_507_E11	Este trabajo
<i>nia1nia2</i>	Doble	At1g77760 At1g37130	Col-0	Puntual (<i>NIA1</i>) Delección (<i>NIA2</i>)	N2356	G4-3	2
<i>nia1,2noa1-2</i>	Triple	At4g47450 At1g77760 At1g37130	Col-0	T-DNA (<i>AIVOA1</i>) Puntual (<i>NIA1</i>) Delección (<i>NIA2</i>)			Este trabajo
<i>nr1-1</i>	Sencillo	At1g77760	Col-0	T-DNA	N571547	SALK_071547	Este trabajo
<i>nr1-2</i>	Sencillo	At1g77760	Col-0	T-DNA	N504181	SALK_004181	Este trabajo
<i>nr2-1</i>	Sencillo	At1g37130	Col-0	T-DNA	N588070	SALK_088070	Este trabajo
<i>xor1-1</i>	Sencillo	At4g34890	Col-0	T-DNA	N648364	SALK_148364	Este trabajo
<i>xor2-1</i>	Sencillo	At4g34900	Col-0	T-DNA	N832099	SAIL_722_C03	Este trabajo
<i>xor1xor2</i>	Doble	At4g34890 At4g34900	Col-0 Col-0	T-DNA (<i>XOR1</i>) T-DNA (<i>XOR2</i>)			Este trabajo
<i>nia1,2noa1-2 pRGA::GFP-RGA</i>	Cuadruple	At4g47450 At1g77760 At1g37130 At2g01570	Ler/Col-0	T-DNA (<i>AIVOA1</i>) Puntual (<i>NIA1</i>) Delección (<i>NIA2</i>) Transgenica Kan ^R		Tai-Ping Sun	Este trabajo
<i>35S::TAP-DELLAs</i>		At1g14920 At2g01570 At1g66350 At3g03450 At5g17490	Ler	Transgénica Gent ^R		Xing-Wang Deng	3
<i>rga-24gai-16</i>	Doble	At2g01570 At1g14920		Delección (<i>rga-24</i>) Trasposón (<i>gai-16</i>)		Nicholas Harberd	
<i>5della</i>	Quintuple	At1g14920 At2g01570 At1g66350 At3g03450 At5g17490	Ler	Trasposón (<i>gai-16</i>) Trasposón (<i>rga-t2</i>) Trasposón (<i>rgl1-1</i>) Trasposón (<i>rgl2-1</i>) T-DNA (<i>rgl3-1</i>)	N16298	Xing-Wang Deng	3
<i>pRGA::GFP-RGA</i>		At2g01570	Ler	Transgenica Kan ^R		Tai-Ping Sun	4
<i>sly1-10</i>	Sencillo	At4g24210	Ler	Delección-Inserción	3510701891	Tai-Ping Sun	5
<i>sly1D</i>	Sencillo	At4g24210	Ler	Sustitución en C-t	3510701907	Tai-Ping Sun	6
<i>pif3-3</i>	Sencillo	At1g09530	Col-0	T-DNA		Peter Quail	7
<i>pif4-2</i>	Sencillo	At2g43010	Col-0	T-DNA		Peter Quail	7
<i>pifQ</i>	Cuadruple	At2g20180 At1g09530 At2g43010 At3g59060	Col-0	T-DNA (<i>pif1-1</i>) neutrones (<i>pif3-3</i>) T-DNA (<i>pif4-2</i>) T-DNA (<i>pif5-1</i>)	N66049	Peter Quail	7
<i>35S::TAP-GFP</i>			Col-0			Vicente Rubio	
<i>gid1a,b</i>	Doble	At3g05120 At3g63010	Col-0	T-DNA Trasposón		Steve Thomas	8
<i>gid1a,c</i>	Doble	At3g05120 At5g27320	Col-0	T-DNA T-DNA		Steve Thomas	8
<i>gid1b,c</i>	Doble	At3g63010 At5g27320	Col-0	Trasposón T-DNA		Steve Thomas	8
<i>PIF3OX</i>		At1g09530	Col-0			Giltsu Choi	9
<i>PIF4OX</i>		At2g43010	Col-0			Christian Fankhauser	10
<i>ga1-3</i>	Sencillo	At4g02780	Ler	Delección	CS3104	Tai-Ping Sun	11
<i>ga1-3 pRGA::GFP-RGA</i>	Doble	At4g02780 At2g01570	Ler	Delección Transgenica Kan ^R		David Alabadi	12

- 1 Guo et al., 2003
2 Wilkinson and Crawford, 1993
3 Feng et al., 2008
4 Silverstone et al., 1998
5 McGinnis et al., 2003
6 Dill et al., 2004
7 Leivar et al., 2008
8 Griffiths et al., 2006
9 Shin et al., 2007
10 Lorrain et al., 2008
11 Silverstone et al., 1997
12 Stavang et al., 2009

Para la obtención del triple mutante *nia1nia2noa1-2*, flores emasculadas de plantas *nia1nia2* se fecundaron con polen procedente de plantas *noa1-2*. Para poder genotipar la población segregante se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada mutación. Así, la mutación puntual en *NIA1/NR1* (Wilkinson y Crawford, 1993), se detectó mediante la aplicación de la técnica CAPS (Cleaved Amplified Polimorphic Sequences), donde, oligonucleótidos que flanquean la mutación se utilizan para amplificar la región mutada y mediante la digestión de ese amplicón con un enzima de restricción podemos discriminar entre alelos silvestres (hay corte) y alelos mutados (no hay corte) al separar el producto de digestión por electroforesis en geles de agarosa. Para detectar la mutación en *NIA2/NR2* (Wilkinson y Crawford, 1993) se utilizaron oligonucleótidos que anillan en la región delecionada en *NIA2/NR2* en el mutante *nia2*. Para detectar la presencia del T-DNA que incorpora el mutante *noa1-2* se utilizaron los mismos oligonucleótidos específicos de ese gen y los de la región flanqueante del T-DNA que se utilizaron para genotipar el mutante sencillo *noa1-2*. Tras comprobar que todas las mutaciones se encontraban en heterocigosis en la F₁, se recogieron las semillas y se sembraron un gran número de ellas para buscar el triple mutante. Tras analizar más de 300 plantas, se encontró un individuo triple mutante y se procedió a analizar el nivel de transcrito de cada uno de los genes mutados mediante RT-PCR semicuantitativa.

Para la obtención de plantas que portaran la línea *pRGA::GFP-RGA* en el fondo genético *nia1nia2noa1-2*, se cruzaron plantas homocigotas para cada fondo genético. Tras comprobar en la primera generación que todas las mutaciones estaban en heterocigosis se procedió a la selección de las mutaciones *nia1*, *nia2*, y *noa1-2*, tal y como se ha descrito anteriormente. La presencia de la construcción *pRGA::GFP-RGA* se determinó mediante la germinación de las semillas en medio suplementado con Kanamicina. En la tercera generación se identificaron plantas homocigotas *pRGA::GFP-RGA/nia1nia2noa1-2* y sus semilla fueron utilizadas en los experimentos que así lo indican.

1.2. Bacterias.

1.2.1. *Escherichia coli*

Para la propagación y purificación de plásmidos se utilizó la cepa *E. coli* DH5 cultivada en medio Luria-Bertani (LB) (sales LB 20 gr/L) estéril tanto en medio líquido como en medio sólido, suplementado con agar (15 gr/L). Para la selección de bacterias transformadas con el plásmido de interés se añadió al medio el antibiótico correspondiente según el caso, concretamente, kanamicina (100 mg/L).

Para la obtención de proteínas recombinantes se utilizaron células competentes comerciales de la cepa BL21(DE3) (Sigma-Aldrich)

2. Tratamientos aplicados a las plantas.

Para llevar a cabo este trabajo, las plantas de *A. thaliana* fueron sometidas a diferentes factores de estrés y a distintos tratamientos exógenos con compuestos químicos como se detalla a continuación. Las muestras, se recogieron a los tiempos o concentraciones indicadas en cada experimento, congelándolas en N₂ líquido y siendo almacenadas a -80 °C hasta su posterior análisis, excepto en los casos en que se indica otro tipo de análisis de las muestras.

2.1. Aplicación exógena de SA, GA₃, ABA, PAC y SNP.

Las aplicaciones exógenas de SA (Merck), ABA (Sigma-Aldrich), PAC (Duchefa) ó GA₃ (Duchefa) fueron realizadas bien por pulverización en las plantas cultivadas en tierra o cultivadas *in vitro* hasta la completa humidificación de las hojas o mediante la adición del compuesto correspondiente al medio MS utilizado para el crecimiento de las plántulas *in vitro*. En plántulas cultivadas *in vitro* en medio líquido, los distintos compuestos se añadieron al medio MS líquido. Concretamente, se sustituyó el medio de cultivo por medio fresco con la concentración del compuesto químico correspondiente cuando las plántulas tenían 11 días.

Para la aplicación exógena de nitroprusiato sódico (SNP) se siguió siempre el esquema descrito por Bethke et al (2006) con pequeñas modificaciones, de forma que el SNP no entra en contacto con las plantas, sino que es el óxido nítrico liberado en la descomposición de éste el que realiza el efecto.

2.2. Deshidratación.

Los experimentos de deshidratación se llevaron a cabo con plantas adultas crecidas en condiciones de DC. Se realizaron dos variantes diferentes para establecer el grado de tolerancia de los diferentes mutantes a la sequía: Por un lado se pesaron plantas enteras de tamaño similar crecidas en las mismas condiciones de irrigación envolviendo las macetas en parafilm para minimizar la pérdida de agua por evaporación. Tras cesar el riego, las plantas se pesaron cada 7 días hasta el día 28, estimando la pérdida de peso como la pérdida de agua con el tiempo. En este punto las plantas se volvieron a regar y se estimó el porcentaje de supervivencia como el número de plantas que continuaron con su crecimiento produciendo nuevas hojas. Por otro lado, plantas crecidas en las mismas condiciones de irrigación se dejaron de regar y, tras 12 o 14 días, se tomaron hojas de las plantas haciendo 3 grupos de 3 hojas cada grupo. Se limpiaron de posibles

restos de tierra y se pesaron. Inmediatamente, se sumergieron en agua destilada. Tras 3 horas, las hojas se secaron cuidadosamente y se volvieron a pesar de forma que el incremento en peso equivale a la pérdida de agua que han sufrido esas hojas en el periodo de deshidratación. Ambos experimentos se adaptaron de Sáez et al (2006).

2.2.1. Apertura estomática, conductancia estomática y medidas psicrométricas.

Se analizaron otros parámetros fisiológicos de las plantas para establecer su resistencia a la deshidratación.

Para la medida de la apertura estomática, se capturaron imágenes de las mismas regiones del envés de las primeras hojas verdaderas de cuatro plántulas diferentes mediante el microscopio confocal Leica TCS SL. La anchura y longitud de diferentes estomas se midieron mediante el análisis de las imágenes con el programa ImageJ (National Institutes of Health). Antes de tomar las imágenes, las plántulas crecidas durante 10 días bajo condiciones de DL se incubaron en una solución de apertura de estomas (30 mM KCl, 10 mM MES-KOH, pH=6.1) en placas de 24 pocillos (Costar) durante 2.5 h bajo iluminación con tubos fluorescentes ($150-200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 22 °C. Para inducir el cierre estomático, las plántulas fueron incubadas en las concentraciones de ABA indicadas en cada caso durante 2.5 h. Para los ensayos de la inhibición de la apertura estomática, los diferentes compuestos, fueron aplicados bajo iluminación con luz verde para evitar la apertura de los estomas por luz.

La conductancia estomática de las hojas de los diferentes mutantes se llevó a cabo en plantas crecidas en DC mediante un porómetro Steady State Diffusion Porometer SC-1 (Decagon Devices) tal y como indican los fabricantes. Las medidas se realizaron 0, 7 y 14 días tras dejar de regar en el envés de tres hojas de seis plantas diferentes para cada punto.

El potencial hídrico de las hojas (LWP) se determinó en discos de 5 mm extraídos de plantas cultivadas en DC usando el método del punto de rocío mediante una cámara C-52 (Wescor) conectada a un psicrómetro (Ps-10) y a un microvoltímetro de punto de rocío (modelo HT-33T; Wescor). Las medidas se realizaron de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes 0, 7 y 14 días tras dejar de regar las plantas. Los valores de LWP se determinaron en tres discos obtenidos de tres hojas pertenecientes a seis plantas diferentes para cada punto y genotipo. El experimento se repitió dos veces.

3. Determinación de Óxido Nítrico.

La determinación de óxido nítrico se realizó haciendo uso de las fluoresceínas desarrolladas para este propósito en los últimos años (Kojima, H et al 1998; Kojima, H et al 2001). Estas fluoresceínas tras reaccionar con el óxido nítrico se transforman en un derivado triazol que al

ser iluminado con una longitud de onda de 500 nm emite fluorescencia a 515 nm. Se utilizaron dos tipos diferentes de fluoresceínas que aportaron datos complementarios. Por un lado, el uso de la 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) (Calbiochem) nos permite cuantificar los niveles de óxido nítrico en una disolución o en el interior del tejido vegetal pero nunca en el interior celular ya que no es capaz de atravesar la membrana lipídica. Por otro lado, el uso de 3-amino-4-aminometil-2,7-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM DA) (Invitrogen) nos permite visualizar y cuantificar la acumulación de óxido nítrico en el interior celular, ya que esta molécula una vez ha entrado en el contexto del tejido se interna en las células por la acción de las esterasas, siendo esta internalización irreversible y quedando la fluoresceína retenida en el interior celular donde al reaccionar con el óxido nítrico emitirá fluorescencia.

3.1. Determinación de Óxido Nítrico mediante DAF-FM DA.

El nivel endógeno de óxido nítrico fue determinado mediante la tinción fluorescente de raíces con la fluoresceína DAF-FM DA como se describe en Guo et al (2003) con pequeñas modificaciones. En resumen, plántulas de 5 a 7 días de edad se incubaron en 10 μ M DAF-FM DA disuelto en tampón de tinción (5 mM MES-KOH, pH 5,7; 0,25 mM KCl; 1 mM CaCl_2) durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Después de 3 lavados con tampón de tinción durante 10 minutos cada uno, las plántulas se trataron con diferentes compuestos (1 mM SA ó 50 μ M ABA) o no se trataron (control). En el caso de la determinación de óxido nítrico en condiciones de oscuridad/luz roja o tras la aplicación de GA_3 , plántulas de 4 días crecidas en oscuridad fueron incubadas durante 1 hora en oscuridad o en luz roja con DAF-FM DA, o bien, se pre-trataron (GA_3) o no (control) con 50 μ M GA_3 durante 2,5 h y se incubaron posteriormente con DAF-FM DA tal y como se ha descrito anteriormente. La fluorescencia dependiente de óxido nítrico fue detectada y registrada con el microscopio de fluorescencia Eclipse 600 (Nikon) o mediante el microscopio confocal TCS SL (Leica) utilizando los mismos parámetros entre los tratamientos. La especificidad de la fluorescencia por el óxido nítrico se demostró pre-tratando las plántulas con 0,5mM de cPTIO (Sigma-Aldrich) (un secuestrador de óxido nítrico) antes de incubarlas con la fluoresceína.

3.1.1. Cuantificación de la fluorescencia.

Para cuantificar la fluorescencia, se siguió el método descrito por García-Mata y Lamattina (2007) con alguna modificación. Las imágenes fueron procesadas con Photoshop, obteniendo el histograma de cada una. Mediante la herramienta de enmarcado, se analizaron diferentes áreas dentro de cada imagen, dando un valor de fluorescencia promedio de cada imagen y dividiendo este valor por el área analizada, obteniendo así el valor relativo de fluorescencia por unidad de

superficie. Al valor promedio correspondiente a las raíces de Col-0 sin tratamiento se le asignó el valor 100%, y la fluorescencia de los demás genotipos se calculó como un valor relativo a éste. Cada experimento fue repetido al menos tres veces, analizando al menos seis plántulas en cada uno.

3.2. Determinación de Óxido Nítrico mediante DAF-2.

El método descrito anteriormente para la fluoresceína DAF-FM DA funciona muy bien en raíces ya que éstas no presentan autofluorescencia. Sin embargo, en tejidos verdes, la presencia de clorofilas dificulta mucho el análisis ya que su autofluorescencia interfiere con la del DAF-FM DA. Se han descrito varios métodos para el uso de esta fluoresceína en tejidos de la parte aérea de la planta, pero todos ellos suponen una manipulación muy invasiva de la muestra. Por ejemplo, el más utilizado es la obtención de “peelings” (fracciones epidérmicas) de la hoja y su posterior tinción con la fluoresceína. Para nosotros estas manipulaciones van a suponer, sin duda, una gran producción de óxido nítrico, haciendo el análisis de esa muestra poco real. Para evitar estas manipulaciones, desarrollamos un método no invasivo haciendo uso de las propiedades de la fluoresceína no permeable DAF-2. Así, plántulas enteras de 10-15 días de edad, se sumergieron en 650 μL de 10 μM DAF-2 en PBS por triplicado y se mantuvieron en oscuridad durante 1 hora. 200 μL de cada tubo fueron traspasados a una placa de 96 pocillos, aptas para el uso en un fluorímetro (Costar, Cambridge, MA). La fluorescencia fue cuantificada mediante el uso de un fluorímetro TECAN equipado con un filtro de excitación de 492 nm y un filtro de emisión de 535 nm. Los valores de fluorescencia fueron normalizados con el peso de las plántulas y con los valores de fluorescencia de plántulas inactivadas térmicamente (calentadas 10 minutos a 99°C). Se muestra como resultado las medias y los errores estándar de tres medidas. El experimento fue repetido tres veces con resultados similares.

4. Ensayos de germinación.

Para comprobar la sensibilidad a ABA, las semillas fueron sembradas en medio MS suplementado con 1% (p/v) sacarosa, 0,8% (p/v) agar y diferentes concentraciones de (\pm)-cis,trans-ABA (Sigma) tras haber estratificado las semillas 3 días a 4°C. La germinación fue contabilizada como la ruptura del endospermo y el establecimiento de plántula como el número de plántulas que presentaban cotiledones verdes y expandidos el día 12 después de la siembra. Para determinar el efecto del estrés osmótico, las semillas de los diferentes fondos genéticos se sembraron en medio suplementado con 125 mM NaCl o 250 mM Manitol y cuantificadas como se menciona anteriormente. Para todos estos ensayos se utilizaron semillas recogidas al mismo tiempo. Para los ensayos de dormición, las semillas se recogieron frescas a partir de silicuas del tallo principal que

empezaban a amarillear, correspondientes al estadio 17B (Ferrandiz et al., 1999). Las semillas se sembraron sin previa estratificación en placas MS y la germinación fue contabilizada como la ruptura del endospermo durante seis días consecutivos.

5. Medidas de la longitud de los hipocotilos.

Las plántulas, fueron recogidas de las placas Petri, colocadas sobre papel de acetato y escaneadas a 600 d.p.i. Las imágenes fueron analizadas con el programa ImageJ para el cálculo de la longitud de los hipocotilos. Los valores de longitud de los hipocotilos son medias \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes (al menos 20 plántulas analizadas por experimento).

6. Análisis del contenido en antocianinas.

A partir de muestras de 100 mg de peso fresco correspondientes a plántulas de 5 días de edad cultivadas en oscuridad o luz blanca, sus antocianinas fueron extraídas y cuantificadas en una solución de metanol ácido durante toda la noche a 4°C tal y como ha sido descrito (Francis, 1982). El contenido en antocianinas se muestra como la absorbancia a 530 nm por mg de peso fresco.

7. Determinación de la actividad GAPDH.

Las proteínas utilizadas para el ensayo se extrajeron en 50 mM Tris-HCl pH= 7,4 siendo cuantificadas a continuación. La actividad GAPDH de los extractos fue ensayada de acuerdo con el método descrito por Muñoz-Bertomeu et al (2009) con pequeñas modificaciones. 50 μ g de proteínas procedentes de plantas tratadas o no con 2 mM de cloruro de 5-amino-3-(4-morfolinil)-1,2,3 oxadiazolio (SIN-1) se incubaron con la solución de reacción (10 mM Tris-HCl pH=7,4; 20 mM Arsenato; 2 mM NAD; 0,5 mM DTT). La reacción se inició mediante la aplicación de 2 mM D,L-gliceraldehido-3-fosfato en un volumen final de 1 mL. La actividad GAPDH se midió siguiendo la conversión de NAD en NADH a 340 nm durante 4 minutos.

8. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos.

8.1. Extracción y purificación de ácidos nucleicos.

Las extracciones de DNA genómico de hojas se llevaron a cabo mediante el método descrito por Edwards (Edwards et al., 1991). Las extracciones de RNA total a partir de diferentes tejidos de *Arabidopsis*, se realizó siguiendo el protocolo descrito por Logemann y col. (1987).

8.2. Cuantificación de ácidos nucleicos.

La cuantificación de DNA y RNA se realizó haciendo uso del espectrofotómetro ND1000 (NanoDrop Technologies) que permite la medida directa de la concentración de una muestra sin diluir utilizando volúmenes de un microlitro.

8.3. Manipulación de ácidos nucleicos.

8.3.1. Retrotranscripción (RT) del RNA.

En primer lugar, las muestras de RNA se sometieron a un tratamiento con DNAsa utilizando el kit Turbo DNA-free™ (Ambion) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. La síntesis de la primera hebra de cDNA se realizó usando la enzima RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (MBI Fermentas) o la M-MLV Reverse Transcriptase (USB) partiendo, de 1 µg de RNA libre de DNA. Las reacciones de RT se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µL.

8.3.2. Amplificación del DNA mediante PCR.

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron en un volumen final de 25 µL empleando los siguientes componentes: tampón de reacción 1 x (Tris-HCl 75 mM pH 8,0, MgCl₂ 2 mM, KCl 5 mM, (NH₄)₂SO₂ 20 mM y 0,0001 % BSA), dNTPs 200 µM, 400 nM de los oligonucleótidos utilizados como cebadores específicos y 1 U de DNA polimerasa (Netzyme N.E.E.D.). Para cada caso se empleó un programa adecuado en función de la secuencia de los cebadores y de la longitud de los fragmentos amplificados. Las secuencias de los cebadores se detallan en la Tabla M2.

8.3.3. Determinación de los niveles de transcrito.

8.3.3.1. PCR semicuantitativa.

Para analizar los niveles de transcrito mediante RT-PCR semicuantitativa se realizaron PCRs con oligonucleótidos específicos para cada gen de interés incluyendo en todos los casos la amplificación del gen endógeno *UBQ10* como control de la reacción, siendo el DNA molde empleado cDNA obtenido a partir de RT de RNA total libre de DNA.

8.3.3.2. PCR cuantitativa a tiempo real.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores específicos para cada gen en las reacciones de PCR cuantitativa fueron diseñados a partir de las regiones de cDNA de interés con el programa Primer Express 2.0 utilizando los parámetros por defecto en el caso de no encontrar alguna referencia donde ya se hubieran diseñado los oligonucleótidos. Al final de cada PCR, se realizó una cinética de T^m (curva de disociación) aplicando un gradiente de temperaturas creciente para analizar la especificidad del producto y la presencia de dímeros de los cebadores. Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron en un volumen final de 20 μ L empleando 10 μ L de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 μ L de RT y una concentración de 600 nM de cada oligonucleótido. Para cada muestra se realizaron tres PCRs idénticas empleando placas MicroAmp™ Optical 96-well reaction plate (Applied Biosystems) y se llevaron a cabo en los instrumentos 7000 Real-Time PCR System y 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Se utilizó el programa de amplificación recomendado por la casa comercial para los oligonucleótidos diseñados con Primer Express (2 min. 50 °C, 10 min. 95 °C, 40 ciclos de 15 s 95 °C, 1 min., 60 °C). Los valores de expresión génica se calcularon mediante la cuantificación de la fluorescencia en un punto de la fase exponencial de la reacción de amplificación (umbral) asociado a un número de ciclos concreto para cada gen (Ct). A partir del parámetro Ct se calcularon para cada experimento los valores de expresión relativa de los genes de interés en las distintas muestras respecto a la muestra control, normalizados con el nivel de expresión obtenido para el gen constitutivo *ACT2/8* en las mismas muestras, según la fórmula:

$$2^{- \left(\text{Ct gen A - Ct ACT2/8}_{\text{(muestra problema)}} - \text{Ct gen A - Ct ACT2/8}_{\text{(muestra control)}} \right)}$$

8.4. Manipulación de microorganismos para transformación de vectores plasmídicos.

8.4.1. Obtención de células competentes para transformación por choque térmico.

Una colonia de *E. coli* DH5 aislada por triple estría se cultivó en 1 mL de medio LB estéril a 37 °C en agitación (200 r.p.m.) durante una noche. Se utilizó un volumen de 0,5 mL de este cultivo para inocular 200 mL de medio LB estéril en un matraz Erlenmeyer de 1 L y se incubó a 37 °C en agitación (200 r.p.m.) hasta que el cultivo bacteriano alcanzó una DO_{600} de 0,5-0,6, indicativa del estado de fase exponencial de las bacterias. A continuación, el cultivo, previamente enfriado en hielo durante 10 min., se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 10 min. a 4 °C manteniendo las condiciones de esterilidad. El sedimento se lavó con 20 mL de $CaCl_2$ 50 mM estéril y frío, manteniendo esta suspensión durante 3 horas en hielo, y se centrifugó posteriormente durante 10 min. a 5000 r.p.m. a 4 °C. Por último, el sedimento bacteriano se resuspendió en 10 mL de una solución $CaCl_2$ 50 mM y 15% (v/v) de glicerol estéril y frío, se fraccionó en alícuotas de 200 μ L

por tubo Eppendorf® que se congelaron inmediatamente en N₂ líquido durante 5 min. y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización. En cada tanda, se realizaron las pruebas pertinentes de eficiencia de transformación y de control de posibles contaminaciones que validaban el uso de estas células para transformar.

8.4.2. Transformación de células competentes por choque térmico.

La transformación de células competentes *E. coli* DH5 y BL21(DE3) se llevó a cabo mediante choque térmico según se describe en Sambrook y col. (1989).

8.4.3. Purificación de plásmidos bacterianos.

Las colonias de *E. coli* potencialmente transformadas se seleccionaron por resistencia a antibiótico. Las colonias elegidas, normalmente 10 por transformación, se cultivaron en tubos estériles con 4 mL de medio LB líquido estéril incubándolas a 37 °C en agitación (250 r.p.m.) durante una noche. Las extracciones de DNA plasmídico se realizaron mediante el procedimiento de lisis alcalina rápida según Sambrook y col. (1989) o mediante sistemas comerciales.

9. Análisis de proteínas.

9.1. Extracción de proteínas.

Las proteínas procedentes de diferentes muestras biológicas congeladas en N₂ líquido fueron extraídas con el tampón TBS (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM) con 1% (v/v) de mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich). Los extractos de proteínas fueron cuantificados siguiendo el método descrito por Bradford (1976).

9.2. Electroforesis de proteínas y Western blot.

Las muestras (10-15 µg) de proteínas fueron separadas en geles SDS-PAGE al 8%, 10%, 12,5% o 15% de acrilamida según la masa molecular de la proteína a detectar. Los geles se tiñeron con Coomassie empleando el reactivo de tinción EZBlue Gel Staining Reagent (Sigma-Aldrich) o con nitrato de plata empleando el kit PlusOne Silver Staining Kit; Proteín (GE) para visualizar el patrón de las proteínas o, alternativamente, se transfirieron a membrana como se describe a continuación.

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL, GE Healthcare) en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina

192 mM, metanol 20% (v/v)) a 100 V durante 90 min. a 4 °C o fijando 30 V y 90 mA para una transferencia durante toda la noche a 4°C. La membrana se lavó brevemente con agua y se tiñó con Pounceau-S para verificar la transferencia y el control de carga de las muestras.

Las membranas se incubaron con diferentes tampones dependiendo del anticuerpo utilizado. Como norma general las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron 2x1 minuto con T-TBS, se incubaron con el anticuerpo primario durante una noche a 4°C, se lavaron 3X10 minutos con T-TBS, se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron finalmente 3X10 minutos con T-TBS. Las condiciones de incubación se resumen en la Tabla M1.

Las proteínas se detectaron mediante el kit Western blot ECL (GE Healthcare) para la mayoría de casos y excepcionalmente para proteínas muy poco abundantes con el kit ECL Advance Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare), tal y como recomiendan los fabricantes. Las proteínas se visualizaron exponiendo una película fotográfica Fuji SuperRx (Fujifilm) y revelándola mediante una procesadora automática M-35-X-OMAT (Kodak) o, alternativamente, mediante el equipo LAS-3000 (Fuji) que incorpora una cámara CCD capaz de detectar la luminiscencia producida por los reactivos ECL sin necesidad de utilizar películas fotográficas.

9.3. Immunoprecipitación de proteínas nitradas en tirosina.

Con la finalidad de estudiar la naturaleza de las proteínas nitradas en tirosina en *Arabidopsis thaliana* nos vimos en la necesidad de desarrollar un método que nos permitiera enriquecer las muestras en proteínas nitradas. Para ello nos servimos de los métodos clásicos de inmunoprecipitación y de la disponibilidad de anticuerpos comerciales que son capaces de unirse a los residuos de tirosina de las proteínas que han sido modificados por el óxido nítrico formando residuos de 3-NitroTirosina (3-nitroY; 3-NY). Así pues, estos anticuerpos reconocen específicamente residuos de 3-NY. Para este propósito elegimos el anticuerpo monoclonal anti-3-NY de la casa comercial Cayman chemicals por haber demostrado una alta afinidad por residuos de 3-NY de proteínas. El método de inmunoprecipitación seguido es el que se describe a continuación.

En primer lugar, se confirmó la integridad de los extractos de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE y posterior tinción con Coomassie. Los extractos que pasaron esta validación fueron llevados a una concentración de 1 mg/mL en un volumen de 1 mL con TBS. Para eliminar las proteínas que se unen inespecíficamente a la proteína A-agarosa (EZview, Sigma-Aldrich), los extractos (4x1mg) se incubaron con 50 µL de proteína A-agarosa durante 4 horas a 4°C en agitación leve. Tras sedimentar por centrifugación (13.000 r.p.m., 4°C) la proteína A-agarosa unida a las proteínas a eliminar, se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo con mucho

cuidado de no incorporar nada de proteína A-agarosa. Tras este primer paso, se añadió 0,1 µg de anticuerpo anti-3-NY y se incubó durante una noche a 4°C en agitación leve. Para recuperar las proteínas unidas al anticuerpo, se añadieron 60 µL de proteína A-agarosa y se dejó incubando en agitación leve durante 4 horas a 4°C. Tras eliminar la fracción no unida por centrifugación y eliminación del sobrenadante, el sedimento que contiene las proteínas unidas al anticuerpo y a la proteína A-agarosa se lavó 3 veces con TBS para eliminar aquellas proteínas que se han unido inespecíficamente al anticuerpo. En cada lavado, los tubos se mantuvieron durante 2 minutos en agitación leve para facilitar el lavado y se volvieron a sedimentar los complejos proteína-anticuerpo-proteína A-agarosa para eliminar cada uno de los lavados. Tras el último lavado, se añadieron 100 µL tampón de elución (1% SDS, 100 mM DTT, 50 mM Tris-HCl pH=7.6) y se incubó a 95°C durante 5 minutos. La elución se realizó 3 veces para asegurar la total elución de las proteínas. La recuperación del eluido se llevó a cabo con la ayuda de jeringuillas de insulina para recuperar el máximo eluido con la menor incorporación de proteína A-agarosa. Los tres eluidos de cada uno de los 4 mg de proteína inmunoprecipitada se combinaron y se filtraron con filtros de 0,2 µm (Costar) para eliminar los posibles restos de proteína A-agarosa. Los eluidos fueron entonces precipitados, combinados y procesados con el kit 2-D Clean Up Kit (GE Healthcare) para su posterior análisis por 2-DE y/o LC-MS/MS.

9.4. Electroforesis bi-dimensional (2-DE).

Para la primera dimensión (separación de las proteínas en función de su punto isoeléctrico), las muestras de proteínas a separar (100µg) se disolvieron en DeStreak Rehydration Solution (GE Healthcare). Con estas muestras se rehidrataron tiras de acrilamida de 18 cm con un rango de pH 3-10 no lineal (Immobiline Dry-Strips, GE Healthcare) pasivamente, durante una noche a temperatura ambiente. Una vez las tiras se encontraban rehidratadas, se sometieron a un programa de electroforesis específico para este tipo de muestra mediante el sistema de electroforesis IPGphor 3 (GE Healthcare). Las condiciones de electroforesis fueron: 1 hora 50 V (step-and-hold), 1 hora 150 V (gradiente), 1 hora 30 minutos 500 V (gradiente), 1 hora 30 minutos 1000 V (gradiente), 2 horas 4000 V (gradiente), 2 horas 8000 V (gradiente) y 7 horas 8000 V (step-and-hold). Una vez finalizada la electroforesis de la primera dimensión, las tiras se redujeron con DTT 1 mg/mL durante 15 minutos seguidas por una alquilación con iodoacetamida 25 mg/mL durante 15 minutos más. Ambos tratamientos se realizaron en tampón de equilibración (6 M urea, 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 29.3 % glicerol, 2 % SDS y 0.002 % azul de bromofenol). Una vez equilibradas, las tiras se introdujeron en geles de 24 cm del 12,5% de acrilamida cuidadosamente desgaseados y polimerizados previamente. Los geles se montaron en el sistema de electroforesis EttanDaltSix (Ge Healthcare) y la electroforesis de los mismos se realizó siguiendo las instrucciones de los fabricantes para una electroforesis durante toda la noche. A continuación los geles se tiñeron con

el reactivo fluorescente DeepPurple (GE Healthcare) tal y como recomiendan los fabricantes. Los geles se escanearon y digitalizaron con el escáner Typhoon (GE Healthcare) y las imágenes se analizaron mediante el programa ImageMaster Platinum 5.0 (GE Healthcare).

Para recoger los diferentes spots de interés para su posterior identificación, los geles fueron procesados con el robot Ettan Spot Picker. Una vez asignadas las coordenadas correspondientes a las imágenes digitales de los geles tal y como indican los fabricantes el robot muestreo los spots de interés y los deposita en placas de 96 pocillos.

9.5. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.

Todas las identificaciones de proteínas que aparecen en este trabajo fueron llevadas a cabo en el servicio de proteómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe (<http://www.cipf.es/RESEARCH/group.aspx?id=49>), miembros de Proteored. Las condiciones en las que se analizaron las diferentes muestras fueron las siguientes.

Las muestras a analizar por MALDI-TOF fueron digeridas con tripsina (Promega, grado de secuenciación), secadas en una centrifuga de vacío y resuspendidas en un volumen de 7 μL de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%. 1 μL se estampó en la placa MALDI. Después de dejar secar a temperatura ambiente se le añadió medio microlitro de matriz (5 mg/mL CHCA (Sigma-Aldrich) en 0,1% TFA-CAN/agua 1:1 (v/v)) y se dejó secar a temperatura ambiente. Los datos MALDI MS y MS/MS fueron obtenidos con un espectrómetro de masas 4700 Proteomics analyzer (Applied Biosystems). Las muestras sin una identificación satisfactoria se analizaron posteriormente por LC-MS/MS.

La separación de péptidos por LC-MS/MS se realizó en un sistema de nano-LC Ultimate nano-LC system (LC Packings) y con un espectrómetro de masas QSTAR XL Q-TOF hybrid mass spectrometer (MDS Sciex-Applied Biosystems). Las muestras (5 μL) fueron incorporadas al sistema mediante un sistema automatizado (FAMOS autosampler, LC Packings) a un caudal de 40 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ y los péptidos fueron retenidos en una pre-columna PrepMap C18 (5 mm, 300 μm i. d., LC Packings). Los péptidos fueron entonces eluidos en la columna analítica PepMap C18 (15 cm, 75 μm i. d., LC Packings) a un caudal de 200 nL/minuto y separados usando un gradiente de 55 minutos del 15-50% ACN. El espectrómetro de masas QSTAR XL se operó en un modo de adquisición dependiente de información, en el que se realizaba un scan TOF MS en valores desde 400-2000 m/z de 1 segundo, seguido de un ion scan del producto de 3 segundos.

9.6. Síntesis, purificación y nitración de AtMS1.

Un plásmido (pET21b) que contenía el cDNA de AtMS1 fusionado a una etiqueta de 6 histidinas (6xHIS) se utilizó para transformar células competentes de E-coli BL21(DE3) (Sigma-

Aldrich) para la producción de la proteína recombinante. Para la inducción de la producción de proteína recombinante, cultivos celulares con una D.O.=0,7 fueron tratados con 1mM de isopropil -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) durante 5 horas. La producción de la proteína recombinante se confirmó lisando cultivos inducidos y no inducidos con Laemli buffer a 95°C durante 10 minutos y resolviendo el patrón de proteínas mediante 8% SDS-PAGE y posterior tinción con Coomassie, así como por Western-blot mediante un anticuerpo anti-pentaHIS (Quiagen).

La purificación de la proteína se llevó a cabo con el kit QIAexpress Ni-NTA Fast Start Kit (Quiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La proteína purificada AtMS1 fue nitrada *in vitro* tratándola o no con un tampón nitrante como se había descrito con anterioridad (Chen et al., 2008b). En este método, 10 µL de proteína purificada se incubó con 500 µM H₂O₂ y 500 µM NaNO₂ en 0,1M PBS a 37°C en oscuridad. Para limpiar la proteína de las impurezas de la reacción, el volumen de reacción se filtra con un filtro de 10 kDa (Microcon, Ambion). Las proteínas se analizaron mediante SDS-PAGE y Western blot. La nitración de la proteína se confirmó con el anticuerpo anti-3-NY y el control de carga con el anticuerpo anti-pentaHIS. Se corrió un gel en paralelo y se tiñó con Coomassie, se cortaron las bandas y tras extraer y digerir la proteína, sus péptidos fueron analizados por LC-MS/MS como se ha descrito anteriormente.

9.6. Modelado y análisis estructural de proteínas.

Los modelos 3D de las proteínas fueron generados por homología mediante los programas de SWISS-MODEL (Arnold et al., 2006) usando las coordenadas de GAPDH de rata (código PDB 2VYN), de la Hidroximetiltransferasa de *Mycobacterium tuberculosis* (código PDB 3HF7), Transcetolasa de maíz (código PDB 1ITZ), RuBisCO de espinaca (código PDB 1IR1) y Manitol deshidrogenasa de *Cladosporium harbarum* (código PDB 3GDF) como moldes. Para la Metionina sintasa se utilizó la estructura de *Arabidopsis thaliana* (código PDB 1U1J). La calidad de los modelos fue evaluada por ANOLEA, Verify3D y Procheck (Bowie et al., 1991; Laskowski et al., 1996; Melo y Feytmans 1998)

10. Microscopía confocal en plantas transgénicas *pRGA::GFP-RGA*

Las plantas *pRGA::GFP-RGA* expresan la proteína RGA, fusionada a la proteína fluorescente GFP bajo la regulación de la propia secuencia promotora del gen RGA, lo que determina que los patrones de expresión y la localización subcelular de la proteína GFP-RGA en planta, es decir, *in vivo*, sean los mismos que los de la proteína RGA endógena.

La fluorescencia de plántulas *pRGA::GFP-RGA* se detectó mediante el microscopio confocal TCS SL (Leica) equipado con un objetivo de inmersión de aceite 40X. Para analizar la fluorescencia de GFP-RGA y la autofluorescencia de los cloroplastos, las muestras fueron excitadas con un láser de Argón a 488 nm. La emisión de fluorescencia fue registrada entre 497-537 nm para GFP (representada en verde) y 579-647 nm para la autofluorescencia de los cloroplastos (representada en rojo). Las proyecciones medias de reconstrucciones de apilamientos en Z (10 cortes de 3 micras cada uno) fueron tomadas y se representan en la figura correspondiente. Se analizaron 10 plántulas en cada experimento, en tres experimentos independientes.

Tabla M1. Anticuerpos utilizados en este trabajo.

Anticuerpo	Tipo	Dilución/Buffer	Bloqueo	Lavados	Secundario	Origen	Referencia
anti-3NY	Monoclonal	1:1000/TBS-T 3% Top-Block	TBS-T 3% Top-Block	TBS-T	1:10000/TBS-T 3% Top-Block	mouse Cayman Chemicals	189542
anti-pentaHIS	Monoclonal	1:8000/TBS 3% BSA	TBS 3% BSA	TBS-T	1:10000/TBS 10% Leche en polvo	mouse Quiagen	
anti-GFPm	Monoclonal	1:8000/TBS-T 5% Leche en polvo	TBS-T 5% Leche en polvo	TBS-T	1:10000/TBS-T 5% Leche en polvo	mouse Clontech	632380/632381
anti-TUB	Monoclonal	1:10000/TBS-T 5% Leche en polvo	TBS-T 5% Leche en polvo	TBS-T	1:10000/TBS 5% Leche en polvo	mouse Sigma-Aldrich	T 6074
anti-PHYB	Monoclonal	1:2500/TBS-T 5% Leche en polvo	TBS-T 5% Leche en polvo	TBS-T	1:10000/TBS-T 5% Leche en polvo	mouse Akira Nagatani lab	
anti-HIS	Monoclonal	1:500/TBS 3% BSA	TBS 3% BSA	TBS-T	1:10000/TBS 5% Leche en polvo	mouse Santa Cruz	sc-803
anti-HA	Monoclonal	1:5000/TBS-T 5% Leche en polvo	TBS-T 5% Leche en polvo	TBS-T	1:10000/TBS-T 5% Leche en polvo	mouse AbCam	ab9110
anti-GRP	Policlonal	1:2500/TBS-T 5% Leche en polvo	TBS-T 5% Leche en polvo	TBS-T	1:10000/TBS-T 5% Leche en polvo	rabbit Dorothee Staiger	
anti-OASTL	Policlonal	1:5000/TBS 2% Leche en polvo	TBS-T 5% Leche en polvo	TBS-T	1:10000/TBS 2% Leche en polvo	rabbit Rüdiger Hell/Cecilia Gotor	
anti-CA	Policlonal	1:3000/TBS-T 5% Leche en polvo	TBS-T 5% Leche en polvo	TBS-T	1:10000/TBS-T 5% Leche en polvo	rabbit Dominique Rumeau	
anti-GAPDH	Policlonal	1:10000/TBS-T 5% Leche en polvo	TBS-T 5% Leche en polvo	TBS-T	1:10000/TBS-T 5% Leche en polvo	rabbit Renate Scheibe	
anti-PKL	Policlonal	1:5000/TBS-T 1% BSA	TBS-T 1% BSA	TBS-T	1:10000/TBS-T 1% BSA	rabbit Joe Ogas	
anti-FBPase	Policlonal	1:2000/TBS-T 5% Leche en polvo	TBS-T 5% Leche en polvo	TBS-T	1:10000/TBS-T 5% Leche en polvo	rabbit Mariam Sahrawy	
anti-MYC-Ct	Policlonal	1:10000/TBS-T 5% Leche en polvo	TBS-T 5% Leche en polvo	TBS-T	No hace falta-conjugado a HRP	Sigma-Aldrich	A 5598

Tabla M2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Oligo	Símbolo en figura	Secuencia del oligo	Uso	Referencia
iNOS-F	9	5'-CCGT AACGCTGAAACACCTCA-3'	genotipado <i>varP1-1</i> <i>varP</i> RT-PCR	Este trabajo
iNOS-R	10	5'-TGTTGCTAGTGGCTTTGTCCC-3'	genotipado <i>varP1-1</i> <i>varP</i> RT-PCR	Este trabajo
AtNOA1.1-LP	2	5'-GCACCTACACCACAGGCAAGC-3'	genotipado <i>noa1-2</i> <i>AtNOA1</i> RT-PCR	Este trabajo
AtNOA1.1-RP	3	5'-CCAATTGGCAATGTTGGTGC-3'	genotipado <i>noa1-2</i> <i>AtNOA1</i> RT-PCR	Este trabajo
NR1.1-LP	11	5'-CCATGAGGTTCCAGATGAGT-3'	genotipado <i>nr1-1</i> <i>NIA1</i> RT-PCR	Este trabajo
NR1.1-RP	12	5'-TCTATAGCCGGAGAGGAGGCG-3'	genotipado <i>nr1-1</i> <i>NIA1</i> RT-PCR	Este trabajo
NR1.2-LP	13	5'-TGGTAGGTATCACGTTCAAAG-3'	genotipado <i>nr1-2</i>	Este trabajo
NR1.2-RP	14	5'-GTACCGGGTTTCATCGGTGGT-3'	genotipado <i>nr1-2</i>	Este trabajo
CAPS NR1-F	4	5'-TACGACGACTCCTCAAGCGAC-3'	genotipado <i>nia1</i>	Este trabajo
CAPS NR1-R	5	5'-GGCTATAGATCCCGCATCGAC-3'	genotipado <i>nia1</i>	Este trabajo
NR2.1-LP	6	5'-ACGGCGTGGTTCGTTCTTACA-3'	genotipado <i>nia2</i> genotipado <i>nr2-1</i> <i>NIA2</i> RT-PCR	Este trabajo
NR2.1-RP	7	5'-ACCTTCTTCGTCGGCGAGTTC-3'	genotipado <i>nr2-1</i> genotipado <i>nia2</i> <i>NIA2</i> RT-PCR	Este trabajo
NR2.2-LP		5'-GGTGGATGATGTCAGCTTCT-3'	genotipado <i>nr2-2</i>	Este trabajo
NR2.2-RP		5'-AGATTGAATCCGAACCACCCG-3'	genotipado <i>nr2-2</i>	Este trabajo
XOR1-LP	15	5'-TCCGTTGAAAGTAGCAGGCAC-3'	genotipado <i>xor1-1</i> <i>XOR1</i> RT-PCR	Este trabajo
XOR1-RP	16	5'-TCCGTTGAAAGTAGCAGGCAC-3'	genotipado <i>xor1-1</i> <i>XOR1</i> RT-PCR	Este trabajo
XOR2-LP	17	5'-TGAGAACCATGCGAAGATGCC-3'	genotipado <i>xor2-1</i> <i>XOR2</i> RT-PCR	Este trabajo
XOR2-RP	18	5'-GGCGCAGGAAGAAGATGAAGA-3'	genotipado <i>xor2-1</i>	Este trabajo
XOR2-RP2		5'-GGAGCAGAACGAGTTCATGGAGG-3'	<i>XOR2</i> RT-PCR	Este trabajo
SALK LBb1	8	5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3'	genotipado líneas SALK	(d)
SALK LBb1.3	8	5'-ATTTGCCGATTTCCGGAAC-3'	genotipado líneas SALK	(d)
SAIL LB3	1	5'-TAGCATCTGAATTCATAACCAATCTCGATACAC-3'	genotipado líneas SAIL	(a)
UBQ10-F		5'-GATCTTTGCCGAAAACAATTGGAGGATGGT-3'	normalizacion RT-PCR	(b)
UBQ10-R		5'-CGACTTGTCATTAGAAGAAGATAACAGG-3'	normalizacion RT-PCR	(b)
qRD29b-F		5'-CTTGGCACCCGTTGGGACTA-3'	<i>RD29b</i> qRT-PCR	Este trabajo
qRD29b-R		5'-TCAGTTCACAGAACTTGAAC-3'	<i>RD29B</i> qRT-PCR	Este trabajo
qRAB18-F		5'-AAGAAGAACATGGCGTCTTACCA-3'	<i>RAB18</i> qRT-PCR	Este trabajo
qRAB18-R		5'-TGCTGCTGGATCGGTTTT-3'	<i>RAB18</i> qRT-PCR	Este trabajo

qACT2-F	5'-TTGTTCCAGCCCTCGTTTGT-3'	normalizacion qRT-PCR	(c)
qACT2-R	5'-TGTCTCGTGATTCCAGCAG-3'	normalizacion qRT-PCR	(c)
qGID1a-F	5'-gtgacggttagagaccgcga-3'		Este trabajo
qGID1a-R	5'-tcctcgggtaaaaacgctt-3'		Este trabajo
qGID1b-F	5'-ttacggtaaggaactcggc-3'		Este trabajo
qGID1b-R	5'-tcgcctgacggttcttc-3'		Este trabajo
qGID1c-F	5'-cggctcaaatctcgatctgg-3'		Este trabajo
qGID1c-R	5'-tggcatttcagggtttc-3'		Este trabajo
qSLY1-F	5'-gggcagaaccagctcagatc-3'		Este trabajo
qSLY1-R	5'-tctcggagccaccaagc-3'		Este trabajo
qPIF1-F	5'- GTTGCTTTTGAAGGCGTT-3'		(e)
qPIF1-R	5'- GCGCTAGGACTTACCTGCGT-3'		(e)
qPIF3-F	5'-CCACGGACCACAGTTCCAAG-3'		(e)
qPIF3-R	5'-ATCGCCACTGGTTGTTGTTG-3'		(e)
qPIF4-F	5'-GAGATTTAGTTACCCGGCGG-3'		(e)
qPIF4-R	5'-GGCACAGACGACGGTTGTT-3'		(e)
qPIF5-F	5'-TTGCAGCTCCAAGCACAGAA-3'		(f)
qPIF5-R	5'-GTACCTAGCGAGCTGCTCCG- 3'		(f)
qRGL1-F	5'-TCAGTGCGGTTAACTCGGT-3'		Este trabajo
qRGL1-R	5'-GGGATGAGCTAAGAGCGATG-3'		Este trabajo
qRGL2-F	5'-GACGGCGCGTAGAGTTAC-3'		Este trabajo
qRGL2-R	5'-TGCATCCCTTGATTAAGCCC-3'		Este trabajo
qRGL3-F	5'-GCTGGAGAATCTGAGCCTCG-3'		Este trabajo
qRGL3-R	5'-AGTAATCCCACGCGCTTGAC-3'		Este trabajo
qRGA-F	5'-ACTTCGACGGGTACGCAGAT-3'		Este trabajo
qRGA-R	5'-TGTCGTACCGTCGTTCCCT-3'		Este trabajo
qGAI_3UTR-F	5'-AATGAATTGATCTGTTGAACCGG-3'		Este trabajo
qGAI_3UTR-R	5'-GGCTTCGGTCGGAATCTATC-3'		Este trabajo

(a) Mc Elver, J et al. *Genetics*, Vol. 159, 1751-1763, December 2001

(b) Cruz Castillo M et al. *Plant Physiology* Vol.135 (1), 85-94, May 2004

(c) Castillo MC and León J. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 59, No. 8, 2171-2179, May 2008

(d) Alonso, J.M. et al *Science*, Vol. 301, 653-657, 2003.

(e) Alabadí et al., 2008

(f) Stavang et al., 2009

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Abello, N., Barroso, B., Kerstjens, H. A., Postma, D. S. y Bischoff, R. (2010).** Chemical labeling and enrichment of nitrotyrosine-containing peptides. **Talanta** 80(4): 1503.
- Abello, N., Kerstjens, H. A., Postma, D. S. y Bischoff, R. (2009).** Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins. **J Proteome Res** 8(7): 3222.
- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng J. y Harberd, N. P. (2006).** Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. **Science** 311(5757): 91.
- Achard, P. y Genschik, P. (2009).** Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. **J Exp Bot** 60(4): 1085.
- Achard, P., Gong, F., Cheminant, S., Alioua, M., Hedden, P. y Genschik, P. (2008a).** The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. **Plant Cell** 20(8): 2117.
- Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., Beeemster, G. T. y Genschik, P. (2009).** Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in Arabidopsis. **Curr Biol** 19(14): 1188.
- Achard, P., Liao, L., Jiang, C., Desnos, T., Bartlett, J., Fu, X. y Harberd, N. P. (2007).** DELLAs contribute to plant photomorphogenesis. **Plant Physiol** 143(3): 1163.
- Achard, P., Renou, J. P., Berthome, R., Harberd, N. P. y Genschik, P. (2008b).** Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. **Curr Biol** 18(9): 656.
- Agrawal, L., Chakraborty, S., Jaiswal, D. K., Gupta, S., Datta, A. y Chakraborty, N. (2008).** Comparative proteomics of tuber induction, development and maturation reveal the complexity of tuberization process in potato (*Solanum tuberosum* L.). **J Proteome Res** 7(9): 3803.
- Ahmad, M. y Cashmore, A. R. (1993).** HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. **Nature** 366(6451): 162.
- Al-Sady, B., Kikis, E. A., Monte, E. y Quail, P. H. (2008).** Mechanistic duality of transcription factor function in phytochrome signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A** 105(6): 2232.
- Al-Sady, B., Ni, W., Kircher, S., Schafer, E. y Quail, P. H. (2006).** Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation. **Mol Cell** 23(3): 439.
- Alabadi, D. y Blazquez, M. A. (2008).** Integration of light and hormone signals. **Plant Signal Behav** 3(7): 448.
- Alabadi, D. y Blazquez, M. A. (2009).** Molecular interactions between light and hormone signaling to control plant growth. **Plant Mol Biol** 69(4): 409.

- Alabadi, D., Blazquez, M. A., Carbonell, J., Ferrandiz, C. y Perez-Amador, M. A. (2009).** Instructive roles for hormones in plant development. *Int J Dev Biol* 53(8-10): 1597.
- Alabadi, D., Gallego-Bartolome, J., Orlando, L., Garcia-Carcel, L., Rubio, V., Martinez, C., Frigerio, M., Iglesias-Pedraz, J. M., Espinosa, A., Deng, X. W. y Blazquez, M. A. (2008).** Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent Arabidopsis seedling de-etiolation in darkness. *Plant J* 53(2): 324.
- Alabadi, D., Gil, J., Blazquez, M. A. y Garcia-Martinez, J. L. (2004).** Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol* 134(3): 1050.
- Alvarez, C., Lozano-Juste, J., Romero, L. C., Garcia, I., Gotor, C. y Leon, J. (2011).** Inhibition of Arabidopsis O-acetylserine(thiol)lyase A1 by tyrosine nitration. *J Biol Chem* 286(1): 578.
- Allakhverdiev, S. I., Kreslavski, V. D., Klimov, V. V., Los, D. A., Carpentier, R. y Mohanty, P. (2008).** Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynth Res* 98(1-3): 541.
- Allen, G. J. y Schroeder, J. I. (2001).** Combining genetics and cell biology to crack the code of plant cell calcium signaling. *Sci STKE* 2001(102): re13.
- Amaya, Y., Yamazaki, K., Sato, M., Noda, K. y Nishino, T. (1990).** Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O₂-dependent type. Amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin. *J Biol Chem* 265(24): 14170.
- Antonov, A. V., Schmidt, T., Wang, Y. y Mewes, H. W. (2008).** ProfCom: a web tool for profiling the complex functionality of gene groups identified from high-throughput data. *Nucleic Acids Res* 36(Web Server issue): W347.
- Arasimowicz-Jelonek, J., Floryszak-Wieczorek y Kosmala, A. (2011).** Are nitric oxide donors a valuable tool to study the functional role of nitric oxide in plant metabolism? *Plant Biol (Stuttg)* 13(2).
- Ariizumi, T., Murase, K., Sun, T. P. y Steber, C. M. (2008).** Proteolysis-independent downregulation of DELLA repression in Arabidopsis by the gibberellin receptor GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1. *Plant Cell* 20(9): 2447.
- Ariizumi, T. y Steber, C. M. (2007).** Seed germination of GA-insensitive *sleepy1* mutants does not require RGL2 protein disappearance in Arabidopsis. *Plant Cell* 19(3): 791.
- Aslan, M., Ryan, T. M., Townes, T. M., Coward, L., Kirk, M. C., Barnes, S., Alexander, C. B., Rosenfeld, S. S. y Freeman, B. A. (2003).** Nitric oxide-dependent generation of reactive species in sickle cell disease. Actin tyrosine induces defective cytoskeletal polymerization. *J Biol Chem* 278(6): 4194.
- Aulak, K. S., Miyagi, M., Yan, L., West, K. A., Massillon, D., Crabb, J. W. y Stuehr, D. J. (2001).** Proteomic method identifies proteins nitrated in vivo during inflammatory challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(21): 12056.
- Bacharach, A. D., Markland, F. S., Pellino, A. y Weber, B. H. (1977).** Modification of yeast 3-phosphoglycerate kinase: isolation and sequence determination of a nitrated active-site peptide and isolation of a carboxyl modified active-site peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 74(1): 165.

- Bae, G. y Choi, G. (2008).** Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. **Annu Rev Plant Biol** 59: 281.
- Bahin, E., Bailly, C., Sotta, B., Kramer, I., Corbineau, F. y Leymarie, J. (2011).** Crosstalk between reactive oxygen species and hormonal signalling pathways regulates grain dormancy in barley. **Plant Cell Environ**.
- Bailey, P. C., Martin, C., Toledo-Ortiz, G., Quail, P. H., Huq, E., Heim, M. A., Jakoby, M., Werber, M. y Weisshaar, B. (2003).** Update on the basic helix-loop-helix transcription factor gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell** 15(11): 2497.
- Bailly, C., El Maarouf Bouteau, H. y Corbineau, F. (2008).** [Seed dormancy alleviation and oxidative signaling]. **J Soc Biol** 202(3): 241.
- Barbosa-Sicard, E., Fromel, T., Keseru, B., Brandes, R. P., Morisseau, C., Hammock, B. D., Braum, T., Kruger, M. y Fleming, I. (2009).** Inhibition of the soluble epoxide hydrolase by tyrosine nitration. **J Biol Chem** 284(41): 28156.
- Barouch, L. A., Harrison, R. W., Skaf, M. W., Rosas, G. O., Cappola, T. P., Kobeissi, Z. A., Hobai, I. A., Lemmon, C. A., Burnett, A. L., O'Rourke, B., Rodriguez, E. R., Huang, P. L., Lima, J. A., Berkowitz, D. E. y Hare, J. M. (2002).** Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. **Nature** 416(6878): 337.
- Barroso, J. B., Corpas, F. J., Carreras, A., Sandalio, L. M., Valderrama, R., Palma, J. M., Lupianez, J. A. y del Rio, L. A. (1999).** Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. **J Biol Chem** 274(51): 36729.
- Basu, S., Keszler, A., Azarova, N. A., Nwanze, N., Perlegas, A., Shiva, S., Broniowska, K. A., Hogg, N. y Kim-Shapiro, D. B. (2010).** A novel role for cytochrome c: Efficient catalysis of S-nitrosothiol formation. **Free Radic Biol Med** 48(2): 255.
- Bauer, D., Viczian, A., Kircher, S., Nobis, T., Nitschke, R., Kunkel, T., Panigrahi, K. C., Adam, E., Fejes, E., Schafer, E. y Nagy, F. (2004).** Constitutive photomorphogenesis 1 and multiple photoreceptors control degradation of phytochrome interacting factor 3, a transcription factor required for light signaling in *Arabidopsis*. **Plant Cell** 16(6): 1433.
- Bechtold, U., Rabbani, N., Mullineaux, P. M. y Thornalley, P. J. (2009).** Quantitative measurement of specific biomarkers for protein oxidation, nitration and glycation in *Arabidopsis* leaves. **Plant J** 59(4): 661.
- Beligni, M. V., Fath, A., Bethke, P. C., Lamattina, L. y Jones, R. L. (2002).** Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. **Plant Physiol** 129(4): 1642.
- Beligni, M. V. y Lamattina, L. (1999).** Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants. **Nitric Oxide** 3(3): 199.
- Beligni, M. V. y Lamattina, L. (2000).** Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. **Planta** 210(2): 215.
- Besson-Bard, A., Gravot, A., Richaud, P., Auroy, P., Duc, C., Gaymard, F., Tacomat, L., Renou, J. P., Pugin, A. y Wendehenne, D. (2009).** Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. **Plant Physiol** 149(3): 1302.

- Besson-Bard, A., Griveau, S., Bedioui, F. y Wendehenne, D. (2008a).** Real-time electrochemical detection of extracellular nitric oxide in tobacco cells exposed to cryptogein, an elicitor of defence responses. **J Exp Bot** 59(12): 3407.
- Besson-Bard, A., Pugin, A. y Wendehenne, D. (2008b).** New insights into nitric oxide signaling in plants. **Annu Rev Plant Biol** 59: 21.
- Bethke, P. C., Badger, M. R. y Jones, R. L. (2004a).** Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. **Plant Cell** 16(2): 332.
- Bethke, P. C., Gubler, F., Jacobsen, J. V. y Jones, R. L. (2004b).** Dormancy of Arabidopsis seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. **Planta** 219(5): 847.
- Bethke, P. C., Libourel, I. G., Aoyama, N., Chung, Y. Y., Still, D. W. y Jones, R. L. (2007).** The Arabidopsis aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. **Plant Physiol** 143(3): 1173.
- Bethke, P. C., Libourel, I. G. y Jones, R. L. (2006a).** Nitric oxide reduces seed dormancy in Arabidopsis. **J Exp Bot** 57(3): 517.
- Bethke, P. C., Libourel, I. G., Reinohl, V. y Jones, R. L. (2006b).** Sodium nitroprusside, cyanide, nitrite, and nitrate break Arabidopsis seed dormancy in a nitric oxide-dependent manner. **Planta** 223(4): 805.
- Bewley, J. D. (1997).** Seed Germination and Dormancy. **Plant Cell** 9(7): 1055.
- Birnboim, H. C., Lemay, A. M., Lam, D. K., Goldstein, R. y Webb, J. R. (2003).** Cutting edge: MHC class II-restricted peptides containing the inflammation-associated marker 3-nitrotyrosine evade central tolerance and elicit a robust cell-mediated immune response. **J Immunol** 171(2): 528.
- Bolwell, G. P. (1999).** Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. **Curr Opin Plant Biol** 2(4): 287.
- Bowie, J. U., Luthy, R. y Eisenberg, D. (1991).** A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. **Science** 253(5016): 164.
- Bowler, C., Neuhaus, G., Yamagata, H. y Chua, N. H. (1994a).** Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. **Cell** 77(1): 73.
- Bowler, C., Yamagata, H., Neuhaus, G. y Chua, N. H. (1994b).** Phytochrome signal transduction pathways are regulated by reciprocal control mechanisms. **Genes Dev** 8(18): 2188.
- Bredt, D. S., Hwang, P. M. y Snyder, S. H. (1990).** Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature** 347(6295): 768.
- Bredt, D. S. y Snyder, S. H. (1990).** Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc Natl Acad Sci U S A** 87(2): 682.
- Bremer, D. J. (2006).** Nitrous oxide fluxes in turfgrass: effects of nitrogen fertilization rates and types. **J Environ Qual** 35(5): 1678.
- Brennan, M. L., Wu, W., Fu, X., Shen, Z., Song, W., Frost, H., Vadseth, C., Narine, L., Lenkiewicz, E., Borchers, M. T., Lusic, A. J., Lee, J. J., Lee, N. A., Abu-Soud, H. M.,**

- Ischiropoulos, H. y Hazen, S. L. (2002).** A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. **J Biol Chem** 277(20): 17415.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J. T., Weir, I. S. y Neill, S. J. (2006).** ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis. **Plant J** 45(1): 113.
- Brouwer, M., Chamulitrat, W., Ferruzzi, G., Sauls, D. L. y Weinberg J. B. (1996).** Nitric oxide interactions with cobalamins: biochemical and functional consequences. **Blood** 88(5): 1857.
- Bruckdorfer, R. (2005).** The basics about nitric oxide. **Mol Aspects Med** 26(1-2): 3.
- Brudler, R., Hitomi, K., Daiyasu, H., Toh, H., Kucho, K., Ishiura, M., Kanehisa, M., Roberts, V. A., Todo, T., Tainer, J. A. y Getzoff, E. D. (2003).** Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution. **Mol Cell** 11(1): 59.
- Brychkova, G., Alikulov, Z., Fluhr, R. y Sagi, M. (2008).** A critical role for ureides in dark and senescence-induced purine remobilization is unmasked in the Atxdh1 Arabidopsis mutant. **Plant J** 54(3): 496.
- Buchanan, B., Gruissem, W. y Jones, R., Eds. (2000).** Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Rockville, MD, John Wiley & Sons Ltd.
- Buchczyk, D. P., Briviba, K., Hartl, F. U. y Sies, H. (2000).** Responses to peroxynitrite in yeast: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a sensitive intracellular target for nitration and enhancement of chaperone expression and ubiquitination. **Biol Chem** 381(2): 121.
- Butt, Y. K., Lum, J. H. y Lo, S. C. (2003).** Proteomic identification of plant proteins probed by mammalian nitric oxide synthase antibodies. **Planta** 216(5): 762.
- Campbell, W. H. (1999).** NITRATE REDUCTASE STRUCTURE, FUNCTION AND REGULATION: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** 50: 277.
- Caro, A. y Puntarulo, S. (1999).** Nitric oxide generation by soybean embryonic axes. Possible effect on mitochondrial function. **Free Radic Res** 31 Suppl: S205.
- Carol, R. J., Takeda, S., Linstead, P., Durrant, M. C., Kakesova, H., Derbyshire, P., Drea, S., Zarsky, V. y Dolan, L. (2005).** A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells. **Nature** 438(7070): 1013.
- Casoni, F., Basso, M., Massignan, T., Gianazza, E., Cheroni, C., Salmona, M., Bendotti, C. y Bonetto, V. (2005).** Protein nitration in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis: possible multifunctional role in the pathogenesis. **J Biol Chem** 280(16): 16295.
- Castillon, A., Shen, H. y Huq, E. (2007).** Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. **Trends Plant Sci** 12(11): 514.
- Cecconi, D., Orzetti, S., Vandelle, E., Rinalducci, S., Zolla, L. y Delledonne, M. (2009).** Protein nitration during defense response in Arabidopsis thaliana. **Electrophoresis** 30(14): 2460.

- Clack, T., Mathews, S. y Sharrock, R. A. (1994).** The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. **Plant Mol Biol** 25(3): 413.
- Clarke, A., Desikan, R., Hurst, R. D., Hancock, J. T. y Neill, S. J. (2000).** NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. **Plant J** 24(5): 667.
- Cluis, C. P., Mouchel, C. F. y Hardtke, C. S. (2004).** The *Arabidopsis* transcription factor HY5 integrates light and hormone signaling pathways. **Plant J** 38(2): 332.
- Conrad, R. (1996).** Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). **Microbiol Rev** 60(4): 609.
- Cooney, R. V., Harwood, P. J., Custer, L. J. y Franke, A. A. (1994).** Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. **Environ Health Perspect** 102(5): 460.
- Corpas, F. J., Barroso, J. B. y del Rio, L. A. (2001).** Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. **Trends Plant Sci** 6(4): 145.
- Corpas, F. J., Chaki, M., Fernandez-Ocana, A., Valderrama, R., Palma, J. M., Carreras, A., Begara-Morales, J. C., Airaki, M., del Rio, L. A. y Barroso, J. B. (2008).** Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. **Plant Cell Physiol** 49(11): 1711.
- Corpas, F. J., Chaki, M., Leterrier, M. y Barroso, J. B. (2009).** Protein tyrosine nitration: a new challenge in plants. **Plant Signal Behav** 4(10): 920.
- Corpas, F. J., del Rio, L. A. y Barroso, J. B. (2007).** Need of biomarkers of nitrosative stress in plants. **Trends Plant Sci** 12(10): 436.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., Chevalier, C. y Lamattina, L. (2006).** Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. **J Exp Bot** 57(3): 581.
- Cousson, A. (2001).** Pharmacological evidence for the implication of both cyclic GMP-dependent and -independent transduction pathways within auxin-induced stomatal opening in *Commelina communis* (L.). **Plant Sci** 161(2): 249.
- Cowling, R. J., Kamiya, Y., Seto, H. y Harberd, N. P. (1998).** Gibberellin dose-response regulation of GA4 gene transcript levels in *Arabidopsis*. **Plant Physiol** 117(4): 1195.
- Crawford, N. M., Galli, M., Tischner, R., Heimer, Y. M., Okamoto, M. y Mack, A. (2006).** Response to Zemojtel et al: Plant nitric oxide synthase: back to square one **Trends in Plant Science** 11(11): 526.
- Crow, J. P. y Beckman, J. S. (1995).** The role of peroxynitrite in nitric oxide-mediated toxicity. **Curr Top Microbiol Immunol** 196: 57.
- Curry-McCoy, T. V., Osna, N. A. y Donohue, T. M., Jr. (2009).** Modulation of lysozyme function and degradation after nitration with peroxynitrite. **Biochim Biophys Acta** 1790(8): 778.
- Cutler, A. J. y Krochko, J. E. (1999).** Formation and breakdown of ABA. **Trends Plant Sci** 4(12): 472.

- Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R. y Abrams, S. R. (2010).** Abscisic acid: emergence of a core signaling network. **Annu Rev Plant Biol** 61: 651.
- Chaki, M., Fernandez-Ocana, A. M., Valderrama, R., Carreras, A., Esteban, F. J., Luque, F., Gomez-Rodriguez, M. V., Begara-Morales, J. C., Corpas, F. J. y Barroso, J. B. (2009a).** Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower-mildew interaction. **Plant Cell Physiol** 50(2): 265.
- Chaki, M., Valderrama, R., Fernandez-Ocana, A. M., Carreras, A., Lopez-Jaramillo, J., Luque, F., Palma, J. M., Pedrajas, J. R., Begara-Morales, J. C., Sanchez-Calvo, B., Gomez-Rodriguez, M. V., Corpas, F. J. y Barroso, J. B. (2009b).** Protein targets of tyrosine nitration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls. **J Exp Bot** 60(15): 4221.
- Chandok, M. R., Ekengren, S. K., Martin, G. B. y Klessig, D. F. (2004).** Suppression of pathogen-inducible NO synthase (iNOS) activity in tomato increases susceptibility to *Pseudomonas syringae*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 101(21): 8239.
- Chandok, M. R., Ytterberg, A. J., van Wijk, K. J. y Klessig, D. F. (2003).** The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. **Cell** 113(4): 469.
- Chang, G. G. y Huang, T. M. (1980).** Involvement of tyrosyl residues in the substrate binding of pigeon liver malic enzyme. **Biochim Biophys Acta** 611(2): 217.
- Chaves, M. M., Flexas, J. y Pinheiro, C. (2009).** Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Ann Bot** 103(4): 551.
- Chehab, E. W., Eich, E. y Braam, J. (2009).** Thigmomorphogenesis: a complex plant response to mechano-stimulation. **J Exp Bot** 60(1): 43.
- Chen, H., Zhang, J., Neff, M. M., Hong, S. W., Zhang, H., Deng, X. W. y Xiong, L. (2008a).** Integration of light and abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development. **Proc Natl Acad Sci U S A** 105(11): 4495.
- Chen, H. J., Chang, C. M., Lin, W. P., Cheng, D. L. y Leong, M. I. (2008b).** H₂O₂/nitrite-induced post-translational modifications of human hemoglobin determined by mass spectrometry: redox regulation of tyrosine nitration and 3-nitrotyrosine reduction by antioxidants. **ChemBiochem** 9(2): 312.
- Chen, M., Galvao, R. M., Li, M., Burger, B., Bugea, J., Bolado, J. y Chory, J. (2010a).** Arabidopsis HEMERA/pTAC12 initiates photomorphogenesis by phytochromes. **Cell** 141(7): 1230.
- Chen, W. W., Yang, J. L., Qin, C., Jin, C. W., Mo, J. H., Ye, T. y Zheng, S. J. (2010b).** Nitric oxide acts downstream of auxin to trigger root ferric-chelate reductase activity in response to iron deficiency in Arabidopsis. **Plant Physiol** 154(2): 810.
- Chen, Y. L., Huang, R., Xiao, Y. M., Lu, P., Chen, J. y Wang, X. C. (2004).** Extracellular calmodulin-induced stomatal closure is mediated by heterotrimeric G protein and H₂O₂. **Plant Physiol** 136(4): 4096.
- Chiang, H. H., Hwang, I. y Goodman, H. M. (1995).** Isolation of the Arabidopsis GA4 locus. **Plant Cell** 7(2): 195.

- Christie, J. M. y Briggs, W. R. (2001).** Blue light sensing in higher plants. **J Biol Chem** 276(15): 11457.
- Christie, J. M., Reymond, P., Powell, G. K., Bernasconi, P., Raibekas, A. A., Liscum, E. y Briggs, W. R. (1998).** Arabidopsis NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. **Science** 282(5394): 1698.
- Dangl, J. (1998).** Innate immunity. Plants just say NO to pathogens. **Nature** 394(6693): 525.
- Danishpajoo, I. O., Gudi, T., Chen, Y., Kharitonov, V. G., Sharma, V. S. y Boss, G. R. (2001).** Nitric oxide inhibits methionine synthase activity in vivo and disrupts carbon flow through the folate pathway. **J Biol Chem** 276(29): 27296.
- de Lucas, M., Daviere, J. M., Rodriguez-Falcon, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J. M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blazquez, M. A., Titarenko, E. y Prat, S. (2008).** A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. **Nature** 451(7177): 480.
- Dean, J. y Harper, J. (1986).** Nitric Oxide and Nitrous Oxide Production by Soybean and Winged Bean during the in Vivo Nitrate Reductase Assay. **Plant Physiol** 82(3): 718.
- Dean, J. V. y Harper, J. E. (1988).** The Conversion of Nitrite to Nitrogen Oxide(s) by the Constitutive NAD(P)H-Nitrate Reductase Enzyme from Soybean. **Plant Physiol** 88(2): 389.
- del Rio, L. A., Corpas, F. J. y Barroso, J. B. (2004).** Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. **Phytochemistry** 65(7): 783.
- del Rio, L. A., Corpas, F. J., Sandalio, L. M., Palma, J. M., Gomez, M. y Barroso, J. B. (2002).** Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **J Exp Bot** 53(372): 1255.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A. y Lamb, C. (1998).** Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. **Nature** 394(6693): 585.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A. y Lamb, C. (2001).** Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. **Proc Natl Acad Sci U S A** 98(23): 13454.
- Deng, X. W., Caspar, T. y Quail, P. H. (1991).** cop1: a regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in Arabidopsis. **Genes Dev** 5(7): 1172.
- Desikan, R., Cheung, M. K., Bright, J., Henson, D., Hancock, J. T. y Neill, S. J. (2004).** ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. **J Exp Bot** 55(395): 205.
- Desikan, R., Griffiths, R., Hancock, J. y Neill, S. (2002).** A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in Arabidopsis thaliana. **Proc Natl Acad Sci U S A** 99(25): 16314.
- Diaz, M., Achkor, H., Titarenko, E. y Martínez, M. C. (2003).** The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. **FEBS Lett** 543(1-3): 136.
- DiCola, D., Polidoro, G., Di Ilio, G., Del Boccia, C., Politi, L. y Scandurra, R. (1976).** Role of tyrosine residues in cytoplasmic aspartate aminotransferase from beef kidney. **Mol Cell Biochem** 11(2): 97.

- Dietz, K. J., Sauter, A., Wichert, K., Messdaghi, D. y Hartung, W. (2000).** Extracellular beta-glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. **J Exp Bot** 51(346): 937.
- Dill, A., Thomas, S. G., Hu, J., Steber, C. M. y Sun, T. P. (2004).** The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. **Plant Cell** 16(6): 1392.
- Dodd, A. N., Gardner, M. J., Hotta, C. T., Hubbard, K. E., Dalchau, N., Love, J., Assie, J. M., Robertson, F. C., Jakobsen, M. K., Goncalves, J., Sanders, D. y Webb, A. A. (2007).** The Arabidopsis circadian clock incorporates a cADPR-based feedback loop. **Science** 318(5857): 1789.
- Dubovskaya, L. V., Bakakina, Y. S., Kolesneva, E. V., Sodel, D. L., McAinsh, M. R., Hetherington, A. M. y Volotovski, I. D. (2011).** cGMP-dependent ABA-induced stomatal closure in the ABA-insensitive Arabidopsis mutant *abi1-1*. **New Phytol.**
- Duek, P. D. y Fankhauser, C. (2003).** HFR1, a putative bHLH transcription factor, mediates both phytochrome A and cryptochrome signalling. **Plant J** 34(6): 827.
- Dupeux, F., Antoni, R., Betz, K., Santiago, J., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, L., Rubio, S., Park, S. Y., Cutler, S., Rodriguez, P. L. y Marquez, J. (2011).** Modulation of ABA signaling in vivo by an engineered receptor-insensitive PP2C allele. **Plant Physiol.**
- Durner, J. y Klessig, D. F. (1999).** Nitric oxide as a signal in plants. **Curr Opin Plant Biol** 2(5): 369.
- Elfering, S. L., Haynes, V. L., Traaseth, N. J., Ettl, A. y Giulivi, C. (2004).** Aspects, mechanism, and biological relevance of mitochondrial protein nitration sustained by mitochondrial nitric oxide synthase. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 286(1): H22.
- Espunya, M. C., Diaz, M., Moreno-Romero, J. y Martinez, M. C. (2006).** Modification of intracellular levels of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase alters glutathione homeostasis and root development. **Plant Cell Environ** 29(5): 1002.
- Fairchild, C. D., Schumaker, M. A. y Quail, P. H. (2000).** HFR1 encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction. **Genes Dev** 14(18): 2377.
- Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., Chen, L., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J. M., Kircher, S., Schafer, E., Fu, X., Fan, L. M. y Deng, X. W. (2008).** Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light and gibberellins. **Nature** 451(7177): 475.
- Ferrandiz, C., Pelaz, S. y Yanofsky, M. F. (1999).** Control of carpel and fruit development in Arabidopsis. **Annu Rev Biochem** 68: 321.
- Finch-Savage, W. E., Cadman, C. S., Toorop, P. E., Lynn, J. R. y Hilhorst, H. W. (2007).** Seed dormancy release in Arabidopsis Cvi by dry after-ripening, low temperature, nitrate and light shows common quantitative patterns of gene expression directed by environmentally specific sensing. **Plant J** 51(1): 60.
- Finch-Savage, W. E. y Leubner-Metzger, G. (2006).** Seed dormancy and the control of germination. **New Phytol** 171(3): 501.

- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T. y Steber, C. (2008).** Molecular aspects of seed dormancy. *Annu Rev Plant Biol* 59: 387.
- Fiore, G., Di Cristo, C., Monti, G., Amoresano, A., Columbano, L., Pucci, P., Cioffi, F. A., Di Cosmo, A., Palumbo, A. y d'Ischia, M. (2006).** Tubulin nitration in human gliomas. *Neurosci Lett* 394(1): 57.
- Fischer, E. y Krebs, E. (1966).** Relationship of structure to function of muscle phosphorylase. *Fed Proc* 25(5): 1511.
- Flores-Perez, U., Sauret-Gueto, S., Gas, E., Jarvis, P. y Rodriguez-Concepcion, M. (2008).** A mutant impaired in the production of plastome-encoded proteins uncovers a mechanism for the homeostasis of isoprenoid biosynthetic enzymes in Arabidopsis plastids. *Plant Cell* 20(5): 1303.
- Flores, T., Todd, C. D., Tovar-Mendez, A., Dhanoa, P. K., Correa-Aragunde, N., Hoyos, M. E., Brownfield, D. M., Mullen, R. T., Lamattina, L. y Polacco, J. C. (2008).** Arginase-negative mutants of Arabidopsis exhibit increased nitric oxide signaling in root development. *Plant Physiol* 147(4): 1936.
- Floris, R., Piersma, S. R., Yang, G., Jones, P. y Wever, R. (1993).** Interaction of myeloperoxidase with peroxynitrite. A comparison with lactoperoxidase, horseradish peroxidase and catalase. *Eur J Biochem* 215(3): 767.
- Floryszak-Wieczorek, J., Milczarek, G., Arasimowicz, M. y Ciszewski, A. (2006).** Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? *Planta* 224(6): 1363.
- Folta, K. M. y Maruhnich, S. A. (2007).** Green light: a signal to slow down or stop. *J Exp Bot* 58(12): 3099.
- Foreman, J., Denidchik, V., Bothwell, J. H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M. A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J. D., Davies, J. M. y Dolan, L. (2003).** Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422(6930): 442.
- Franze, T., Weller, M. G., Niessner, R. y Poschl, U. (2004).** Comparison of nitrotyrosine antibodies and development of immunoassays for the detection of nitrated proteins. *Analyst* 129(7): 589.
- Frigerio, M., Alabadi, D., Perez-Gomez, J., Garcia-Carcel, L., Phillips, A. L., Hedden, P. y Blazquez, M. A. (2006).** Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* 142(2): 553.
- Fu, X., Richards, D. E., Fleck, B., Xie, D., Burton, N. y Harberd, N. P. (2004).** The Arabidopsis mutant *sleepy1gar2-1* protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCFSLY1 E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell* 16(6): 1406.
- Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S. Y., Cutler, S. R., Sheen, J., Rodriguez, P. L. y Zhu, J. K. (2009).** In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* 462(7273): 660.
- Fujisawa, Y., Kato, K. y Giulivi, C. (2009).** Nitration of tyrosine residues 368 and 345 in the beta-subunit elicits FoF1-ATPase activity loss. *Biochem J* 423(2): 219.
- Fujita, H., Morisugi, T., Tanaka, Y., Kawakami, T., Kirita, T. y Yoshimura, Y. (2009).** MMP-3 activation is a hallmark indicating an early change in TMJ disorders, and is related to nitration. *Int J Oral Maxillofac Surg* 38(1): 70.

- Gallego-Bartolome, J., Minguet, E. G., Marin, J. A., Prat, S., Blazquez, M. A. y Alabadi, D. (2010).** Transcriptional diversification and functional conservation between DELLA proteins in Arabidopsis. **Mol Biol Evol** 27(6): 1247.
- Gao, Y., Zeng, Q., Guo, J., Cheng, J., Ellis, B. E. y Chen, J. G. (2007).** Genetic characterization reveals no role for the reported ABA receptor, GCR2, in ABA control of seed germination and early seedling development in Arabidopsis. **Plant J** 52(6): 1001.
- Gapper, C. y Dolan, L. (2006).** Control of plant development by reactive oxygen species. **Plant Physiol** 141(2): 341.
- Garcia-Mata, C. y Lamattina, L. (2001).** Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. **Plant Physiol** 126(3): 1196.
- Garcia-Mata, C. y Lamattina, L. (2002).** Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. **Plant Physiol** 128(3): 790.
- Garcia-Mata, C. y Lamattina, L. (2007).** Abscisic acid (ABA) inhibits light-induced stomatal opening through calcium- and nitric oxide-mediated signaling pathways. **Nitric Oxide** 17(3-4): 143.
- Gas, E., Flores-Perez, U., Sauret-Gueto, S. y Rodriguez-Concepcion, M. (2009).** Hunting for plant nitric oxide synthase provides new evidence of a central role for plastids in nitric oxide metabolism. **Plant Cell** 21(1): 18.
- Gaupels, F., Spiazzi-Vandelle, E., Yang, D. y Delledonne, M. (2011).** Detection of peroxynitrite accumulation in Arabidopsis thaliana during the hypersensitive defense response. **Nitric Oxide**.
- Gemes, K., Poor, P., Horvath, E., Kolbert, Z., Szopko, D., Szepesi, A. y Tari, I. (2011).** Cross-talk between salicylic acid and NaCl-generated reactive oxygen species and nitric oxide in tomato during acclimation to high salinity. **Physiol Plant**.
- Ghesquiere, B., Colaert, N., Helsen, K., Dejager, L., Vanhaute, C., Verleysen, K., Kas, K., Timmerman, E., Goethals, M., Libert, C., Vandekerckhove, J. y Gevaert, K. (2009).** In vitro and in vivo protein-bound tyrosine nitration characterized by diagonal chromatography. **Mol Cell Proteomics** 8(12): 2642.
- Ghosh, S., Janocha, A. J., Aronica, M. A., Swaidani, S., Conhair, S. A., Xu, W., Zheng L., Kaveti, S., Kinter, M., Hazen, S. L. y Erzurum, S. C. (2006).** Nitrotyrosine proteome survey in asthma identifies oxidative mechanism of catalase inactivation. **J Immunol** 176(9): 5587.
- Gilberthorpe, N. J. y Poole, R. K. (2008).** Nitric oxide homeostasis in Salmonella typhimurium: roles of respiratory nitrate reductase and flavohemoglobin. **J Biol Chem** 283(17): 11146.
- Gniazdowska, A., Dobrzynska, U., Babanczyk, T. y Bogatek, R. (2007).** Breaking the apple embryo dormancy by nitric oxide involves the stimulation of ethylene production. **Planta** 225(4): 1051.
- Godber, B. L., Doel, J. J., Durgan, J., Eisenthal, R. y Harrison, R. (2000a).** A new route to peroxynitrite: a role for xanthine oxidoreductase. **FEBS Lett** 475(2): 93.
- Godber, B. L., Doel, J. J., Sapkota, G. P., Blake, D. R., Stevens, C. R., Eisenthal, R. y Harrison, R. (2000b).** Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. **J Biol Chem** 275(11): 7757.

- Gokulrangan, G., Zaidi, A., Michaelis, M. L. y Schoneich, C. (2007).** Proteomic analysis of protein nitration in rat cerebellum: effect of biological aging. **J Neurochem** 100(6): 1494.
- Gole, M. D., Souza, J. M., Choi, I., Hertkorn, C., Malcolm, S., Foust, R. F., 3rd, Finkel, B., Lanken, P. N. y Ischiropoulos, H. (2000).** Plasma proteins modified by tyrosine nitration in acute respiratory distress syndrome. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 278(5): L961.
- Gonzalez-Garcia, M. P., Vilarrasa-Blasi, J., Zhiponova, M., Divol, F., Mora-Garcia, S., Russinova, E. y Cano-Delgado, A. I. (2011).** Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in Arabidopsis roots. **Development** 138(5): 849.
- Gonzalez-Guzman, M., Apostolova, N., Belles, J. M., Barrero, J. M., Piqueras, P., Ponce, M. R., Micol, J. L., Serrano, R. y Rodriguez, P. L. (2002).** The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. **Plant Cell** 14(8): 1833.
- Gorg, B., Bidmon, H. J., Keitel, V., Foster, N., Goerlich, R., Schliess, F. y Haussinger, D. (2006).** Inflammatory cytokines induce protein tyrosine nitration in rat astrocytes. **Arch Biochem Biophys** 449(1-2): 104.
- Gosti, F., Beaudoin, N., Serizet, C., Webb, A. A., Vartanian, N. y Giraudat, J. (1999).** ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. **Plant Cell** 11(10): 1897.
- Gow, A., Duran, D., Thom, S. R. y Ischiropoulos, H. (1996).** Carbon dioxide enhancement of peroxynitrite-mediated protein tyrosine nitration. **Arch Biochem Biophys** 333(1): 42.
- Gow, A. J., Farkouh, C. R., Munson, D. A., Posencheg, M. A. y Ischiropoulos, H. (2004).** Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 287(2): L262.
- Gow, A. J. y Stamler, J. S. (1998).** Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. **Nature** 391(6663): 169.
- Graham, I. A. (2008).** Seed storage oil mobilization. **Annu Rev Plant Biol** 59: 115.
- Graziano, M. y Lamattina, L. (2007).** Nitric oxide accumulation is required for molecular and physiological responses to iron deficiency in tomato roots. **Plant J** 52(5): 949.
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z. L., Powers, S. J., Gong, F., Phillips, A. L., Hedden, P., Sun, T. P. y Thomas, S. G. (2006).** Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. **Plant Cell** 18(12): 3399.
- Groppa, M. D., Rosales, E. P., Iannone, M. F. y Benavides, M. P. (2008).** Nitric oxide, polyamines and Cd-induced phytotoxicity in wheat roots. **Phytochemistry** 69(14): 2609.
- Grubisic, D., Giba, Z. y Konjevic, R. (1992).** The effect of organic nitrates in phytochrome-controlled germination of Paulownia tomentosa seeds. **Photochem Photobiol**(56): 629.
- Gubler, F., Millar, A. A. y Jacobsen, J. V. (2005).** Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting. **Curr Opin Plant Biol** 8(2): 183.
- Guo, F. Q. y Crawford, N. M. (2005).** Arabidopsis nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. **Plant Cell** 17(12): 3436.

- Guo, F. Q., Okamoto, M. y Crawford, N. M. (2003).** Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. **Science** 302(5642): 100.
- Guo, J., Zeng, Q., Emami, M., Ellis, B. E. y Chen, J. G. (2008).** The GCR2 gene family is not required for ABA control of seed germination and early seedling development in Arabidopsis. **PLoS One** 3(8): e2982.
- Gupta, K. J. (2011).** Protein S-nitrosylation in plants: photorespiratory metabolism and NO signaling. **Sci Signal** 4(154): jc1.
- Gupta, K. J., Fernie, A. R., Kaiser, W. M. y van Dongen, J. T. (2011).** On the origins of nitric oxide. **Trends Plant Sci** 16(3): 160.
- Gupta, K. J., Stoimenova, M. y Kaiser, W. M. (2005).** In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, in vitro and in situ. **J Exp Bot** 56(420): 2601.
- Han, S., Tang, R., Anderson, L. K., Woerner, T. E. y Pei, Z. M. (2003).** A cell surface receptor mediates extracellular Ca(2+) sensing in guard cells. **Nature** 425(6954): 196.
- Harberd, N., Ed. (2006).** Seed to seed: The secret life of plants. London, Bloomsbury publishing.
- Harberd, N. P. (2003).** Botany. Relieving DELLA restraint. **Science** 299(5614): 1853.
- Harberd, N. P., Belfield, E. y Yasumura, Y. (2009).** The angiosperm gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: how an "inhibitor of an inhibitor" enables flexible response to fluctuating environments. **Plant Cell** 21(5): 1328.
- Harper, J. E. (1981).** Evolution of Nitrogen Oxide(s) during In Vivo Nitrate Reductase Assay of Soybean Leaves. **Plant Physiol** 68(6): 1488.
- Harrison, R. (2002).** Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? **Free Radic Biol Med** 33(6): 774.
- Hartung, W., Sauter, A. y Hose, E. (2002).** Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? **J Exp Bot** 53(366): 27.
- He, Y., Tang, R. H., Hao, Y., Stevens, R. D., Cook, C. W., Ahn, S. M., Jing, L., Yang, Z., Chen, L., Guo, F., Fiorani, F., Jackson, R. B., Crawford, N. M. y Pei, Z. M. (2004).** Nitric oxide represses the Arabidopsis floral transition. **Science** 305(5692): 1968.
- Heim, M. A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B. y Bailey, P. C. (2003).** The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. **Mol Biol Evol** 20(5): 735.
- Hesberg, C., Hansch, R., Mendel, R. R. y Bittner, F. (2004).** Tandem orientation of duplicated xanthine dehydrogenase genes from Arabidopsis thaliana: differential gene expression and enzyme activities. **J Biol Chem** 279(14): 13547.
- Hilhorst, H. W. (1990a).** Dose-Response Analysis of Factors Involved in Germination and Secondary Dormancy of Seeds of *Sisymbrium officinale*: I. Phytochrome. **Plant Physiol** 94(3): 1090.
- Hilhorst, H. W. (1990b).** Dose-Response Analysis of Factors Involved in Germination and Secondary Dormancy of Seeds of *Sisymbrium officinale*: II. Nitrate. **Plant Physiol** 94(3): 1096.

Hiltbrunner, A., Tscheuschler, A., Viczian, A., Kunkel, T., Kircher, S. y Schafer, E. (2006). FHY1 and FHL act together to mediate nuclear accumulation of the phytochrome A photoreceptor. **Plant Cell Physiol** 47(8): 1023.

Hiltbrunner, A., Viczian, A., Bury, E., Tscheuschler, A., Kircher, S., Toth, R., Honsberger, A., Nagy, F., Fankhauser, C. y Schafer, E. (2005). Nuclear accumulation of the phytochrome A photoreceptor requires FHY1. **Curr Biol** 15(23): 2125.

Ho, C. H., Lin, S. H., Hu, H. C. y Tsay, Y. F. (2009). CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. **Cell** 138(6): 1184.

Holdsworth, M. J., Bentsink, L. y Soppe, W. J. (2008a). Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. **New Phytol** 179(1): 33.

Holdsworth, M. J., Finch-Savage, W. E., Grappin, P. y Job, D. (2008b). Post-genomics dissection of seed dormancy and germination. **Trends Plant Sci** 13(1): 7.

Holtgreve, S., Gohlke, J., Starmann, J., Druce, S., Klocke, S., Altmann, B., Wojtera, J., Lindermayr, C. y Scheibe, R. (2008). Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications. **Physiol Plant** 133(2): 211.

Hong J. K., Yun, B. W., Kang J. G., Raja, M. U., Kwon, E., Sorhagen, K., Chu, C., Wang Y. y Loake, G. J. (2008). Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance. **J Exp Bot** 59(2): 147.

Hong S. J., Gokulrangan, G. y Schoneich, C. (2007). Proteomic analysis of age dependent nitration of rat cardiac proteins by solution isoelectric focusing coupled to nanoHPLC tandem mass spectrometry. **Exp Gerontol** 42(7): 639.

Horiguchi, G., Ferjani, A., Fujikura, U. y Tsukaya, H. (2006). Coordination of cell proliferation and cell expansion in the control of leaf size in Arabidopsis thaliana. **J Plant Res** 119(1): 37.

Hornitschek, P., Lorrain, S., Zoete, V., Michielin, O. y Fankhauser, C. (2009). Inhibition of the shade avoidance response by formation of non-DNA binding bHLH heterodimers. **EMBO J** 28(24): 3893.

Hu, X., Neill, S. J., Tang, Z. y Cai, W. (2005). Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. **Plant Physiol** 137(2): 663.

Huang S., Kerschbaum, H. H., Engel, E. y Hermann, A. (1997). Biochemical characterization and histochemical localization of nitric oxide synthase in the nervous system of the snail, *Helix pomatia*. **J Neurochem** 69(6): 2516.

Huang X., Stettmaier, K., Michel, C., Hutzler, P., Mueller, M. J. y Durner, J. (2004). Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in Arabidopsis thaliana. **Planta** 218(6): 938.

Huang X., von Rad, U. y Durner, J. (2002). Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in Arabidopsis suspension cells. **Planta** 215(6): 914.

Huang Y., Baxter, R., Smith, B. S., Partch, C. L., Colbert, C. L. y Deisenhofer, J. (2006). Crystal structure of cryptochrome 3 from Arabidopsis thaliana and its implications for photolyase activity. **Proc Natl Acad Sci U S A** 103(47): 17701.

- Huq, E. y Quail, P. H. (2002).** PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in Arabidopsis. **EMBO J** 21(10): 2441.
- Igamberdiev, A. U. y Hill, R. D. (2009).** Plant mitochondrial function during anaerobiosis. **Ann Bot** 103(2): 259.
- Ignarro, L. J. (1990).** Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. **Hypertension** 16(5): 477.
- Ikeda, A., Ueguchi-Tanaka, M., Sonoda, Y., Kitano, H., Koshioka, M., Futsuhara, Y., Matsuoka, M. y Yamaguchi, J. (2001).** slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. **Plant Cell** 13(5): 999.
- Imaizumi, T., Tran, H. G., Swartz, T. E., Briggs, W. R. y Kay, S. A. (2003).** FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in Arabidopsis. **Nature** 426(6964): 302.
- Inoue, K., Akaike, T., Miyamoto, Y., Okamoto, T., Sawa, T., Otagiri, M., Suzuki, S., Yoshimura, T. y Maeda, H. (1999).** Nitrosothiol formation catalyzed by ceruloplasmin. Implication for cytoprotective mechanism in vivo. **J Biol Chem** 274(38): 27069.
- Irie, Y., Saeki, M., Kamisaki, Y., Martin, E. y Murad, F. (2003).** Histone H1.2 is a substrate for denitrase, an activity that reduces nitrotyrosine immunoreactivity in proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A** 100(10): 5634.
- Ischiropoulos, H. (1998).** Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. **Arch Biochem Biophys** 356(1): 1.
- Ischiropoulos, H. (2003).** Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. **Biochem Biophys Res Commun** 305(3): 776.
- Ischiropoulos, H. y al-Mehdi, A. B. (1995).** Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. **FEBS Lett** 364(3): 279.
- Ito, K., Hanazawa, T., Tomita, K., Barnes, P. J. y Adcock, I. M. (2004).** Oxidative stress reduces histone deacetylase 2 activity and enhances IL-8 gene expression: role of tyrosine nitration. **Biochem Biophys Res Commun** 315(1): 240.
- Jang, I. C., Henriques, R., Seo, H. S., Nagatani, A. y Chua, N. H. (2010).** Arabidopsis PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR proteins promote phytochrome B polyubiquitination by COP1 E3 ligase in the nucleus. **Plant Cell** 22(7): 2370.
- Jang, I. C., Yang, J. Y., Seo, H. S. y Chua, N. H. (2005).** HFR1 is targeted by COP1 E3 ligase for post-translational proteolysis during phytochrome A signaling. **Genes Dev** 19(5): 593.
- Jarillo, J. A., Capel, J., Tang, R. H., Yang, H. Q., Alonso, J. M., Ecker, J. R. y Cashmore, A. R. (2001a).** An Arabidopsis circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB. **Nature** 410(6827): 487.
- Jarillo, J. A., Gabrys, H., Capel, J., Alonso, J. M., Ecker, J. R. y Cashmore, A. R. (2001b).** Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. **Nature** 410(6831): 952.

- Jasid, S., Simontacchi, M., Bartoli, C. G. y Puntarulo, S. (2006).** Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins. **Plant Physiol** 142(3): 1246.
- Jeannette, E., Rona, J. P., Bardat, F., Cornel, D., Sotta, B. y Miginiac, E. (1999).** Induction of RAB18 gene expression and activation of K⁺ outward rectifying channels depend on an extracellular perception of ABA in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. **Plant J** 18(1): 13.
- Jenkins, G. I. (2009).** Signal transduction in responses to UV-B radiation. **Annu Rev Plant Biol** 60: 407.
- Jiao, Y., Lau, O. S. y Deng, X. W. (2007).** Light-regulated transcriptional networks in higher plants. **Nat Rev Genet** 8(3): 217.
- Jing, H. C., Hebler, R., Oeljeklaus, S., Sitek, B., Stuhler, K., Meyer, H. E., Sturre, M. J., Hille, J., Warscheid, B. y Dijkwel, P. P. (2008).** Early leaf senescence is associated with an altered cellular redox balance in *Arabidopsis cpr5/old1* mutants. **Plant Biol (Stuttg)** 10 Suppl 1: 85.
- Johansson, C. (1984).** Field measurements of emission of nitric oxide from fertilized and unfertilized forest soils in Sweden **Journal of Atmospheric Chemistry** 1: 429.
- Jonassen, E. M., Sandsmark, B. A. y Lillo, C. (2009a).** Unique status of NIA2 in nitrate assimilation: NIA2 expression is promoted by HY5/HYH and inhibited by PIF4. **Plant Signal Behav** 4(11): 1084.
- Jonassen, E. M., Sevin, D. C. y Lillo, C. (2009b).** The bZIP transcription factors HY5 and HYH are positive regulators of the main nitrate reductase gene in *Arabidopsis* leaves, NIA2, but negative regulators of the nitrate uptake gene NRT1.1. **J Plant Physiol** 166(18): 2071.
- Jovanovic, V., Giba, Z., Djokovic, D., Milosavljevic, S., Grubisic, D. y Konjevic, R. (2005).** Gibberellic acid nitrite stimulates germination of two species of light-requiring seeds via the nitric oxide pathway. **Ann N Y Acad Sci** 1048: 476.
- Kagawa, T., Kasahara, M., Abe, T., Yoshida, S. y Wada, M. (2004).** Function analysis of phototropin2 using fern mutants deficient in blue light-induced chloroplast avoidance movement. **Plant Cell Physiol** 45(4): 416.
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P. y Fankhauser, C. (2010).** Light-regulated plant growth and development. **Curr Top Dev Biol** 91: 29.
- Kamisaki, Y., Wada, K., Bian, K., Balabanli, B., Davis, K., Martin, E., Behbod, F., Lee, Y. C. y Murad, F. (1998).** An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A** 95(20): 11584.
- Kang, J., Hwang, J. U., Lee, M., Kim, Y. Y., Assmann, S. M., Martinoia, E. y Lee, Y. (2010).** PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. **Proc Natl Acad Sci U S A** 107(5): 2355.
- Kasina, S., Rizwani, W., Radhika, K. V. y Singh, S. S. (2005).** Nitration of profilin effects its interaction with poly (L-proline) and actin. **J Biochem** 138(6): 687.
- Kato, H., Asai, S., Yamamoto-Katou, A., Yoshioka, H., Doke, N. y Kawakita, K. (2008).** Involvement of NbNOA1 in NO production and defense responses in INF1-treated *Nicotiana benthamiana*. **JGenPlantPathol** 74: 15.

- Keeley, J. E. y Fotheringham, C. J. (1998).** Mechanism of smoke-induced seed germination in a post-fire chaparral annual. **Journal of Ecology** 86: 27.
- Khanna, R., Huq, E., Kikis, E. A., Al-Sady, B., Lanzatella, C. y Quail, P. H. (2004).** A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific basic helix-loop-helix transcription factors. **Plant Cell** 16(11): 3033.
- Kiba, T., Henriques, R., Sakakibara, H. y Chua, N. H. (2007).** Targeted degradation of PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5 by an SCFZTL complex regulates clock function and photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell** 19(8): 2516.
- Kidokoro, S., Maruyama, K., Nakashima, K., Imura, Y., Narusaka, Y., Shinwari, Z. K., Osakabe, Y., Fujita, Y., Mizoi, J., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009).** The phytochrome-interacting factor PIF7 negatively regulates DREB1 expression under circadian control in *Arabidopsis*. **Plant Physiol** 151(4): 2046.
- Kim, J., Yi, H., Choi, G., Shin, B. y Song, P. S. (2003).** Functional characterization of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signal transduction. **Plant Cell** 15(10): 2399.
- Kim, W. K. (1999).** S-nitrosation ameliorates homocysteine-induced neurotoxicity and calcium responses in primary culture of rat cortical neurons. **Neurosci Lett** 265(2): 99.
- Kim, W. K., Choi, Y. B., Rayudu, P. V., Das, P., Asaad, W., Arnelle, D. R., Stamler, J. S. y Lipton, S. A. (1999).** Attenuation of NMDA receptor activity and neurotoxicity by nitroxyl anion, NO. **Neuron** 24(2): 461.
- Kiyosue, T. y Wada, M. (2000).** LKP1 (LOV kelch protein 1): a factor involved in the regulation of flowering time in *Arabidopsis*. **Plant J** 23(6): 807.
- Kleine, T., Lockhart, P. y Batschauer, A. (2003).** An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. **Plant J** 35(1): 93.
- Klepper, L. (1990).** Comparison between NO(x) Evolution Mechanisms of Wild-Type and nr(1) Mutant Soybean Leaves. **Plant Physiol** 93(1): 26.
- Klepper, L. A. (1987).** Nitric Oxide Emissions from Soybean Leaves during in Vivo Nitrate Reductase Assays. **Plant Physiol** 85(1): 96.
- Klessig, D., Martin, G. y Ekengren, S. (2004a).** Suppression of pathogen-inducible NO synthase (iNOS) activity in tomato increases susceptibility to *Pseudomonas syringae*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 101(45).
- Klessig, D. F., Ytterberg, A. J. y van Wijk, K. J. (2004b).** The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. **Cell** 119(3): 445.
- Knowles, M. E., McWeeny, D. J., Couchman, L. y Thorogood, M. (1974).** Interaction of nitrite with proteins at gastric pH. **Nature** 247(439): 288.
- Knyushko, T. V., Sharov, V. S., Williams, T. D., Schoneich, C. y Bigelow, D. J. (2005).** 3-Nitrotyrosine modification of SERCA2a in the aging heart: a distinct signature of the cellular redox environment. **Biochemistry** 44(39): 13071.

- Koini, M. A., Alvey, L., Allen, T., Tilley, C. A., Harberd, N. P., Whitelam, G. C. y Franklin, K. A. (2009).** High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4. **Curr Biol** 19(5): 408.
- Kolbert, Z., Bartha, B. y Erdei, L. (2008a).** Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordia. **J Plant Physiol** 165(9): 967.
- Kolbert, Z., Bartha, B. y Erdei, L. (2008b).** Osmotic stress- and indole-3-butyric acid-induced NO generation are partially distinct processes in root growth and development in *Pisum sativum*. **Physiol Plant** 133(2): 406.
- Kolbert, Z. y Erdei, L. (2008).** Involvement of nitrate reductase in auxin-induced NO synthesis. **Plant Signal Behav** 3(11): 972.
- Koornneef, M., Bentsink, L. y Hilhorst, H. (2002).** Seed dormancy and germination. **Curr Opin Plant Biol** 5(1): 33.
- Kotamraju, S., Tampo, Y., Keszler, A., Chitambar, C. R., Joseph, J., Haas, A. L. y Kalyanaraman, B. (2003).** Nitric oxide inhibits H₂O₂-induced transferrin receptor-dependent apoptosis in endothelial cells: Role of ubiquitin-proteasome pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A** 100(19): 10653.
- Krebs, E. y Fischer, E. (1964).** PHOSPHORYLASE AND RELATED ENZYMES OF GLYCOGEN METABOLISM. **Vitam Horm** 22: 399.
- Kumar, S. V. y Wigge, P. A. (2010).** H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*. **Cell** 140(1): 136.
- Kuo, W. N., Jn-Baptiste, J. B., Kanadia, R. N., McNabb, L. D., Zhai, L., Weeks, K., Dopson, N. y Chambers, M. C. (1996).** Immunoreactivities of m-calpain, calpastatin, nitric oxide synthase, myelin basic protein and dynamin II in baker's yeast, wheat germ and lobster tail muscle. **Cytobios** 87(351): 251.
- Kuo, W. N., Kanadia, R. N., Shanbhag, V. P. y Toro, R. (1999).** Denitration of peroxynitrite-treated proteins by 'protein nitrates' from rat brain and heart. **Mol Cell Biochem** 201(1-2): 11.
- Kuppusamy, K. T., Walcher, C. L. y Nemhauser, J. L. (2009).** Cross-regulatory mechanisms in hormone signaling. **Plant Mol Biol** 69(4): 375.
- Kuromori, T., Miyaji, T., Yabuuchi, H., Shimizu, H., Sugimoto, E., Kamiya, A., Moriyama, Y. y Shinozaki, K. (2010).** ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. **Proc Natl Acad Sci U S A** 107(5): 2361.
- Kuromori, T. y Shinozaki, K. (2010).** ABA transport factors found in *Arabidopsis* ABC transporters. **Plant Signal Behav** 5(9): 1124.
- Kushiro, T., Okamoto, M., Nakabayashi, K., Yamagishi, K., Kitamura, S., Asami, T., Hirai, N., Koshihara, T., Kamiya, Y. y Nambara, E. (2004).** The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. **EMBO J** 23(7): 1647.
- Kwak, J. M., Mori, I. C., Pei, Z. M., Leonhardt, N., Torres, M. A., Dangl, J. L., Bloom, R. E., Bodde, S., Jones, J. D. y Schroeder, J. I. (2003).** NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. **EMBO J** 22(11): 2623.

- Lamas, S., Marsden, P. A., Li, G. K., Tempst, P. y Michel, T. (1992).** Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. **Proc Natl Acad Sci U S A** 89(14): 6348.
- Lamattina, L., Garcia-Mata, C., Graziano, M. y Pagnussat, G. (2003).** Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. **Annu Rev Plant Biol** 54: 109.
- Lamattina, L. y Polacco, J. C., Eds. (2007).** Nitric Oxide in Plant Growth, Development and Stress Physiology. Plant Cell Monographs. Heidelberg, Springer-Verlag.
- Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R. y Thornton, J. M. (1996).** AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. **J Biomol NMR** 8(4): 477.
- Lau, O. S. y Deng, X. W. (2010).** Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. **Curr Opin Plant Biol** 13(5): 571.
- Layne, P. P. y Najjar, V. A. (1979).** Evidence for a tyrosine residue at the active site of phosphoglucomutase and its interaction with vanadate. **Proc Natl Acad Sci U S A** 76(10): 5010.
- Leckie, C. P., McAinsh, M. R., Allen, G. J., Sanders, D. y Hetherington, A. M. (1998).** Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose. **Proc Natl Acad Sci U S A** 95(26): 15837.
- Lee, J., He, K., Stolc, V., Lee, H., Figueroa, P., Gao, Y., Tongprasit, W., Zhao, H., Lee, I. y Deng, X. W. (2007).** Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development. **Plant Cell** 19(3): 731.
- Lee, K. H., Piao, H. L., Kim, H. Y., Choi, S. M., Jiang, F., Hartung, W., Hwang, I., Kwak, J. M. y Lee, I. J. (2006).** Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. **Cell** 126(6): 1109.
- Lee, S., Cheng, H., King, K. E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N. P. y Peng, J. (2002).** Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. **Genes Dev** 16(5): 646.
- Lee, U., Wie, C., Fernandez, B. O., Feilisch, M. y Vierling, E. (2008).** Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in Arabidopsis. **Plant Cell** 20(3): 786.
- Legnaioli, T., Cuevas, J. y Mas, P. (2009).** TOC1 functions as a molecular switch connecting the circadian clock with plant responses to drought. **EMBO J** 28(23): 3745.
- Lei, S. Z., Pan, Z. H., Aggarwal, S. K., Chen, H. S., Hartman, J., Sucher, N. J. y Lipton, S. A. (1992).** Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. **Neuron** 8(6): 1087.
- Leitner, M., Vandelle, E., Gaupels, F., Bellin, D. y Delledonne, M. (2009).** NO signals in the haze: nitric oxide signalling in plant defence. **Curr Opin Plant Biol** 12(4): 451.
- Leivar, P., Monte, E., Al-Sady, B., Carle, C., Storer, A., Alonso, J. M., Ecker, J. R. y Quail, P. H. (2008a).** The Arabidopsis phytochrome-interacting factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels. **Plant Cell** 20(2): 337.

- Leivar, P., Monte, E., Oka, Y., Liu, T., Carle, C., Castillon, A., Huq, E. y Quail, P. H. (2008b).** Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness. **Curr Biol** 18(23): 1815.
- Leivar, P. y Quail, P. H. (2011).** PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. **Trends Plant Sci** 16(1): 19.
- Leivar, P., Tepperman, J. M., Monte, E., Calderon, R. H., Liu, T. L. y Quail, P. H. (2009).** Definition of early transcriptional circuitry involved in light-induced reversal of PIF-imposed repression of photomorphogenesis in young Arabidopsis seedlings. **Plant Cell** 21(11): 3535.
- Li, B. y Foley, M. E. (1996).** Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Dormancy-Associated Gene Expression by Afterripening in Wild Oat. **Plant Physiol** 110(4): 1267.
- Li, H., Samouilov, A., Liu, X. y Zweier, J. L. (2001).** Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrite reduction. Evaluation of its role in nitric oxide generation in anoxic tissues. **J Biol Chem** 276(27): 24482.
- Li, L., Saga, N. y Mikami, K. (2009a).** Ca²⁺ influx and phosphoinositide signalling are essential for the establishment and maintenance of cell polarity in monospores from the red alga *Porphyra yezoensis*. **J Exp Bot** 60(12): 3477.
- Li, Y., Qi, J., Liu, K., Li, B., Wang, H. y Jia, J. (2010).** Peroxynitrite-induced nitration of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase promotes their binding in diabetic angiopathy. **Mol Med** 16(9-10): 335.
- Li, Z., Wakao, S., Fischer, B. B. y Niyogi, K. K. (2009b).** Sensing and responding to excess light. **Annu Rev Plant Biol** 60: 239.
- Liang, F. S., Ho, W. Q. y Crabtree, G. R. (2011).** Engineering the ABA Plant Stress Pathway for Regulation of Induced Proximity. **Sci Signal** 4(164): rs2.
- Libourel, I. G., Bethke, P. C., De Michele, R. y Jones, R. L. (2006).** Nitric oxide gas stimulates germination of dormant Arabidopsis seeds: use of a flow-through apparatus for delivery of nitric oxide. **Planta** 223(4): 813.
- Lillo, C., Meyer, C., Lea, U. S., Provan, F. y Olstedal, S. (2004).** Mechanism and importance of post-translational regulation of nitrate reductase. **J Exp Bot** 55(401): 1275.
- Lin, C., Yang, H., Guo, H., Mockler, T., Chen, J. y Cashmore, A. R. (1998).** Enhancement of blue-light sensitivity of Arabidopsis seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. **Proc Natl Acad Sci U S A** 95(5): 2686.
- Lin, Y. y Cheng, C. L. (1997).** A chlorate-resistant mutant defective in the regulation of nitrate reductase gene expression in Arabidopsis defines a new HY locus. **Plant Cell** 9(1): 21.
- Lindermayr, C., Saalbach, G., Bahnweg, G. y Durner, J. (2006).** Differential inhibition of Arabidopsis methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. **J Biol Chem** 281(7): 4285.
- Lindermayr, C., Saalbach, G. y Durner, J. (2005).** Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis. **Plant Physiol** 137(3): 921.
- Lindermayr, C., Sell, S., Muller, B., Leister, D. y Durner, J. (2010).** Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of Arabidopsis thaliana by nitric oxide. **Plant Cell** 22(8): 2894.

- Liu, B., Tewari, A. K., Zhang L., Green-Church, K. B., Zweier, J. L., Chen, Y. R. y He, G. (2009a).** Proteomic analysis of protein tyrosine nitration after ischemia reperfusion injury: mitochondria as the major target. **Biochim Biophys Acta** 1794(3): 476.
- Liu, C., Wang J., Huang T., Wang F., Yuan, F., Cheng X., Zhang Y., Shi, S., Wu, J. y Liu, K. (2010).** A missense mutation in the VHYNP motif of a DELLA protein causes a semi-dwarf mutant phenotype in *Brassica napus*. **Theor Appl Genet** 121(2): 249.
- Liu, L., Hausladen, A., Zeng M., Que, L., Heitman, J. y Stamler, J. S. (2001).** A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. **Nature** 410(6827): 490.
- Liu, X., Yue, Y., Li, B., Nie, Y., Li, W., Wu, W. H. y Ma, L. (2007).** A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. **Science** 315(5819): 1712.
- Liu, Y., Shi, L., Ye, N., Liu, R., Jia, W. y Zhang J. (2009b).** Nitric oxide-induced rapid decrease of abscisic acid concentration is required in breaking seed dormancy in *Arabidopsis*. **New Phytol** 183(4): 1030.
- Liu, Z., Cao, J., Ma, Q., Gao, X., Ren, J. y Xue, Y. (2011).** GPS-YNO2: computational prediction of tyrosine nitration sites in proteins. **Mol Biosyst** 7(4): 1197.
- Lo, S. C., Butt, Y. K. y Chan, Y. S. (2000).** False nitric oxide synthase immunoreactivity in *Asparagus bean* (*Vigna sesquipedalis*). **Nitric Oxide** 4(2): 175.
- Lombardo, M. C., Graziano, M., Polacco, J. C. y Lamattina, L. (2006).** Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. **Plant Signal Behav** 1(1): 28.
- Lopez-Bucio, J., Acevedo-Hernandez, G., Ramirez-Chavez, E., Molina-Torres, J. y Herrera-Estrella, L. (2006).** Novel signals for plant development. **Curr Opin Plant Biol** 9(5): 523.
- Lorrain, S., Allen, T., Duek, P. D., Whitelam, G. C. y Fankhauser, C. (2008).** Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. **Plant J** 53(2): 312.
- Loy, J. B. y Liu, P. B. (1974).** Response of seedlings of a dwarf and a normal strain of watermelon to gibberellins. **Plant Physiol** 53(3): 325.
- Lymar, S. V., Jiang Q. y Hurst, J. K. (1996).** Mechanism of carbon dioxide-catalyzed oxidation of tyrosine by peroxyxynitrite. **Biochemistry** 35(24): 7855.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A. y Grill, E. (2009).** Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. **Science** 324(5930): 1064.
- MacRobbie, E. A. (2000).** ABA activates multiple Ca²⁺ fluxes in stomatal guard cells, triggering vacuolar K⁺(Rb⁺) release. **Proc Natl Acad Sci U S A** 97(22): 12361.
- Mallick, N., Rai, L. C., Mohn, F. H. y Soeder, C. J. (1999).** Studies on nitric oxide (NO) formation by the green alga *Scenedesmus obliquus* and the diazotrophic cyanobacterium *Anabaena doliolum*. **Chemosphere** 39(10): 1601.

- Mallozzi, C., Ceccarini, M., Camerini, S., Macchia, G., Crescenzi, M., Petrucci, T. C. y Di Stasi, A. M. (2009).** Peroxynitrite induces tyrosine residue modifications in synaptophysin C-terminal domain, affecting its interaction with src. **J Neurochem** 111(3): 859.
- Mas, P., Devlin, P. F., Panda, S. y Kay, S. A. (2000).** Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. **Nature** 408(6809): 207.
- Mathews, S. (2006).** Seeing the light. **Nat Genet** 38(6): 606.
- McCourt, P. y Creelman, R. (2003).** The ABA receptors -- we report you decide. **Curr Opin Plant Biol** 11(5): 474.
- Melcher, K., Xu, Y., Ng L. M., Zhou, X. E., Soon, F. F., Chinnusamy, V., Suino-Powell, K. M., Kovach, A., Tham, F. S., Cutler, S. R., Li, J., Yong, E. L., Zhu, J. K. y Xu, H. E. (2010).** Identification and mechanism of ABA receptor antagonism. **Nat Struct Mol Biol** 17(9): 1102.
- Melo, F. y Feytmans, E. (1998).** Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy. **J Mol Biol** 277(5): 1141.
- Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A. y Giraudat, J. (2001).** The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. **Plant J** 25(3): 295.
- Merlot, S., Mustilli, A. C., Genty, B., North, H., Lefebvre, V., Sotta, B., Vavasseur, A. y Giraudat, J. (2002).** Use of infrared thermal imaging to isolate Arabidopsis mutants defective in stomatal regulation. **Plant J** 30(5): 601.
- Miflin, B. J. (1974).** The location of nitrite reductase and other enzymes related to amino Acid biosynthesis in the plastids of root and leaves. **Plant Physiol** 54(4): 550.
- Mikula, I., Durocher, S., Martasek, P., Mutus, B. y Slama-Schwok, A. (2009).** Isoform-specific differences in the nitrite reductase activity of nitric oxide synthases under hypoxia. **Biochem J** 418(3): 673.
- Millar, T. M., Stevens, C. R., Benjamin, N., Eisenthal, R., Harrison, R. y Blake, D. R. (1998).** Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. **FEBS Lett** 427(2): 225.
- Millar, T. M., Stevens, C. R. y Blake, D. R. (1997).** Xanthine oxidase can generate nitric oxide from nitrate in ischaemia. **Biochem Soc Trans** 25(3): 528S.
- Mira-Rodado, V., Sweere, U., Grefen, C., Kunkel, T., Fejes, E., Nagy, F., Schafer, E. y Harter, K. (2007).** Functional cross-talk between two-component and phytochrome B signal transduction in Arabidopsis. **J Exp Bot** 58(10): 2595.
- Mishina, T. E., Lamb, C. y Zeier, J. (2007).** Expression of a nitric oxide degrading enzyme induces a senescence programme in Arabidopsis. **Plant Cell Environ** 30(1): 39.
- Miyagi, M., Sakaguchi, H., Darrow, R. M., Yan, L., West, K. A., Aulak, K. S., Stuehr, D. J., Hollyfield, J. G., Organisciak, D. T. y Crabb, J. W. (2002).** Evidence that light modulates protein nitration in rat retina. **Mol Cell Proteomics** 1(4): 293.
- Modolo, L. V., Augusto, O., Almeida, I. M., Magalhaes, J. R. y Salgado, I. (2005).** Nitrite as the major source of nitric oxide production by Arabidopsis thaliana in response to Pseudomonas syringae. **FEBS Lett** 579(17): 3814.

- Modolo, L. V., Cunha, F. Q., Braga, M. R. y Salgado, I. (2002).** Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. meridionalis elicitor. **Plant Physiol** 130(3): 1288.
- Moglich, A., Yang, X., Ayers, R. A. y Moffat, K. (2010).** Structure and function of plant photoreceptors. **Annu Rev Plant Biol** 61: 21.
- Molassiotis, A., Tanou, G. y Diamantidis, G. (2010).** NO says more than 'YES' to salt tolerance: Salt priming and systemic nitric oxide signaling in plants. **Plant Signal Behav** 5(3): 209.
- Moreau, M., Lee, G. I., Wang, Y., Crane, B. R. y Klessig D. F. (2008).** AtNOS/AtNOA1 is a functional *Arabidopsis thaliana* cGTPase and not a nitric-oxide synthase. **J Biol Chem** 283(47): 32957.
- Moreau, M., Lindermayr, C., Durner, J. y Klessig D. F. (2010).** NO synthesis and signaling in plants--where do we stand? **Physiol Plant** 138(4): 372.
- Morot-Gaudry-Talarmin, Y., Rockel, P., Moureaux, T., Quillere, I., Leydecker, M. T., Kaiser, W. M. y Morot-Gaudry, J. F. (2002).** Nitrite accumulation and nitric oxide emission in relation to cellular signaling in nitrite reductase antisense tobacco. **Planta** 215(5): 708.
- Muangprom, A., Thomas, S. G., Sun, T. P. y Osborn, T. C. (2005).** A novel dwarfing mutation in a green revolution gene from *Brassica rapa*. **Plant Physiol** 137(3): 931.
- Muller, A. H. y Hansson, M. (2009).** The barley magnesium chelatase 150-kd subunit is not an abscisic acid receptor. **Plant Physiol** 150(1): 157.
- Muller, K., Carstens, A. C., Linkies, A., Torres, M. A. y Leubner-Metzger, G. (2009).** The NADPH-oxidase AtrbohB plays a role in *Arabidopsis* seed after-ripening. **New Phytol** 184(4): 885.
- Mur, L. A., Carver, T. L. y Prats, E. (2006).** NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. **J Exp Bot** 57(3): 489.
- Mur, L. A., Laarhoven, L. J., Harren, F. J., Hall, M. A. y Smith, A. R. (2008).** Nitric oxide interacts with salicylate to regulate biphasic ethylene production during the hypersensitive response. **Plant Physiol** 148(3): 1537.
- Murase, K., Hirano, Y., Sun, T. P. y Hakoshima, T. (2008).** Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. **Nature** 456(7221): 459.
- Mussig, C., Shin, G. H. y Altmann, T. (2003).** Brassinosteroids promote root growth in *Arabidopsis*. **Plant Physiol** 133(3): 1261.
- Mustilli, A. C., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F. y Giraudat, J. (2002).** *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. **Plant Cell** 14(12): 3089.
- Nakagawa, A., Sakamoto, S., Takahashi, M., Morikawa, H. y Sakamoto, A. (2007).** The RNAi-mediated silencing of xanthine dehydrogenase impairs growth and fertility and accelerates leaf senescence in transgenic *Arabidopsis* plants. **Plant Cell Physiol** 48(10): 1484.
- Nakajima, M., Shimada, A., Takashi, Y., Kim, Y. C., Park, S. H., Ueguchi-Tanaka, M., Suzuki, H., Katoh, E., Iuchi, S., Kobayashi, M., Maeda, T., Matsuoka, M. y Yamaguchi, I.**

- (2006). Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. **Plant J** 46(5): 880.
- Nambara, E. y Marion-Poll, A. (2005)**. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. **Annu Rev Plant Biol** 56: 165.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lison, P., Nemri, A., Harberd, N. P. y Jones, J. D. (2008)**. DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. **Curr Biol** 18(9): 650.
- Neff, M. M., Fankhauser, C. y Chory, J. (2000)**. Light: an indicator of time and place. **Genes Dev** 14(3): 257.
- Neill, S. (2005)**. NO way to die--nitric oxide, programmed cell death and xylogenesis. **New Phytol** 165(1): 5.
- Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Morris, P., Ribeiro, D. y Wilson, I. (2008)**. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. **J Exp Bot** 59(2): 165.
- Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A. y Hancock, J. T. (2002a)**. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. **Plant Physiol** 128(1): 13.
- Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D. y Hancock, J. T. (2002b)**. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. **J Exp Bot** 53(372): 1237.
- Nelson, D. C., Lasswell, J., Rogg, L. E., Cohen, M. A. y Bartel, B. (2000)**. FKF1, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in Arabidopsis. **Cell** 101(3): 331.
- Nemhauser, J. (2008)**. Dawning of a new era: photomorphogenesis as an integrated molecular network. **Curr Opin Plant Biol** 11(1): 4.
- Nemhauser, J. L., Maloof, J. N. y Chory, J. (2003)**. Building integrated models of plant growth and development. **Plant Physiol** 132(2): 436.
- Neuhaus, G., Bowler, C., Hiratsuka, K., Yamagata, H. y Chua, N. H. (1997)**. Phytochrome-regulated repression of gene expression requires calcium and cGMP. **EMBO J** 16(10): 2554.
- Ni, M., Tepperman, J. M. y Quail, P. H. (1998)**. PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. **Cell** 95(5): 657.
- Nicolaou, A., Kenyon, S. H., Gibbons, J. M., Ast, T. y Gibbons, W. A. (1996)**. In vitro inactivation of mammalian methionine synthase by nitric oxide. **Eur J Clin Invest** 26(2): 167.
- Nicolaou, A., Waterfield, C. J., Kenyon, S. H. y Gibbons, W. A. (1997)**. The inactivation of methionine synthase in isolated rat hepatocytes by sodium nitroprusside. **Eur J Biochem** 244(3): 876.
- Nicotra, A. B., Atkin, O. K., Bonser, S. P., Davidson, A. M., Finnegan, E. J., Mathesius, U., Poot, P., Purugganan, M. D., Richards, C. L., Valladares, F. y van Kleunen, M. (2010)**. Plant phenotypic plasticity in a changing climate. **Trends Plant Sci** 15(12): 684.
- Nishimura, N., Hitomi, K., Arvai, A. S., Rambo, R. P., Hitomi, C., Cutler, S. R., Schroeder, J. I. y Getzoff, E. D. (2009)**. Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. **Science** 326(5958): 1373.

Nishimura, N., Sarkeshik, A., Nito, K., Park, S. Y., Wang, A., Carvalho, P. C., Lee, S., Caddell, D. F., Cutler, S. R., Chory, J., Yates, J. R. y Schroeder, J. I. (2010). PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in Arabidopsis. **Plant J** 61(2): 290.

Nitsan, J. y Lang, A. (1966). DNA synthesis in the elongating nondividing cells of the lentil epicotyl and its promotion by gibberellin. **Plant Physiol** 41(6): 965.

Nozue, K., Covington, M. F., Duek, P. D., Lorrain, S., Fankhauser, C., Harmer, S. L. y Maloof, J. N. (2007). Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. **Nature** 448(7151): 358.

Oh, E., Yamaguchi, S., Hu, J., Yusuke, J., Jung, B., Paik, I., Lee, H. S., Sun, T. P., Kamiya, Y. y Choi, G. (2007). PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in Arabidopsis seeds. **Plant Cell** 19(4): 1192.

Okamoto, M., Kushiro, T., Jikumaru, Y., Abrams, S. R., Kamiya, Y., Seki, M. y Nambara, E. (2011). ABA 9'-hydroxylation is catalyzed by CYP707A in Arabidopsis. **Phytochemistry** 72(8): 717.

Orozco-Cardenas, M. L. y Ryan, C. A. (2002). Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. **Plant Physiol** 130(1): 487.

Otvos, K., Pasternak, T. P., Miskolczi, P., Domoki, M., Dorjgotov, D., Szucs, A., Bottka, S., Dudits, D. y Feher, A. (2005). Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. **Plant J** 43(6): 849.

Pagnussat, G. C., Lanteri, M. L. y Lamattina, L. (2003). Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. **Plant Physiol** 132(3): 1241.

Pagnussat, G. C., Lanteri, M. L., Lombardo, M. C. y Lamattina, L. (2004). Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. **Plant Physiol** 135(1): 279.

Pagnussat, G. C., Simontacchi, M., Puntarulo, S. y Lamattina, L. (2002). Nitric oxide is required for root organogenesis. **Plant Physiol** 129(3): 954.

Palamalai, V. y Miyagi, M. (2010). Mechanism of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by tyrosine nitration. **Protein Sci** 19(2): 255.

Palmieri, M. C., Lindermayr, C., Bauwe, H., Steinhauser, C. y Durner, J. (2010). Regulation of plant glycine decarboxylase by s-nitrosylation and glutathionylation. **Plant Physiol** 152(3): 1514.

Pandey, S., Nelson, D. C. y Assmann, S. M. (2009). Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in Arabidopsis. **Cell** 136(1): 136.

Parani, M., Rudrabhatla, S., Myers, R., Weirich, H., Smith, B., Leaman, D. W. y Goldman, S. L. (2004). Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in Arabidopsis. **Plant Biotechnol J** 2(4): 359.

- Parihar, M. S., Parihar, A., Chen, Z., Nazarewicz, R. y Ghafourifar, P. (2008).** mAtNOS1 regulates mitochondrial functions and apoptosis of human neuroblastoma cells. **Biochim Biophys Acta** 1780(6): 921.
- Park, E., Kim, J., Lee, Y., Shin, J., Oh, E., Chung, W. I., Liu, J. R. y Choi, G. (2004).** Degradation of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signaling. **Plant Cell Physiol** 45(8): 968.
- Park, S. Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T. F., Alfred, S. E., Bonetta, D., Finkelstein, R., Provart, N. J., Desveaux, D., Rodriguez, P. L., McCourt, P., Zhu, J. K., Schroeder, J. I., Volkman, B. F. y Cutler, S. R. (2009).** Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. **Science** 324(5930): 1068.
- Peng, J., Carol, P., Richards, D., King, K., Cowling, R., Murphy, G. y Harberd, N. (1997).** The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. **Genes Dev** 11(23): 3194.
- Perazzoli, M., Romero-Puertas, M. C. y Delledonne, M. (2006).** Modulation of nitric oxide bioactivity by plant haemoglobins. **J Exp Bot** 57(3): 479.
- Petersen, B., Petersen, T. N., Andersen, P., Nielsen, M. y Lundegaard, C. (2009).** A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. **BMC Struct Biol** 9: 51.
- Peterson, F. C., Burgie, E. S., Park, S. Y., Jensen, D. R., Weiner, J. J., Bingman, C. A., Chang, C. E., Cutler, S. R., Phillips, G. N., Jr. y Volkman, B. F. (2010).** Structural basis for selective activation of ABA receptors. **Nat Struct Mol Biol** 17(9): 1109.
- Phillips, A. L., Ward, D. A., Uknes, S., Appleford, N. E., Lange, T., Huttly, A. K., Gaskin, P., Graebe, J. E. y Hedden, P. (1995).** Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from Arabidopsis. **Plant Physiol** 108(3): 1049.
- Planchet, E., Jagadis Gupta, K., Sonoda, M. y Kaiser, W. M. (2005).** Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. **Plant J** 41(5): 732.
- Planchet, E. y Kaiser, W. M. (2006).** Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources. **J Exp Bot** 57(12): 3043.
- Pokorny, R., Klar, T., Hennecke, U., Carell, T., Batschauer, A. y Essen, L. O. (2008).** Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome. **Proc Natl Acad Sci U S A** 105(52): 21023.
- Polverari, A., Molesini, B., Pezzotti, M., Buonauro, R., Marte, M. y Delledonne, M. (2003).** Nitric oxide-mediated transcriptional changes in Arabidopsis thaliana. **Mol Plant Microbe Interact** 16(12): 1094.
- Prado, A. M., Porterfield, D. M. y Feijo, J. A. (2004).** Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. **Development** 131(11): 2707.
- Qiao, W. y Fan, L. M. (2008).** Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stresses. **J Integr Plant Biol** 50(10): 1238.

- Radi, R. (2004).** Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. **Proc Natl Acad Sci U S A** 101(12): 4003.
- Ramirez, L., Zabaleta, E. J. y Lamattina, L. (2010).** Nitric oxide and frataxin: two players contributing to maintain cellular iron homeostasis. **Ann Bot** 105(5): 801.
- Razem, F. A., El-Kereamy, A., Abrams, S. R. y Hill, R. D. (2006).** The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. **Nature** 439(7074): 290.
- Razem, F. A. y Hill, R. D. (2007).** Hydrogen peroxide affects abscisic acid binding to ABAP1 in barley aleurones. **Biochem Cell Biol** 85(5): 628.
- Reichler, S. A., Torres, J., Rivera, A. L., Cintolesi, V. A., Clark, G. y Roux, S. J. (2009).** Intersection of two signalling pathways: extracellular nucleotides regulate pollen germination and pollen tube growth via nitric oxide. **J Exp Bot** 60(7): 2129.
- Reynolds, J. D., Ahearn, G. S., Angelo, M., Zhang, J., Cobb, F. y Stamler, J. S. (2007).** S-nitrosohemoglobin deficiency: a mechanism for loss of physiological activity in banked blood. **Proc Natl Acad Sci U S A** 104(43): 17058.
- Ribeiro, D. M., Desikan, R., Bright, J., Confraria, A., Harrison, J., Hancock, J. T., Barros, R. S., Neill, S. J. y Wilson, I. D. (2009).** Differential requirement for NO during ABA-induced stomatal closure in turgid and wilted leaves. **Plant Cell Environ** 32(1): 46.
- Ribeiro, E. A., Jr., Cunha, F. Q., Tamashiro, W. M. y Martins, I. S. (1999).** Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. **FEBS Lett** 445(2-3): 283.
- Richards, D. E., King, K. E., Ait-Ali, T. y Harberd, N. P. (2001).** HOW GIBBERELLIN REGULATES PLANT GROWTH AND DEVELOPMENT: A Molecular Genetic Analysis of Gibberellin Signaling. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** 52: 67.
- Richter, R., Behringer, C., Muller, I. K. y Schwechheimer, C. (2010).** The GATA-type transcription factors GNC and GNL/CGA1 repress gibberellin signaling downstream from DELLA proteins and PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS. **Genes Dev** 24(18): 2093.
- Rieu, I., Eriksson, S., Powers, S. J., Gong, F., Griffiths, J., Woolley, L., Benloch, R., Nilsson, O., Thomas, S. G., Hedden, P. y Phillips, A. L. (2008).** Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in Arabidopsis. **Plant Cell** 20(9): 2420.
- Risk, J. M., Macknight, R. C. y Day, C. L. (2008).** FCA does not bind abscisic acid. **Nature** 456(7223): E5.
- Rizzini, L., Favory, J. J., Cloix, C., Faggionato, D., O'Hara, A., Kaiserli, E., Baumeister, R., Schafer, E., Nagy, F., Jenkins, G. I. y Ulm, R. (2011).** Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. **Science** 332(6025): 103.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J. y Kaiser, W. M. (2002).** Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. **J Exp Bot** 53(366): 103.
- Roelfsema, M. R. y Hedrich, R. (2005).** In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. **New Phytol** 167(3): 665.
- Roelfsema, M. R. y Hedrich, R. (2010).** Making sense out of Ca(2+) signals: their role in regulating stomatal movements. **Plant Cell Environ** 33(3): 305.

- Romanov, G. A., Lomin, S. N., Rakova, N. Y., Heyl, A. y Schmulling T. (2008).** Does NO play a role in cytokinin signal transduction? **FEBS Lett** 582(6): 874.
- Romera, F. J., Garcia, M. J., Alcantara, E. y Perez-Vicente, R. (2011).** Latest findings about the interplay of auxin, ethylene and nitric oxide in the regulation of Fe deficiency responses by Strategy I plants. **Plant Signal Behav** 6(1).
- Romero-Puertas, M. C., Campostrini, N., Matte, A., Righetti, P. G., Perazzoli, M., Zolla, L., Roepstorff, P. y Delledonne, M. (2008).** Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana* undergoing hypersensitive response. **Proteomics** 8(7): 1459.
- Romero-Puertas, M. C., Laxa, M., Matte, A., Zaninotto, F., Finkemeier, I., Jones, A. M., Perazzoli, M., Vandelle, E., Dietz, K. J. y Delledonne, M. (2007).** S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. **Plant Cell** 19(12): 4120.
- Romero-Puertas, M. C., Perazzoli, M., Zago, E. D. y Delledonne, M. (2004).** Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions. **Cell Microbiol** 6(9): 795.
- Rubio, S., Rodrigues, A., Saez, A., Dizon, M. B., Galle, A., Kim, T. H., Santiago, J., Flexas, J., Schroeder, J. I. y Rodriguez, P. L. (2009).** Triple loss of function of protein phosphatases type 2C leads to partial constitutive response to endogenous abscisic acid. **Plant Physiol** 150(3): 1345.
- Rusterucci, C., Espunya, M. C., Diaz, M., Chabannes, M. y Martinez, M. C. (2007).** S-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. **Plant Physiol** 143(3): 1282.
- Ryan, S. A., Nelson, R. S. y Harper, J. E. (1983).** Soybean Mutants Lacking Constitutive Nitrate Reductase Activity : II. Nitrogen Assimilation, Chlorate Resistance, and Inheritance. **Plant Physiol** 72(2): 510.
- Saez, A., Apostolova, N., Gonzalez-Guzman, M., Gonzalez-Garcia, M. P., Nicolas, C., Lorenzo, O. y Rodriguez, P. L. (2004).** Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. **Plant J** 37(3): 354.
- Saez, A., Robert, N., Maktabi, M. H., Schroeder, J. I., Serrano, R. y Rodriguez, P. L. (2006).** Enhancement of abscisic acid sensitivity and reduction of water consumption in *Arabidopsis* by combined inactivation of the protein phosphatases type 2C ABI1 and HAB1. **Plant Physiol** 141(4): 1389.
- Saijo, Y., Sullivan, J. A., Wang, H., Yang, J., Shen, Y., Rubio, V., Ma, L., Hoecker, U. y Deng, X. W. (2003).** The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. **Genes Dev** 17(21): 2642.
- Saito, S., Hirai, N., Matsumoto, C., Ohgashi, H., Ohta, D., Sakata, K. y Mizutani, M. (2004).** *Arabidopsis* CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. **Plant Physiol** 134(4): 1439.
- Saito, S., Yamamoto-Katou, A., Yoshioka, H., Doke, N. y Kawakita, K. (2006).** Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco BY-2 cells. **Plant Cell Physiol** 47(6): 689.
- Sakamoto, A., Sakurao, S. H., Fukunaga, K., Matsubara, T., Ueda-Hashimoto, M., Tsukamoto, S., Takahashi, M. y Morikawa, H. (2004).** Three distinct *Arabidopsis* hemoglobins

exhibit peroxidase-like activity and differentially mediate nitrite-dependent protein nitration. **FEBS Lett** 572(1-3): 27.

Sakihama, Y., Nakamura, S. y Yamasaki, H. (2002). Nitric oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative NO production pathway in photosynthetic organisms. **Plant Cell Physiol** 43(3): 290.

Sandalio, L. M., Rodriguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M. C. y Del Rio, L. A. (2008). Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide in vivo in plant tissues. **Methods Enzymol** 440: 397.

Santiago, J., Dupeux, F., Round, A., Antoni, R., Park, S. Y., Jamin, M., Cutler, S. R., Rodriguez, P. L. y Marquez, J. A. (2009). The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. **Nature** 462(7273): 665.

Santner, A., Calderon-Villalobos, L. I. y Estelle, M. (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. **Nat Chem Biol** 5(5): 301.

Sarath, G., Bethke, P. C., Jones, R., Baird, L. M., Hou, G. y Mitchell, R. B. (2006). Nitric oxide accelerates seed germination in warm-season grasses. **Planta** 223(6): 1154.

Sarver, A., Scheffler, N. K., Shetlar, M. D. y Gibson, B. W. (2001). Analysis of peptides and proteins containing nitrotyrosine by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **J Am Soc Mass Spectrom** 12(4): 439.

Sasaki, A., Itoh, H., Gomi, K., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Jeong, D. H., An, G., Kitano, H., Ashikari, M. y Matsuoka, M. (2003). Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. **Science** 299(5614): 1896.

Schmidt, P., Youhnovski, N., Daiber, A., Balan, A., Arsic, M., Bachschmid, M., Przybylski, M. y Ullrich, V. (2003). Specific nitration at tyrosine 430 revealed by high resolution mass spectrometry as basis for redox regulation of bovine prostacyclin synthase. **J Biol Chem** 278(15): 12813.

Schomburg, F. M., Bizzell, C. M., Lee, D. J., Zeevaart, J. A. y Amasino, R. M. (2003). Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. **Plant Cell** 15(1): 151.

Schopfer, F. J., Baker, P. R. y Freeman, B. A. (2003). NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? **Trends Biochem Sci** 28(12): 646.

Schroeder, J. I. y Nambara, E. (2006). A quick release mechanism for abscisic acid. **Cell** 126(6): 1023.

Schultz, T. F., Kiyosue, T., Yanovsky, M., Wada, M. y Kay, S. A. (2001). A role for LKP2 in the circadian clock of *Arabidopsis*. **Plant Cell** 13(12): 2659.

Selby, C. P. y Sancar, A. (2006). A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. **Proc Natl Acad Sci U S A** 103(47): 17696.

Seligman, K., Saviani, E. E., Oliveira, H. C., Pinto-Maglio, C. A. y Salgado, I. (2008). Floral transition and nitric oxide emission during flower development in *Arabidopsis thaliana* is affected in nitrate reductase-deficient plants. **Plant Cell Physiol** 49(7): 1112.

- Sen, S. y Cheema, I. R. (1995).** Nitric oxide synthase and calmodulin immunoreactivity in plant embryonic tissue. **Biochem. Arch.** 11: 221.
- Seo, H. S., Watanabe, E., Tokutomi, S., Nagatani, A. y Chua, N. H. (2004).** Photoreceptor ubiquitination by COP1 E3 ligase desensitizes phytochrome A signaling. **Genes Dev** 18(6): 617.
- Seo, H. S., Yang, J. Y., Ishikawa, M., Bolle, C., Ballesteros, M. L. y Chua, N. H. (2003).** LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. **Nature** 423(6943): 995.
- Serpa, V., Vernal, J., Lamattina, L., Grotewold, E., Cassia, R. y Terenzi, H. (2007).** Inhibition of AtMYB2 DNA-binding by nitric oxide involves cysteine S-nitrosylation. **Biochem Biophys Res Commun** 361(4): 1048.
- Shang, Y., Yan, L., Liu, Z. Q., Cao, Z., Mei, C., Xin, Q., Wu, F. Q., Wang, X. F., Du, S. Y., Jiang, T., Zhang, X. F., Zhao, R., Sun, H. L., Liu, R., Yu, Y. T. y Zhang, D. P. (2010).** The Mg-chelatase H subunit of Arabidopsis antagonizes a group of WRKY transcription repressors to relieve ABA-responsive genes of inhibition. **Plant Cell** 22(6): 1909.
- Sharov, V. S., Galeva, N. A., Drenina, E. S., Williams, T. D. y Schoneich, C. (2009).** Inactivation of rabbit muscle glycogen phosphorylase b by peroxynitrite revisited: does the nitration of Tyr613 in the allosteric inhibition site control enzymatic function? **Arch Biochem Biophys** 484(2): 155.
- Shen, H., Moon, J. y Huq, E. (2005).** PIF1 is regulated by light-mediated degradation through the ubiquitin-26S proteasome pathway to optimize photomorphogenesis of seedlings in Arabidopsis. **Plant J** 44(6): 1023.
- Shen, Y., Khanna, R., Carle, C. M. y Quail, P. H. (2007).** Phytochrome induces rapid PIF5 phosphorylation and degradation in response to red-light activation. **Plant Physiol** 145(3): 1043.
- Shen, Y. Y., Wang, X. F., Wu, F. Q., Du, S. Y., Cao, Z., Shang, Y., Wang, X. L., Peng, C. C., Yu, X. C., Zhu, S. Y., Fan, R. C., Xu, Y. H. y Zhang, D. P. (2006).** The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. **Nature** 443(7113): 823.
- Shin, J., Park, E. y Choi, G. (2007).** PIF3 regulates anthocyanin biosynthesis in an HY5-dependent manner with both factors directly binding anthocyanin biosynthetic gene promoters in Arabidopsis. **Plant J** 49(6): 981.
- Shkolnik-Inbar, D. y Bar-Zvi, D. (2010).** ABI4 mediates abscisic acid and cytokinin inhibition of lateral root formation by reducing polar auxin transport in Arabidopsis. **Plant Cell** 22(11): 3560.
- Silverstone, A. L., Ciampaglio, C. N. y Sun, T. (1998).** The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. **Plant Cell** 10(2): 155.
- Silverstone, A. L., Jung, H. S., Dill, A., Kawaide, H., Kamiya, Y. y Sun, T. P. (2001).** Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. **Plant Cell** 13(7): 1555.
- Silverstone, A. L., Tseng, T. S., Swain, S. M., Dill, A., Jeong, S. Y., Olszewski, N. E. y Sun, T. P. (2007).** Functional analysis of SPINDLY in gibberellin signaling in Arabidopsis. **Plant Physiol** 143(2): 987.

- Sirichandra, C., Wasilewska, A., Vlad, F., Valon, C. y Leung, J. (2009).** The guard cell as a single-cell model towards understanding drought tolerance and abscisic acid action. **J Exp Bot** 60(5): 1439.
- Skirycz, A., Claeys, H., De Bodt, S., Oikawa, A., Shinoda, S., Andriankaja, M., Maleux, K., Eloy, N. B., Coppens, F., Yoo, S. D., Saito, K. y Inze, D. (2011a).** Pause-and-Stop: The Effects of Osmotic Stress on Cell Proliferation during Early Leaf Development in Arabidopsis and a Role for Ethylene Signaling in Cell Cycle Arrest. **Plant Cell**
- Skirycz, A., Vandenbroucke, K., Clauw, P., Maleux, K., De Meyer, B., Dhondt, S., Pucci, A., Gonzalez, N., Hoeberichts, F., Tognetti, V. B., Galbiati, M., Tonelli, C., Van Breusegem, F., Vuylsteke, M. y Inze, D. (2011b).** Survival and growth of Arabidopsis plants given limited water are not equal. **Nat Biotechnol** 29(3): 212.
- Soderling, A. S., Hultman, L., Delbro, D., Hojrup, P. y Caidahl, K. (2007).** Reduction of the nitro group during sample preparation may cause underestimation of the nitration level in 3-nitrotyrosine immunoblotting. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci** 851(1-2): 277.
- Somers, D. E., Schultz, T. F., Milnamow, M. y Kay, S. A. (2000).** ZEITLUPE encodes a novel clock-associated PAS protein from Arabidopsis. **Cell** 101(3): 319.
- Souza, J. M., Choi, I., Chen, Q., Weisse, M., Daikhin, E., Yudkoff, M., Obin, M., Ara, J., Horwitz, J. y Ischiropoulos, H. (2000).** Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins. **Arch Biochem Biophys** 380(2): 360.
- Souza, J. M., Daikhin, E., Yudkoff, M., Raman, C. S. y Ischiropoulos, H. (1999).** Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration. **Arch Biochem Biophys** 371(2): 169.
- Stamler, J. S., Jaraki, O., Osborne, J., Simon, D. I., Keane, J., Vita, J., Singel, D., Valeri, C. R. y Loscalzo, J. (1992a).** Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. **Proc Natl Acad Sci U S A** 89(16): 7674.
- Stamler, J. S., Lamas, S. y Fang, F. C. (2001).** Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. **Cell** 106(6): 675.
- Stamler, J. S., Simon, D. I., Osborne, J. A., Mullins, M. E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D. J. y Loscalzo, J. (1992b).** S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. **Proc Natl Acad Sci U S A** 89(1): 444.
- Stamler, J. S., Singel, D. J. y Loscalzo, J. (1992c).** Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Science** 258(5090): 1898.
- Stamler, J. S., Toone, E. J., Lipton, S. A. y Sucher, N. J. (1997).** (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. **Neuron** 18(5): 691.
- Stasolla, C., Katahira, R., Thorpe, T. A. y Ashihara, H. (2003).** Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. **J Plant Physiol** 160(11): 1271.
- Stavang, J. A., Gallego-Bartolome, J., Gomez, M. D., Yoshida, S., Asami, T., Olsen, J. E., Garcia-Martinez, J. L., Alabadi, D. y Blazquez, M. A. (2009).** Hormonal regulation of temperature-induced growth in Arabidopsis. **Plant J** 60(4): 589.
- Steen, H. y Mann, M. (2004).** The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nat Rev Mol Cell Biol** 5(9): 699.

- Stevens, S. M., Jr., Prokai-Tatrai, K. y Prokai, L. (2008).** Factors that contribute to the misidentification of tyrosine nitration by shotgun proteomics. **Mol Cell Proteomics** 7(12): 2442.
- Stirpe, F. y Della Corte, E. (1969).** The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). **J Biol Chem** 244(14): 3855.
- Stohr, C., Strube, F., Marx, G., Ullrich, W. R. y Rockel, P. (2001).** A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. **Planta** 212(5-6): 835.
- Strittmatter, P., Soll, J. y Bolter, B. (2010).** The chloroplast protein import machinery: a review. **Methods Mol Biol** 619: 307.
- Stuehr, D. J. (1997).** Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 37: 339.
- Sultana, R., Poon, H. F., Cai, J., Pierce, W. M., Merchant, M., Klein, J. B., Markesbery, W. R. y Butterfield, D. A. (2006).** Identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain using a redox proteomics approach. **Neurobiol Dis** 22(1): 76.
- Sun, J., Xin, C., Eu, J. P., Stamler, J. S. y Meissner, G. (2001).** Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. **Proc Natl Acad Sci U S A** 98(20): 11158.
- Sun, T. P. y Gubler, F. (2004).** Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. **Annu Rev Plant Biol** 55: 197.
- Suzuki, H., Park, S. H., Okubo, K., Kitamura, J., Ueguchi-Tanaka, M., Iuchi, S., Katoh, E., Kobayashi, M., Yamaguchi, I., Matsuoka, M., Asami, T. y Nakajima, M. (2009).** Differential expression and affinities of Arabidopsis gibberellin receptors can explain variation in phenotypes of multiple knock-out mutants. **Plant J** 60(1): 48.
- Suzuki, Y., Tanaka, M., Sohmiya, M., Ichinose, S., Omori, A. y Okamoto, K. (2005).** Identification of nitrated proteins in the normal rat brain using a proteomics approach. **Neurol Res** 27(6): 630.
- Tada, Y., Mori, T., Shinogi, T., Yao, N., Takahashi, S., Betsuyaku, S., Sakamoto, M., Park, P., Nakayashiki, H., Tosa, Y. y Mayama, S. (2004).** Nitric oxide and reactive oxygen species do not elicit hypersensitive cell death but induce apoptosis in the adjacent cells during the defense response of oat. **Mol Plant Microbe Interact** 17(3): 245.
- Tada, Y., Spoel, S. H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J. y Dong, X. (2008).** Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. **Science** 321(5891): 952.
- Takaya, N. (2002).** Dissimilatory nitrate reduction metabolisms and their control in fungi. **J Biosci Bioeng** 94(6): 506.
- Tayeh, M. A. y Marletta, M. A. (1989).** Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. **J Biol Chem** 264(33): 19654.
- Thomas, S. G., Phillips, A. L. y Hedden, P. (1999).** Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2- oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96(8): 4698.

- Tischner, R., Galli, M., Heimer, Y. M., Bielefeld, S., Okamoto, M., Mack, A. y Crawford, N. M. (2007).** Interference with the citrulline-based nitric oxide synthase assay by argininosuccinate lyase activity in Arabidopsis extracts. **FEBS J** 274(16): 4238.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E. y Quail, P. H. (2003).** The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. **Plant Cell** 15(8): 1749.
- Tonon, C., Cecilia Terrile, M., Jose Iglesias, M., Lamattina, L. y Casalongue, C. (2010).** Extracellular ATP, nitric oxide and superoxide act coordinately to regulate hypocotyl growth in etiolated Arabidopsis seedlings. **J Plant Physiol** 167(7): 540.
- Tornieri, K. y Rehder, V. (2007).** Nitric oxide release from a single cell affects filopodial motility on growth cones of neighboring neurons. **Dev Neurobiol** 67(14): 1932.
- Trewavas, A. (2009).** What is plant behaviour? **Plant Cell Environ** 32(6): 606.
- Trimm, K. R. y Rehder, V. (2004).** Nitric oxide acts as a slow-down and search signal in developing neurites. **Eur J Neurosci** 19(4): 809.
- Tsai, Y. C., Delk, N. A., Chowdhury, N. I. y Braam, J. (2007).** Arabidopsis potential calcium sensors regulate nitric oxide levels and the transition to flowering. **Plant Signal Behav** 2(6): 446.
- Tsakagoshi, H., Busch, W. y Benfey, P. N. (2010).** Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. **Cell** 143(4): 606.
- Tsumoto, H., Taguchi, R. y Kohda, K. (2010).** Efficient identification and quantification of peptides containing nitrotyrosine by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry after derivatization. **Chem Pharm Bull (Tokyo)** 58(4): 488.
- Tun, N. N., Holk, A. y Scherer, G. F. (2001).** Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin. **FEBS Lett** 509(2): 174.
- Tun, N. N., Livaja, M., Kieber, J. J. y Scherer, G. F. (2008).** Zeatin-induced nitric oxide (NO) biosynthesis in Arabidopsis thaliana mutants of NO biosynthesis and of two-component signaling genes. **New Phytol** 178(3): 515.
- Tun, N. N., Santa-Catarina, C., Begum, T., Silveira, V., Handro, W., Floh, E. I. y Scherer, G. F. (2006).** Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in Arabidopsis thaliana seedlings. **Plant Cell Physiol** 47(3): 346.
- Turko, I. V., Li, L., Aulak, K. S., Stuehr, D. J., Chang, J. Y. y Murad, F. (2003).** Protein tyrosine nitration in the mitochondria from diabetic mouse heart. Implications to dysfunctional mitochondria in diabetes. **J Biol Chem** 278(36): 33972.
- Tzionalos, K. y Hare, J. M. (2009).** Role of xanthine oxidoreductase in cardiac nitroso-redox imbalance. **Front Biosci** 14: 237.
- Ubeda-Tomas, S., Federici, F., Casimiro, I., Beenster, G. T., Bhalerao, R., Swarup, R., Doerner, P., Haseloff, J. y Bennett, M. J. (2009).** Gibberellin signaling in the endodermis controls Arabidopsis root meristem size. **Curr Biol** 19(14): 1194.
- Ubeda-Tomas, S., Swarup, R., Coates, J., Swarup, K., Laplaze, L., Beenster, G. T., Hedden, P., Bhalerao, R. y Bennett, M. J. (2008).** Root growth in Arabidopsis requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. **Nat Cell Biol** 10(5): 625.

- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T. Y., Hsing, Y. I., Kitano, H., Yamaguchi, I. y Matsuoka, M. (2005).** GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. **Nature** 437(7059): 693.
- Ueguchi-Tanaka, M., Nakajima, M., Katoh, E., Ohmiya, H., Asano, K., Saji, S., Hongyu, X., Ashikari, M., Kitano, H., Yamaguchi, I. y Matsuoka, M. (2007).** Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, *GID1*, with a rice *DELLA* protein, *SLR1*, and gibberellin. **Plant Cell** 19(7): 2140.
- Valderrama, R., Corpas, F. J., Carreras, A., Fernandez-Ocana, A., Chaki, M., Luque, F., Gomez-Rodriguez, M. V., Colmenero-Varea, P., Del Rio, L. A. y Barroso, J. B. (2007).** Nitrosative stress in plants. **FEBS Lett** 581(3): 453.
- van der Vliet, A., Eiserich, J. P., Halliwell, B. y Cross, C. E. (1997).** Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. **J Biol Chem** 272(12): 7617.
- Varbanova, M., Yamaguchi, S., Yang, Y., McKelvey, K., Hanada, A., Borochoy, R., Yu, F., Jikumaru, Y., Ross, J., Cortes, D., Ma, C. J., Noel, J. P., Mander, L., Shulaev, V., Kaniya, Y., Rodermel, S., Weiss, D. y Pichersky, E. (2007).** Methylation of gibberellins by Arabidopsis *GAMT1* and *GAMT2*. **Plant Cell** 19(1): 32.
- Vardi, A., Bidle, K. D., Kwitny, C., Hirsh, D. J., Thompson, S. M., Callow, J. A., Falkowski, P. y Bowler, C. (2008).** A diatom gene regulating nitric-oxide signaling and susceptibility to diatom-derived aldehydes. **Curr Biol** 18(12): 895.
- Wang, F., Zhu, D., Huang, X., Li, S., Gong, Y., Yao, Q., Fu, X., Fan, L. M. y Deng, X. W. (2009a).** Biochemical insights on degradation of Arabidopsis *DELLA* proteins gained from a cell-free assay system. **Plant Cell** 21(8): 2378.
- Wang, Y. Q., Feechan, A., Yun, B. W., Shafiei, R., Hofmann, A., Taylor, P., Xue, P., Yang, F. Q., Xie, Z. S., Pallas, J. A., Chu, C. C. y Loake, G. J. (2009b).** S-nitrosylation of *AtSABP3* antagonizes the expression of plant immunity. **J Biol Chem** 284(4): 2131.
- Webb, A. A., Larman, M. G., Montgomery, L. T., Taylor, J. E. y Hetherington, A. M. (2001).** The role of calcium in ABA-induced gene expression and stomatal movements. **Plant J** 26(3): 351.
- Weiner, J. J., Peterson, F. C., Volkman, B. F. y Cutler, S. R. (2010).** Structural and functional insights into core ABA signaling. **Curr Opin Plant Biol** 13(5): 495.
- Wendehenne, D., Durner, J. y Klessig, D. F. (2004).** Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. **Curr Opin Plant Biol** 7(4): 449.
- Wilkinson, J. Q. y Crawford, N. M. (1991).** Identification of the Arabidopsis *CHL3* gene as the nitrate reductase structural gene *NIA2*. **Plant Cell** 3(5): 461.
- Wilkinson, J. Q. y Crawford, N. M. (1993).** Identification and characterization of a chlorate-resistant mutant of Arabidopsis thaliana with mutations in both nitrate reductase structural genes *NIA1* and *NIA2*. **Mol Gen Genet** 239(1-2): 289.
- Willige, B. C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E. M., Maier, A. y Schwechheimer, C. (2007).** The *DELLA* domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of Arabidopsis. **Plant Cell** 19(4): 1209.

- Woodward, A. W. y Bartel, B. (2005).** Auxin: regulation, action, and interaction. **Ann Bot** 95(5): 707.
- Wu, F. Q., Xin, Q., Cao, Z., Liu, Z. Q., Du, S. Y., Mei, C., Zhao, C. X., Wang, X. F., Shang, Y., Jiang, T., Zhang, X. F., Yan, L., Zhao, R., Cui, Z. N., Liu, R., Sun, H. L., Yang, X. L., Su, Z. y Zhang, D. P. (2009).** The magnesium-chelatase H subunit binds abscisic acid and functions in abscisic acid signaling: new evidence in Arabidopsis. **Plant Physiol** 150(4): 1940.
- Wu, W., Chen, Y. y Hazen, S. L. (1999).** Eosinophil peroxidase nitrates protein tyrosyl residues. Implications for oxidative damage by nitrating intermediates in eosinophilic inflammatory disorders. **J Biol Chem** 274(36): 25933.
- Xie, X. y Yoneyama, K. (2010).** The strigolactone story. **Annu Rev Phytopathol** 48: 93.
- Xu, J., Wang, S., Wu, Y., Song, P. y Zou, M. H. (2009).** Tyrosine nitration of PA700 activates the 26S proteasome to induce endothelial dysfunction in mice with angiotensin II-induced hypertension. **Hypertension** 54(3): 625.
- Xu, M. J., Dong, J. F. y Zhu, M. Y. (2005).** Nitric oxide mediates the fungal elicitor-induced hypericin production of *Hypericum perforatum* cell suspension cultures through a jasmonic-acid-dependent signal pathway. **Plant Physiol** 139(2): 991.
- Yakovlev, V. A., Bayden, A. S., Graves, P. R., Kellogg, G. E. y Mikkelsen, R. B. (2010).** Nitration of the tumor suppressor protein p53 at tyrosine 327 promotes p53 oligomerization and activation. **Biochemistry** 49(25): 5331.
- Yamada, R. X., Matsuki, N. y Ikegaya, Y. (2006).** Nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate-mediated growth cone collapse of dentate granule cells. **Neuroreport** 17(6): 661.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (1993).** Arabidopsis DNA encoding two desiccation-responsive rd29 genes. **Plant Physiol** 101(3): 1119.
- Yamaguchi, S. (2008).** Gibberellin metabolism and its regulation. **Annu Rev Plant Biol** 59: 225.
- Yamamoto-Katou, A., Katou, S., Yoshioka, H., Doke, N. y Kawakita, K. (2006).** Nitrate reductase is responsible for elicitor-induced nitric oxide production in *Nicotiana benthamiana*. **Plant Cell Physiol** 47(6): 726.
- Yamasaki, H. (2000).** Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition in vivo. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 355(1402): 1477.
- Yamasaki, H. y Sakihama, Y. (2000).** Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. **FEBS Lett** 468(1): 89.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y. y Takahashi, S. (1999).** An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. **Trends Plant Sci** 4(4): 128.
- Yamashino, T., Matsushika, A., Fujimori, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S. y Mizuno, T. (2003).** A Link between circadian-controlled bHLH factors and the APRR1/TOC1 quintet in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiol** 44(6): 619.

- Ye, Z., Rodriguez, R., Tran, A., Hoang H., de los Santos, D., Brown, S. y Vellanoweth, R. L. (2000).** The developmental transition to flowering represses ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Sci** 158(1-2): 115.
- Zaragoza, R., Torres, L., Garcia, C., Eroles, P., Corrales, F., Bosch, A., Lluch, A., Garcia-Trevijano, E. R. y Vina, J. R. (2009).** Nitration of cathepsin D enhances its proteolytic activity during mammary gland remodelling after lactation. **Biochem J** 419(2): 279.
- Zeidler, D., Zahringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P. y Durner, J. (2004).** Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. **Proc Natl Acad Sci U S A** 101(44): 15811.
- Zeier, J., Delledonne, M., Mishina, T., Severi, E., Sonoda, M. y Lamb, C. (2004).** Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant-pathogen interactions. **Plant Physiol** 136(1): 2875.
- Zemojtel, T., Frohlich, A., Palmieri, M. C., Kolanczyk, M., Mikula, I., Wyrwicz, L. S., Wanker, E. E., Mundlos, S., Vingron, M., Martasek, P. y Durner, J. (2006a).** Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? **Trends Plant Sci** 11(11): 524.
- Zemojtel, T., Kolanczyk, M., Kossler, N., Stricker, S., Lurz, R., Mikula, I., Duchniewicz, M., Schuelke, M., Ghafourifar, P., Martasek, P., Vingron, M. y Mundlos, S. (2006b).** Mammalian mitochondrial nitric oxide synthase: characterization of a novel candidate. **FEBS Lett** 580(2): 455.
- Zhan, X. y Desiderio, D. M. (2009).** Mass spectrometric identification of in vivo nitrotyrosine sites in the human pituitary tumor proteome. **Methods Mol Biol** 566: 137.
- Zhang A., Jiang M., Zhang J., Ding H., Xu, S., Hu, X. y Tan, M. (2007a).** Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. **New Phytol** 175(1): 36.
- Zhang A., Zhang J., Ye, N., Zhang H., Tan, M. y Jiang M. (2011).** Nitric oxide mediates brassinosteroid-induced ABA biosynthesis involved in oxidative stress tolerance in maize leaves. **Plant Cell Physiol** 52(1): 181.
- Zhang H., Han, W., De Smet, I., Talboys, P., Loya, R., Hassan, A., Rong, H., Jurgens, G., Paul Knox, J. y Wang M. H. (2010).** ABA promotes quiescence of the quiescent centre and suppresses stem cell differentiation in the *Arabidopsis* primary root meristem. **Plant J** 64(5): 764.
- Zhang L., Wang Y., Zhao, L. y Shi, S. (2006).** Involvement of nitric oxide in light-mediated greening of barley seedlings. **J Plant Physiol** 163(8): 818.
- Zhang M., An, L., Feng H., Chen, T., Chen, K., Liu, Y., Tang, H., Chang, J. y Wang X. (2003).** The cascade mechanisms of nitric oxide as a second messenger of ultraviolet B in inhibiting mesocotyl elongations. **Photochem Photobiol** 77(2): 219.
- Zhang Q., Qian, W. J., Knyushko, T. V., Clauss, T. R., Purvine, S. O., Moore, R. J., Sacksteder, C. A., Chin, M. H., Smith, D. J., Camp, D. G., 2nd, Bigelow, D. J. y Smith, R. D. (2007b).** A method for selective enrichment and analysis of nitrotyrosine-containing peptides in complex proteome samples. **J Proteome Res** 6(6): 2257.
- Zhang X., Zhang L., Dong F., Gao, J., Galbraith, D. W. y Song C. P. (2001).** Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. **Plant Physiol** 126(4): 1438.

Zhang Z., Naughton, D., Winyard, P. G., Benjamin, N., Blake, D. R. y Symons, M. C. (1998). Generation of nitric oxide by a nitrite reductase activity of xanthine oxidase: a potential pathway for nitric oxide formation in the absence of nitric oxide synthase activity. **Biochem Biophys Res Commun** 249(3): 767.

Zhang Z., Naughton, D. P., Blake, D. R., Benjamin, N., Stevens, C. R., Winyard, P. G., Symons, M. C. y Harrison, R. (1997). Human xanthine oxidase converts nitrite ions into nitric oxide (NO). **Biochem Soc Trans** 25(3): 524S.

Zhao, D. Y., Tian, Q. Y., Li, L. H. y Zhang W. H. (2007). Nitric oxide is involved in nitrate-induced inhibition of root elongation in *Zea mays*. **Ann Bot** 100(3): 497.

Zhou, J., Li, H., Zeng J. y Huang K. (2009). Effects of peroxynitrite-induced protein tyrosine nitration on insulin-stimulated tyrosine phosphorylation in HepG2 cells. **Mol Cell Biochem** 331(1-2): 49.

Zhu, Y., Nomura, T., Xu, Y., Zhang Y., Peng Y., Mao, B., Hanada, A., Zhou, H., Wang R., Li, P., Zhu, X., Mander, L. N., Kamiya, Y., Yamaguchi, S. y He, Z. (2006). ELONGATED UPPERMOST INTERNODE encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice. **Plant Cell** 18(2): 442.

Zhu, Y., Tepperman, J. M., Fairchild, C. D. y Quail, P. H. (2000). Phytochrome B binds with greater apparent affinity than phytochrome A to the basic helix-loop-helix factor PIF3 in a reaction requiring the PAS domain of PIF3. **Proc Natl Acad Sci U S A** 97(24): 13419.

Zisapel, N. (1978). The reactivity of a functional tyrosyl residue in carboxypeptidase B. Nitration of the cadmium enzyme. **Eur J Biochem** 90(1): 199.

Zottini, M., Costa, A., De Michele, R., Ruzzene, M., Carimi, F. y Lo Schiavo, F. (2007). Salicylic acid activates nitric oxide synthesis in Arabidopsis. **J Exp Bot** 58(6): 1397.

Zrenner, R., Stitt, M., Sonnewald, U. y Boldt, R. (2006). Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. **Annu Rev Plant Biol** 57: 805.

ANEXO: Publicaciones derivadas de la Tesis doctoral

Enhanced Abscisic Acid-Mediated Responses in *nia1nia2noa1-2* Triple Mutant Impaired in NIA/NR- and AtNOA1-Dependent Nitric Oxide Biosynthesis in *Arabidopsis*^{1[W]}

Jorge Lozano-Juste and José León*

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Politécnica de Valencia, Ciudad Politécnica de la Innovación, 46022 Valencia, Spain

Nitric oxide (NO) regulates a wide range of plant processes from development to environmental adaptation. Despite its reported regulatory functions, it remains unclear how NO is synthesized in plants. We have generated a triple *nia1nia2noa1-2* mutant that is impaired in nitrate reductase (NIA/NR)- and Nitric Oxide-Associated1 (AtNOA1)-mediated NO biosynthetic pathways. NO content in roots of *nia1nia2* and *noa1-2* plants was lower than in wild-type plants and below the detection limit in *nia1nia2noa1-2* plants. NIA/NR- and AtNOA1-mediated biosynthesis of NO were thus active and responsible for most of the NO production in *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*). The *nia1nia2noa1-2* plants displayed reduced size, fertility, and seed germination potential but increased dormancy and resistance to water deficit. The increasing deficiency in NO of *nia1nia2*, *noa1-2*, and *nia1nia2noa1-2* plants correlated with increased seed dormancy, hypersensitivity to abscisic acid (ABA) in seed germination and establishment, as well as dehydration resistance. In *nia1nia2noa1-2* plants, enhanced drought tolerance was due to a very efficient stomata closure and inhibition of opening by ABA, thus uncoupling NO from ABA-triggered responses in NO-deficient guard cells. The NO-deficient mutants in NIA/NR- and AtNOA1-mediated pathways in combination with the triple mutant will be useful tools to functionally characterize the role of NO and the contribution of both biosynthetic pathways in regulating plant development and defense.

Nitric oxide (NO) is a small ubiquitous molecule derived from nitrogen-containing precursors that is one of the earliest and most widespread signaling molecules in living organisms from metazoans to mammals (Torreilles, 2001). The regulatory functions of NO have been extensively studied in mammals, where it is synthesized from Arg through the activity of NO synthases (Knowles and Moncada, 1994). By contrast, the biosynthesis and function of this molecule in plants are largely unknown. During the last 10 years, NO biosynthesis in plants has been one of the most controversial topics in plant biology (Durner and Klessig, 1999; Wendehenne et al., 2001; del Río et al., 2004; Zeier et al., 2004; Lamotte et al., 2005; Meyer et al., 2005; Modolo et al., 2005; Crawford, 2006; Crawford et al., 2006; Zemojtel et al., 2006a). Despite the controversy about its biosynthesis, it is now clear

that NO regulates many physiological processes of plants, including seed germination, cell death, defense responses against pathogens, stomata function, senescence, and flowering (Beligni and Lamattina, 2000; Pedroso et al., 2000; Neill et al., 2002; Lamattina et al., 2003; He et al., 2004; Romero-Puertas et al., 2004; Wendehenne et al., 2004; Delledonne, 2005; Guo and Crawford, 2005; Simpson, 2005; Grün et al., 2006; Melotto et al., 2006; Planchet et al., 2006; Ali et al., 2007; Mishina et al., 2007).

The molecular mechanisms underlying the control of seed dormancy and germination are still poorly characterized. Genetic data support a central role of abscisic acid (ABA) in regulating seed dormancy, whereas gibberellins promote germination (Finkelstein et al., 2008; Holdsworth et al., 2008). In addition, NO has been lately characterized as a new component in the signaling pathway leading to dormancy breakage. NO-releasing compounds reduce dormancy in a NO-dependent manner in *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), some warm-season grasses, and certain barley (*Hordeum vulgare*) cultivars (Bethke et al., 2004; Sarath et al., 2006). More recently, the aleurone layer cells have been characterized as responsive to NO, gibberellins, and ABA, thus becoming a primary determinant of seed dormancy in *Arabidopsis* (Bethke et al., 2007).

Two main enzyme-based pathways have been proposed to be functional for NO biosynthesis in plants.

¹ This work was supported by Ministerio de Educación y Ciencia and Fondo Europeo de Desarrollo Regional funds (grant nos. GEN2003-20477-C02-02, BIO2005-00222, and BIO2008-00839 to J.L.) and by the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Bancaja Program fellowship to J.L.-J.).

* Corresponding author; e-mail jleon@ibmcp.upv.es.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: José León (jleon@ibmcp.upv.es).

^[W] The online version of this article contains Web-only data.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.109.148023

One is based on the activity of nitrate reductases (Meyer et al., 2005; Modolo et al., 2005), and another one, yet undefined, is based on the direct or indirect function of the Nitric Oxide-Associated1/Resistant to Inhibition by Fosfidomycin1 (AtNOA1/RIF1) protein. It has been also reported that NO synthesis from nitrite occurs in mitochondria associated with mitochondrial electron transport (Planchet et al., 2005) and also that this pathway is mainly functioning in roots under anoxia (Gupta et al., 2005). Moreover, the balance between mitochondrial nitrite reduction and superoxide-dependent NO degradation seems to be derived from factors controlling NO levels in Arabidopsis (Wulff et al., 2009). It has been recently reported that the synthesis of NO in floral organs requires nitrate reductase activity (Seligman et al., 2008) and also that homologues of AtNOA1 participate in NO biosynthesis in diatoms (Vardi et al., 2008), mammals (Zemojtel et al., 2006b; Parihar et al., 2008a, 2008b), and *Nicotiana benthamiana* (Kato et al., 2008). Recently, the identification of the *rif1* mutant, carrying a null mutation in the *AtNOA1* locus (At3g47450), allowed uncovering of a function for AtNOA1/RIF1 in the expression of plastome-encoded proteins (Flores-Pérez et al., 2008). Moreover, another recent report claims that AtNOA1 is not a NO synthase but a cGTPase (Moreau et al., 2008), likely playing a role in ribosome assembly and subsequent mRNA translation to proteins in the chloroplasts.

To date, it is not clear if both pathways coexist in plants and, if so, the corresponding contributions of each pathway to NO biosynthesis. In this work, we have addressed the functions of both pathways in Arabidopsis by generating a triple mutant in both nitrate reductases and AtNOA1 that is severely impaired in NO production. Further characterization of NO-deficient plants allowed us to identify a functional cross talk between NO and ABA in controlling seed germination and dormancy as well as plant resistance to water deficit.

RESULTS

Impaired NO Biosynthesis in Triple *nia1nia2noa1-2* Mutant Plants

To elucidate how NO is synthesized in Arabidopsis, we generated a mutant plant simultaneously impaired in protein AtNOA1 and nitrate reductases (NR1/NIA1 and NR2/NIA2) with previously proposed NO biosynthetic activities (Yamasaki et al., 1999; Desikan et al., 2002; Rockel et al., 2002; Guo et al., 2003; Guo and Crawford, 2005; Meyer et al., 2005; Modolo et al., 2005). First, we identified and characterized a *noa1* mutant allele from the Syngenta collection of T-DNA insertion lines (line SAIL_507_E11) that we called *noa1-2*. This mutant allele has a T-DNA insertion in the seventh intron (Fig. 1A) and resulted in a null mutant, as demonstrated by the undetectable levels of

AtNOA1 transcript (Fig. 1C), and a growth phenotype undistinguishable from that of *noa1-1* (Guo et al., 2003; data not shown). We then crossed *nia1nia2* double mutant plants (Wilkinson and Crawford, 1993) with *noa1-2* mutant plants and searched for a triple *nia1nia2noa1-2* mutant plant in the F2 progeny. PCR-based genotyping of F2 plants allowed us to find plants with homozygous mutations in the three genes (Fig. 1B). Plants with *nia1nia2noa1-2* mutant genotype were, like the parental *noa1-2* and *nia1nia2* plants, null for *AtNOA1* and *NIA2/NR2* transcripts, respectively (Fig. 1C). Since *nia1* is a point mutation that did not truncate the open reading frame, the levels of mutant *NIA1* transcript were similar to the endogenous transcript in wild-type plants. To assess whether the triple mutant in genes coding for the potential NO biosynthetic enzymes led to an actual reduced NO content, roots from different mutant and wild-type plants were analyzed. We used a cell-permeable NO-sensitive diamino fluorescein diacetate (DAF-FM DA; Invitrogen) to detect NO in roots. The basal levels of NO-associated fluorescence were low in untreated roots of wild-type plants but strongly increased upon treatment with compounds such as ABA or salicylic acid (SA; Fig. 2A). These compounds have been already characterized as inducers of NO biosynthesis (Guo et al., 2003; Zottini et al., 2007). We found that ABA was a stronger and faster inducer than SA (Fig. 2A). The detected fluorescence was specifically associated with the production of NO because of the observed reduced NO-associated fluorescence detected in SA- or ABA-treated roots in the presence of the NO scavenger 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO; Fig. 2A). The NO-associated fluorescence was analyzed in untreated and ABA-treated roots of mutant versus wild-type plants. Figure 2B shows that the basal level of NO-associated fluorescence was strongly reduced in the roots of *nia1nia2* and *noa1-2* plants and undetectable in the roots of the triple mutant plants. Moreover, ABA-treated roots of the *nia1nia2* and *noa1-2* plants accumulated NO levels lower than those detected in the roots of ecotype Columbia (Col-0) plants, and the roots of the triple mutant plants were unable to sustain an ABA-induced accumulation of NO in the roots (Fig. 2B). *nia1nia2noa1-2* plants were thus severely impaired in both basal and induced synthesis of NO as a result of the simultaneous block of AtNOA1- and NIA/NR-based biosynthetic pathways. Since NO biosynthesis may be different in different organs of the plants (Kolbert et al., 2008; Seligman et al., 2008) and to rule out a root-specific effect, we have also analyzed the accumulated production of NO in wild-type and NO-deficient whole seedlings by measuring the NO that diffused out of the cells into the medium with the non-cell-permeable 4,5-diaminofluorescein (DAF-2) and subsequently measuring the fluorescence associated with the corresponding triazole derivative. To assess whether NO production detected in *nia1nia2noa1-2* seedlings was

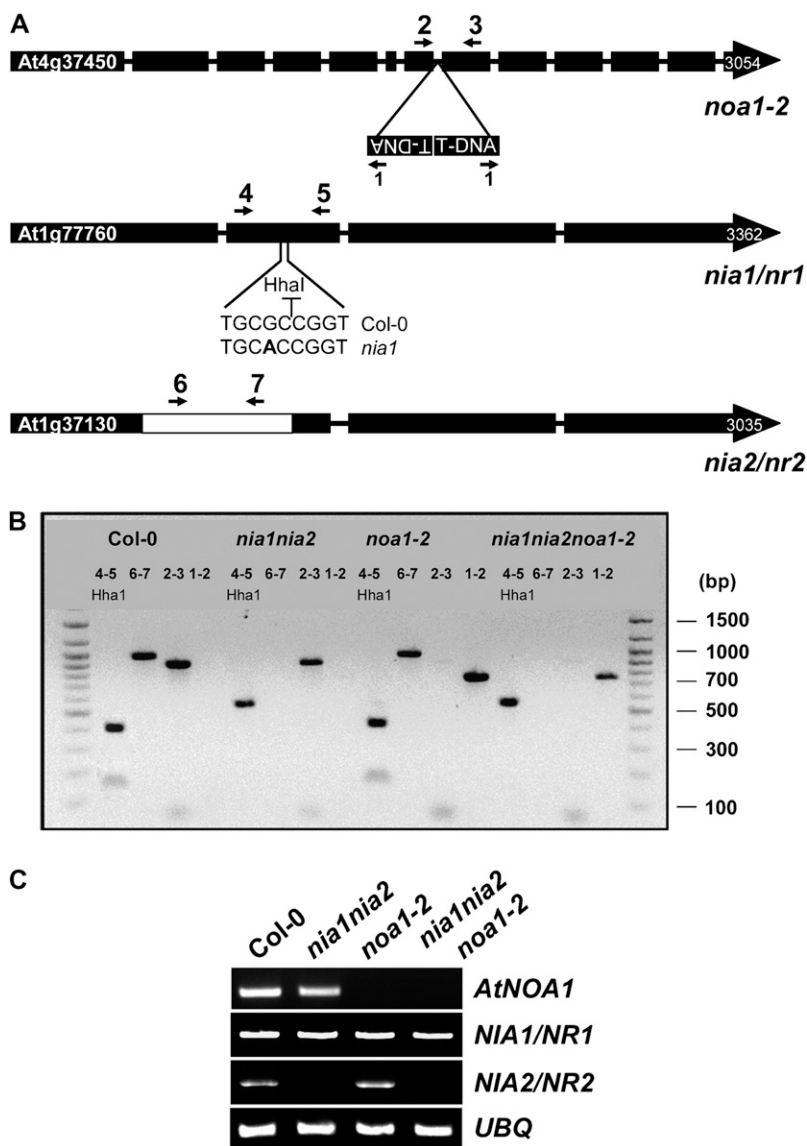


Figure 1. Generation of the *nia1nia2noa1-2* triple mutant. A, Diagram showing the position of the T-DNA insertion and primers (indicated with arrows) used for genotyping (Supplemental Table S1) of *noa1-2* and the *nia1* and *nia2* mutations in the corresponding genes. The *HhaI* restriction site for genotyping of *nia1/nr1* is also shown. B, PCR-based genotyping of wild-type and mutant plants. Ethidium bromide-stained amplicons of different combinations of primers are shown. C, RT-PCR-based analysis of *AtNOA1*, *NIA1/NR1*, and *NIA2/NR2* transcripts. Total RNAs from the indicated genotypes were extracted from 10-d-old seedlings, treated with DNase, reverse transcribed, and separated on 1% agarose gels. *Ubiquitin10* (*UBQ*) expression was used as a loading control.

biologically or chemically synthesized, we performed measurements with seedlings from the different genotypes and the corresponding thermally inactivated seedlings as controls for nonenzymatic production of NO. We detected similar levels of basal production of NO in every sample from thermally inactivated seedlings that corresponded to nonenzymatic production. After subtraction of nonenzymatically produced NO, *nia1nia2* and *noa1-2* plants accumulated lower levels of NO than wild-type plants, and *nia1nia2noa1-2* plants displayed an additive reduction to levels below 10% of those detected in wild-type seedlings (Fig. 2C).

NO-Deficient Mutant Plants Display Alterations in Development

nia1nia2noa1-2 plants displayed reduced shoot and root vegetative growth as a result of additive effects

from *nia1nia2* and *noa1-2* mutant phenotypes (Fig. 3). The delayed growth was already observed at the early seedling stage. NO-deficient seedlings showed their first pair of leaves significantly later than wild-type plants, and this phenotype was additive in the triple mutant plants (Fig. 3A). Adult triple mutant plants were semidwarf, with reduced height and stem diameter (25% and 37% of wild-type plants, respectively; Fig. 3B). The semidwarf phenotype observed in the shoots correlated also with significantly reduced root growth (56%, 35%, and 15% of wild-type roots for *nia1nia2*, *noa1-2*, and *nia1nia2noa1-2* roots, respectively; Fig. 3C). This causes an altered root-to-shoot fresh weight ratio for the NO-deficient genotypes, with the ratio for *nia1nia2noa1-2* being around three times lower than in the wild type (0.33 ± 0.02 and 0.12 ± 0.01 , respectively). NO deficiency also correlated well with reduced size and number of siliques as well as with

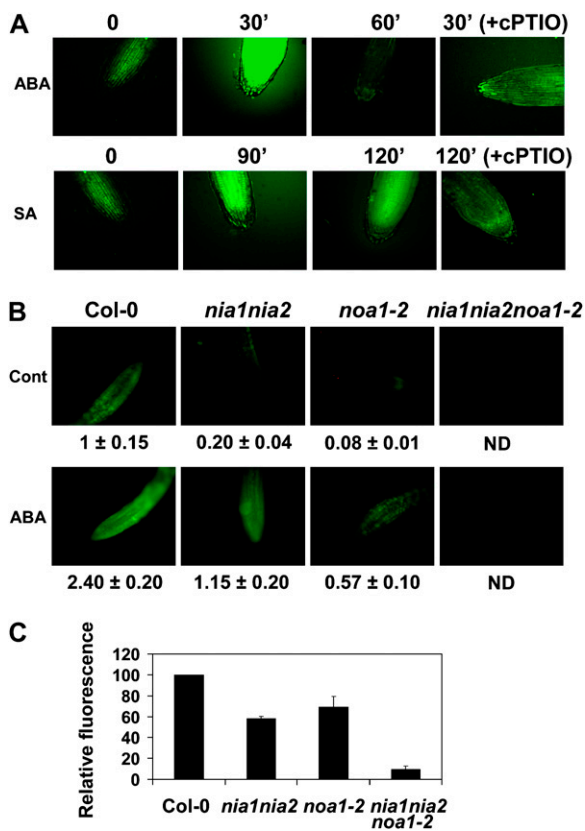


Figure 2. NO production in Col-0, *nia1nia2*, *noa1-2*, and *nia1nia2noa1-2* roots and seedlings. A, Roots from 5- to 7-d-old Col-0 seedlings treated with 50 μM ABA or 1 mM SA were loaded with 15 μM DAF-FM DA as described in "Materials and Methods." Images were taken with a confocal microscope at the indicated times upon treatment. Roots were pretreated with 500 μM cPTIO before incubation with DAF-FM DA where indicated (+cPTIO). B, NO accumulation in Col-0, *nia1nia2*, *noa1-2*, and *nia1nia2noa1-2* roots treated or not with 50 μM ABA for 30 min. Roots from 5- to 7-d-old seedlings (10 plants per experiment, three replicates) were loaded with DAF-FM DA and then treated or not with ABA. Images were captured with a Nikon fluorescence microscope 30 min after treatment with equal settings for every image. NO-derived fluorescence is shown as means \pm SE of three independent experiments. Cont, Control; ND, not detected. C, NO production in Col-0, *nia1nia2*, *noa1-2*, and *nia1nia2noa1-2* seedlings using DAF-2 fluorescein. NO that was synthesized in the seedlings and diffused out of cells into the medium was trapped by DAF-2, and the fluorescence associated with the corresponding triazole derivative was quantified with a TECAN fluorimeter. Means \pm SE are shown. The experiment was repeated three times with similar results.

increased number of aborted seeds, thus leading to decreased seed yield (Fig. 3D). To assess whether the small size of the seedlings and the short roots of mutants were due to lower NO levels, we compared the length of roots and the weight of different genotype seedlings treated or not with NO. Supplemental Figure S1 shows that the fresh weight of the whole seedlings and the length of their roots were between 20% and 40% larger in NO-treated *nia1nia2* and *noa1-2* seedlings than in untreated seedlings. This reversion effect was more evident for NO-treated *nia1nia2noa1-2*

seedlings, and their roots were between 90% and 95% larger than untreated controls (Supplemental Fig. S1).

Interactions between NO and ABA in Dormancy, Seed Germination, and Establishment

NO has been characterized as a regulator of seed dormancy and germination, dehydration responses, and oxidative damage, all ABA-related processes. Most of the work supporting this function has been conducted with biochemical/physiological approaches based on application of exogenous NO donors, many of which have uncontrolled side effects potentially interfering with the analysis. Nevertheless, genetic evidence supporting a role for NR/NIA and AtNOA1 in ABA-NO interactions has also been reported (Desikan et al., 2002; Guo et al., 2003). We thus decided to characterize NO-modulated and ABA-triggered responses in the different NO-deficient mutants, including the triple *nia1nia2noa1-2* mutant plants generated in this work. Freshly harvested seeds from wild-type and NO-deficient mutant plants were sown, and the percentage of germination was calculated daily to day 6 after sowing. Figure 4A (left) shows that 2 d after sowing, when 20% of the wild-type seeds have already germinated, less than 5% of the NO-deficient mutant seeds had germinated. Moreover, the maximum germination potential for the wild-type seeds was reached by day 5 after sowing, whereas NO-deficient mutant seeds were more dormant than wild-type seeds. *noa1-2*, *nia1nia2*, and *nia1nia2noa1-2* seeds reached 65%, 25%, and less than 10% germination, respectively, by day 6 after sowing (Fig. 4A, left). When freshly harvested seeds were exposed to a NO-enriched environment, the increased dormancy phenotype of the *noa1-2* mutant seeds was released and the germination was similar to that observed for the wild-type seeds (Fig. 4A, right). However, the increased dormancy of either *nia1nia2* or the triple mutant seeds was not fully released by sodium nitroprusside (SNP) treatment (Fig. 4A, right). Nevertheless, NO treatment led to an improved germination potential of *nia1nia2noa1-2* seeds. Close to 40% of the *nia1nia2noa1-2* seeds germinated in the NO-enriched environment, contrasting with around 6% that germinated in the absence of NO treatment (Fig. 4A, right).

ABA inhibits germination and is essential for the acquisition and maintenance of seed dormancy (Koornneef et al., 2002; Gubler et al., 2005). It was originally reported that the break of Arabidopsis seed dormancy by the NO released from SNP did not occur in ABA-treated seeds (Bethke et al., 2004). However, further experimental data indicated that NO gas was able to break seed dormancy also in ABA-imbibed seeds (Bethke et al., 2006). Establishment assays with NO-deficient mutant seeds in the presence of increasing concentrations of ABA indicated that all mutants were hypersensitive to ABA. Figure 4B (left) shows that at 0.6 μM ABA, around 80% of the wild-type seeds and only 35% and 20% of the *noa1-2* and *nia1nia2*

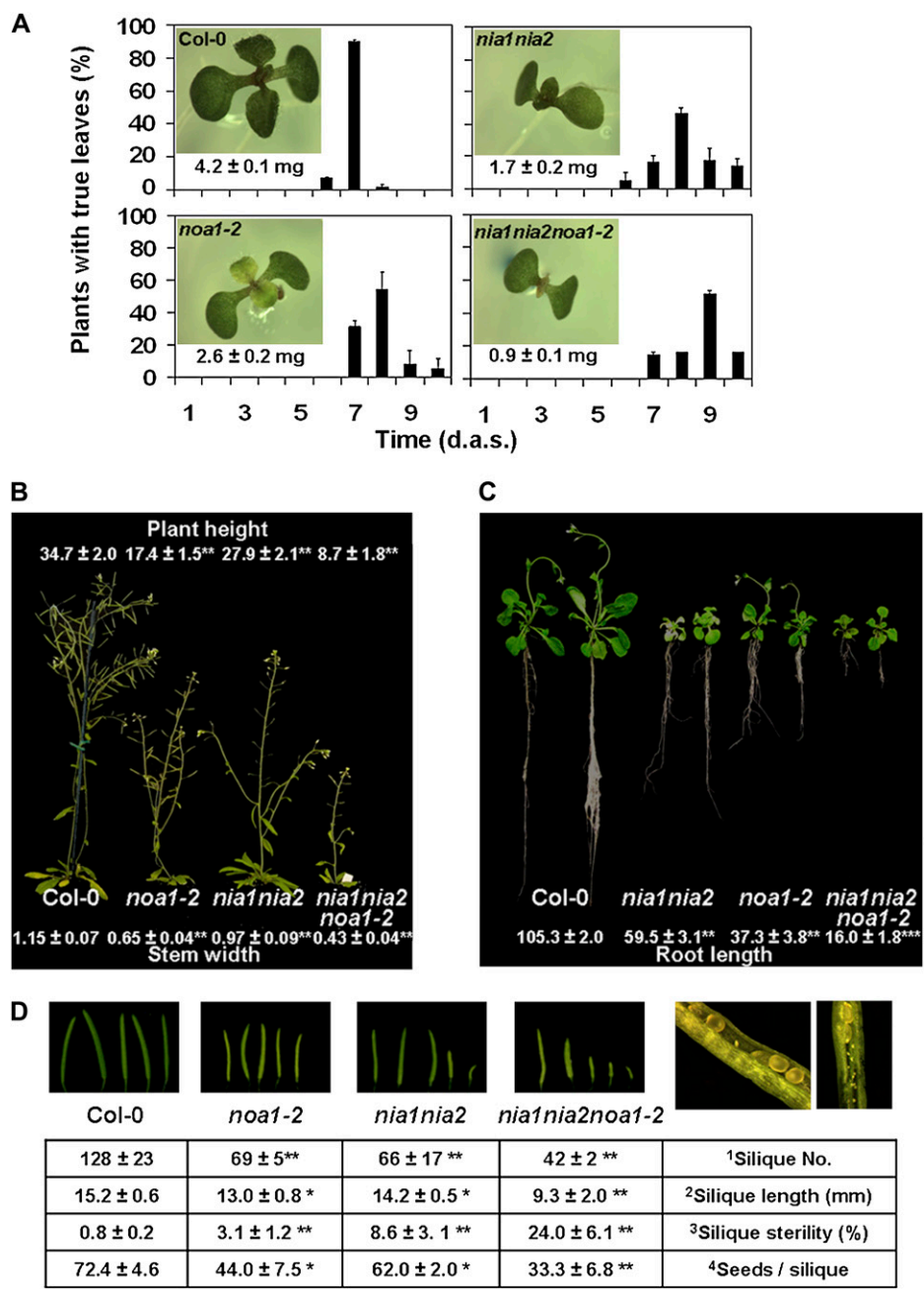


Figure 3. Developmental phenotypes of *nia1nia2noa1-2* plants. **A**, Fresh weight (mg) per seedling ($n = 12$) of the indicated genotypes grown for 7 d on MS plates. The appearance of the first pair of true leaves was scored daily from day 0 to day 10 after sowing (d.a.s.; $n = 200$). Histograms show the percentage of seedlings from the indicated genotypes displaying their first pair of true leaves at the indicated times. All plants were grown in long-day conditions on MS plates. Means \pm SD are shown. **B**, Size and shape on the indicated genotypes grown in soil under long-day conditions at 22°C. Plant height (cm) was scored when plants reached its higher size ($n = 10$). The width (mm) of two portions from the base of the main stem ($n = 5$) was measured with ImageJ. Means \pm SD are shown. **C**, Length (mm) of the main root of Col-0, *nia1nia2*, *noa1-2*, and *nia1nia2noa1-2* plants grown on MS vertical plates under long-day conditions. Means \pm SD from 12 plants per genotype are shown. **D**, Reduced size of siliques in NO-deficient plants. Details of the aborted seeds contained in *nia1nia2noa1-2* siliques are shown. ¹Silique number per plant ($n = 10$). ²A total of 10 mature fruits per plant were collected from the main inflorescence ($n = 5$), and their average lengths were determined using ImageJ software. ³The incidence of fruit sterility was calculated based on the number of seedless fruits versus the total number of fruits per plant ($n = 10$). ⁴The average number was determined for seeds contained in two mature fruits per plant ($n = 5$). Means \pm SD are shown. Asterisks indicate statistical significance versus the Col-0 control in each case (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Student's *t* test).

mutant seeds established. Moreover, *nia1nia2noa1-2* seeds displayed a 100% inhibition of seed establishment at 0.6 μ M ABA (Fig. 4B, left), suggesting that NIA/NR- and AtNOA1-mediated pathways of NO biosynthesis are additive in terms of ABA-mediated inhibition of seedling establishment. The additive effect was also observed when germination, as endosperm rupture, was quantified with time in NO-deficient seeds in the presence of ABA (Supplemental Fig. S2). Due to the well-known effects of sugar content on seed germination and ABA signaling (for a recent review, see Graham, 2008), we also performed experiments in medium containing ABA with or without

Suc. The effect of ABA on seedling establishment and germination was similar in medium containing or not Suc (Supplemental Fig. S3). The application of exogenous NO released ABA inhibition of seedling establishment of wild-type and NO-deficient mutant seeds (Fig. 4B, right). Reversion was almost complete for *noa1-2* seedlings and sufficient to go from below 10% to around 60% of seedling establishment in *nia1nia2* and *nia1nia2noa1-2* seeds (Fig. 4B, right).

Since osmotic stress-mediated inhibition of germination is ABA dependent, we also tested whether NO deficiency may also alter the germination in medium supplemented with NaCl or mannitol. Table I shows

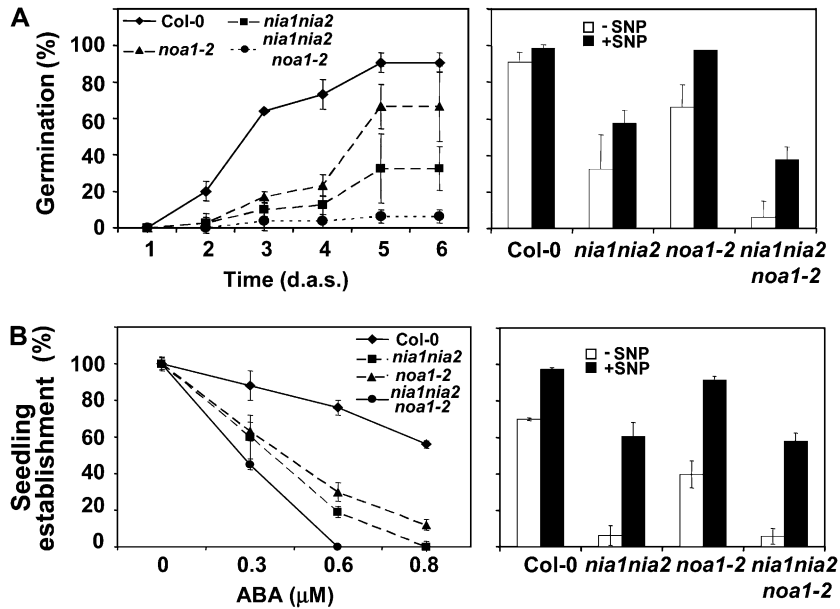


Figure 4. The NO-deficient mutant plants show hypersensitivity to ABA-regulated germination. A, Germination potential of freshly harvested nonstratified seeds on MS plates was scored daily until day 6 after sowing (d.a.s.; left). Assays performed in the presence (+ SNP; black bars) or absence (– SNP; white bars) of NO gas derived from a light-exposed 100 μM solution of SNP contained in separate vessels (right). Germination was scored at day 5 after sowing, and values are means \pm SE of three independent experiments with at least 200 seeds per experiment. B, Percentage of seeds that germinated and developed green expanded cotyledons (seedling establishment) in MS medium supplemented with the indicated ABA concentrations. At least 200 seeds were sown, stratified for 3 d at 4°C, and scored after 12 d (left). The experiment was repeated four times with similar results. Similar assays performed in MS medium plus 0.5 μM ABA in the presence (+ SNP; black bars) or absence (– SNP; white bars) of NO vapors (from a 100 μM solution of SNP) scored at day 12 after sowing (right). Values are means \pm SE. MS plates contained MS salts, 1% Suc, and 0.8% agar, pH 5.7.

that NO-deficient mutant seeds were more sensitive to osmotic stress-inhibited germination than wild-type seeds, with *nia1nia2* and *nia1nia2noa1-2* seeds showing stronger effects than *noa1-2* seeds.

Analysis of ABA-Responsive Gene Expression in NO-Deficient Plants

Quantitative real-time PCR was used to monitor the expression of the ABA-inducible *RD29b* (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1993) and *RAB18* (Jeannette et al., 1999) genes. Table II shows that all NO-deficient mutant seedlings contained around 2-fold transcript accumulation of *RD29b* and *RAB18* genes compared with wild-type seedlings. Upon ABA treatment, the triple mutant show more than double induction than

Col-0, whereas for *nia1nia2* and *noa1-2*, the induction rates were also higher than in Col-0 but not as high as in the triple mutant (Table II). These data suggest that the modulation exerted by NO on ABA sensitivity may not be restricted to seeds but could also be functional in seedlings and adult plants.

NO Deficiency Confers Enhanced Resistance to Dehydration

Since NO-deficient mutant plants displayed hypersensitivity to ABA, we tested whether the ABA-related phenotype of resistance to dehydration could also be observed in plants with altered levels of endogenous NO. Wild-type and NO-deficient mutant plants were subjected to water deficit. After 28 d without watering,

Table I. Effects of mannitol or salt treatment on seed germination of wild-type and NO-deficient plants

Seeds from NO-deficient mutant plants (at least 200 per genotype) were sown on MS medium plus 1% (w/v) Suc (control) or that medium supplemented with 125 mM NaCl or 250 mM mannitol as indicated. Percentage values of seed germination are means of four replicates \pm SE.

Treatment	Col-0	<i>nia1nia2</i>	<i>noa1-2</i>	<i>nia1nia2noa1-2</i>
Control	100	96 \pm 2	100	96 \pm 3
Mannitol	77.97 \pm 2.67	15.1 \pm 0.94	51.98 \pm 1.19	14.13 \pm 2.05
NaCl	50.77 \pm 6.88	1.94 \pm 0.99	14.64 \pm 4.81	0

Table II. Relative transcript levels of ABA-responsive genes in NO-deficient mutant seedlings

Values are means of three independent biological replicates \pm se and are shown as relative values to those detected in Col-0 wild-type seedlings. Levels were normalized with the endogenous content of *ACTIN2/8* transcript.

Treatment	Gene	Genotype			
		Col-0	<i>nia1nia2</i>	<i>noa1-2</i>	<i>nia1nia2noa1-2</i>
Mock	<i>RD29b</i>	1	2.39 \pm 0.44	2.10 \pm 0.45	2.65 \pm 0.37
	<i>RAB18</i>	1	1.74 \pm 0.14	1.95 \pm 0.42	2.17 \pm 0.21
ABA	<i>RD29b</i>	1	1.31 \pm 0.05	1.25 \pm 0.10	2.33 \pm 0.15
	<i>RAB18</i>	1	1.65 \pm 0.25	1.63 \pm 0.15	2.05 \pm 0.20

NO-deficient plants were more resistant to dehydration than wild-type plants, with a stronger effect in *nia1nia2noa1-2* plants than in *nia1nia2* and *noa1-2* plants (Fig. 5A). When wild-type plants showed extreme dehydration effects, the triple mutant plants kept green with no obvious dehydration symptoms (Fig. 5A). We found that the rate of weight loss due to water transpiration was significantly slower in NO-deficient than in wild-type plants, with *nia1nia2noa1-2* plants showing the lowest transpiration rate and consequently being the most resistant to dehydration (Fig. 5B). Moreover, whereas 42% of the wild-type plants survived the drought treatment after restoring watering, 100% of the plants from the three different NO-deficient mutant genotypes survived (Fig. 5A). In addition, a detailed water-loss assay was performed by comparing fresh and turgid weight of rosette leaves. Under these experimental conditions, *noa1-2* and *nia1nia2* mutants showed a reduced water loss as compared with the wild type, retaining around two times more water than wild-type leaves (Fig. 5C). This phenotype was even stronger in *nia1nia2noa1-2*, which retained around four times more water than wild-type leaves under the same drought period (Fig. 5C). These results show an additive role for NIA/NR and AtNOA1 pathways on drought resistance, which is in agreement with the above described additive ABA hypersensitivity of the NO-deficient mutants.

To test whether enhanced resistance to drought in NO-deficient plants was due to direct effects of ABA on stomatal closure, we measured stomatal aperture in wild-type and *nia1nia2noa1-2* leaves under different conditions. First, the effects of exogenous ABA treatment and dehydration on stomatal closure of seedlings were analyzed. Figure 6, A and B, shows that stomata from *nia1nia2noa1-2* leaves were significantly closer than wild-type stomata in seedlings treated with 50 μ M ABA, suggesting that stomata from *nia1nia2noa1-2* leaves were more efficient in ABA-induced stomatal closure. At a higher saturating concentration of 150 μ M ABA, stomata from wild-type and mutant plants were both similarly closed (Fig. 6A). In addition, *nia1nia2noa1-2* stomata were also significantly closer than wild-type stomata in response to dehydration of the seedlings (Fig. 6C). Since ABA is also regulating the stomata opening by light (Roelfsema

and Hedrich, 2005), we analyzed this process in wild-type and *nia1nia2noa1-2* seedlings. Figure 6D shows that *nia1nia2noa1-2* opened stomata upon the shift to light like the wild type. ABA inhibited opening of wild-type stomata, and the effect was stronger on *nia1nia2noa1-2* (Fig. 6D), thus displaying hypersensitivity to ABA in agreement with other phenotypes shown above. Moreover, the ABA-mediated inhibition of stomata opening was prevented by treatment with the cell-permeable calcium chelator 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid tetraacetoxymethyl ester or the NO scavenger cPTIO in wild-type plants but not in the *nia1nia2noa1-2* mutant (Fig. 6D).

We have also confirmed altered stomatal aperture in adult *nia1nia2noa1-2* plants using a noninvasive method to minimize the NO production derived from tissue damage. We found significantly lower stomatal conductance in *nia1nia2noa1-2* than in wild-type plants after 7 and 14 d without watering (Fig. 7A). Besides, we also measured the leaf water potential (LWP) by psychrometry in wild-type and NO-deficient *nia1nia2noa1-2* plants at those times. By 7 d, no significant changes in LWP were detected (Fig. 7B), correlating with no visual alteration in leaf turgor in any of the genotypes. By 14 d after stopping watering, when wild-type plants already showed dehydration symptoms and a decrease in LWP, only a slight decrease in LWP was observed in *nia1nia2noa1-2* plants (Fig. 7B), correlating very well with the lack of a water deficit-related phenotype observed in those plants (Fig. 5).

DISCUSSION

The increasing evidence of NO regulating a wide array of plant physiological processes contrasts with the limited and controversial knowledge about its biosynthesis. However, most of the accumulated data on NO production and function rely on experimental approaches based on the application of NO donors and scavengers and on the analysis of targets not directly related to NO. In this paper, we have addressed the analysis of different NO-regulated processes by exploring the effects of endogenously

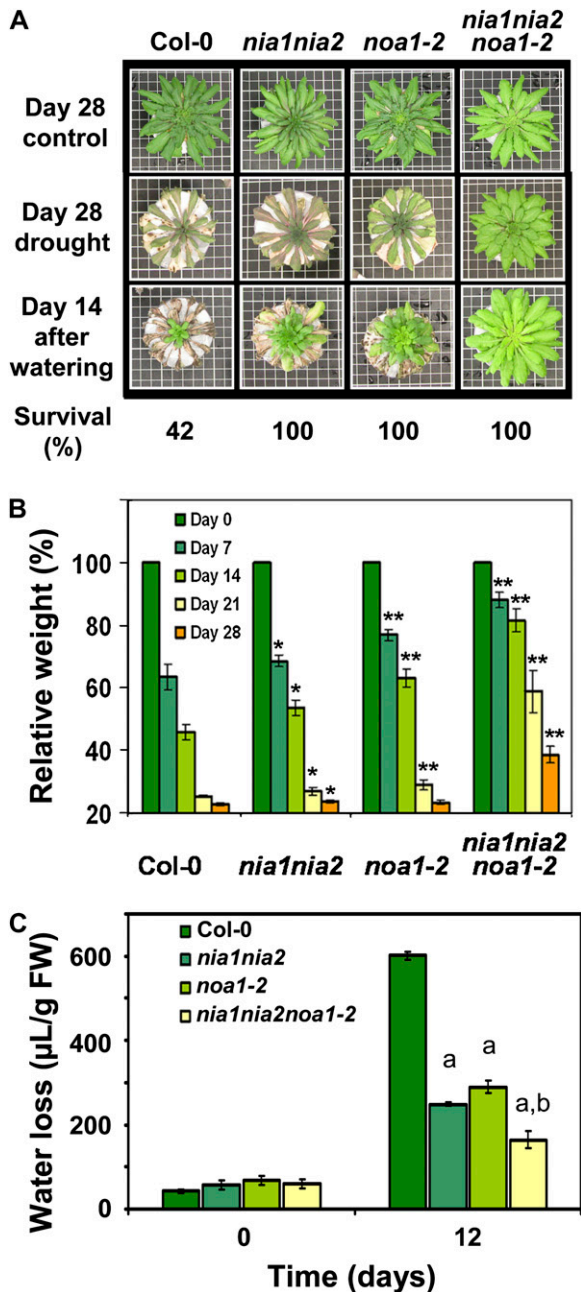


Figure 5. Drought resistance of NO-deficient mutant plants. A, Appearance of Col-0, *nia1nia2*, *noa1-2*, and *nia1nia2noa1-2* plants 28 d after stopping watering and 14 d after restoring standard watering regimes. Plants (10 per experiment, three independent experiments) were cultivated in homogenous Jiffy 7 soil substrate under short-day conditions. Survival rate was measured as the percentage of plants developing new green rosette leaves by day 14 d after restoring watering. Means \pm SE are shown. B, Losses of relative weight (%) of the same individuals (plant + sealed pot) shown in A. The total weights were scored when watering was stopped and every 7 d until day 28. Values are means \pm SE of 10 individuals per experiment. The experiment was repeated three times with similar results. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ by Student's *t* test. C, Quantification of transpiration-mediated water loss in plants after 12 d without watering. Data shown are average amounts of water loss measured in 10 leaves ($\mu\text{L g}^{-1}$ fresh

generated NO through different pathways. First, we have confirmed that AtNOA1 participates in NO biosynthesis in Arabidopsis, since we isolated a new T-DNA mutant allele, *noa1-2*, that is impaired in NO production. A recent report characterizing the *Nicotiana benthamiana* homolog of the AtNOA1 gene is in full agreement with our data, as transgenic tobacco plants with VIGS-mediated silencing of *NbNOA1* contained reduced levels of NO (Kato et al., 2008). However, the way AtNOA1 participates in NO biosynthesis is still unknown. The recent identification and characterization of the *rif1* mutant point to a putative function of AtNOA1/RIF1 in the correct expression of the plastome-encoded proteins in Arabidopsis (Flores-Pérez et al., 2008). AtNOA1's role in NO biosynthesis could thus be essentially connected to chloroplast (Flores-Pérez et al., 2008) instead of mitochondrial function (Guo and Crawford, 2005). Whether the function of AtNOA1 in NO biosynthesis is related to the overall control of plastome-encoded proteins or to specific plastid targets remains unknown. The recent characterization of AtNOA1 as a GTP-binding protein with a circularly permuted GTPase domain (Moreau et al., 2008) points to a general role of this protein in ribosome function and protein translation in chloroplasts. Whether a specific still unknown protein involved in NO synthesis is not translated in *noa1-2* chloroplasts, or there is an indirect effect on the chloroplastic protein synthesis, the overall function of chloroplasts remains unclear and will require more work.

On the other hand, we have also confirmed that a nitrate reductase-based mechanism represents a significant contribution in the biosynthesis of NO in Arabidopsis. In the double *nia1nia2* mutant plants, with nearly null activity of the two Arabidopsis nitrate reductases NR1/NIA1 and NR2/NIA2 (Wilkinson and Crawford, 1993), we detected lower NO content than in wild-type plants. However, neither *nia1nia2* nor *noa1-2* mutant plants were completely impaired in basal NO production, and in fact they displayed only a partial reduction in ABA-induced NO synthesis. To obtain further insight into the function of NR/NIA- and AtNOA1-based biosynthesis of NO in Arabidopsis, we searched for a potential null NO biosynthetic mutant by crossing *nia1nia2* and *noa1-2* plants. After isolation of the triple homozygous *nia1nia2noa1-2* mutant plants, we found an additive effect in the reduction of NO production compared with their parental plants. We did not detect basal or ABA-induced levels of NO in roots of the triple mutant plant. The analysis of NO production by whole seedlings indicated that *nia1nia2noa1-2* plants are still able to produce residual (lower than 10% of wild-type plants) levels of NO. This may be explained by the existence of a still unidenti-

weight [FW]) collected from 10 different plants. ^a $P < 0.001$ by comparing NO-deficient mutants with the wild type by *t* test. ^b $P < 0.005$ by comparing *nia1nia2noa1-2* with *nia1nia2* or *noa1-2* by *t* test.

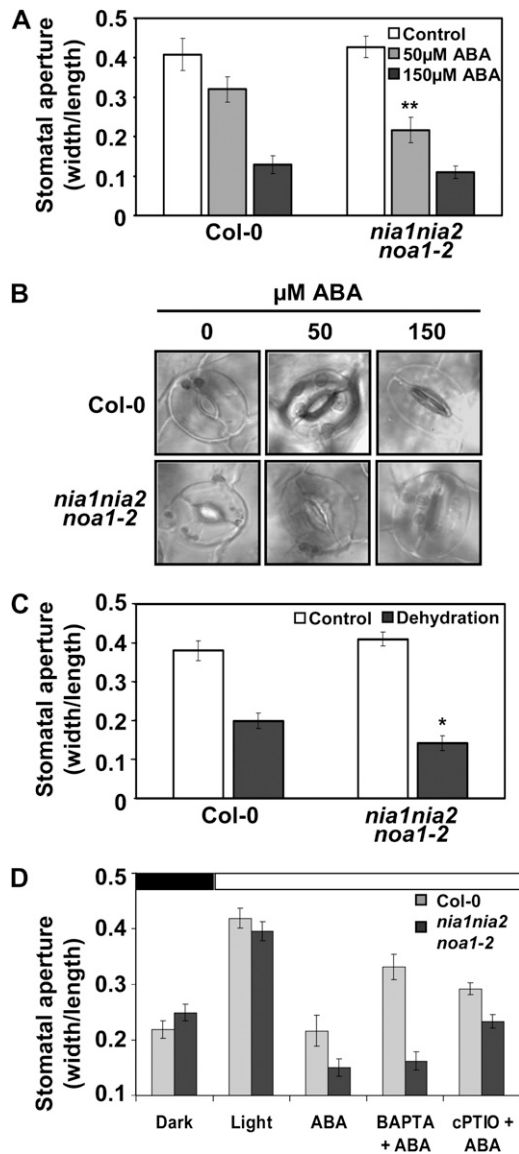


Figure 6. Reduced stomatal apertures of *nia1nia2noa1-2* mutant plants. **A**, ABA-induced stomatal closing of Col-0 and *nia1nia2noa1-2* seedlings was tested in leaves with stomata preopened under light for 2.5 h and then incubated in the indicated ABA concentrations for 2.5 h under light. Data represent means \pm SE of 40 measured stomata per experiment. The experiment was repeated twice with similar results. **B**, Representative confocal microscopy images of stomata from leaves of the indicated genotype and ABA treatment used for quantification in **A**. **C**, Stomatal apertures under control (white bars) and dehydration (black bars) conditions. Dehydration conditions were set up by removing seedlings from culture medium and further incubation for 5 min in a laminar flow cabinet. **D**, ABA-mediated inhibition of stomata opening upon transference from darkness to light. Seedlings were incubated in the dark in opening buffer for 2.5 h. Then, they were treated for 0.5 h with 50 μ M ABA, 250 μ M 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid tetraacetoxymethyl ester (BAPTA-AM), or 250 μ M cPTIO as indicated in "Materials and Methods" and shifted to light conditions. Stomatal aperture was measured just before (black horizontal bar) or 2.5 h after (white horizontal bar) the shift to light. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ by Student's *t* test.

fied enzyme-based production of NO different from that mediated by NIA/NR and AtNOA1 pathways. That alternative pathway would be significantly less active, if active at all, in roots than in shoots. We are actively looking for such an alternative enzyme-based pathway that may be functional in Arabidopsis. We have also checked that a non-enzyme-based NO production occurred at similar levels either in NO-deficient mutant or in thermally inactivated wild-type seedlings, suggesting that there is a significant contribution of unspecific chemically produced NO in seedlings. Moreover, it is also likely that the contribution of each biosynthetic or chemical pathway may be different in different organs or developmental stages, as the expression patterns of *NIA1*, *NIA2*, and *AtNOA1* genes vary along development and topology of the plant

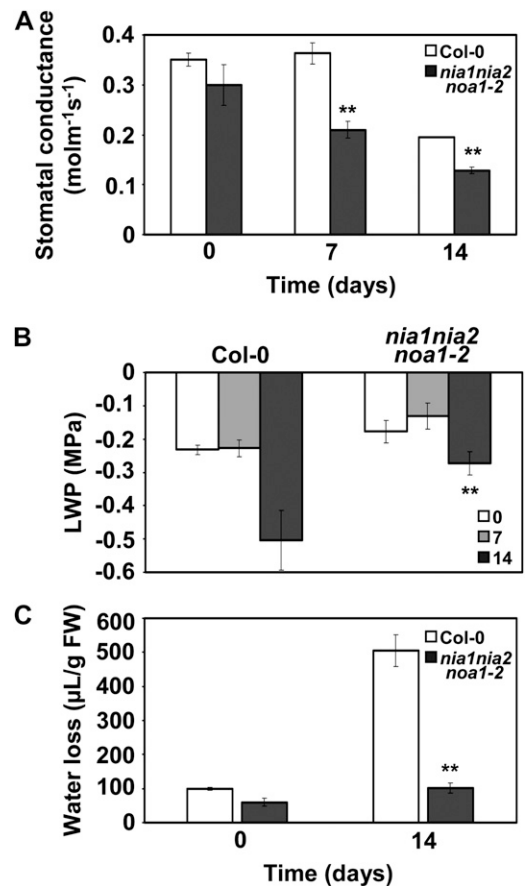


Figure 7. Stomatal conductance, LWP, and water losses in wild-type and *nia1nia2noa1-2* plants undergoing water shortage. **A**, Stomatal conductance of wild-type and *nia1nia2noa1-2* mutant leaves at the indicated times after stopping watering. Means of 18 replicate measurements \pm SE are shown. The experiment was repeated twice with similar results. **B**, LWP of plants undergoing dehydration after stopping watering for 0, 7, or 14 d. Values represent means of six replicate measurements \pm SD. **C**, Water loss assay (mean \pm SD) done with the same plants used in **A**. Water shortage conditions were as described in "Materials and Methods" and Figure 5. ** $P < 0.01$ by Student's *t* test.

(Supplemental Fig. S4). According to data from public microarray databases (Bio-Array Resource [<http://www.bar.utoronto.ca/>] and Genevestigator [<https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>]), *AtNOA1* transcript levels are 15- to 100-fold lower than those of *NIA1* and *NIA2* transcripts depending on the organ or developmental stage. Based on transcript level data, we should expect a larger contribution of the *NIA/NR*-mediated pathway to NO biosynthesis. However, our data suggest a larger contribution of the *AtNOA1*-mediated pathway in NO biosynthesis in roots, which is especially important in ABA-treated roots, and similar contributions of both pathways in basal NO production in shoots. These data suggest that there is no direct correlation between transcript levels of the potential NO biosynthetic genes and the actual levels of endogenous NO. The NO contents in the different organs of the plants are presumably due to the levels of the corresponding encoded proteins or to the activity of them. It is worthy of mention that nitrate reductase activities are more dependent on posttranslational modifications than on transcriptional regulation under certain conditions (Lea et al., 2006) and also that the activity of *NIA/NR* or *AtNOA1* in every plant organ may be strongly modulated by the availability of the corresponding substrates.

The different NO-deficient plants we have used in this work allowed us to propose a new role for the *NR/NIA*- and *AtNOA1*-mediated biosynthesis of NO in the regulation of seed germination, dormancy, and resistance to water deficit. As expected from previously reported data on the role of NO in regulating seed dormancy and germination in connection to ABA (Bethke et al., 2004, 2006), we found that several of the NO regulatory effects were exerted through interaction with ABA. NO-deficient mutant seeds were more dormant and showed increased sensitivity to ABA-mediated inhibition of germination than wild-type seeds, which is in agreement with the proposed role for NO decreasing the sensitivity of seeds to ABA (Bethke et al., 2006). This effect was more severe in *nialnia2noa1-2* seeds than in their parental seeds, suggesting that there is a clear correlation with the endogenous NO levels. Accordingly, NO-deficient seedlings had increased basal and induced expression of ABA-responsive genes.

The altered sensitivity to ABA is likely the cause for NO-deficient mutant plants showing increased resistance to water deficit. ABA promotes closure and prevents opening of stomata (Neill et al., 2008). NO has been proposed to be a component of the signaling pathway involved in the stomata closure triggered by ABA (Desikan et al., 2002; Guo et al., 2003; García-Mata and Lamattina, 2007). Since NO-deficient plants are markedly resistant to water deficit, the reduced water losses in NO-deficient plants may be due to hypersensitivity to ABA, thus leading to NO-independent inhibition of stomata opening and enhanced closure by ABA. Actually, we observed that the triple *nialnia2noa1-2* mutant showed a hypersensitive

response to dehydration or exogenous ABA treatment in stomata closure or in the inhibition of stomata opening. Moreover, leaves of *nialnia2noa1-2* plants showed a consequent decreased stomatal conductance, a drastic reduction in water loss by transpiration, and no significant alteration in LWP upon water shortage. These data suggest that ABA-mediated regulation of stomata closure may not be necessarily dependent on de novo biosynthesis of NO through any of the proposed *NIA/NR*- and *AtNOA1*-mediated pathways. These results contrast with Desikan et al. (2002) proposing that *NR/NIA*-dependent NO production was essential for ABA-mediated stomatal closure. However, they could not observe a wilting phenotype in *nialnia2* plants, suggesting that ABA can regulate stomatal closure through a mechanism independent of NO biosynthesis. This is also in agreement with enhanced stomata closure detected in *nialnia2* or the single *nial1* and *nial2* mutants subjected to dehydration (Ribeiro et al., 2009). Moreover, the ABA inhibition of stomata opening was not affected in the *nialnia2noa1-2* mutant, in agreement with previously reported data on *nialnia2* plants (Desikan et al., 2002). Therefore, our data support that NO-deficient mutants displayed an enhanced ABA-mediated stomatal closure and inhibition of opening due to ABA hypersensitivity. This process was essentially mediated by a mechanism independent of de novo NO biosynthesis, as we demonstrate that *nialnia2noa1-2* stomata closed efficiently by ABA despite levels of NO in their guard cells that were undetectable (Supplemental Fig. S5). Moreover, we have observed that the application of a NO scavenger (cPTIO) prevented the inhibition of stomata opening by ABA in wild-type plants, as reported previously (García-Mata and Lamattina, 2007; Ribeiro et al., 2009), whereas constitutive shortage of NO in NO-deficient mutants did not prevent it (Desikan et al., 2002; this work). On the other hand, although it has been reported that changes in endogenous calcium levels play an important role in ABA-mediated inhibition of stomata opening (Roelfsema and Hedrich, 2005) and our data are consistent with that in wild-type seedlings, we found that this process was calcium independent in the *nialnia2noa1-2* mutant. Among calcium-independent signaling components involved in the regulation of stomata closure by ABA, we are currently assessing whether ABA-induced calcium-independent kinases might be deregulated in NO-deficient backgrounds.

This work supports that *NR/NIA*- and *AtNOA1*-mediated production of NO are both functional and account for most of the NO biosynthesis in Arabidopsis seedlings. Several ABA-related phenotypes found in NO-deficient plants seem to be due to a function for NO as an endogenous negative regulator of the sensitivity to ABA. Under conditions where ABA-promoted synthesis of NO is impaired, plant cells respond by increasing the sensitivity to the primary stimulus; thus, NO deficiency correlates with enhanced ABA-activated responses.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material, Growth Conditions, and NO Treatments

Wild-type Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* Col-0) was the genetic background of every mutant plant used in this work. Seeds from the *nia1nia2* mutant were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre seed bank (N2356). Seeds from *noa1-1* were a kind gift from Nigel Crawford (University of California, San Diego), and the *noa1-2* allele was obtained from the SAIL collection of T-DNA insertions (SAIL_507_E11). Seeds were grown in soil mixture or Murashige and Skoog (MS) medium as described previously (Castillo and León, 2008).

NO treatments were performed by photochemically mediated release of NO gas from a solution of SNP that was always contained in internal vessels separated from MS medium, as reported previously (Bethke et al., 2006).

Generation of the Triple *nia1nia2noa1-2* Mutant

Emasculated flowers from *nia1nia2* plants were crossed with pollen from *noa1-2* flowers. T1 plants were self-pollinated, and T2 plants were genotyped by PCR. Primers to amplify the wild-type *NIA2* gene sequence that is deleted in the *nia2* mutant and cleaved-amplified polymorphic sequence primers for the *nia1* point mutation are described in Supplemental Table S1. A region containing the nucleotide change (G to A) in *nia1* was amplified with cleaved-amplified polymorphic sequence primers and further digested with *HhaI* to discriminate *nia1* from wild-type sequences (Fig. 1B). Plants homozygous for the T-DNA insertion in the *AtNOA1* locus were genotyped by PCR with specific primers for *AtNOA1* located upstream and downstream of the T-DNA insertion as well as a primer from the T-DNA left border as described in Figure 1. The transcript levels were quantified by reverse transcription (RT)-PCR with specific primers (Supplemental Table S1) for each gene.

Germination Assays

To test ABA sensitivity, seeds were sown in MS medium supplemented or not with 1% (w/v) Suc, 0.8% (w/v) agar, and increasing concentrations of (\pm -cis,trans-ABA (Sigma) after stratification 3 d at 4°C. Germination was scored as endosperm rupture, and seedling establishment was assessed by quantifying seedlings with green expanded cotyledons at day 12 after sowing. To test the effect of osmotic stress, seeds were sown in medium supplemented with 125 mM NaCl or 250 mM mannitol and quantified as above. Seeds harvested at the same time were used to carry on these assays. For dormancy assays, freshly harvested seeds from yellowing siliques at stage 17B (Ferrández et al., 1999) of the primary bolt were used. Seeds were sown without stratification treatment on MS plates (MS salts, 1% [w/v] Suc, and 0.8% [w/v] agar, pH 5.7), and germination was quantified as endosperm rupture for 6 d.

NO Detection by Fluorescence and Confocal Microscopy

The endogenous levels of NO in roots and stomatal guard cells were determined by staining with DAF-FM DA as described (Guo et al., 2003). To analyze the kinetics of NO production, seedlings were first treated with 50 μ M ABA, 1 mM SA, or not treated, as a control, for the indicated times and subsequently loaded with 15 μ M DAF-FM DA. NO-associated fluorescence was detected with a fluorescence Nikon Eclipse microscope or with a TCS SL confocal laser-scanning microscope (Leica), using unchanged parameters for every measurement. Fluorescence was quantified as described previously (García-Mata and Lamattina, 2007). The specificity of NO-related fluorescence detection was assessed by treatment with 0.5 mM of the NO scavenger cPTIO (Sigma).

To quantify NO produced by seedlings, 10- to 15-d-old Col-0 and NO-deficient mutant seedlings were submerged in 650 μ L of 10 μ M DAF-2 in phosphate-buffered saline and kept in darkness for 1 h. The NO-derived fluorescence was then quantified in replicates on a 96-well black plate (Costar) using a TECAN fluorimeter with excitation filter of 492 nm and emission filter of 535 nm. The fluorescence values were the result of subtracting the fluorescence values of thermally inactivated seedlings (heated for 10 min at 99°C), as a control of non-enzyme-based synthesis of NO, from total fluorescence in noninactivated seedlings. Values were normalized to the fresh weight of seedlings.

RNA Isolation and Analysis

Total RNA was isolated from 10- to 12-d-old seedlings, separated, and analyzed by RT-PCR techniques as described previously (Castillo and León,

2008). *RAB18* and *RD29B* transcript levels were quantified by quantitative RT-PCR using specific primers (Supplemental Table S1).

Drought Assays

Plants with similar rosette sizes were selected to minimize biomass-related factors in further drought experiments. NO-deficient seeds were sown before wild-type seeds in Jiffy 7 substrate (Clause), grown under short-day conditions, and exposed to drought as follows. Three independent replicates with 10 plants per experiment grown under standard watering conditions were not watered for 28 d. Evaporation from the soil was minimized by covering pots with plastic wrap film. Pots were weighed and photographed before stopping watering and every 7 d until day 28. To quantify drought resistance, plants were then watered again with the same demineralized water quantity for an additional 14 d, and the percentage of plants surviving drought treatment was calculated for every genotype.

Assays to estimate the transpiration-mediated water loss were performed as follows. Plants (10 individuals per experiment, three independent experiments) were grown under normal watering conditions and subjected to drought stress by completely terminating irrigation and minimizing soil evaporation by covering pots with plastic wrap film. Ten leaves were removed at the indicated time points, weighed, incubated in demineralized water for 3 h, and weighed again. The difference in weight was considered as water loss.

Stomatal Aperture, Conductance, and Psychrometric Measurements

For stomata aperture measurements, the same adaxial regions of the first true leaves of four different plants were captured with a TCS SL confocal laser-scanning microscope (Leica), and width and length of the aperture were measured with ImageJ software (National Institutes of Health). Prior to measurements, plants grown for 10 d under long-day conditions were incubated in stomata-opening buffer (30 mM KCl and 10 mM MES-KOH, pH 6.1) on 24-well multiwell plates (Costar) for 2.5 h under cool-white light (150–200 μ E m⁻² s⁻¹) at 22°C. To induce stomata closure, plants were incubated in the appropriate ABA concentrations for 2.5 h under light. For inhibition of stomata opening, experiments were done by applying chemicals carefully under green light to avoid light-induced stomata opening as reported previously (García-Mata and Lamattina, 2007).

Stomatal conductances were measured on short-day cultivated plants with the Steady State Difusión Porometer SC-1 (Decagon Devices) as indicated by the manufacturer at 0, 7, and 14 d after stopping watering on the adaxial side of three leaves of six different plants at each time point. LWP was determined in 5-mm leaf discs of short-day cultivated plants using the dew-point method with a C-52 sample chamber (Wescor) connected to a psychrometer switchbox (Ps-10) and to a dew-point microvoltmeter (model HT-33T; Wescor). Measurements were performed according to the manufacturer's instructions at 0, 7, and 14 d after stopping watering. Potential values were determined in three leaf discs obtained from three leaves belonging to six different plants for each time point and genotype.

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure S1. Rescue of vegetative developmental phenotypes of NO-deficient mutants by NO.

Supplemental Figure S2. The NO-deficient mutant plants show hypersensitivity to ABA in germination assays.

Supplemental Figure S3. Suc does not affect ABA sensitivity in NO-deficient mutant plant germination and establishment.

Supplemental Figure S4. *NIA1*, *NIA2*, and *AtNOA1* expression levels in different tissues and developmental stages.

Supplemental Figure S5. NO in guard cells of wild-type and *nia1nia2noa1-2* stomata.

Supplemental Table S1. Oligonucleotides used for genotyping and RT-PCR.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledged the assistance of M.D. Gómez (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas [IBMCP]) in microscopy techniques. We thank Silvia Rubio (IBMCP) for help in ABA sensitivity tests of seed germination and Pedro Rodríguez (IBMCP) for critical reading of the manuscript. We also thank Manuel Agustí and Carlos Mesejo (IAM) for assistance and discussion on psychrometric measurements.

Received September 23, 2009; accepted December 2, 2009; published December 9, 2009.

LITERATURE CITED

- Ali R, Ma W, Lemtiri-Chlieh F, Tsaltas D, Leng Q, von Bodman S, Berkowitz GA (2007) Death don't have no mercy and neither does calcium: *Arabidopsis* CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL2 and innate immunity. *Plant Cell* **19**: 1081–1095
- Beligni MV, Lamattina L (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* **210**: 215–221
- Bethke PC, Gubler F, Jacobsen JV, Jones RL (2004) Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta* **219**: 847–855
- Bethke PC, Libourel IG, Aoyama N, Chung YY, Still DW, Jones RL (2007) The *Arabidopsis* aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Physiol* **143**: 1173–1188
- Bethke PC, Libourel IGL, Jones RL (2006) Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **57**: 517–526
- Castillo MC, León J (2008) Expression of the beta-oxidation gene 3-ketoacyl-CoA thiolase 2 (KAT2) is required for the timely onset of natural and dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **59**: 2171–2179
- Crawford NM (2006) Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *J Exp Bot* **57**: 471–478
- Crawford NM, Galli M, Tischner R, Heimer YM, Okamoto M, Mack A (2006) Response to Zmopt1 et al: Plant nitric oxide synthase: back to square one. *Trends Plant Sci* **11**: 526–527
- Delledonne M (2005) NO news is good news for plants. *Curr Opin Biol* **8**: 390–396
- del Río LA, Corpas FJ, Barroso JB (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* **65**: 783–792
- Desikan R, Graffiths R, Hancock J, Neill S (2002) A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 16314–16318
- Durner J, Klessig DF (1999) Nitric oxide as a signal in plants. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 369–374
- Ferrández C, Pelaz S, Yanofsky MF (1999) Control of carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Annu Rev Biochem* **68**: 321–354
- Finkelstein R, Reeves W, Arizumi T, Steber C (2008) Molecular aspects of seed dormancy. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 387–415
- Flores-Pérez U, Sauret-Güeto S, Gas E, Jarvis P, Rodríguez-Concepción M (2008) A mutant impaired in the production of plastome-encoded proteins uncovers a mechanism for the homeostasis of isoprenoid biosynthetic enzymes in *Arabidopsis* plastids. *Plant Cell* **20**: 1303–1315
- García-Mata C, Lamattina L (2007) Abscisic acid (ABA) inhibits light-induced stomatal opening through calcium- and nitric oxide-mediated signaling pathways. *Nitric Oxide* **17**: 143–151
- Graham IA (2008) Seed storage oil mobilization. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 115–142
- Grün S, Lindermayr C, Sell S, Durner J (2006) Nitric oxide and gene regulation in plants. *J Exp Bot* **57**: 507–516
- Gubler F, Millar AA, Jacobsen JV (2005) Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 183–187
- Guo FQ, Crawford NM (2005) *Arabidopsis* nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell* **17**: 3436–3450
- Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* **302**: 100–103
- Gupta KJ, Stoimenova M, Kaiser WM (2005) In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, *in vitro* and *in situ*. *J Exp Bot* **56**: 2601–2609
- He Y, Tang RH, Hao Y, Stevens RD, Cook CW, Ahn SM, Jing L, Yang Z, Chen L, Guo F, et al (2004) Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* **305**: 1968–1971
- Holdsworth MJ, Finch-Savage WE, Grappin P, Job D (2008) Post-genomics dissection of seed dormancy and germination. *Trends Plant Sci* **13**: 7–13
- Jeannette E, Rona JP, Bardat F, Cornel D, Sotta B, Miginiac E (1999) Induction of RAB18 gene expression and activation of K⁺ outward rectifying channels depend on an extracellular perception of ABA in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant J* **18**: 13–22
- Kato H, Asai S, Yamamoto-Katou A, Yoshioka H, Doke N, Kawakita K (2008) Involvement of NbNOA1 in NO production and defense responses in INF1-treated *Nicotiana benthamiana*. *J Gen Plant Pathol* **74**: 15–23
- Knowles RG, Moncada S (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* **298**: 249–258
- Kolbert Z, Bartha B, Erdei L (2008) Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordia. *J Plant Physiol* **165**: 967–975
- Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H (2002) Seed dormancy and germination. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 33–36
- Lamattina L, García-Mata C, Graziano M, Pagnussat G (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 109–136
- Lamotte O, Courtois C, Barnavon L, Pugin A, Wendehenne D (2005) Nitric oxide in plants: the biosynthesis and cell signalling properties of a fascinating molecule. *Planta* **221**: 1–4
- Lea US, Leydecker MT, Quilleré I, Meyer C, Lillo C (2006) Posttranslational regulation of nitrate reductase strongly affects the levels of free amino acids and nitrate, whereas transcriptional regulation has only minor influence. *Plant Physiol* **140**: 1085–1094
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**: 969–980
- Meyer C, Lea US, Provan F, Kaiser WM, Lillo C (2005) Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game? *Photosynth Res* **83**: 181–189
- Mishina TE, Lamb C, Zeier J (2007) Expression of a nitric oxide degrading enzyme induces a senescence programme in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* **30**: 39–52
- Modolo LV, Augusto O, Almeida IM, Magalhaes JR, Salgado I (2005) Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. *FEBS Lett* **579**: 3814–3820
- Moreau M, Lee GI, Wang Y, Crane BR, Klessig DF (2008) AtNOS/A1 is a functional *Arabidopsis thaliana* cGTPase and not a nitric oxide synthase. *J Biol Chem* **283**: 32957–32967
- Neill S, Barros R, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Morris P, Ribeiro D, Wilson I (2008) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J Exp Bot* **59**: 165–176
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hancock JT (2002) Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol* **128**: 13–16
- Parihar A, Parihar MS, Chen Z, Ghafourifar P (2008a) mAtNOS1 induces apoptosis of human mammary adenocarcinoma cells. *Life Sci* **82**: 1077–1082
- Parihar MS, Parihar A, Chen Z, Nazarewicz R, Ghafourifar P (2008b) mAtNOS1 regulates mitochondrial functions and apoptosis of human neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* **1780**: 921–926
- Pedroso MC, Magalhaes JR, Durzan D (2000) A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues. *J Exp Bot* **51**: 1027–1036
- Planchet E, Gupta KJ, Sonoda M, Kaiser WM (2005) Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant J* **41**: 732–743
- Planchet E, Sonoda M, Zeier J, Kaiser WM (2006) Nitric oxide (NO) as an intermediate in the cryptogem-induced hypersensitive response: a critical re-evaluation. *Plant Cell Environ* **29**: 59–69
- Ribeiro DM, Desikan R, Bright J, Confraria A, Harrison J, Hancock JT, Barros RS, Neill SJ, Wilson ID (2009) Differential requirement for NO

- during ABA-induced stomatal closure in turgid and wilted leaves. *Plant Cell Environ* **32**: 46–57
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM** (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J Exp Bot* **53**: 103–110
- Roelfsema MR, Hedrich R** (2005) In the light of stomatal opening: new insights into ‘the Watergate’. *New Phytol* **167**: 665–691
- Romero-Puertas MC, Perazzolli M, Zago ED, Delledonne M** (2004) Nitric oxide signaling functions in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol* **6**: 795–803
- Sarath G, Bethke PC, Jones R, Baird LM, Hou G, Mitchell RB** (2006) Nitric oxide accelerates seed germination in warm-season grasses. *Planta* **223**: 1154–1164
- Seligman K, Saviani EE, Oliveira HC, Pinto-Maglio CA, Salgado I** (2008) Floral transition and nitric oxide emission during flower development in *Arabidopsis thaliana* is affected in nitrate reductase-deficient plants. *Plant Cell Physiol* **49**: 1112–1121
- Simpson GG** (2005) NO flowering. *Bioessays* **27**: 239–241
- Torreilles J** (2001) Nitric oxide: one of the more conserved and widespread signaling molecules. *Front Biosci* **6**: D1161–D1172
- Vardi A, Bidle KD, Kwityn C, Hirsh DJ, Thompson SM, Callow JA, Falkowski P, Bowler C** (2008) A diatom gene regulating nitric-oxide signaling and susceptibility to diatom-derived aldehydes. *Curr Biol* **18**: 895–899
- Wendehenne D, Durner J, Klessig DF** (2004) Nitric oxide: a new player in plant signalling and defense responses. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 449–455
- Wendehenne D, Pugin A, Klessig DF, Durner J** (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci* **6**: 177–183
- Wilkinson JQ, Crawford NM** (1993) Identification and characterization of a chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes *NIA1* and *NIA2*. *Mol Gen Genet* **239**: 289–297
- Wulff A, Oliveira HC, Saviani EE, Salgado I** (2009) Nitrite reduction and superoxide-dependent nitric oxide degradation by *Arabidopsis* mitochondria: influence of external NAD(P)H dehydrogenases and alternative oxidase in the control of nitric oxide levels. *Nitric Oxide* **21**: 132–139
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1993) Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol Gen Genet* **236**: 331–340
- Yamasaki H, Sakihama Y, Takahashi S** (1999) An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends Plant Sci* **4**: 128–129
- Zeier J, Delledonne M, Mishina T, Severi E, Sonoda M, Lamb C** (2004) Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant-pathogen interactions. *Plant Physiol* **136**: 2875–2886
- Zemojtel T, Fröhlich A, Palmieri MC, Kolanczyk M, Mikula I, Wyrwicz LS, Wanker EE, Mundlos S, Vingron M, Martasek P, et al** (2006a) Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends Plant Sci* **11**: 524–525; author reply 526–527
- Zemojtel T, Kolanczyk M, Kossler N, Stricker S, Lurz R, Mikula I, Duchniewicz M, Schuelke M, Ghafourifar P, Martasek P, et al** (2006b) Mammalian mitochondrial nitric oxide synthase: characterization of a novel candidate. *FEBS Lett* **580**: 455–462
- Zottini M, Costa A, De Michele R, Ruzzene M, Carimi F, Lo Schiavo F** (2007) Salicylic acid activates nitric oxide synthesis in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **58**: 1397–1405

Nitric oxide modulates sensitivity to ABA

Jorge Lozano-Juste and José León*

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV); Valencia, Spain

Nitric oxide (NO) is a gas with crucial signaling functions in plant defense and development. As demonstrated by generating a triple *nia1nia2noa1-2* mutant with extremely low levels of NO (February 2010 issue of *Plant Physiology*), NO is synthesized in plants through mainly two different pathways involving nitrate reductase (NR/NIA) and NO Associated 1 (AtNOA1) proteins. Depletion of basal NO levels leads to a priming of ABA-triggered responses that causes hypersensitivity to this hormone and results in enhanced seed dormancy and decreased seed germination and seedling establishment in the triple mutant. NO produced under non-stressed conditions represses inhibition of seed developmental transitions by ABA. Moreover, NO plays a positive role in post-germinative vegetative development and also exerts a critical control of ABA-related functions on stomata closure. The triple *nia1nia2noa1-2* mutant is hypersensitive to ABA in stomatal closure thus resulting in an extreme phenotype of resistance to drought. In the light of the recent discovery of PYR/PYL/RCAR as a family of potential ABA receptors, regulation of ABA sensitivity by NO may be exerted either directly on ABA receptors or on downstream signaling components; both two aspects that deserve our present and future attention.

Key words: nitric oxide, abscisic acid, seed germination, stomata opening

Submitted: 01/15/10

Accepted: 01/15/10

Previously published online:

www.landesbioscience.com/journals/psb/article/11235

*Correspondence to: José León;
Email: jleon@ibmcp.upv.es

Addendum to: Lozano-Juste J, León J. Enhanced abscisic acid-mediated responses in *nia1nia2noa1-2* triple mutant impaired in NIA/NR- and AtNOA1-mediated nitric oxide biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiol* 2009; PMID: 20007448; DOI: 10.1104/pp.109.148023.

including levels of primary and secondary metabolites. Among the latter, hormones such as gibberellins (GA), auxins, cytokinins, ethylene and abscisic acid (ABA) participate in the control of most of the developmental transitions.^{1,2} During the last years, nitric oxide (NO) has gained an increasing role as an essential player in plant defense responses³ as well as a co-regulator of many developmental processes.⁴ However, studies of NO function as a regulatory molecule in plants have been hampered by the scanty, limited and controversial knowledge on how this gas is synthesized in plants.^{5,6} This situation has moved researchers in this area to adopt pharmacological approaches based on chemicals acting as artificial NO donors as well as inhibitors or scavengers of NO action. The lack of specificity and the inherent artificial effects of these chemicals can be overcome by genetic approaches based on the use of mutants with endogenous low levels of NO. In February 2010 issue of *Plant Physiology*, we report the generation and further characterization of a triple *nia1nia2noa1-2* mutant that contains extremely low levels of NO due to the impairment of two NO biosynthetic pathways involving nitrate reductase (NIA/NR) or NO Associated 1 (AtNOA1) proteins.⁷ These findings support that NO is mainly produced through those pathways in Arabidopsis. However, the possible existence of a minor still uncharacterized pathway involved in the residual production of NO can not be ruled out at this time.

Further functional characterization of *nia1nia2noa1-2* mutant in terms of development has pointed to NO as an overall positive regulator of plant growth, affecting to almost every developmental stage

Plant development is the result of the successful execution of several programs that control the transition between different growth phases. Every developmental transition is regulated through coordinated mechanisms that involved exogenous environmental factors such as light and temperature as well as endogenous cues,

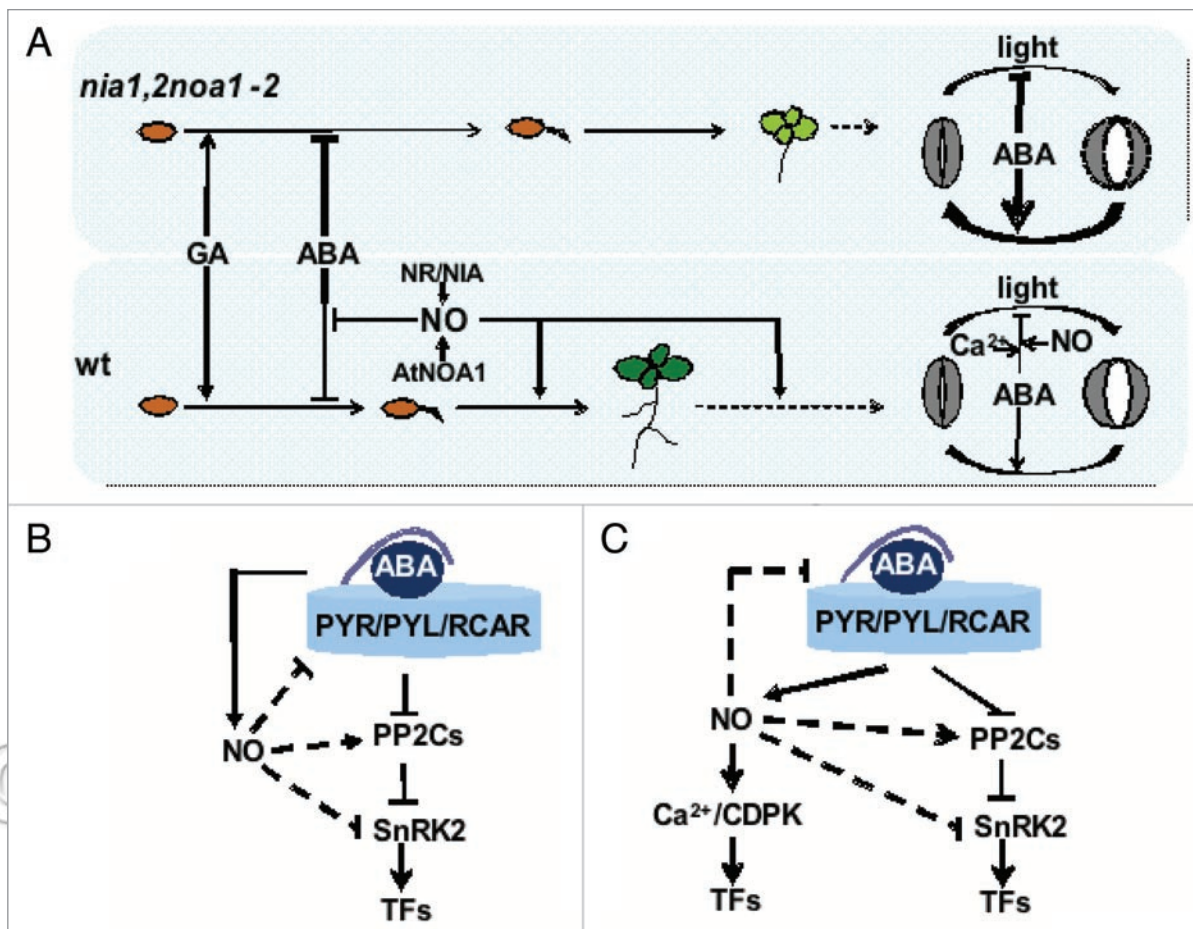


Figure 1. Interactions between NO and ABA results in modulated sensitivity to ABA throughout development. (A) NO synthesized through nitrate reductase (NR/NIA) and NO associated I (AtNOA1) protein regulate germinative and post-germinative development as well as stomata movements through modulation of the sensitivity to ABA. Arrows and bars represent positive and negative effects, and the thickness of lines are proportional to the magnitude of regulatory effects. (B) Scheme of a minimal ABA signalling module and the potential targets of NO. Dashed lines represent effects still to be demonstrated. (C) ABA signalling in stomata guard cells through Ca²⁺-dependent and -independent pathways and the potential interactions with NO as represented by dashed lines.

from seed germination to reproductive development. Accordingly, triple mutant plants display a delayed growth resulting in small shoot and root size and they also produce low amounts of viable seeds.⁷

Dormancy and seed germination are developmental programs largely regulated by the combined action of GA and ABA.¹ GA promote breaking of dormancy and promote germination whereas ABA acts as a brake in those processes, thus ensuring a timely seed germination. Our data from the characterization of dormancy and seed germination in the *nia1nia2noa1-2* mutant suggest that NO's role in the control of those processes may be exerted through modulation of the sensitivity to ABA (Fig. 1A). Seeds from NO deficient plants have increased dormancy and lower seed

germination and seedling establishment rates than wild type seeds due to the enhanced ABA inhibitory action. These effects can be reversed by exogenous application of NO to *nia1nia2noa1-2*, suggesting that the sensitivity to ABA is actually controlled by the endogenous levels of NO. The recent identification of PYR/PYL/RCAR family of ABA receptors,^{8,9} and the further characterization of the essential ABA regulatory module including receptor, protein phosphatases of the 2C class and kinases of the SnRK2 family¹⁰ point to these components as potential targets of NO in regulating sensitivity to ABA (Fig. 1B). This work is in progress in our lab but we already know that some of the PYR/PYL/RCAR receptors and SnRKs are actually regulated by NO and

also that this regulation may be exerted at different levels (Lozano-Juste J and León J, unpublished data).

The enhanced sensitivity to ABA observed in germinative and post-germinative development of *nia1nia2noa1-2*, is extended throughout plant life cycle and it is actually the cause of the very strong resistance of *nia1nia2noa1-2* plants to water deficit conditions.⁷ Stomatal aperture is a fine-tuned process controlled mainly through a balance between the light-promoted opening and the ABA-mediated promotion of closure and inhibition of opening¹¹ (Fig. 1A). It has been previously reported that ABA function on stomata movements involve the participation of NO as well as Ca²⁺ in such a way that Ca²⁺ chelators and NO scavengers

block ABA action on stomata movements.¹² Stomata of *nia1nia2noa1-2* leaves, despite of being depleted of NO, are not impaired for ABA inhibition of stomata opening but, in turn, they seem to be primed for a more efficient ABA response (Fig. 1A). Contrary to the Ca²⁺ requirements for ABA action on wild type stomata movements, this process is not affected by Ca²⁺ chelators in *nia1nia2noa1-2* stomata, and it thus seems to be independent of Ca²⁺ in NO-deficient backgrounds (Fig. 1C). As mentioned above, NO might regulate sensitivity to ABA by acting on ABA receptors or on SnRKs, some of which are Ca²⁺-independent kinases. Both receptors and Ca²⁺-independent kinases are likely targets of NO in the modulation of stomata sensitivity to ABA thus explaining the more efficient stomata closure in *nia1nia2noa1-2* leaves, and the consequent low rates of evapotranspiration that leads to the extreme resistance of triple mutant plants to drought.

The future characterization of the interactions between NO and key components of ABA signaling will be the basis for a better knowledge of the functional interactions between different hormones in plant development and defense, but it will also open up new possibilities of identifying new targets and strategies leading to improved drought resistance.

References

1. Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WJ. Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytol* 2008; 179:33-54.
2. Davis SJ. Integrating hormones into the floral-transition pathway of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 2009; 32:1201-10.
3. Leitner M, Vandelle E, Gaupels F, Bellin D, Delledonne M. NO signals in the haze: nitric oxide signalling in plant defense. *Curr Opin Plant Biol* 2009; 12:451-8.
4. López-Bucio J, Acevedo-Hernández G, Ramírez-Chávez E, Molina-Torres J, Herrera-Estrella L. Novel signals for plant development. *Curr Opin Plant Biol* 2006; 9:523-9.
5. Wilson ID, Neill SJ, Hancock JT. Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environ* 2008; 31:622-31.
6. Moreau M, Lindermayr C, Durner J, Klessig DF. NO synthesis and signaling in plants—where do we stand? *Physiol Plant* 2009; 138:372-83; DOI: 10.1111/j.1399-3054.2009.01308.x.
7. Lozano-Juste J, León J. Enhanced abscisic acid-mediated responses in *nia1nia2noa1-2* triple mutant impaired in NIA/NR- and AtNOA1-mediated nitric oxide biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiol* 152:891-903. doi 10.1104 pp.109.148023.
8. Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 2009; 324:1064-8.
9. Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, et al. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 2009; 324:1068-71.
10. Fujii H, Chinnusamy V, Rodrigues A, Rubio S, Antoni R, Park SY, et al. In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* 2009; 462:660-4.
11. Roelfsema MR, Hedrich R. In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. *New Phytol* 2005; 167:665-91.
12. García-Mata C, Lamattina L. Abscisic acid (ABA) inhibits light-induced stomatal opening through calcium- and nitric oxide-mediated signaling pathways. *Nitric Oxide* 2007; 17:143-51.

©2010 Landes Bioscience.
Do not distribute.

RESEARCH PAPER

In vivo protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*

Jorge Lozano-Juste, Rosa Colom-Moreno and José León*

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, CSIC-Universidad Politécnica de Valencia, CPI Ed. 8E, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: jleon@ibmcp.upv.es

Received 29 October 2010; Revised 27 January 2011; Accepted 31 January 2011

Abstract

Nitration of tyrosine (Y) residues of proteins is a low abundant post-translational modification that modulates protein function or fate in animal systems. However, very little is known about the *in vivo* prevalence of this modification and its corresponding targets in plants. Immunoprecipitation, based on an anti-3-nitroY antibody, was performed to pull-down potential *in vivo* targets of Y nitration in the *Arabidopsis thaliana* proteome. Further shotgun liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS/MS) proteomic analysis of the immunoprecipitated proteins allowed the identification of 127 proteins. Around 35% of them corresponded to homologues of proteins that have been previously reported to be Y nitrated in other non-plant organisms. Some of the putative *in vivo* Y-nitrated proteins were further confirmed by western blot with specific antibodies. Furthermore, MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) analysis of protein spots, separated by two-dimensional electrophoresis from immunoprecipitated proteins, led to the identification of seven nitrated peptides corresponding to six different proteins. However, *in vivo* nitration sites among putative targets could not be identified by MS/MS. Nevertheless, an MS/MS spectrum with 3-aminoY318 instead of the expected 3-nitroY was found for cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Reduction of nitroY to aminoY during MS-based proteomic analysis together with the *in vivo* low abundance of these modifications made the identification of nitration sites difficult. In turn, *in vitro* nitration of methionine synthase, which was also found in the shotgun proteomic screening, allowed unequivocal identification of a nitration site at Y287.

Key words: AminoY, *Arabidopsis*, nitric oxide, nitrotyrosine, nitroY, post-translational modification, protein nitration.

Introduction

During the last 20 years, nitric oxide (NO) has been characterized as an essential regulator of many physiological processes in animals. More recently, NO has been characterized as a signal molecule regulating plant defence against pathogens (Romero-Puertas *et al.*, 2004; Mur *et al.*, 2006), resistance to abiotic stress (Zhang *et al.*, 2006), and different developmental processes including seed dormancy and germination (Bethke *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007), floral transition (He *et al.*, 2004; Simpson, 2005), and leaf senescence (Mishina *et al.*, 2007). NO acts as a regulator of gene expression at the transcriptional level by regulating disease resistance processes (Polverari *et al.*, 2003) and the expression of stress-related transcription factors and signalling-related kinases (Parani *et al.*, 2004), and by the interaction with other signalling mole-

cules such as salicylic acid and jasmonic acid (Grün *et al.*, 2006).

Some of the regulatory properties of NO are exerted through NO-mediated post-translational modifications including nitrosylation of thiol groups and nitration of tyrosine (Y) residues (Gow *et al.*, 2004). This is thought to affect the activity, the stability, or the intracellular location of proteins, thus potentially altering their functions and eventually cell signalling. The regulation of protein function at the levels of NO-related post-translational modifications represents a new area of research in plant biology, and it will help to elucidate the mode of action of NO in regulating many processes in plants. Recent reports suggest that S-nitrosylation is specific and regulated (Lindermayr *et al.*, 2005; Romero-Puertas *et al.*, 2008), and it may play

a regulatory role in central processes in plants such as ethylene biosynthesis (Lindermayr *et al.*, 2006). The interaction between NO and superoxide leads to the formation of peroxynitrite, a reactive molecule with strong nitrating activity (Szabó *et al.*, 2007). The production of peroxynitrite under physiological conditions in plants has been reported (Bechtold *et al.*, 2009; Chaki *et al.*, 2009). Some proteins are targets of peroxynitrite, and the nitration of Y residues to 3-nitrotyrosine represents a hallmark of post-translational protein modification associated with human pathologies and biological ageing (Hong *et al.*, 2007). Although well characterized in mammals, scant information is available on nitration of Y residues of proteins in plants. Detection of nitrated proteins was first reported in tobacco plants with reduced nitrite reductase activity (Morot-Gaudry-Talarmain *et al.*, 2002). Later, the detection of *in vivo* nitrated proteins in plants treated with exogenous nitrating reagents (Saito *et al.*, 2006) as well as under physiological conditions in both unstressed conditions (Chaki *et al.*, 2009) and upon pathogen challenge (Romero-Puertas *et al.*, 2007; Cecconi *et al.*, 2009) was reported. However, in all these recent reports there are no data about unequivocal identification of nitrated peptides or proteins (i.e. nitration sites). Here the identification of potential *in vivo* nitration sites of some *Arabidopsis* proteins is reported. Drawbacks in proteomic approaches to identify Y nitration post-translational modification under physiological conditions are also discussed. The analysis of the regulatory functions of Y nitration of proteins in any plant biological process will require, after initial identification of potential targets, a case-by-case analysis. Recent proteomic approaches based on the protection of the primary amino group by acetylation followed by the reduction of nitroY to aminoY residues, and further derivatization of the amino group from aminoY residues (Chiappetta *et al.*, 2009; Tsumoto *et al.*, 2010), will help to overcome some of the difficulties found due to the low abundance and limited stability of nitroY residues in proteins determined to be potentially nitrated *in vivo* in this work.

Materials and methods

Plant growth conditions

Seeds of the Col-0 wild-type accession of *Arabidopsis thaliana* were sown in moistened soil and grown under photoperiodic conditions (cycles of 8 h day and 16 h night for short days, at 22 °C and 20 °C, respectively) as mentioned in different experiments. Plants were illuminated with 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ cool white fluorescent lamps and grown under 60% relative humidity. Alternatively, surface-sterilized seeds were germinated and grown in sterile liquid or agar-supplemented Murashige and Skoog (MS) medium (Duchefa, Haarlem, The Netherlands) with 1% (w/v) sucrose.

Protein extraction and immunoprecipitation

Two-week-old seedlings were frozen and ground in liquid nitrogen. Proteins were extracted by adding extraction buffer [10 mM TRIS-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% (v/v) protease inhibitor cocktail from Sigma, USA] and briefly vortexing. Protein extracts were obtained by centrifugation at 13 000 g at 4 °C. Protein extracts

(4 × 1 mg) were pre-cleared with 50 μl of protein A-agarose (EZView Sigma, USA) for 8 h at 4 °C. The unbound fractions were each incubated overnight with 0.1 μg of monoclonal anti-3-nitroY antibody (Cayman, USA) at 4 °C. To recover 3-nitroY-containing proteins, 60 μl of protein A-agarose were added and incubated for 8 h at 4 °C. After extensive washing with extraction buffer, proteins were eluted at 95 °C with elution buffer [1% SDS, 100 mM dithiothreitol (DTT), 50 mM TRIS-HCl pH 7.6] three times. After removing agarose beads with a 0.2 μm filter (Costar Corning, NY, USA), the proteins were precipitated, combined, and processed with a 2D-Clean Up Kit (GE, UK) for subsequent two-dimensional electrophoresis (2-DE) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis.

2-DE and image analysis

Protein samples (100 μg) were dissolved in DeStreak Rehydration solution (GE, UK) before electrophoresis. For the first dimension, 18 cm pH 3–10 NL (non-linear) strips were passively rehydrated overnight at room temperature. The set-up of the IPGphor3 (GE, UK) was 1 h at 50 V step-and-hold, 1 h at a 150 V gradient, 1 h 30 min at a 500 V gradient, 1 h 30 min at a 1000 V gradient, 2 h at a 4000 V gradient, 2 h at a 8000 V gradient, and 7 h at a 8000 V step-and-hold. The strips were then treated with 1 mg ml^{-1} DTT for 15 min and alkylated with 25 mg ml^{-1} iodoacetamide for 15 min in equilibration buffer (6 M urea, 75 mM TRIS-HCl pH 8.8, 29.3% glycerol, 2% SDS, and 0.002% bromophenol blue), and the focused proteins were then separated on 12.5% acrylamide gels in the EttanDalt six electrophoresis unit (GE, UK) as recommended by the manufacturers for an overnight run. The gels were stained with a DeepPurple (GE, UK) or PlusOne™ Silver Staining Kit (GE, UK), digitalized with Typhoon (GE, UK), and analysed by using Image Master Platinum 5.0 (GE, UK) software.

MS analysis

Samples were digested with sequencing grade trypsin (Promega, USA). Peptide separation by LC-MS/MS was performed using an Ultimate nano-LC system (LC Packings) and a QSTAR XL Q-TOF hybrid mass spectrometer (MDS Sciex-Applied Biosystems). Samples (5 μl) were delivered to the system using a FAMOS autosampler (LC Packings) at 40 $\mu\text{l min}^{-1}$, and the peptides were trapped on a PepMap C18 pre-column (5 mm, i.d. 300 μm ; LC Packings). Peptides were then eluted from a PepMap C18 analytical column (15 cm, i.d. 75 μm ; LC Packings) at 200 nl min^{-1} and separated using a 55 min gradient of 15–50% acetonitrile (120 min for the mixtures). The QSTAR XL was operated in information-dependent acquisition mode, in which a 1 s time of flight (TOF) MS scan from 400 m/z to 2000 m/z , was performed, followed by 3 s product ion scans from 65 m/z to 2000 m/z on the three most intense doubly or triply charged ions. A database search on Swiss-Prot and NCBI nr databases was performed using the MASCOT search engine (Matrix-Science). Searches were done with tryptic specificity allowing one missed cleavage and a tolerance on the mass measurement of 100 ppm in MS mode and 0.8 Da for MS/MS ions. Carbamidomethylation of C was used as a fixed modification, and oxidation of M, deamidation of D and E, and nitration or amination of Y as variable modifications.

Western blot

Protein extracts (10 μg) were separated by SDS-PAGE, blotted onto a nitrocellulose membrane, stained with Ponceau-S, and probed with antibodies at the followed dilutions: monoclonal anti-3-nitroY (Cayman Chemicals) 1:1000, anti-5×His (QIAGEN) 1:8000, polyclonal anti-GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 1:10 000, anti-CA (carbonic anhydrase) 1:3000, anti-PKL (PICKLE) 1:5000; anti-FBPase (fructose biphosphatase) 1:2000, and anti-GRP (glycine-rich RNA-binding protein) 1:2500. Secondary antibody was anti-mouse or anti-rabbit, for monoclonal

or polyclonal primary antibodies, respectively, coupled to horseradish peroxidase (GE, UK) at 1:10 000 dilution, and an ECL kit (GE, UK) was used for visualization of proteins.

GAPDH activity

Proteins were extracted in 50 mM TRIS-HCl pH 7.4 and quantified. GAPDH activity of the extracts was assayed according to Muñoz-Bertomeu *et al.* (2009) with minor modifications. Briefly, 50 µg of protein extracts from plants treated or not with 2 mM SIN-1 (3-morpholinosydnonimine) were incubated in reaction buffer (10 mM TRIS-HCl pH 7.4, 20 mM arsenate, 2 mM NAD, 0.5 mM DTT) and the reaction was initiated by the addition of 2 mM DL-GAPDH in a final volume of 1 ml. GAPDH activity was measured following the conversion of NAD to NADH at 340 nm during 4 min.

Synthesis, purification, and nitration of His-tagged methionine synthase AtMS1

A plasmid containing *AtMS1* cDNA fused to a 6×His tag (Dixon *et al.*, 2005) was used to transform BL21(DE3) competent cells (Sigma-Aldrich) for recombinant protein production. For protein induction, cell cultures with OD=0.7 were treated with 1 mM isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) for 5 h. Recombinant protein production was checked by SDS-PAGE and western blot analysis. Recombinant protein purification was carried out with the QIAexpress Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen) following the manufacturer's recommendations. Purified AtMS1 was treated or not with a nitrating buffer as described previously (Chen *et al.*, 2008). Briefly, 10 µl of purified protein was incubated with 500 µM H₂O₂ and 500 µM NaNO₂ in 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.2 for NO₂ radical-mediated protein nitration at 37 °C in the dark for 2 h in a total volume of 500 µl. To clean nitrated protein, the nitrating reaction volume was filtered through a 10 kDa cut-off filter (Microcon, Ambion). Proteins were then analysed by SDS-PAGE and western blot. Protein nitration was confirmed with anti-3-nitroY antibody (Cayman) and the anti-5×His antibody supplied by the manufacturers (QIAGEN). A duplicate gel was run and stained with Coomassie blue, and the bands were excised, trypsin digested, and further analysed by LC-MS/MS as described above.

Protein modelling and structural analysis

Three-dimensional (3-D) protein models were generated by homology modelling at the SWISS-MODEL workspace (Arnold *et al.*, 2006) using the coordinates of GAPDH from rat (PDB code 2VYN), serine hydroxymethyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* (PDB code 3H7F), transketolase from maize (PDB code 1ITZ), Rubisco from spinach (PDB code 1IR1), and mannitol dehydrogenase from *Cladosporium harbarum* (PDB code 3GDF) as templates. For methionine synthase, the crystal structure from *A. thaliana* was used (PDB code 1U1J). Model qualities were evaluated by ANOLEA, Verify3D, and Procheck (Melo and Feytmans, 1998; Bowie *et al.*, 1991; Laskowski *et al.*, 1996, respectively). 3-D models were visualized and manipulated with Yasara (www.yasara.org) or PyMol (www.pymol.org). The distance between residues in Å and the presence of hydrogen bonds were analysed with both programs using default settings.

Results

Crude protein extracts from *A. thaliana* plants contained a number of proteins spanning the whole range of molecular weights that cross-react with antibodies against 3-nitroY in western blot analysis (Fig. 1A). The specific

cross-reaction of antibodies with 3-nitroY residues of those target proteins was checked by on-membrane protein reduction of 3-nitroY to 3-aminoY with sodium dithionite, as previously reported (Miyagi *et al.*, 2002), thus resulting in no cross-reaction with the specific antibodies (Fig. 1A). Upon antibody validation, anti-3-nitroY antibodies were used as a specific immunoprecipitation reagent together with protein A-agarose to pull-down 3-nitroY-containing proteins from crude *Arabidopsis* seedling extracts. Figure 1B shows that a small number of proteins present in the crude extracts, <20 bands as detected by Coomassie staining, were recovered in the immunoprecipitated fraction. Those proteins were further checked for cross-reaction in western blots with anti-3-nitroY antibodies (Fig. 1B). A moderate enrichment in nitrated proteins was thus observed in the immunoprecipitated fraction (Fig. 1B). Considering the low resolution capacity of one-dimensional SDS-PAGE, the complexity of the immunopurified samples was further assessed by 2-DE and the more sensitive silver staining, resulting in the separation of ~450 spots with isoelectric points in the 3–10 range (Fig. 1C).

To identify potential *in vivo* targets of Y nitration in *Arabidopsis*, the immunopurified fraction was then analysed by MS following two different strategies. First, a shotgun analysis, based on LC-MS/MS of the immunoprecipitated proteins, was performed. Comparison of MS-generated data with the SwissProt database by specifying taxonomy for *Arabidopsis* allowed identification of 127 proteins with a statistically significant MASCOT score of at least 35 and more than two matched peptides (Table 1). Among identified proteins, 35% have homologue counterparts that have been previously reported as nitrated in non-plant organisms (Supplementary Table S1 available at *JXB* online), thus supporting the usefulness of the immunoprecipitation approach to enrich the purified fractions in *Arabidopsis* potential nitrated proteins. To validate the proteomic identification further, several of the identified proteins were detected by western blots with specific antibodies in the samples immunopurified by precipitation with anti-3-nitroY antibodies. Some proteins identified with a MASCOT score >200, such as chloroplastic GAPDH, CA, or FBPase, and some others with a lower score such as GRP7 (score 66) and the CHD3-type chromatin remodeling factor PKL (score 58) were selected. All of them cross-reacted with proteins in the 3-nitroY-immunoprecipitated samples (Fig. 2), making the proteomic identification reliable. For proteins such as GAPDH or PKL showing no signal in the supernatant, most of the corresponding proteins were associated with IP resin and a significant proportion further recovered after washing in the IP. In contrast, the immunoprecipitation is far less efficient for others proteins such as FBPase or CA which show a similar amount of protein in the supernatant and crude extract, thus suggesting that the corresponding nitrated forms would not be abundant in the total protein population of crude extracts. Most of the proteins tested gave complex patterns of cross-reacting bands in both crude extracts and immunopurified samples (Fig. 2, Supplementary Fig. S5 at

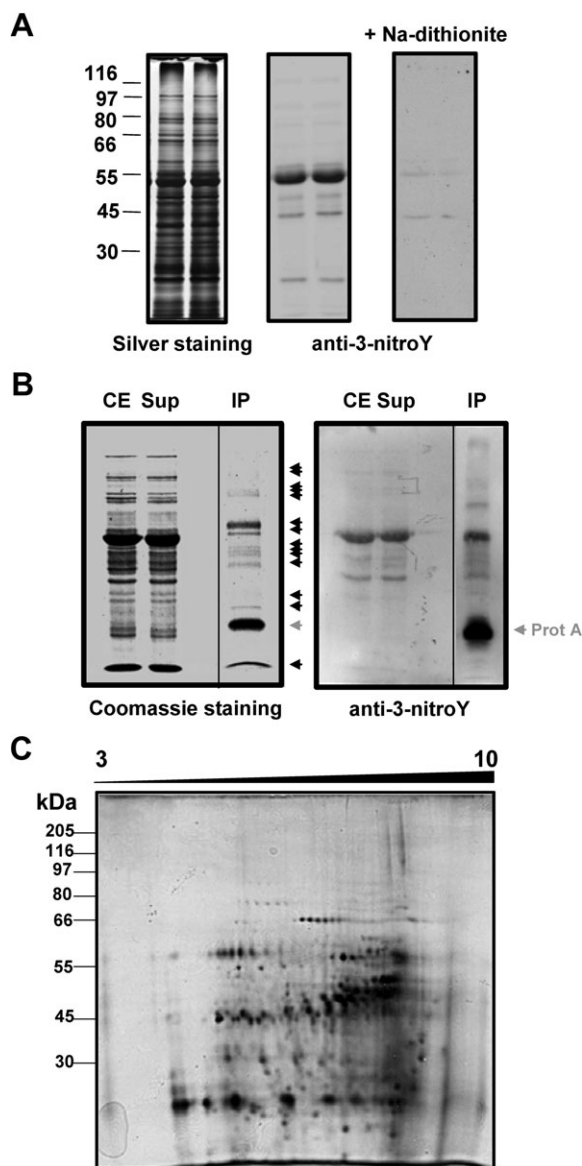


Fig. 1. Detection of 3-nitroY-containing proteins. (A) Crude protein extracts (10 µg per lane) were separated using 10% SDS-PAGE in duplicate. The left panel shows the silver-stained gel with the position of a molecular weight protein ladder. The central panel shows the corresponding western blot performed with anti-3-nitroY primary antibody, and the right panel the corresponding western blot after reduction of 3-nitroY to 3-aminoY with 100 mM sodium dithionite for 30 min. (B) *In vivo* immunoprecipitation of *Arabidopsis* 3-nitroY-containing proteins. Crude extracts (CE) were immunoprecipitated with antibody against 3-nitroY. The resulting supernatants (Sup) and immunoprecipitated proteins (IP) alongside the CE were separated by one-dimensional SDS-PAGE in duplicate and either Coomassie stained (left panel) or transferred to a nitrocellulose membrane and probed with anti-3-nitroY antibodies by western blot (right panel). Immunoprecipitated proteins detected by one-dimensional SDS-PAGE are marked with black arrowheads. The protein A which is released from the resin in the immunoprecipitates is marked with a grey arrowhead. (C) Immunoprecipitated proteins (0.1 mg) were separated by 2-DE with isoelectric focusing in the range of pH 3–10 NL and a second

JXB online). This is probably due to different cross-reactive isoforms that are the result of potential post-translational modifications or to unespecific cross-reaction of the antibody.

Despite the success in identifying a large number of potentially nitrated proteins, no MS/MS spectrum with a good enough MASCOT score was obtained for nitrated peptides, thus preventing the identification of unequivocal nitration sites. To overcome this, and because the amount of protein required for the identification of nitrated peptides is often a limitation in the method, the most abundant proteins in 2-DE gels from 3-nitroY-immunoprecipitated proteins were excised from the gels, digested with trypsin, and further analysed by MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight). Supplementary Table S2 at *JXB* online summarizes the identified proteins, their MASCOT scores, the number of non-redundant peptides, and the corresponding sequence coverage. Twenty-two proteins were identified with a MASCOT score >59, considered as significant in the proteomic analysis. Unfortunately, no MS/MS spectra with a high enough score corresponding to a *bona fide* Y-nitrated peptide could be obtained. However, six out of 22 identified proteins showed MALDI-TOF spectra for potentially nitrated peptides with a signal/noise ratio >25, considered as significant in the analysis. The simultaneous identification of nitrated peptides and their unmodified forms in addition to the length of the nitrated peptides identified (≥ 7 amino acid residues) makes the identification more reliable (Stevens *et al.*, 2008). Table 2 shows the identity of those proteins and the corresponding nitrated peptides with the signal/noise ratio, the molecular mass of the unmodified and modified peptides, and the corresponding +45 shift to the modification of Y to nitroY. Three out of those six proteins (Rubisco, Rubisco activase, and transketolase) showed nitrated peptides containing a single Y residue and a +45 mass shift, thus allowing the assignment of a putative nitration site for those proteins. For serine hydroxymethyltransferase, the nitrated peptide contained two Y residues and showed a mass shift of +90, compatible with two Y nitration sites. Finally, for the other two proteins, a cytosolic GAPDH and a putative mannitol dehydrogenase, the nitrated peptides contained two Y residues and showed a mass shift of +45, corresponding to a single nitration event, so no nitration site could be proposed for these proteins (Table 2).

Y residues contained in the nitrated peptides were checked to see if they fulfilled the previously characterized factors determining the selectivity of Y nitration in proteins. These factors include the proximity of a basic amino acid within the primary sequence, the exposure of the aromatic

dimension 10% gel. The identification of spots corresponding to nitrated proteins was performed by comparing four independent sets of 2-DE gels corresponding to biologically independent replicates with similar spot patterns. Molecular mass marker positions are indicated in kDa on the left side. Proteins were silver stained.

Table 1. Immunopurified Y-nitrated proteins identified in *Arabidopsis thaliana* seedlings by a shotgun LC-MS/MS approach. Those proteins that have been previously reported as nitrated in other plant systems are marked with a single (Chaki *et al.*, 2009) or double asterisk (Cecconi *et al.*, 2009).

SwissProt locus	AGI code	Description	MASCOT score	Peptides matched (no.)	Best two peptides (ion score)
ATPB_ARATH	AtCg00480	ATP synthase subunit beta	1150	23	R.FVQAGSEVSALLGR.M (85) K.IGLFGGAGVGK.T (80)
METE_ARATH	At5g17920	Methionine synthase 1	1014	27	K.DEALFSANAAALASR.R (97) K.MLAVLEQNILWNPDCGLK.T(91)
G3PB_ARATH	At1g42970	GAPDH B, chloroplast	884	22	K.IVDNETISVDGK.L (85)
G3PA_ARATH	At3g26650	GAPDH A, chloroplast	831	18	R.KDSPLEWVWLNDSGGVK.N (75) R.VPTPNVSVWDLVQVSK.K (68)
RCA_ARATH	At2g39730	Rubisco activase, chloroplast**	761	20	K.KVIITAPGK.G (60)
GOX1_ARATH	At3g14415	Probable peroxisomal glycolate oxidase1	670	16	R.GLAYDTSDDQQDITR.G (81) R.VQLAETYLSSQAALGDANADAIGR.G (72)
GOX2_ARATH	At3g14420	Probable peroxisomal glycolate oxidase2	651	16	R.AASAAGTIMTLSSWATSSVEEV ASTGPGIR.F (101) K.DIQWLQTITNMPILVK.G (58)
SAHH1_ARATH	At4g13940	Adenosyl homocysteinase 1*	581	18	R.AASAAGTIMTLSSWATSSV EEVASTGPGIR.F (101)
PGKH_ARATH	At1g56190	Phosphoglycerate kinase, chloroplast	542	14	R.IPVFLDGGVR.R (52) K.VALLHLGK.L (55)
ATPA_ARATH	AtCg00120	ATP synthase subunit alpha**	504	12	R.DSAAVFAWK.G (54) K.LASLADLYVNDAFGTAHR.A (77)
EFTU_ARATH	At4g20360	Elongation factor Tu, chloroplast	491	13	K.FAAGTEAIANK.L (75) R.EAYPGDVFYLSHR.L (64)
G3PC_ARATH	At3g04120	GAPDH C, cytosolic	479	13	R.EQHTLIYDDLK.Q (62) K.KYDEIDAAPEER.A (72)
CAHC_ARATH	At3g01500	Carbonic anhydrase 1, chloroplast	475	13	R.SYTVTGVEFMFK.I (54) R.VPTVDVSWDLTVR.L (71)
EF1A_ARATH	At1g07940	Elongation factor 1-alpha	450	11	K.KVISAPSK.D (52) K.YGGVGAIEYAVLHLK.V (64)
ACT7_ARATH	At5g09810	Actin-7	448	12	R.EAVNVSLANLLTYPFVR.E (60) R.EHALLAFTLGVK.Q (103)
ACT2_ARATH	At3g18780	Actin-2	430	12	K.FHINIVIGHVDSGK.S (82) K.SEYDESGPSIVHR.K (75)
KPPR_ARATH	At1g32060	Phosphoribulokinase, chloroplast	418	13	K.NYELPDGQVITIGAER.F (57) K.AGFAGDDAPR.A (52)
RUBB_ARATH	At1g55490	Rubisco large subunit beta	389	13	R.LDELIVESHLSNLSTK.F (55) K.ILVIEGLHPMFDER.V (52)
CAH2_ARATH	At5g14740	Carbonic anhydrase 2	379	11	R.GYISPYFVTDSEK.M (71) K.YEDLMAAGIIDPTK.V (52)
TBA6_ARATH	At4g14960	Tubulin alpha-6 chain	358	11	R.EAVNVSLANLLTYPFVR.E (60) K.VENIVIGHSACGGIK.G (59)
METK1_ARATH	At1g02500	S-Adenosyl methionine synthetase 1	334	11	R.AVFVDLEPTVIDEVR.T (67) R.LVSQVISSLTASLR.F (50)
RUBA_ARATH	At2g28000	Rubisco large subunit alpha, chloroplast	331	11	R.FVIGGPHGDAGLTGR.K (73) K.IIIDTYGGWGAHGGGAFSGK.D (64)
METK2_ARATH	At4g01850	S-Adenosyl methionine synthetase 2	326	11	K.VVNDGVTIAR.A (60) K.TNDSAGDGTITASILAR.E (56)
GLNA2_ARATH	At5g35630	Glutamine synthetase, chloroplast/mitochondrial**	314	10	R.FVIGGPHGDAGLTGR.K (73) K.IIIDTYGGWGAHGGGAFSGK.D (64)
SGAT_ARATH	At2g13360	Serine-glyoxylate aminotransferase	306	10	K.VSGEVPWFGEIQEYTLQQNVK.W (76) K.KETASIDQFSGVAVNR.G (42)
RBS1A_ARATH	At1g67090	Rubisco small subunit 1A, chloroplast	299	9	R.AALDLIFEGLLENIIAR.H (61) K.VFFDWDNDYLK.F (42)
					K.LPLFGCTDSAQVLK.E (71)

Table 1. Continued

SwissProt locus	AGI code	Description	MASCOT score	Peptides matched (no.)	Best two peptides (ion score)
TBA3_ARATH	At5g19770	Tubulin alpha-3/alpha-5 chain	284	8	K.EVDYLIR.N (46) R.AVFVDLEPTVIDEVR.T (67) R.LISQIISLTTSLR.F (65)
PORB_ARATH	At4g27440	Protochlorophyllide reductase B	263	12	R.LLLDDLKK.S (53) K.GYVSETESGKR.L (46)
RBS1B_ARATH	At5g38430	Rubisco small subunit 1B, chloroplast	254	7	K.LPLFGCTDSAQVLK.E (71) K.EVDYLLR.N (46)
ILV5_ARATH	At3g58610	Ketol-acid reductoisomerase, chloroplast	240	9	K.VSLAGYEEYIVR.G (44) K.APVSLDFETSVFK.K (43)
TBB4_ARATH	At5g44340	Tubulin beta-4 chain	226	8	K.LAVNLIPFPR.L (54) R.YLTASAVFR.G (35)
HSP71_ARATH	At5g02500	Heat shock cognate 70 kDa protein 1*	217	10	R.MVNHVFQEFK.R (40) K.ATAGDTHLGGEDFDNR.M (35)
F16P1_ARATH	At3g54050	Fructose-1,6-bisphosphatase	214	10	R.TLLYGGIYGYP.R.D (58) R.VLDIQPTEIHQR.V (42)
TBB2_ARATH	At5g62690	Tubulin beta-2/beta-3 chain	203	9	K.LAVNLIPFPR.L (54) R.AVLMDLPGTMDSLR.S (35)
TBB1_ARATH	At1g75780	Tubulin beta-1 chain	193	8	K.LAVNLIPFPR.L (54) R.AVLMDLPGTMDSIR.S (35)
PGMP_ARATH	At5g51820	Phosphoglucomutase, chloroplast	173	9	K.SLPTKPIEGQK.T (30) K.LPFFEVPTGWK.F (26)
P2SAF_ARATH	At5g23120	Photosystem II stability/assembly factor HCF136	172	8	R.ADGGLWLLVR.G (40) K.GTGITEEFEEVAVQSR.G (34)
HSP73_ARATH	At3g09440	Heat shock cognate 70 kDa protein 3*	172	7	R.MVNHVFQEFK.R (40) K.ATAGDTHLGGEDFDNR.M (35)
APX1_ARATH	At1g07890	L-Ascorbate peroxidase 1, cytosolic	161	5	K.EGILLQLVSDK.A (44) K.QMGLSDKDIVALSGAHTLGR.C (35)
MTDH_ARATH	At4g39330	Probable mannitol dehydrogenase	139	5	K.NYGGYSENIWVQDR.F (47) K.NYGGYSENIWVQDR.F (34)
CD48A_ARATH	At3g09840	Cell division control protein 48 A	120	6	R.KGDLFLVR.G (29) R.IVSQLLTMDGLK.S (29)
GME_ARATH	At5g28840	GDP-mannose 3,5-epimerase	112	5	R.SFTFIDECVEGVL.R.L (43) K.KLPIHHIPGPEGVR.G (31)
GBLP_ARATH	At1g18080	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta	103	4	R.LWDLAAGVSTR.R (42) K.DGVLLWDLAEGK.K (27)
CLPP_ARATH	AtCg00670	ATP-dependent Clp protease	99	2	R.SPGEGDTSWWDIYNR.L (70) R.TGKPIWISEDMER.D (30)
GCST_ARATH	At1g11860	Aminomethyltransferase, mitochondrial	99	5	K.GGDVSWHIHDER.S (25) R.AEGGFLGADVILQQLK.D (24)
AAT5_ARATH	At4g31990	Aspartate aminotransferase, chloroplast	98	5	K.ATAELLFGAGHPVIK.E (27) R.VATIQLSGTGSRL.L (24)
ACA9_ARATH	At3g21180	Ca-transporting ATPase 9, plasma membrane	98	7	R.VAIDSMAN.N (28) R.QAALVLNASRR.F (21)
RH56_ARATH	At5g11200	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 56	97	5	K.LSEMEKNR.K (30) K.VSVFYGGVNIK.I (25)
ENO_ARATH	At2g36530	Enolase	96	6	K.AGAVVSGIPLYK.H (30) K.LAMQEFMILPVGAASF.K.E (30)
MRP7_ARATH	At3g13100	Multidrug resistance-associated protein 7	86	7	R.YGPHLPMVLRGLTCTFR.G (20) R.GIEAGWLK.K (17)
AFB3_ARATH	At1g12820	AUXIN SIGNALLING F-BOX 3	84	6	R.LWILDSIGDK.G (23) R.LMSCAPQLVDLGVGSYE NEPDPEFAK.L (17)
PDX13_ARATH	At5g01410	Pyridoxal biosynthesis protein	79	4	K.VGLAQMLR.G (43) R.NMDDDEVFTFAK.K (14)
PDX11_ARATH	At2g38230	Pyridoxal biosynthesis protein	75	3	K.VGLAQMLR.G (43) K.IAAPYDLVWQTK.E (20)

Table 1. Continued

SwissProt locus	AGI code	Description	MASCOT score	Peptides matched (no.)	Best two peptides (ion score)
EFTM_ARATH	At4g02930	Elongation factor Tu, mitochondrial	75	2	R.GSALSALQGTNDEIGR.Q (49) K.LMDAVDEYIPDPVR.V (26)
MDR11_ARATH	At3g28860	Multidrug resistance protein 11 (P-glycoprotein 19)	73	6	K.SSVIAMIER.F (24) R.AVLKNPTVLLLDEATSALDAESEC VLQEALERLMR.G (22)
MDHP_ARATH	At3g47520	Malate dehydrogenase, chloroplast	70	3	K.DVNVVIPAGVPR.K (35) K.LFGVTTLDVVR.A (22)
SR54C_ARATH	At5g03940	Signal recognition particle 54 kDa protein, chloroplast	70	5	R.GVKPDQQLVK.I (16) R.QEDAEDLQKK.I (16)
MDHG1_ARATH	At5g09660	Malate dehydrogenase, glyoxysomal	70	3	R.TGAEEVYQLGPLNEYER.I (31) K.LLGVTTLDVAR.A (30)
TAF1B_ARATH	At3g19040	Transcription initiation factor TFIID subunit 1-B	69	7	R.ENLQQLNSDARGR.L (20) K.EIGTPICQMKKILK.E (17)
TYW23_ARATH	At4g04670	tRNA wybutosine-synthesizing protein	69	5	R.ADPLNILNDVWR.L (24) K.RVIIAIRCSIR.M (15)
CATA3_ARATH	At1g20620	Catalase-3	69	3	R.LGPNYLQLPVNAPK.C (32) K.GFFEVTHTDISNLTCADFLR.A (28)
KASC1_ARATH	At5g46290	3-Oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase I, chloroplast	68	3	K.LLSGESGISLIDR.F (53) R.ADGLGVSSCIER.C (9)
ATPG1_ARATH	At4g04640	ATP synthase gamma chain 1, chloroplast	68	2	R.ALQESLASELAAR.M (52) R.ASSVSPLQASLREL.R.D (16)
GRP7_ARATH	At2g21660	Glycine-rich RNA-binding protein 7	66	1	R.ALETAFAYGQGVDSK.I (66)
FDH_ARATH	At5g14780	Formate dehydrogenase, mitochondrial	66	5	R.QAVVDVAVESGHIGGYSGDVWD PQPAPK.D (18) R.LQMAPELEK.E (17)
HSP83_ARATH	At5g56010	Heat shock protein 81-3*	62	5	K.GIEVLYMVDAIDEYAIQGLK.E (21) K.EGQNDIFYITGESK.K (16)
TGA2_ARATH	At5g06950	Transcription factor TGA2	61	4	K.LTQLEQELQR.A (19) R.LQTLQQMIR.V (15)
TCPA_ARATH	At3g20050	T-complex protein 1 subunit alpha	61	6	R.NKIHPTSIISGYR.L (19) R.GANDYMLDEMER.A (15)
CAPP3_ARATH	At3g14940	Phosphoenolpyruvate carboxylase 3	60	4	K.LLVSEDLWAFGEKLR.A (22) K.RLVSDLGK.S (15)
WRK19_ARATH	At4g12020	WRKY transcription factor 19	60	6	K.CTYLGCPSPK.R.V (19) K.LCQVEGCQKGR.D (16)
THI4_ARATH	At5g54770	Thiazole biosynthetic enzyme, chloroplast	59	2	K.HAALFTSTIMSK.L (33) K.ALDMNTAEDAIVR.L (26)
OMT1_ARATH	At5g54160	Quercetin 3-O-methyltransferase 1	59	2	K.NPEAPVMLDR.I (34) K.VLMESWYHLK.D (25)
IF5A2_ARATH	At1g26630	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2 (eIF-5A)	59	2	K.LPTDDGLTAQMR.L (33) K.CHFVAIDIFTAK.K (26)
PKL_ARATH	At2g25170	PICKLE chromatin-remodelling factor	58	6	K.GLLHPYQLEGLNFLR.F (19) K.AYKSNHRLK.T (14)
Y1934_ARATH	At1g09340	Uncharacterized protein chloroplast	57	3	K.SSLSAEGFDVVDYDINGR.E (26) R.FIGLFLSR.I (16)
VIN3_ARATH	At5g57380	VERNALIZATION-INSENSITIVE 3	56	5	R.GIVNRLSSGVHVQKLCSSQ AMEALDK.V (27) R.NEIMKICAEMGKER.K (14)
PME4_ARATH	At2g47030	Pectinesterase-4 (VANGUARD1-like protein 1)	54	6	K.AVQGICQSTSDKASCVK.T (16) K.NTAGPMGHQAAAIRVNGDRAV IFNCR.F (12)
APT1_ARATH	At1g27450	Adenine phosphoribosyltransferase 1 (APRT 1)	54	3	R.AIIIDDLIATGGTLAAAIR.L (35) K.DTIALFVDR.Y (15)
DRL19_ARATH	At1g63350	Putative disease resistance protein At1g63350	54	4	R.NAELQRLCLOGFCSKSLTTSYR.Y (17) K.MCLLYCALFPEDAK.I (16)
FABG_ARATH	At1g24360	3-Oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase, chloroplast	54	3	K.WGTIDVWVNNAGITR.D (25)

Table 1. Continued

SwissProt locus	AGI code	Description	MASCOT score	Peptides matched (no.)	Best two peptides (ion score)
BSL1_ARATH	At4g03080	Serine/threonine-protein phosphatase BSL1	53	4	K.ILGTIPLGR.Y (19) K.IICMHGGIGR.S (16) R.HGAASVGIRIYVHGGLR.G (16)
PER9_ARATH	At1g44970	Peroxidase 9	52	3	K.AYAEDERLFFQQFAK.S (26) K.EPRMAASLLR.L (13)
UPL1_ARATH	At1g55860	E3 ubiquitin-protein ligase UPL1	52	5	K.LLSDIVLMYSHGTSVILR.R (20) R.LIDFDNKKAYFR.S (16)
HDA5_ARATH	At5g61060	Histone deacetylase 5	51	3	R.KVGLIYDETMCK.H (24) K.LQLAGVSQR.C (18)
HAC12_ARATH	At1g16710	HAC12 histone acetyltransferase	51	5	K.LTTHPSLADQNAQNK.E (14) K.ASGQSDFSGNASK.D (13)
MRP14_ARATH	At3g59140	Multidrug resistance-associated protein 14	50	7	R.IATFLEAPELQGGERRR.K (16) R.WAVENPTKPKV.E (11)
ASHH2_ARATH	At1g77300	Histone-lysine N-methyltransferase ASHH2	50	6	K.ILPRPRPR.M (13) K.SPSENGSHLIPNAKKAK.H (13)
ATM_ARATH	At3g48190	Serine/threonine-protein kinase ATM (PI3Kc_related)	47	8	R.RVLLQILGCEKCTMQHL LQSASLLR.K (14) K.QIPMAQLHENEGRK.S (11)
FBX10_ARATH	At1g51290	Putative F-box only protein 10	47	4	R.LVICCYDETTQVYIYVRR.N (16) K.YVIGYDNKK.R (14)
PSBP1_ARATH	At1g06680	Oxygen-evolving enhancer protein 2-1, chloroplast	45	3	K.TNTDFLPYNGDGFK.V (25) K.EIEYPGQVLR.F (12)
CHLD_ARATH	At4g18480	Magnesium-chelatase subunit chID, chloroplast	45	3	K.IYKAGMSLLVIDTENK.F (26) R.VAAVGIATQFQERCNEVFR.M (22)
FBK38_ARATH	At2g29800	Putative F-box/Kelch-repeat	44	3	K.MANFGGKLVILGCYR.S (20) R.HLRNMKR.D (16)
GLYM_ARATH	At4g37930	Serine hydroxymethyltransferase mitochondrial	44	4	R.GFVEEDFAK.V (22) K.VLEAVHIASNK.N (11)
SCP37_ARATH	At3g52010	Serine carboxypeptidase-like 37	44	3	K.AIHANTTK.L (19) K.KLPGQPSGVSR.Q (18)
COL14_ARATH	At2g33500	CONSTANS-LIKE 14	44	3	K.LCLPCDQHVHSANLLSR.K (20) K.SNNIPAAIHSK.S (14)
SYV_ARATH	At1g14610	Valyl-tRNA synthetase	43	7	K.SDLFKADAK.S (16) K.INLDILRVVGYR.Q (13)
DRP1D_ARATH	At2g44590	Dynamain-related protein 1D	43	3	R.MQCAKRLELYK.K (22) R.MGSEYLAK.L (14)
VATB_ARATH	At1g76030	Vacuolar ATP synthase subunit B	43	3	R.NIFQSLDLAWTLR.I (16) R.KFVMQGGAYDTR.N (15)
SIZ1_ARATH	At5g60410	E3 SUMO-protein ligase SIZ1	42	5	K.WQCPICLK.N (15) R.HRSLNKICILCAGK.N (12)
HAC2_ARATH	At1g67220	HAC2 histone acetyltransferase	42	4	R.ACTGCYTKNRTL.R.H (16) K.LGTVDIIEPMKCDER.S (11)
TMK1_ARATH	At1g66150	Putative receptor protein kinase TMK1 precursor	42	4	K.GNDPCTNWIGIACSNONI TVISLEK.M (18) K.VVNLTNHLQGPVPVFK.S (12)
SYM_ARATH	At4g13780	Probable methionyl-tRNA synthetase	42	3	R.LVEGSCPFEGCNYDSAR.G (26) K.CKVCQNTPR.I (12)
WEE1_ARATH	At1g02970	Wee1-like protein kinase	41	3	R.AMPPPCLK.N (19) K.LPLLPGHSLQLQLLK.T (15)
ARR12_ARATH	At2g25180	Two-component response regulator	41	5	-.MTVEQNLEALDQFPVGM.R.V (17) R.HCQYHVTTTNQAQK.A (9)
CESA4_ARATH	At5g44030	Cellulose synthase A catalytic subunit 4	41	4	K.KAGAMNAMVR.V (22) K.SSLMSQKNFEKR.F (12)
AUR2_ARATH	At2g25880	Serine/threonine-protein kinase Aurora-2	41	3	R.LYGYFYDQKRYYLILEYAVR.G (18) M.LYQAASEAAQK.R (14)
Y1838_ARATH	At1g18380	Uncharacterized protein At1g18380	41	3	R.YIMEDKACR.R (32)

Table 1. Continued

SwissProt locus	AGI code	Description	MASCOT score	Peptides matched (no.)	Best two peptides (ion score)
2AAA_ARATH	At1g25490	Serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit A alpha	41	4	R.SSDSDEGCMKYAEIPMLR.S (8) R.LAGGEWFAAR.V (17)
FBK84_ARATH	At4g19865	F-box/Kelch-repeat protein At4g19865	40	3	R.RAAASNLGK.F (11) K.IEFGNVNEMCAYDTKLCK.W (20) K.IYVMGGCQGLKDEPWAEVFNK.T (10)
MSH3_ARATH	At4g25540	DNA mismatch repair protein MSH3	40	4	R.LVNAGYKIGVVK.Q (17) R.LVNAGYK.I (13)
DCDA1_ARATH	At3g14390	Diaminopimelate decarboxylase 1, chloroplast	39	1	R.DAAVLMIEYIDEIR.R (39)
GL25_ARATH	At5g26700	Probable germin-like protein subfamily 2–5	39	3	R.IDYAPNGLNPPHVHPR.A (17) K.LPGLNLTGLSMSR.I (14)
CYSK1_ARATH	At4g14880	Cysteine synthase (OAS-TL A)	39	3	K.IDGFVSGIGTGGTITGAGK.Y (21) R.IGFSMISDAEK.K (15)
MRP13_ARATH	At1g30410	Multidrug resistance-associated protein 13	39	4	R.KKYNCVLLGACYCWEVPLR.L (22) R.SVLIKQEEER.E (14)
ERG11_ARATH	At5g24150	Squalene monooxygenase 1,1	39	3	R.RLLQPLSNLGNAAK.I (18) R.LFGLAMKMLVPHLK.A (13)
DPOLA_ARATH	At5g67100	DNA polymerase alpha catalytic subunit	38	4	K.NGCNVLSENSERALLNRLF ELNK.L (14) R.KRSGILSHFTVWR.N (13)
CWP17_ARATH	At2g06850	23 kDa cell wall protein	38	3	-.IPCRKAIDVPFGTR.Y (19) R.KAIDVPFGPR.Y (13)
MOCOS_ARATH	At1g16540	Molybdenum cofactor sulphurase (ABA3)	38	7	K.LLKSLTPSAIWMHTTSLSIYVK.K (12) R.YEIDEKR.Q (10)
ALA11_ARATH	At1g13210	Phospholipid-transporting ATPase 11	38	5	K.SLTYALEDDFKK.K (18) R.SMAMRSNGSSLVGDDLDVWV DQSGPK.I (10)
TAP1_ARATH	At1g70610	Antigen peptide transporter-like 1, chloroplast	38	3	R.GCFFGIANMILVKRMR.E (16) R.QRIGYVQEPK.L (12)
AGO1_ARATH	At1g48410	Protein argonaute	37	2	R.INLLDEEVGAGGQR.R (36) R.GYGQPPQQQQYGGPQ EYQGRGR.G (4)
FBK19_ARATH	At1g32430	Putative F-box/Kelch-repeat protein At1g32430	37	2	K.VEVRELTLNPNGLK.A (22) R.CIKLEVNESLDFLGIGYDNNK.R (14)
LUMI_ARATH	At4g02560	LUMINIDEPENDENS	37	2	K.KHMLGSNPSYNK.E (21) K.HDSSTHPYWNQNK.R (18)
CAPP1_ARATH	At1g53310	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1	36	2	K.LEELGSVLTSLDPGDSIAK.A (23) K.GIAAGLQNTG.- (14)
WBC16_ARATH	At3g55090	Probable white-brown complex homologue protein 16	36	2	K.TIIGDEGHR.G (29) R.ILFYLCLLLGSKNK.R (8)
CNGC4_ARATH	At5g54250	Cyclic nucleotide-gated ion channel 4	36	3	R.IGLTCGGR.R (36) R.GVDECEMVQNLPEGLR.R (5)
U496L_ARATH	At2g18630	UPF0496 protein At2g18630	36	2	K.INSEYTEHLSSYER.A (21) K.YEKVVRGQK.E (13)
ARFM_ARATH	At1g34170	Auxin response factor 13	36	2	K.FVDAMNNNYIVGSR.F (20) K.FVDAMNNNYIVGSRFR.M (16)
CYSKM_ARATH	At3g59760	Cysteine synthase, mitochondrial (OAS-TL C)	35	3	K.IQGIGAGFIPK.N (15) R.IGYSMVTDAEQKGFISPGK.S (15)

ring to the surface of the protein, the location of the Y residue on a loop structure, its association with a neighbouring negative charge, and the proximity of the proteins to the site of generation of nitrating agents (Souza *et al.*, 1999; Ischiropoulos, 2003; Chaki *et al.*, 2009). With the exception of Rubisco activase, for which no structural model is available, the structures of the proteins were modelled as

indicated in the Materials and methods. All putative nitrated Y residues had acidic residues close enough ($<10 \text{ \AA}$ from the Y target) and all of them have basic amino acids in the primary sequence flanking the Y residue (Table 3). However, only Y337 and Y135 from transketolase and putative mannitol dehydrogenase, respectively, were located in loops, and most of them showed accessible solvent area

(ASA) indexes <70 (Table 3), thus having a low probability of being efficiently exposed to the solvent. Regarding the

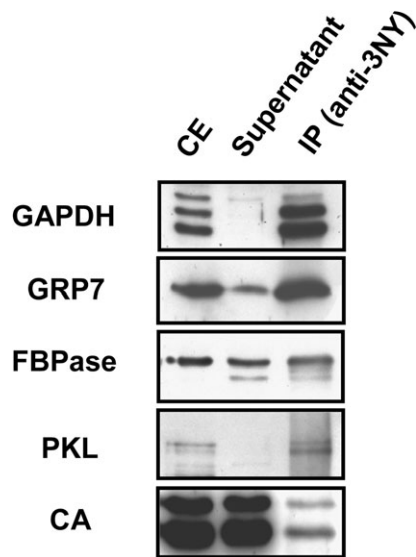


Fig. 2 Confirmation of the presence of proteins identified through shotgun proteomic analysis in the immunopurified nitroproteome. Crude protein extracts (CE) were immunoprecipitated with anti-3-nitroY (anti-3-NY) antibodies. The CE, supernatant, and immunoprecipitate (IP) were separated by 12% SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane, and probed with specific antibodies raised against chloroplastic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), glycine-rich protein 7 (GRP7), fructose bisphosphatase (FBPase), PICKEL (PKL), or carbonic anhydrase (CA). The procedure started from 1mg of total protein in the crude extract that was immunoprecipitated as described in the Materials and methods, and then the whole IP was loaded on the gel along with 1% of the CE input and the corresponding supernatant.

proximity of the proteins to the site of generation of nitrating agents, all the proteins identified are located in subcellular compartments previously characterized as sites of NO and superoxide production in plants, such as apoplasts, mitochondria, and chloroplasts (Corpas *et al.*, 2001; Bethke *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2005; Jasid *et al.*, 2006; Flores-Pérez *et al.*, 2008; Igamberdiev and Hill, 2009). In addition, the fact that some of the Y residues found to be potentially nitrated are highly conserved Y residues in proteins functionally homologous in other organisms (Supplementary Fig. S1 at *JXB* online) confers potential functional relevance to this post-translational modification as a regulatory mechanism of their activity/function. Regarding this, it has been confirmed that treatment of seedlings with a peroxyxynitrite donor, such as SIN-1, led to inhibition of GAPDH activity (Fig. 3A).

Despite efforts made to identify sites of *in vivo* Y nitration among proteins immunoprecipitated with anti-3-nitroY, not a single MS/MS spectrum corresponding to a nitrated peptide was identified. There might be two explanations for this lack of success. First, the nitrated form of the identified proteins could be naturally very low abundant in the analysed samples, thus making MS/MS-based identification extremely difficult. Secondly, the lack of detection of nitrated peptides may be the result of the unstable nature of nitroY under the conditions used to process samples by MS. Regarding the latter, it has been proposed that the nitro group linked to Y residues of proteins can be reduced to an amino group (Sarver *et al.*, 2001; Tsumoto *et al.*, 2010). When crude proteomic data from spots excised from gels after 2-DE were searched for aminoY instead of nitroY post-translational modification, an MS/MS fragmentation spectrum corresponding to LVSWYDNEWGYSSR peptide (monoisotopic mass of neutral peptide of 1776.7631; ion

Table 2. Putative Y-nitrated peptides identified by MALDI-TOF from 2D gel-excised spots

Samples containing 3-nitroY immunopurified proteins were separated by 2-DE and identified by MALDI-TOF as described in the Materials and methods. The AGI identifiers for each identified protein are included along with the corresponding Y-nitrated peptide sequence (the residues susceptible to Y nitration are underlined and unequivocal nitration of Y is indicated in bold). Error (difference between the experimental and calculated masses); signal-to-noise ratio, relative molecular mass (M_r) observed for the modified and the corresponding unmodified peptide that appeared in the same MASCOT search. Values in parentheses indicate the absence of the unmodified peptide. The mass shift (Shift) and the modifications of the corresponding peptide with their respective mass increases are also shown. Those proteins that have been previously reported as nitrated in other plant systems have been marked with a single (Chaki *et al.*, 2009) or double asterisk (Cecconi *et al.*, 2009).

Description	AGI identifier	Peptide sequence	Error	Signal-to-noise	M_r (observed) (unmodified)	M_r (observed)	Shift	Modification
Rubisco activase, chloroplast precursor	At2g39730	351R.VYDDEVR.K359	0.01	110	895.34	940.41	+45.07	NitroY (+45)
		72R.GLA <u>Y</u> DTSDDQDITR.G88	-0.05	25	1697.66	1744.66	+46.97	2 Deamination (+2) NitroY (+45)
Serine hydroxymethyl transferase	At4g13930	160K.VNFTTGYIDYDKLEEK.A177	0.03	60	1934.83	2025.92	+91.09	Deamination (+1) 2 NitroY (+90)
Transketolase, putative*	At3g60750	333K.ANSY <u>Y</u> SVHGAALG EKEVEATR.N354	0.15	57	(2090.15)	2135.15	(+45)	NitroY (+45)
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	At3g04120	313K.LVSWYDNEWGYSSR.V328	-0.06	50	1761.72	1806.72	+45	NitroY (+45)
Probable mannitol dehydrogenase	At4g39330	133K.NYGGYSENIVVDQR.F148	-0.04	27	1613.63	1658.70	+45.07	NitroY (+45)
Rubisco large chain precursor**	AtCg00490	236K.GH <u>Y</u> LNATAGTCEEMIK.R253	0.04	25	(1794.84)	1839.84	(+45)	NitroY (+45)

Table 3. Structural features of potential Y targets of nitration in MALDI-TOF-identified proteins

Protein annotation and AGI code along with the Putative nitrated Y are indicated. Parameters were calculated as described in the Materials and methods. Accessible solvent area (ASA) was calculated by NetSurfP software (Petersen *et al.* 2009).

Protein/AGI	Putative nitrated Y	Distance to D/E	Proximal basic amino acids in primary sequence	Location in loop	ASA
Rubisco activase, chloroplast precursor_ At2g39730	Y353	(No model)	R351, R358, K359	(No model)	5.45
	Y76		R72		79.13
Serine hydroxymethyl transferase_ At4g13930	Y167	5.99 Å to E342	K160, K172, K176	No	62.38
	Y170	5.04 Å to D197	K160, K172, K176	No	23.35
Transketolase, putative_ At3g60750	Y337	9.01 Å to D268	K333, H340, K347	Yes	66.16
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic_ At3g04120	Y318	6.08 Å to D319	K313, R327	No	7.35
	Y324	6.61 Å to E321	K313, R327	No	19.17
Probable mannitol dehydrogenase_ At4g39330	Y135	4.31 Å to E8	K133, R147	Yes	34.66
	Y138	3.75 Å to D53	K133, R147	No	13.55
Rubisco large subunit precursor_ AtCg00490	Y239	6.33 Å to E158	K236, H238, K252, R253	No	6.37

score 43; expected 0.00088) was found for cytosolic GAPDH (G3PC). This spectrum included a +15 shift compatible with an amino modification of Y318 (Fig. 3B). These data suggest that from two Y residues found as potential nitration targets in G3PC (Table 2), part of the 3-nitroY318 residues in the protein population might undergo reduction to 3-aminoY318 under the conditions used for MS analysis. Since reduction may occur with any nitroY, the crude data from LC-MS/MS shotgun analysis were searched for aminoY modification, and 51 putative aminoY-containing peptides with ion scores >15 were found that corresponded to 47 different proteins (Supplementary Table S3 at *JXB* online). Comparison of nitroY and aminoY searches led to only five peptides that were detected to be Y nitrated or aminated in the same residue, but all of them had ion scores <10, thus suggesting that the partial reduction of nitroY may lower the abundance of both modifications, making MS identification even more difficult.

To overcome the low abundance of nitrated forms of proteins found *in vivo*, one of the proteins identified in the screen as potentially nitrated, 5-methyl tetrahydropteroyl-triglutamate-homocysteine *S*-methyltransferase or methionine synthase 1 (AtMS1) was expressed as a 6×His-tagged version in bacteria. The tagged recombinant protein was expressed to moderately high levels by 5 h after induction with IPTG (data not shown). Crude recombinant extracts were checked for AtMS1 protein content by western blot with anti-5×His tag antibodies and subsequently purified with Ni-resin. The purified protein was then split into two equivalent samples, one of them being nitrated *in vitro* whereas the other was used as control of no exogenous nitration. The efficiency of nitration was then checked by western blot with anti-3-nitroY. No cross-reacting band was detected in the control protein but a strong signal was observed in the nitrated recombinant AtMS1 protein (Fig. 4A). Both samples had comparable levels of recombinant protein as confirmed by western blot with anti-5×His antibodies (Fig. 4A). A duplicate one-dimensional SDS-polyacrylamide gel was stained with Coomassie blue and

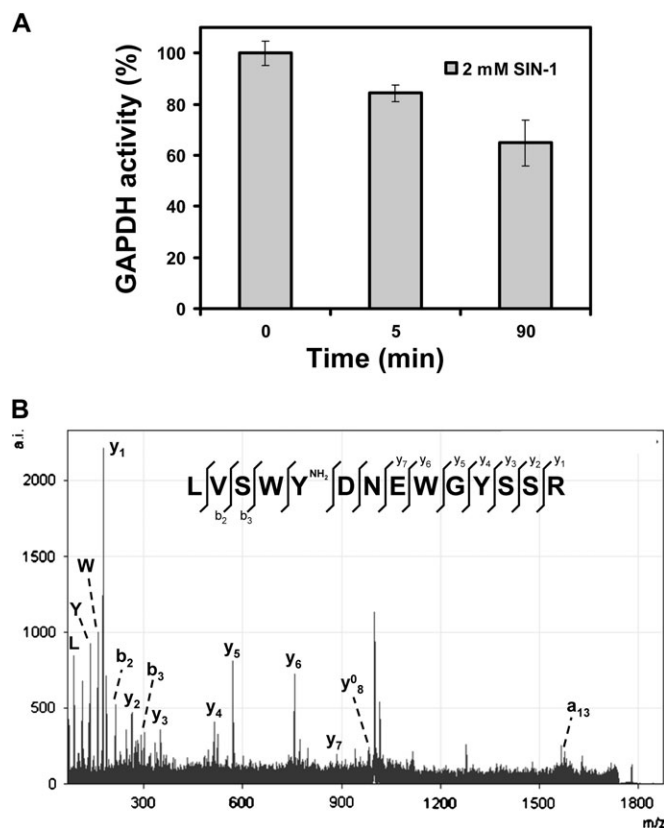


Fig. 3. Effect of nitration on GAPDH. (A) *Arabidopsis* seedlings were treated with SIN-1. After the indicated times, the GAPDH activity levels were measured in crude protein extracts from whole seedlings as described in the Materials and methods. Measurements for activity were performed in triplicate and the average values \pm SD are shown. (B) MS/MS spectrum of aminated L(V)SWYDNEWGYSSR peptide from *Arabidopsis* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Detected peaks of y and b series as well as immonium ions of L, Y, and W are indicated.

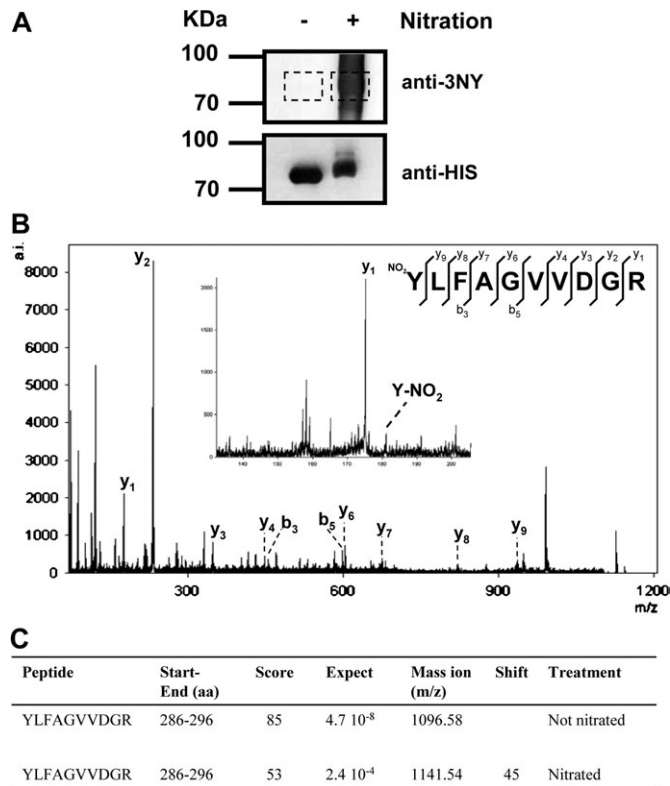


Fig. 4. Identification of the nitration site in recombinant tagged methionine synthase 1 from *Arabidopsis*. (A) Equal amounts (5 μ g) of recombinant AtMS1 protein were nitrated (+) or not (-), separated by one-dimensional SDS-PAGE, and blotted onto nitrocellulose to be probed by western blot with anti-3-nitroY (anti-3NY) antibodies. After stripping, membranes were further probed with anti-5 \times His antibodies. Molecular size markers are shown on the left side of the panels. (B) MS/MS spectrum of nitrated YLFAGVVDGR peptide from AtMS1. The insert shows the detected y and b series as well as a detail of the spectrum showing the immonium ion corresponding to nitrated Y (C).

the bands corresponding to nitrated and non-nitrated proteins were excised from the gel, digested in gel with trypsin, and further analysed by LC-MS/MS. The same YLFAGVVDGR peptide was found from control non-nitrated protein (m/z 1096.58, score 85) and nitrated protein (m/z 1141.54, score 53), showing a shift of 44.96 equivalent to the typical shift of a single nitration (Fig. 4C). The MS/MS spectrum of nitrated peptide showed most of the peaks corresponding to the y and b series and also the immonium ion of a nitrated Y287 residue (Fig. 4B). These data allowed identification of an unequivocal site of nitration in AtMS1 at Y287. Whether this post-translational modification of AtMS1 may alter its activity, stability, subcellular location, or other post-translational modifications will require further study. Nevertheless, Y287 is conserved in plant methionine synthases but not in the enzymes from yeast (Supplementary Fig. S2A at *JXB* online), and it is located in a loop on the external surface of the protein far from the 5-methyl tetrahydropteroyltryglutamate (THG)- and homocysteine (HC)-binding sites inside the catalytic pocket (Supplementary Fig. S2B). Y287 forms hydrogen bonds with two

proximal residues, T262 and F264, which may be important to maintain suitable folding of the protein but which do not interfere directly with substrate binding or cofactor function. However, it has been described that methionine synthase activity is regulated by NO. NO treatment impairs methionine synthase activity in different models both *in vitro* (Brouwer *et al.*, 1996, Nicolaou *et al.*, 1996, 1997) and *in vivo* (Danishpajooch *et al.*, 2001), suggesting that tyrosine nitration might be responsible for the NO-dependent reduction of methionine synthase activity.

Discussion

Although several reports regarding proteomic approaches for the identification of nitrated proteins in mammals have been published recently (Suzuki *et al.*, 2005; Sultana *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007) and the detection of nitrated proteins in pathogen-challenged plants was also reported (Romero-Puertas *et al.*, 2007), the first two reports focusing on general proteomic approaches to nitrated plant protein identification were not published until very recently (Ceconi *et al.*, 2009; Chaki *et al.*, 2009). Both groups described the use of anti-3-nitroY antibodies for the detection of plant putatively nitrated proteins in western blot and the subsequent identification of the immunoreactive proteins by MALDI-TOF/TOF. A total of 8 and 21 proteins were identified in these reports (Ceconi *et al.*, 2009; Chaki *et al.*, 2009), respectively. However, no nitrated peptides and consequently no nitration sites were identified in either of those reports, probably due to the low level of nitration under non-stressed conditions (Chaki *et al.*, 2009) and technical limitations (Ceconi *et al.*, 2009), as described by the authors. In this work, a proteomic methodology has been used to purify and identify proteins nitrated *in vivo* at Y residues in *A. thaliana*. The method is based on the purification of nitrated proteins by immunoprecipitation with well characterized anti-3-nitroY antibodies (Schmidt *et al.*, 2003; Gokulrangan *et al.*, 2007), and further identification by LC-MS/MS. This method has been previously reported to be useful in identifying nitrated proteins in mammals (Turko *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2009; Zhan and Desiderio, 2009). The procedure was sensitive enough to identify 127 potentially nitrated proteins from *Arabidopsis* seedlings. These results are in the range of the best proteomic methods reported in animal systems (Suzuki *et al.*, 2005; Sultana *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007), and they represent the description of the widest potential *in vivo* nitroproteome of a plant to date. A literature search showed that ~35% of the identified *Arabidopsis* Y-nitrated proteins were previously described as Y nitrated in other organisms (Supplementary Table S1, and references therein), which supports the reliability of the method in identifying potentially Y-nitrated proteins. Moreover, a large proportion of the proteins reported to be potential targets of nitration in the two previous reports on plants (Ceconi *et al.*, 2009; Chaki *et al.*, 2009) were also identified as putatively nitrated in the present work. Moreover, some

of the MS-based protein identifications used have been technically validated by detection of the corresponding proteins in the immunopurified samples by western blot with specific antibodies (Fig. 2). Although the methodology presented in this work seems to be reliable and robust enough to be considered a good starting point for the characterization of Y-nitrated plant proteins, no unequivocal nitration sites were found by MS/MS. Due to the low abundance of Y residues in proteins and because the nitration sites were usually restricted to one or two Y residues per protein (Abello *et al.*, 2009), a low level of occurrence of Y nitration is expected.

The most abundant protein spots in 2-DE gels from anti-3-nitroY-immunoprecipitated proteins were analysed and searched for Y nitration modification. Nitrated peptides for GAPDH, ribulose biphosphate carboxylase large subunit, Rubisco activase, mannitol dehydrogenase, and transketolase were identified (Table 2). The identifications are based on peptide mass fingerprinting data obtained by MALDI-TOF because no good fragmentation MS/MS spectra were obtained. Only molecular ions with a signal-to-noise ratio >25 and a difference between the experimental and calculated masses of <0.15 were selected. Furthermore, *in silico* analysis of potentially nitrated peptides showed that most of them fulfilled most of the criteria to be nitration targets: Y residues were located in loops with a large solvent-accessible area and had a basic amino acid in the vicinity and a proximal negative charge (Table 3). Gene Ontology tools for the analysis of the potentially Y-nitrated identified proteins showed a significant over-representation of proteins located in the chloroplast, peroxisome, mitochondria, and apoplast, subcellular compartments that have been proposed as a source of NO and superoxide anions in plants (Corpas *et al.*, 2001; Bethke *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2005; Jasid *et al.*, 2006; Flores-Pérez *et al.*, 2008; Igamberdiev and Hill, 2009), thus representing cellular domains where the nitrating reagent peroxynitrite is produced (Szabó *et al.*, 2007). These data support the previously proposed idea that the proximity of proteins to the site of generation of nitrating agents is a main factor in directing protein nitration (Ischiropoulos, 2003).

When the Gene Ontology tools were used for the analysis of the Y-nitrated identified proteins, it was found that >60% were involved in primary metabolism. Post-translational nitration of key enzymes and the subsequent alteration of their catalytic properties may represent a new level of regulation of primary metabolism. It is noteworthy that one of the proteins identified as putatively nitrated in this work (*S*-adenosyl homocysteine hydrolase, Table 1) has also been reported to be nitrated in sunflower hypocotyls (Chaki *et al.*, 2009). The activity of the enzyme was inhibited upon nitration (Chaki *et al.*, 2009), thus suggesting that the activity of the *Arabidopsis* counterpart may also be regulated through nitration. Moreover, Rubisco activase, ATP synthase subunit α , and glutamine synthetase 2 have also been identified as putative nitrated proteins in pathogen-challenged *Arabidopsis* (Cecconi *et al.*, 2009). It has been discussed that nitration of these proteins may be a way to

modulate defence-related responses including the hypersensitive response (Cecconi *et al.*, 2009). Alternatively, nitration of abundant proteins such as those involved in photosynthesis and carbon metabolism may represent just a non-selective scavenging system for reactive nitrogen and oxygen species produced under standard or stress-related conditions. Moreover, the functional relevance of this post-translational modification on these targets is further supported by the fact that most of the identified nitrated Y residues are strictly conserved in the amino acid sequence of homologous proteins from other organisms (Supplementary Fig. S1 at *JXB* online), thus supporting a potential functional effect of this post-translational modification.

In the case of GAPDH, the two Y residues identified as nitrated in peptide LVS $\text{WY}^*\text{DNEWGY}^*\text{SSR}$ were not only conserved in the rabbit GAPDH but were actually also identified as nitrated LIS $\text{WY}^*\text{DNEFGY}^*\text{SNR}$, resulting in complete loss of catalytic activity (Palamalai and Miyagi, 2010). GAPDH models for rat and *Arabidopsis* overlapped greatly throughout the molecule and particularly on nitrated Y residues (Supplementary Fig. S3). In addition, as reported for yeast and mammals (Buchczyk *et al.*, 2000; Palamalai and Miyagi, 2010), *Arabidopsis* GAPDH activity was also inhibited by peroxynitrite (Fig. 3A). Notwithstanding, several proteins participating with GAPDH in the gluconeogenesis conversion of malate to sucrose were also identified as nitrated forms in *Arabidopsis* (Table 1 and Supplementary Fig. S4), thus suggesting a potential for Y nitration as a significant regulatory level on this principal metabolic pathway. Interestingly, among potential targets of Y nitration in *Arabidopsis* were also three enzymes involved in the biosynthesis of methionine, the 5-methyl tetrahydropteroylglutamate-homocysteine methyltransferase, also called methionine synthase, the *S*-adenosylmethionine synthetases 1 and 2, and *S*-adenosylhomocysteinase 1 (Supplementary Fig. S4). It has been previously reported that NO probably inhibits mammalian methionine synthase activity by reaction with cobalt-containing cobalamin cofactor (Brouwer *et al.*, 1996; Nicolaou *et al.*, 1997; Danishpajooch *et al.*, 2001). Nevertheless, in the light of the results obtained here, this mode of action for NO is compatible with the mechanism of control of methionine synthase activity through nitration of key Y residues of the protein. Moreover, the fact that not only a key regulatory step but most of the enzymes involved in methionine biosynthesis are potentially nitrated in *Arabidopsis* suggests that Y nitration may represent an important regulatory level to control the biosynthesis of this amino acid in plants. Furthermore, nitration of *S*-adenosylmethionine synthetases could also represent an interesting regulatory point in ethylene production. Regarding this, the *S*-nitrosylation of *S*-adenosylmethionine synthetase 1 resulting in reduced activity and decreased ethylene production in *Arabidopsis* has recently been reported (Lindermayr *et al.* 2006).

The fact that neither in this work nor in the two previous reports on protein nitration in plants (Cecconi *et al.*, 2009; Chaki *et al.*, 2009) were any nitrated peptide and the corresponding nitration site unequivocally identified needs further discussion. It is well known that Y nitration is a very

low abundant post-translational modification as compared with other protein modifications such as phosphorylation (Abello *et al.*, 2009). In fact, only 0.033–0.43 mmol of nitroY per mol of Y has been detected in plant proteins, depending on the tissue or species studied (Bechtold *et al.*, 2009; Chaki *et al.*, 2009). Moreover, it is also likely that under non-stressed conditions, when only basal levels of NO and superoxide and thus low amounts of peroxynitrite are generated by cells, even lower abundance is expected. Nevertheless, because the presented methodology enriched samples in potentially Y-nitrated-containing proteins by immunoprecipitation with a specific anti-3-nitroY antibody, the identification of some nitrated peptides by MS/MS should be expected. A survey of the literature on identification of nitrated proteins in different organisms points to a very low number of nitrated sites identified, thus suggesting the existence of technical difficulties intrinsically associated with MS-based analysis of this kind of protein modification. A possible explanation for the lack of nitroY signatures could be related to alterations produced by the treatments performed before mass spectrometry analysis or during the ionization of the protein samples. It has been reported that the treatment of nitrated proteins with DTT and elevated temperature, as used for trypsin digestion, can reduce the nitroY to aminoY or other related species (Söderling *et al.*, 2007). Moreover, the ionization energy for MALDI or electrospray ionization (ESI) technologies is too aggressive for the nitrated Y residues, and the laser-induced photochemical decomposition of nitroY to aminoY during MALDI-MS analysis has been reported (Sarver *et al.*, 2001). Therefore, a conversion of nitroY to aminoY in the samples during sample processing before MS analysis may explain the lack of detection of nitrated peptides in the present studies. To validate this hypothesis, the proteomic experiments were searched for aminoY modification instead of nitroY modification. By selecting aminoY as a variable modification in the MASCOT data analysis in MALDI-TOF/TOF experiments, a fragmentation MS/MS spectrum corresponding to a peptide containing a 3-aminoY residue was found in the protein spot corresponding to GAPDH (Fig. 3). More precisely a peptide containing aminoY318 was found, suggesting that from the two Y residues found as potential targets to be nitrated in G3PC (Table 2), part of the 3-nitroY318 residues in the protein population might undergo reduction to 3-aminoY318 under the conditions used for MS analysis. Moreover, although no further MS/MS spectra corresponding to aminoY-containing peptides were obtained, ~50 additional putative aminoY-containing peptides with an ion score >15 were found (Supplementary Table S3 at *JXB* online). This confirms the hypothesis that the lack of identification of nitrated peptides in this work, and probably in others, may be due to the conversion of the nitroY to aminoY. Such a conclusion leads to the proposal that future analysis of Y nitration of proteins should be based on a simultaneous search for both nitroY and aminoY variable modifications. Eventually, the chemical reduction of all nitroY to aminoY by means of a strong reducing reagent such as sodium dithionite may represent an advantage in

further proteomic analysis either searching directly for aminoY or after derivatization of aminoY (Ghesquière *et al.*, 2009; Abello *et al.*, 2010).

The proteomic method described in this work represents a tool to identify proteins undergoing *in vivo* Y nitration in plants. The application of this methodology, with the improvements discussed above, to the analysis of different biological processes in plants will allow the identification of Y nitration protein targets. Because of the low abundance and limited stability of this post-translational modification, the obtained data suggest that after identification of *in vivo* targets, the confirmation of the modification sites and the functional consequences have to be addressed through *in vitro* assays with larger amounts of modified protein. These Y-nitrated proteins may represent nodes for a new unexplored level of regulation of proteins exerted by NO through post-translational modification. Further characterization of the identified Y-nitrated proteins will provide key information about new regulatory features of NO in many aspects of plant growth, development, and defence.

Supplementary data

Supplementary data are available at *JXB* online.

Figure S1. Potential Y nitration targets in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, serine hydroxymethyltransferase, transketolase, Rubisco large subunit, and Rubisco activase are conserved in different plants and other organisms.

Figure S2. Conservation and structural modelling analysis of plant methionine synthases.

Figure S3. Alignment of 3D structure models of rat and *Arabidopsis* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases.

Figure S4. Scheme displaying primary carbon and sulphur metabolism enzymes highlighting those that have been identified in this work as potentially nitrated in *Arabidopsis*.

Figure S5. Confirmation of the presence of proteins identified through shotgun proteomic analysis in the immunopurified nitroproteome. The entire gels for western blots performed in Fig. 2 are shown to account for the specificity of the antibodies.

Figure S6. ROS and NO detection in roots of wild-type plants grown under standard conditions. Nitroblue tetrazolium (NBT) staining of roots in different zones (A, B). Roots were pre-incubated with 10 U ml⁻¹ superoxide dismutase (SOD) prior to NBT staining (C, D). DAF-FM DA staining of roots pre-treated (G, H) or not (E, F) with the NO scavenger cPTIO under UV illumination (E, G) or bright field (F, H).

Table S1. Putative Y-nitrated proteins identified from *Arabidopsis* and the corresponding functional Y-nitrated counterparts in other organisms.

Table S2. Identification of potentially Y-nitrated proteins by MALDI-TOF peptide fingerprinting of the most abundant 2D gel-excised spots from anti-3-nitroY-immunoprecipitated *Arabidopsis* proteins.

Table S3. Identification of potential targets of 3-aminoY modification by shotgun LC-MS/MS analysis.

Acknowledgements

We thank Rafael Ruiz-Partida (CIPF) for his valuable help with protein modelling. We also thank Renate Scheibe (Universität Osnabrück, Germany), Dorothee Staiger (University of Bielefeld, Germany), Mariam Sahrawy (EEZ-CSIC, Granada, Spain), Joe Ogas (Purdue University, USA), and Dominique Rumeau (Université de la Méditerranée, France) for their kind donation of antibodies against GAPDH, GRP7, fructose biphosphatase, PICKEL, and carbonic anhydrase, respectively. The AtMS1 cDNA fused to the 6×His tag was kindly donated by David Dixon (University of Durham, UK). MS-based protein identification was performed by the Proteomic Service of CIPF-PROTEORED (Valencia, Spain). This work was supported by Ministerio de Educación y Ciencia from Spain and FEDER funds from EU grants GEN2003-20477-C02-02, BIO2005-00222, BIO2008-00839, and CONSOLIDER TRANSPLANTA CSD2007-00057 (to JL), a fellowship from the Bancaja-CSIC Programme (to JLJ), and a contract of the I3P Programme of CSIC (co-financed with FEDER funds of the EU, to RC-M).

References

- Abello N, Barroso B, Kerstjens HA, Postma DS, Bischoff R.** 2010. Chemical labeling and enrichment of nitrotyrosine-containing peptides. *Talanta* **80**, 1503–1512.
- Abello N, Kerstjens HA, Postma DS, Bischoff R.** 2009. Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins. *Journal of Proteome Research* **8**, 3222–3328.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T.** 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**, 195–201.
- Bechtold U, Rabbani N, Mullineaux PM, Thornalley PJ.** 2009. Quantitative measurement of specific biomarkers for protein oxidation, nitration and glycation in *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal* **59**, 661–671.
- Bethke PC, Badger MR, Jones RL.** 2004. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *The Plant Cell* **16**, 332–41.
- Bethke PC, Libourel IG, Jones RL.** 2006. Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **57**, 517–526.
- Bowie JU, Lüthy R, Eisenberg D.** 1991. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science* **253**, 164–170.
- Brouwer M, Chamulitrat W, Ferruzzi G, Sauls DL, Weinberg JB.** 1996. Nitric oxide interactions with cobalamins: biochemical and functional consequences. *Blood* **88**, 1857–1864.
- Buchczyk DP, Briviba K, Hartl FU, Sies H.** 2000. Responses to peroxynitrite in yeast: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a sensitive intracellular target for nitration and enhancement of chaperone expression and ubiquitination. *Biological Chemistry* **381**, 121–126.
- Cecconi D, Orzetti S, Vandelle E, Rinalducci S, Zolla L, Delledonne M.** 2009. Protein nitration during defense response in *Arabidopsis thaliana*. *Electrophoresis* **30**, 2460–2468.
- Chaki M, Valderrama R, Fernández-Ocaña AM, et al.** 2009. Protein targets of tyrosine nitration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls. *Journal of Experimental Botany* **60**, 4221–4234.
- Chang GG, Huang TM.** 1980. Involvement of tyrosyl residues in the substrate binding of pigeon liver malic enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta* **611**, 217–226.
- Chen H-JC, Chang C-M, Lin W-P, Cheng D-L, Leong M-I.** 2008. H₂O₂/nitrite-induced post-translational modifications of human hemoglobin determined by mass spectrometry: redox regulation of tyrosine nitration and 3-nitrotyrosine reductions by antioxidants. *Chembiochem* **9**, 312–323.
- Chiappetta G, Corbo C, Palmese A, Galli F, Piroddi M, Marino G, Amoresano A.** 2009. Quantitative identification of protein nitration sites. *Proteomics* **9**, 1524–1537.
- Corpas FJ, Barroso JB, del Río LA.** 2001. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science* **6**, 145–150.
- Danishpajooch IO, Gudi T, Chen Y, Kharitonov VG, Sharma VS, Boss GR.** 2001. Nitric oxide inhibits methionine synthase activity *in vivo* and disrupts carbon flow through the folate pathway. *Journal of Biological Chemistry*. **20**, 27296–27303.
- Dixon DP, Skipsey M, Grundy NM, Edwards R.** 2005. Stress-induced protein S-glutathionylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **138**, 2233–2244.
- Flores-Pérez U, Sauret-Güeto S, Gas E, Jarvis P, Rodríguez-Concepción M.** 2008. A mutant impaired in the production of plastome-encoded proteins uncovers a mechanism for the homeostasis of isoprenoid biosynthetic enzymes in *Arabidopsis* plastids. *The Plant Cell* **20**, 1303–1315.
- Ghesquière B, Colaert N, Helsen K, et al.** 2009. *In vitro* and *in vivo* protein-bound tyrosine nitration characterized by diagonal chromatography. *Molecular and Cellular Proteomics* **8**, 2642–2652.
- Gokulrangan G, Zaidi A, Michaelis ML, Schöneich C.** 2007. Proteomic analysis of protein nitration in rat cerebellum: effect of biological aging. *Journal of Neurochemistry* **100**, 1494–1504.
- Gow AJ, Farkouh CR, Munson DA, Posencheg MA, Ischiropoulos H.** 2004. Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology* **287**, L262–L268.
- Grün S, Lindermayr C, Sell S, Durner J.** 2006. Nitric oxide and gene regulation in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**, 507–516.
- Gupta KJ, Stoimenova M, Kaiser WM.** 2005. In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, *in vitro* and *in situ*. *Journal of Experimental Botany* **56**, 2601–2609.
- He Y, Tang RH, Hao Y, et al.** 2004. Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* **305**, 1968–1971.

- Hong SJ, Gokulrangan G, Schöneich C.** 2007. Proteomic analysis of age dependent nitration of rat cardiac proteins by solution isoelectric focusing coupled to nanoHPLC tandem mass spectrometry. *Experimental Gerontology* **42**, 639–651.
- Igamberdiev AU, Hill RD.** 2009. Plant mitochondrial function during anaerobiosis. *Annals of Botany* **103**, 259–268.
- Ischiropoulos H.** 2003. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **305**, 776–783.
- Jasid S, Simontacchi M, Bartoli CG, Puntarulo S.** 2006. Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins. *Plant Physiology* **142**, 1246–1255.
- Laskowski RA, Rullmann JA, MacArthur MW, Kaptein R, Thornton JM.** 1996. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *Journal of Biomolecular NMR* **8**, 477–486.
- Lindermayr C, Saalbach G, Bahnweg G, Durner J.** 2006. Differential inhibition of Arabidopsis methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 4285–4291.
- Lindermayr C, Saalbach G, Durner J.** 2005. Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology* **137**, 921–930.
- Liu B, Tewari AK, Zhang L, Green-Church KB, Zweier JL, Chen YR, He G.** 2009. Proteomic analysis of protein tyrosine nitration after ischemia reperfusion injury: mitochondria as the major target. *Biochimica et Biophysica Acta* **1794**, 476–485.
- Liu HY, Yu X, Cui DY, Sun MH, Sun WN, Tang ZC, Kwak SS, Su WA.** 2007. The role of water channel proteins and nitric oxide signaling in rice seed germination. *Cell Research* **17**, 638–649.
- Melo F, Feytmans E.** 1998. Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy. *Journal of Molecular Biology* **277**, 1141–1152.
- Mishina TE, Lamb C, Zeier J.** 2007. Expression of a nitric oxide degrading enzyme induces a senescence programme in Arabidopsis. *Plant, Cell and Environment* **30**, 39–52.
- Miyagi M, Sakaguchi H, Darrow RM, Yan L, West KA, Aulak KS, Stuehr DJ, Hollyfield JG, Organisciak DT, Crabb JW.** 2002. Evidence that light modulates protein nitration in rat retina. *Molecular and Cellular Proteomics* **1**, 293–303.
- Morot-Gaudry-Talarmain Y, Rockel P, Moureaux T, Quilleré I, Leydecker MT, Kaiser WM, Morot-Gaudry JF.** 2002. Nitrite accumulation and nitric oxide emission in relation to cellular signaling in nitrite reductase antisense tobacco. *Planta* **215**, 708–715.
- Muñoz-Bertomeu J, Cascales-Miñana B, Mulet JM, Baroja-Fernández E, Pozueta-Romero J, Kuhn JM, Segura J, Ros R.** 2009. Plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase deficiency leads to altered root development and affects the sugar and amino acid balance in Arabidopsis. *Plant Physiology* **151**, 541–558.
- Mur LA, Carver TL, Prats E.** 2006. NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant–pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* **57**, 489–505.
- Nicolaou A, Kenyon SH, Gibbons JM, Ast T, Gibbons WA.** 1996. *In vitro* inactivation of mammalian methionine synthase by nitric oxide. *European Journal of Clinical Investigation* **26**, 167–170.
- Nicolaou A, Warefield CJ, Kenyon SH, Gibbons WA.** 1997. The inactivation of methionine synthase in isolated rat hepatocytes by sodium nitroprusside. *European Journal of Biochemistry* **244**, 876–882.
- Palamalai V, Miyagi M.** 2010. Mechanism of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by tyrosine nitration. *Protein Science* **19**, 255–262.
- Parani M, Rudrabhatla S, Myers R, Weirich H, Smith B, Leaman DW, Goldman SL.** 2004. Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in Arabidopsis. *Plant Biotechnology Journal* **2**, 359–366.
- Petersen B, Petersen TN, Andersen P, Nielsen M, Lundegaard C.** 2009. A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. *BMC Structural Biology* **9**, 51.
- Polverari A, Molesini B, Pezzotti M, Buonaurio R, Marte M, Delledonne M.** 2003. Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 1094–1105.
- Romero-Puertas MC, Camprostrini N, Mattè A, Righetti PG, Perazzolli M, Zolla L, Roepstorff P, Delledonne M.** 2008. Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis thaliana undergoing hypersensitive response. *Proteomics* **8**, 1459–1469.
- Romero-Puertas MC, Laxa M, Mattè A, Zaninotto F, Finkemeier I, Jones AM, Perazzolli M, Vandelle E, Dietz KJ, Delledonne M.** 2007. S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *The Plant Cell* **19**, 4120–30.
- Romero-Puertas MC, Perazzolli M, Zago ED, Delledonne M.** 2004. Nitric oxide signalling functions in plant–pathogen interactions. *Cell Microbiology* **6**, 795–803.
- Saito S, Yamamoto-Katou A, Yoshioka H, Doke N, Kawakita K.** 2006. Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology* **47**, 689–697.
- Sarver A, Scheffler NK, Shetlar MD, Gibson BW.** 2001. Analysis of peptides and proteins containing nitrotyrosine by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society of Mass Spectrometry* **12**, 439–448.
- Schmidt P, Youhnovski N, Daiber A, Balan A, Arsic M, Bachschmid M, Przybylski M, Ullrich V.** 2003. Specific nitration at tyrosine 430 revealed by high resolution mass spectrometry as basis for redox regulation of bovine prostacyclin synthase. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 12813–12819.
- Simpson GG.** 2005. NO flowering. *Bioessays* **27**, 239–241.
- Söderling AS, Hultman L, Delbro D, Højrup P, Caidahl K.** 2007. Reduction of the nitro group during sample preparation may cause underestimation of the nitration level in 3-nitrotyrosine immunoblotting. *Journal of Chromatography B* **851**, 277–286.

- Souza JM, Daikhin E, Yudkoff M, Raman CS, Ischiropoulos H.** 1999. Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **371**, 169–178.
- Stevens SM Jr, Prokai-Tatrai K, Prokai L.** 2008. Factors that contribute to the misidentification of tyrosine nitration by shotgun proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics* **7**, 2442–2451.
- Sultana R, Poon HF, Cai J, Pierce WM, Merchant M, Klein JB, Markesbery WR, Butterfield DA.** 2006. Identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain using a redox proteomics approach. *Neurobiology of Disease* **22**, 76–87.
- Suzuki Y, Tanaka M, Sohmiya M, Ichinose S, Omori A, Okamoto K.** 2005. Identification of nitrated proteins in the normal rat brain using a proteomics approach. *Neurological Research* **27**, 630–633.
- Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R.** 2007. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews on Drug Discovery* **6**, 662–680.
- Tsumoto H, Taguchi R, Kohda K.** 2010. Efficient identification and quantification of peptides containing nitrotyrosine by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry after derivatization. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **58**, 488–494.
- Turko IV, Li L, Aulak KS, Stuehr DJ, Chang JY, Murad F.** 2003. Protein tyrosine nitration in the mitochondria from diabetic mouse heart. Implications to dysfunctional mitochondria in diabetes. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 33972–33977.
- Zhan X, Desiderio DM.** 2009. Mass spectrometric identification of *in vivo* nitrotyrosine sites in the human pituitary tumor proteome. *Methods in Molecular Biology* **566**, 137–163.
- Zhang Q, Qian WJ, Knyushko TV, et al.** 2007. A method for selective enrichment and analysis of nitrotyrosine-containing peptides in complex proteome samples. *Journal of Proteome Research* **6**, 2257–2268.
- Zhang Y, Wang L, Liu Y, Zhang Q, Wei Q, Zhang W.** 2006. Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na⁺/H⁺ antiport in the tonoplast. *Planta* **224**, 545–555.

Inhibition of *Arabidopsis* O-Acetylserine(thiol)lyase A1 by Tyrosine Nitration*

Received for publication, May 25, 2010, and in revised form, October 19, 2010. Published, JBC Papers in Press, November 3, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.147678

Consolación Álvarez^{‡1,2}, Jorge Lozano-Juste^{§1}, Luís C. Romero[‡], Irene García[‡], Cecilia Gotor[‡], and José León^{§3}

From the [‡]Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC-Universidad de Sevilla, Avenida Américo Vespucio 49, 41092 Sevilla, Spain and the [§]Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, CSIC-Universidad Politécnica de Valencia, CPI Ed. 8E, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

The last step of sulfur assimilation is catalyzed by O-acetylserine(thiol)lyase (OASTL) enzymes. OASTLs are encoded by a multigene family in the model plant *Arabidopsis thaliana*. Cytosolic OASA1 enzyme is the main source of OASTL activity and thus crucial for cysteine homeostasis. We found that nitrating conditions after exposure to peroxynitrite strongly inhibited OASTL activity. Among OASTLs, OASA1 was markedly sensitive to nitration as demonstrated by the comparative analysis of OASTL activity in nitrated crude protein extracts from wild type and different *oastl* mutants. Furthermore, nitration assays on purified recombinant OASA1 protein led to 90% reduction of the activity due to inhibition of the enzyme, as no degradation of the protein occurred under these conditions. The reduced activity was due to nitration of the protein because selective scavenging of peroxynitrite with epicatechin impaired OASA1 nitration and the concomitant inhibition of OASTL activity. Inhibition of OASA1 activity upon nitration correlated with the identification of a modified OASA1 protein containing 3-nitroTyr³⁰² residue. The essential role of the Tyr³⁰² residue for the catalytic activity was further demonstrated by the loss of OASTL activity of a Y302A-mutated version of OASA1. Inhibition caused by Tyr³⁰² nitration on OASA1 activity seems to be due to a drastically reduced O-acetylserine substrate binding to the nitrated protein, and also to reduced stabilization of the pyridoxal-5'-phosphate cofactor through hydrogen bonds. This is the first report identifying a Tyr nitration site of a plant protein with functional effect and the first post-translational modification identified in OASA1 enzyme.

Sulfur is an essential nutrient for all living organisms as it is a component of the amino acids cysteine and methionine required for protein synthesis. Moreover, a major determinant in plant cellular redox control such as glutathione (GSH) also contained sulfur. Most plant sulfur-containing compounds, including GSH, are derived from Cys, which is the final product of the primary sulfate assimilation pathway. The Cys bio-

synthetic pathway involves two sequential reactions catalyzed by Ser acetyltransferase (SAT),⁴ which synthesizes the intermediary product, O-acetyl-Ser (OAS), from acetyl-CoA and Ser, and O-acetyl-Ser(thiol)lyase (OASTL), which incorporates sulfide, coming from the assimilatory reduction of sulfate, to OAS producing Cys. This reaction requires pyridoxal phosphate (PLP) as cofactor. There are nine genes coding for different isoforms of OASTL in the *Arabidopsis* genome (1). The most abundant OASTL transcripts correspond to the cytosolic OASA1, the plastidial OASB, and the mitochondrial OASC isoforms. Analysis of null alleles of different SAT and OASTL genes together with subcellular metabolite distributions in *A. thaliana* have recently shown that cysteine is predominantly formed in the cytosol, while OAS is produced in the mitochondria (2–6). The major cytosolic OASTL isoform and main responsible for cysteine biosynthesis, OASA1, is essential for heavy metal tolerance as its overexpression is sufficient to confer tolerance to elevated cadmium concentrations (7–9). By contrast, the mutant *oas1.1* shows sensitivity to heavy metals but it is due to a constitutively reduced capacity to eliminate reactive oxygen species (ROS) under non-stressed conditions (9).

The uptake and assimilation of sulfate is strongly regulated by diverse regulatory mechanisms (for a recent review, see Ref. 10). Some components of the pathway are specifically regulated at the transcriptional level in plants, mainly the sulfate uptake and the reduction of 5'-adenylsulfate (APS). It has been characterized that OASA1 is regulated at the transcriptional level in different abiotic stresses such as salinity and the presence of heavy metal (7, 11). Besides, SAT and OASTL form the hetero-oligomeric cysteine synthase complex in such a way that SAT requires binding to OASTL for full activity, while bound OASTL becomes inactivated (12). It has been proposed this complex acting as a sensor of the sulfur status of the plant. Moreover, the activity of the cysteine synthase complex is also regulated at the level of the rate-limiting step catalyzed by SAT through cysteine-mediated inhibition of this enzyme, although depending on subcellular local-

* This work was supported by Grants BIO2008-00839 and CONSOLIDER TRANSPLANTA CSD2007-00057 (to J. L.) and BIO2010-15201 (to C. G.).

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Recipient of JAE program fellowship support.

³ To whom correspondence should be addressed: Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, CSIC-Universidad Politécnica de Valencia, CPI Ed. 8E, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain. Tel.: 34-963877882; Fax: 34-963877859; E-mail: jleon@ibmcp.upv.es.

⁴ The abbreviations used are: SAT, serine acetyltransferase; APS, 5'-adenylsulfate; APR, adenosine 5'-phosphosulfate reductase; CE, crude extract; IP, immunoprecipitate; LC-MS/MS, liquid chromatography tandem mass spectrometry; MS, Murashige and Skoog medium; NO, nitric oxide; OAS, O-acetyl-Ser; OASTL, O-acetylserine(thiol)lyase; PLP, pyridoxal-5'-phosphate; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride; ROS, reactive oxygen species; SIN-1, 3-morpholiniosydnonimine hydrochloride; Sup, supernatant; TCA, trichloroacetic acid.

ization and plant species (13). Because cysteine biosynthesis requires the reduced sulfur in form of sulfide, which is exclusively produced through sulfate assimilatory pathway in plastids (14), the mitochondria provide the bulk of OAS (2), and the main site for Cys production is cytosol in *Arabidopsis*, an exchange of sulfide and OAS between subcellular compartments must be important in controlling the function of the enzyme components of the cysteine synthase complex.

Post-translational modification represents an increasingly interesting level of regulation of protein function in all living organisms. Among more than hundred different post-translational modifications characterized, those mediated by the action of nitric oxide (NO)-derived modifiers have attracted lately the attention of plant biology researchers. The most important post-translational modifications related to NO action are S-nitrosylation of Cys (15) and nitration of Tyr residues (16). Nitration of Tyr residues under physiological conditions is mostly the result of protein interaction with the strong nitrating agent peroxynitrite, which is formed by the reaction of NO with superoxide anion (17). There is a second alternative mechanism of tyrosine nitration based on the generation of NO₂[•] radicals by various hemoperoxydases in the presence of hydrogen peroxide and nitrite (18). Whatsoever, the nitration of tyrosine residues is a selective process with respect to the proteins that are nitrated and the affected tyrosine residues in a given protein (19, 20).

Despite the well documented regulation of OASTL and SAT function at the protein-protein interaction level, to our knowledge nothing has been reported about post-translational regulation of those proteins. Here we address whether post-translational modification of OASA1 may modulate its activity. Peroxynitrite-mediated nitration of crude extracts and purified recombinant protein as well as plant treatments with peroxynitrite inhibited OASTL activity through nitration of tyrosine residues. Mass spectrometry analysis of nitrated recombinant OASA1 protein allowed the identification of nitrated Tyr³⁰², a catalytically essential amino acid residue that is close to the previously reported key Asn⁷⁷ in O-acetylserine binding site of OASA1 (21).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant Growth Conditions and Treatments—*A. thaliana* seeds of Col-0 wild type or different *oastl* mutants (9) were sown in moistened soil and grown under photoperiodic conditions (cycles of 16 h day and 8 h night for long days, at 22 °C and 20 °C). Plants were illuminated with 150 μE m⁻² s⁻¹ cool-white fluorescent lamps and grown in 60% relative humidity. Alternatively, surface sterilized seeds were germinated and grown in agar-supplemented Murashige and Skoog (MS) medium (Duchefa, Haarlem, The Netherlands).

Expression, Extraction, and Purification of Recombinant His-tagged OASA1—The complete cDNA of OASA1 was cloned in pDEST17 vector (Invitrogen) to express a hexahistidine-tagged version of OASA1 by transformation of BL21-AI *Escherichia coli* competent cells (Invitrogen). Site-directed mutagenesis to generate Y203A and Y302A versions of OASA1 was performed as previously reported (22) with slight modifications. For protein induction, cell cultures with an OD

of 0.4 were treated with 0.1% L-arabinose overnight at 22°. Recombinant protein production was checked by SDS-PAGE and Western blot analysis. Recombinant protein purification was carried out with the Ni-NTA purification system (Invitrogen) following manufacturers recommendations. His-tagged proteins were detected by Western blot with a polyclonal anti-His₆ antibody (Santa Cruz Biotechnology).

Protein Extraction, Immunoprecipitation, and Nitrating Treatments—For activity assays, around 100 mg of Col-0 and *oastl* mutant leaves were frozen and ground in liquid nitrogen and then extracted by adding extraction buffer (50 mM phosphate buffer, pH 7.5, 1 mM EDTA, 10 μM PLP, 0.5 mM PMSE, 1% (v/v) protease inhibitor mixture from Sigma) with or without 1 mM DTT, as described in each case, and briefly vortexing. Protein extracts were obtained by 13,000 × *g* centrifugation at 4 °C. For immunoprecipitation purposes, proteins were extracted in (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% (v/v) protease inhibitor mixture from Sigma) buffer. Protein extracts (1 mg) were precleared with 50 μl of protein A-agarose (EZView Sigma) for 8 h at 4 °C. The unbound fractions were incubated overnight with 0.1 μg of monoclonal anti-3-NY antibody (Cayman) at 4 °C. To recover 3-NY-containing proteins, 60 μl of protein A-agarose were added and incubated for 8 h at 4 °C. After extensive washing with extraction buffer, proteins were eluted at 95 °C with elution buffer (1% SDS, 100 mM DTT, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6) three times. Protein was quantified by Bradford's method (23).

Nitrating treatments on crude extracts or purified recombinant protein was performed by treatment with peroxynitrite generated from sodium nitrite plus hydrogen peroxide, or 3-morpholinodisodnonimine hydrochloride (SIN-1; Invitrogen) at the indicated concentrations, as previously reported (24, 25). *In planta* peroxynitrite treatments were performed by infiltrating leaves with SIN-1. Selective scavenging of peroxynitrite with epicatechin (26) was used to assess the specificity of protein nitration and not oxidation and the subsequent inhibition of OASTL activity.

Measurement of OASTL Activity—OASTL activity was measured using the method described previously (27) in protein extracts obtained as described above. Cysteine was determined by measuring optical density at 560 nm after the formation of a complex with ninyhydrin (28).

Western Blots—Protein extracts were separated by 10% SDS-PAGE, blotted onto nitrocellulose membrane, stained with Ponceau-S and probed with antibodies at the followed dilutions: monoclonal anti-3-NY (Cayman Chemicals) 1:1000, anti-His (Santa Cruz Biotechnology) 1:500, and custom-made polyclonal anti-recombinant OAS-A1 antibody (Biomedal S.L.) 1:10000. Secondary antibody was anti-mouse or anti-rabbit, for monoclonal or polyclonal primary antibodies, respectively, coupled to horseradish peroxidase (GE) at 1:10000 dilution, and ECL or ECL advance kit (GE) was used for immunoreactive protein detection.

MS Analysis—Samples were digested with sequencing grade trypsin, chymotrypsin, or the glutamic acid specific V8 protease (Promega) to improve peptide sequence coverage. Peptide separation by LC-MS/MS was performed using an Ultimate nano-LC system (LC Packings) and a QSTAR XL

Nitration of OASA1

Q-TOF hybrid mass spectrometer (MDS Sciex-Applied Biosystems). Samples (5 μ l) were delivered to the system using a FAMOS autosampler (LC Packings) at 40 μ l min⁻¹, and the peptides were trapped onto a PepMap C18 pre-column (5 mm, 300 m i.d.; LC Packings). Peptides were then eluted onto the PepMap C18 analytical column (15 cm, 75 m i.d.; LC Packings) at 200 nl min⁻¹ and separated using a 55 min gradient of 15–50% ACN (120 min for the mixtures). The QSTAR XL was operated in information-dependent acquisition mode, in which a 1-s TOF MS scan from 400–2000 m/z , was performed, followed by 3-s product ion scans from 65–2000 m/z on the three most intense doubly or triply charged ions. Database search on Swiss-Prot and NCBI Inr databases was performed using MASCOT search engine (Matrix-Science). Searches were done with the different proteases specificity allowing one missed cleavage and a tolerance on the mass measurement of 100 ppm in MS mode and 0.8 Da for MS/MS ions. Carbamidomethylation of Cys was used as a fixed modification and oxidation of Met, deamidation of Asn and Gln, and nitration of Tyr as variable modifications.

Structural Analysis of OASA1—Three-dimensional structure of OASA1 (At4g14880) was obtained from the Protein Data Bank (PDB code access 1Z7W). The structure was visualized with Yasara or PyMol software. The distance between residues in Angstroms (\AA) and the presence of hydrogen bonds were carried out with both programs with default settings.

RESULTS

Inhibition of OASTL Activity under Nitrating Conditions—Nitration of many different cellular acceptors including tyrosine residues of proteins is the result of either peroxynitrite action or NO_2^{\cdot} radicals attack on the corresponding targets. Peroxynitrite can be produced *in situ* by different donors including 3-morpholinopyridone (SIN-1). Similarly, NO_2^{\cdot} radicals can be produced *in vitro* by treatment with nitrite and hydrogen peroxide. We have tested whether nitrating treatments altered the OASTL activity of crude protein extracts from *Arabidopsis*. Fig. 1A shows that nitration with 1 mM nitrite/peroxide treatment led to a reduction of 81% in OASTL activity levels in wild-type extracts without DTT, and to around 37% in the presence of DTT, commonly used in the extraction buffer for OASTL activity (7–9). OASTL activity associated to OASA1 represented around 65–70% of total activity present in wild-type *Arabidopsis* crude extracts, as *oasa1.1* extracts had 30–35% of the activity present in wild-type plants (Fig. 1A) (9). Similar treatments on *oasa1.1* extracts led to a reduction of OASTL activity of 38 and 53% with and without DTT, respectively (Fig. 1A). The reduction of OASTL activity upon nitration must be due to inactivation of the enzyme as no changes in the OASA1 protein levels could be detected in any of the described treatments (Fig. 1A). Moreover, crude extracts from wild type and mutants of the most abundant OASTLs were also nitrated with 0.5 mM SIN-1 in the absence of DTT. Nitrated wild type, *oasb*, and *oasc* mutant extracts retained 22, 19, and 40%, respectively, of the OASTL activity present in non-nitrated controls (Fig. 1B). However, when nitrated the two allele mutants *oasa1.1* and

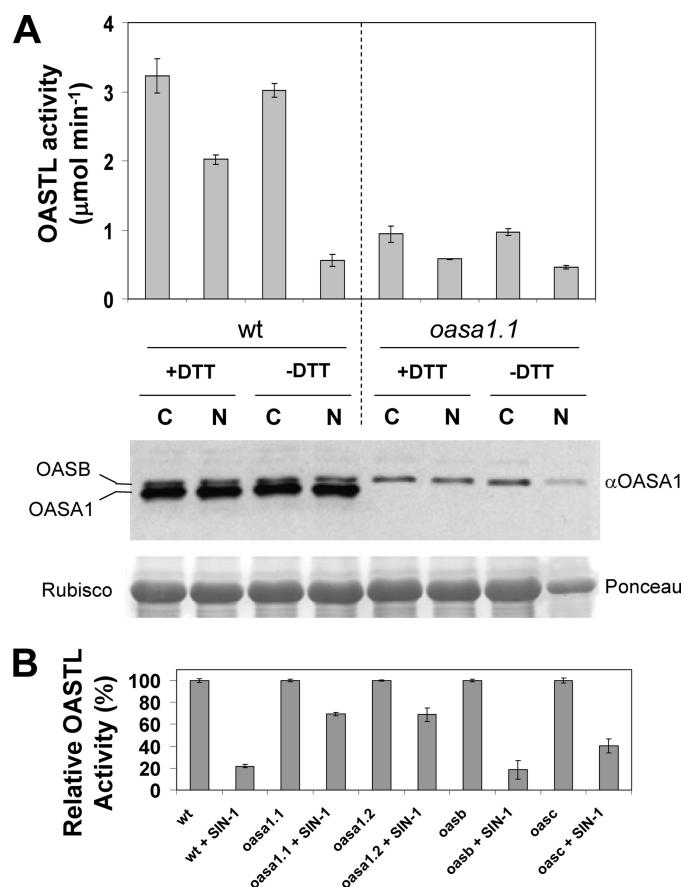


FIGURE 1. Effect of nitration on OASTL activity and OASA1 protein levels of wild type and mutant extracts. Total OASTL activity and OASA1 protein levels were analyzed in wild type and *oasa1.1* extracts obtained either in the presence (+DTT) or absence of (-DTT), and either non-nitrated as control (C) or nitrated (N) by treatment with 1 mM nitrite/hydrogen peroxide mixture for 1 h. Anti-OASA1 antibody crossreacted preferentially with OASA1 but showed also a weaker crossreaction with OASB isoform. Ponceau S staining of Rubisco is shown as loading control. OASTL activities are the mean values of three replicates \pm S.D. (A). OASTL activity in 0.5 mM SIN-1 treated extracts from wild type, *oasa1.1*, *oasa1.2*, *oasb*, and *oasc* mutants was measured after 1 h. After SIN-1 removal, activity was measured along with non-treated samples as controls. Values are the mean \pm S.D. of three replicates and are expressed relative to the corresponding non-nitrated control for every genotype (B).

oasa1.2, extracts retained 69% of the activity of its corresponding control (Fig. 1B). As shown with nitrite/peroxide-treated samples, SIN-1 treatment did not produce OASA1 protein degradation as tested by Western blot (data not shown). These data suggest that OASA1 is more sensitive to nitration-mediated inhibition than other OASTLs. Based on wild type and *oasa1* allele activities upon nitration, SIN-1, and nitrite/peroxide treatments inhibited 37 and 47% of the OASTL activity catalyzed by non OASA1 proteins (Table 1). In turn, OASA1 activity was 88 and 95% inhibited by both nitrating treatments (Table 1). Differential effect of nitration in inhibiting activity of OASA1 and other OASTLs moved us to analyze the effects of nitrating treatment on purified recombinant OASA1.

Samples of purified recombinant OASA1 obtained from *E. coli* expressing an N-terminal hexahistidine-tagged version were tested for OASTL activity after treatment with increasing concentrations of SIN-1. At 250 μM SIN-1 significant in-

TABLE 1

Sensitivity of OASA1 and other OASTL enzymes to nitration-mediated inhibition

OASTL activity associated to OASA1 was estimated by the difference between the total activity measured in wild-type seedlings and that measured in *oasa1.1* mutant. Nitration (N) was performed by treatments for 1 h with nitrite/peroxide or SIN-1, and no DTT as indicated. Untreated samples were used as controls (C). Values (nmol min⁻¹) are the mean of three replicates \pm standard deviation. Relative percentages of inhibition were calculated for OASA1 and the rest of OASTLs after nitration by both treatments.

	wt C	<i>oasa1.1</i> C	OASA1 C	Other OASTLs C	wt N	<i>oasa1.1</i> N	OASA1 N	Other OASTLs N	Inhibition OASA1	Inhibition other OASTLs
Nitrite/H ₂ O ₂	3020 \pm 99	970 \pm 49	2050	970	559 \pm 85	458 \pm 22	101	458	%	%
SIN-1	603 \pm 3	231 \pm 3	372	231	189 \pm 25	145 \pm 30	44	145	88	37

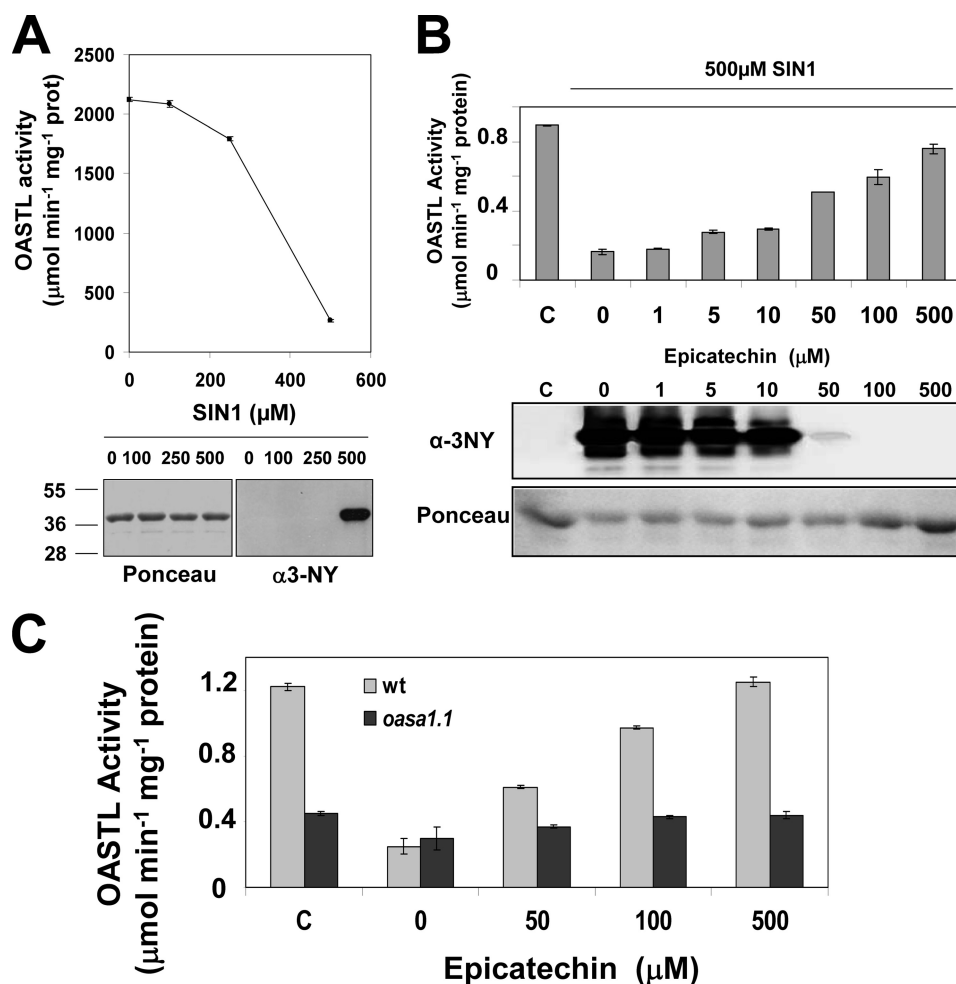


FIGURE 2. OASTL activity and nitrated OASA1 protein levels in purified OASA1 protein treated with increasing concentrations of the nitrating reagent SIN-1. Samples of 12 μg of His-tagged purified recombinant OASA1 protein were treated with the indicated concentration of SIN-1 for 1 h. After SIN-1 removal, OASTL activity, and total and nitrated protein levels were quantified (A). Activity and protein levels in samples treated with 0.5 mM SIN-1 or untreated as a control (c) and epicatechin at the indicated concentrations (B). Western blot with anti-3-nitroY antibody (α-3NY) and Ponceau staining as loading control are shown in panels A and B. Scavenging effect of epicatechin on the OASTL activity of SIN-1 (0.5 mM)-nitrated crude extracts from wild type (clear gray bars) and *oasa1.1* (dark gray bars) leaves (C). OASTL activities are the mean values of three replicates \pm S.D.

inhibition was already detected and 87% inhibition occurred at 500 μM (Fig. 2A). This percentage of inhibition is fully consistent with the estimation of inhibition of the OASTL activity corresponding to OASA1 detected in nitrated crude extracts (Table 1). Reduction of OASTL activity under these nitrating conditions was not due to degradation of protein as demonstrated by unaltered levels of proteins present in samples treated with increasing SIN-1 concentrations (Fig. 2B). Correlating with the strong inhibition of OASTL activity of OASA1 the corresponding Tyr-nitrated form of OASA1 was detected by Western blot using an anti-3-nitroY antibody (Fig. 2A). We

checked that inhibition of OASA1 activity was specifically associated to nitration and not to oxidation by using the peroxynitrite scavenger epicatechin (26). Increasing concentrations of epicatechin blocked SIN-1 mediated OASA1 nitration and the concomitant inhibition of OASTL activity (Fig. 2B). Moreover, the protective effect of epicatechin specifically on OASA1 was supported by the negligible effect caused by epicatechin on crude extracts from the *oasa1.1* mutant (Fig. 2C). **Identification of Tyr-nitration Site in Nitrated OASA1**—Nitrated and non-nitrated samples of purified OASA1 used for inhibition assays described above were further analyzed by

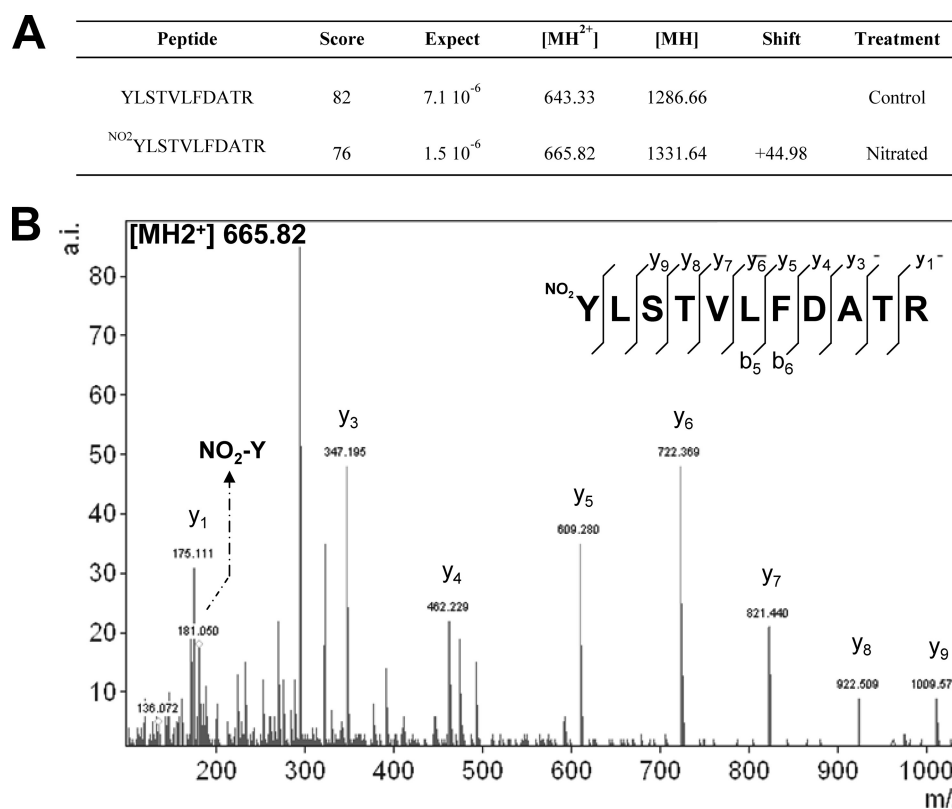


FIGURE 3. **Identification of a Tyr-nitration site in OASA1.** LC-MS/MS analysis of nitrated OASA1 and non-nitrated control allowed the identification of Y*³⁰²LSTVLFDA³⁰²TR peptide with nitrated or non-nitrated Tyr³⁰², respectively (A). The 22.49 Da shift of the double charged peptide indicates nitration of Tyr³⁰². Ion score (MASCOT) of the nitrated and non-nitrated peptides are shown. The MS spectra corresponding to Y(NO₂)LSTVLFDA³⁰²TR (Z = 2; m/z = 665.82) is shown (B). NO₂-Y indicates the presence of the nitrated tyrosine immonium ion mass in the LC-MS/MS spectra. Identified y and b ion series are pointed out.

mass spectrometry. Samples were digested with chymotrypsin or trypsin and analyzed by LC-MS/MS. Nitrated and non-nitrated samples were confirmed to be OASA1 with MASCOT scores (sequence coverages) of 725 (79%) and 1207 (88%) for trypsin-digested samples and 248 (24%) and 163 (40%) for chymotrypsin-digested samples, respectively. By LC-MS/MS, the nitrated peptide Y(NO₂)LSTVLFDA³⁰²TR (Z = 2; m/z = 665.828096; MASCOT Ion Score: 76; Expect: 1.5e-006; Monoisotopic mass of neutral peptide: 1329.6565) was identified with an increase mass of 44.99 Da compatible with acquisition of a nitro group in Tyr³⁰² (Fig. 3). OASA1 contains 7 Tyr residues distributed all along the amino acid sequence but most of them are located far away from the active site in the three-dimensional structure, except Tyr³⁰², which is directed to the active site (Fig. 4A). Tyr³⁰² is located at 4.7 Å from the Asn⁷⁷ (Fig. 4B), and forming a hydrogen bond with this amino acid (Fig. 4C), which has been previously reported to be essential for the activity (21). Asn⁷⁷ interacts with the O-acetylserine and SAT binding site and through hydrogen bond stabilizes pyridoxal phosphate (PLP) cofactor anchored by Lys⁴⁶ (21). Changes in spatial conformation of PLP and substrate microenvironment sites may also alter the efficiency of substrate binding to the active site. Upon binding of O-acetylserine to the active site of the enzyme, the substrate reacts with PLP yielding the α-aminoacrylate intermediate with an absorbance maximum at 470 nm (21, 29). We measured the increase in absorbance at 470 nm of purified OASA1 in the presence of increasing concentrations of O-acetylserine

and compared with the values obtained using the same amount of nitrated protein. The non-nitrated OASA1 increases its absorbance at 470 nm with increasing OAS concentration as expected. By contrast, no increase in absorbance was detected in nitrated OASA1 (Fig. 4D), suggesting that either binding of O-acetylserine is severely hindered by nitration of Tyr³⁰² or binding occurs but far enough from the PLP site to avoid productive interaction between substrate and cofactor.

We have further confirmed the essential role of Tyr³⁰² for OASTL activity of OASA1 by constructing a site-directed Y302A mutant version that retained less than 3% of the activity of the unmodified recombinant OASA1 protein (Fig. 5). This effect was specific for Tyr³⁰² as another mutated version Y203A, with a mutation in a Tyr residue that was not identified above as a functional target of nitration, retained 88% of the activity and responded to SIN-1-nitrating treatment with nitration of the mutated protein and consequent inhibition of the activity (Fig. 5) similarly to that observed for unmodified OASA1 (Fig. 2A).

In Vivo Detection of Nitrated OASA1—To test whether the nitration of Tyr detected in OASA1 *in vitro* could be physiologically relevant, we performed an immunoprecipitation assay of wild-type protein extracts with anti-3-nitroY antibody. The immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blot with an antibody against OASA1. Fig. 6A shows that a small fraction of the OASA1 protein present in the crude extract was detected in the immunoprecipitated fraction, sug-

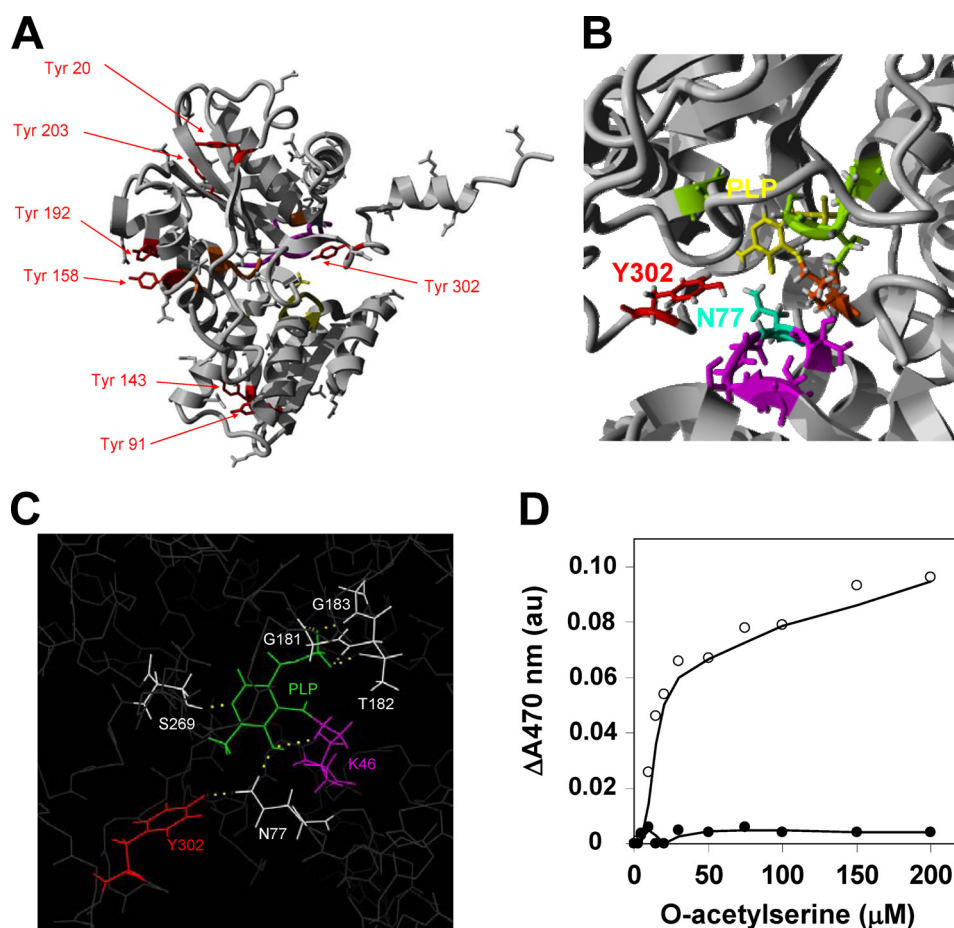


FIGURE 4. Three-dimensional model of OASA1 showing the position and potential interactions of Tyr residues. The conformation of OASA1 molecule showing the position of the seven Tyr residues (in red), the PLP binding site (in orange), O-acetylserine substrate binding site (in yellow) and SAT protein interaction site (in purple) are shown (A). Detail of the three-dimensional structure showing Tyr³⁰² and the Asn⁷⁷ residues at a 4.7 Å distance, the amino acid residues interacting with the Lys⁴⁶ (in orange)-linked PLP (in yellow) through hydrogen bonds (in green), and the OAS and SAT binding site (in purple) (B). *In silico* analysis, using PyMol software, of the potential hydrogen bonds (yellow dashed line) between amino acid residues surrounding PLP (C). Spectrophotometric detection of the reaction of OASA1-bound O-acetylserine with PLP to form an α -aminoacrylate intermediate. Samples of 200 μ g of non-nitrated (open circles) or nitrated (close circles) purified OASA1 were incubated with increasing concentrations of O-acetylserine as indicated, and the increase in the absorbance at 470 nm registered (D).

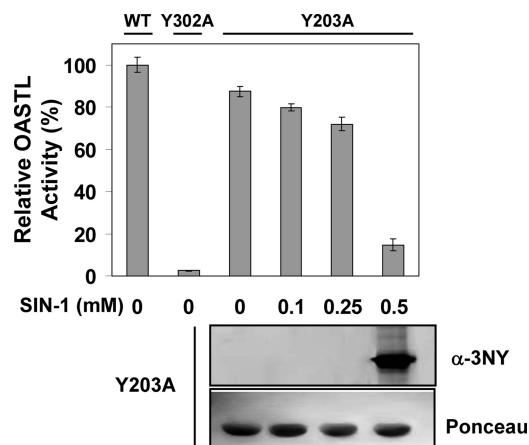


FIGURE 5. OASTL activity of mutated recombinant versions of OASA1. Purified samples of WT and mutated (Y302A and Y203A) versions of OASA1 were assayed for OASTL activity in the absence or presence of the indicated concentrations of SIN-1. OASTL activities are the mean values of three replicates \pm standard deviation. Western blot with anti-3nitroY antibody (α -3NY) and Ponceau staining as loading control (Ponceau) are shown for nitrated Y203A samples.

gesting that OASA1 may be Tyr-nitrated under physiological conditions in the absence of an exogenous nitration treatment. Despite efforts to identify *in vivo* Tyr-nitrated peptides we did not succeed, likely because of the low amounts of nitrated protein that are expected under physiological conditions. We then proceed to perform *in planta* nitration experiments by infiltrating leaves with SIN-1 and further protein extraction and OASTL activity analysis. Fig. 6B shows that by 90 min after treatment with 2 mM SIN-1, OASTL activity was 34% inhibited. Inhibition of activity correlated with detection of a significant fraction of nitrated OASA1 in SIN-1-treated leaf samples (Fig. 6B).

DISCUSSION

Cysteine biosynthesis is a crucial process because this amino acid is a constituent of proteins. Moreover, Cys is a precursor for a huge number of essential bio-molecules, such as many plant defense compounds formed in response to different environmental adverse conditions. Among them, glutathione is the most determinant molecule in controlling the redox state of the cells. The main site of cysteine biosynthesis

Nitration of OASA1

is the cytosol in *A. thaliana*, and therefore the major contributor to this synthesis is OASA1, but in its unbound form, when it is fully active. Association and dissociation of the cysteine synthase complex appears to be a level of regulation of cysteine biosynthesis in response to sulfur nutrition perturbations (12). The gene coding for OASA1 is also transcriptionally regulated by stress conditions (7, 11). Sulfate assimilation has been proposed to be extensively regulated by abiotic stress at the post-transcriptional level acting on plant adenosine 5'-phosphosulfate reductase (APR) through a complex network of multiple signals (30). However, besides transcriptional control of *OASTL* genes and interaction with SAT, no other level of regulation has been reported for OASTL func-

tion. A rapid way to modulate the function of OASTL may be through post-translational modification of the protein. However, to date no such modification has been identified in plants. Many stress activated responses have in common the participation of redox processes. Under oxidative, nitrosative, or nitrative conditions plant proteins can undergo several modifications including oxidation of Met, Cys, or Trp residues, nitration of Tyr, and nitrosylation of Cys (31). The main physiological nitrating molecules are the radicals NO_2^{\cdot} and ONOO^- , which are in turn produced from nitric oxide by further oxidation (32). Although NO_2^{\cdot} and ONOO^- are extremely reactive, their interactions with proteins do not lead to stochastic nitration of Tyr residues of the target protein. Factors determining the selectivity of Tyr nitration in proteins include the exposure of the aromatic ring to the surface of the protein, the location of the Tyr on a loop structure, its association with a neighboring negative charge, the proximity of the proteins to the site of generation of nitrating agents, their abundance and the local environments of the Tyr residues (19, 33). Moreover, the physiological significance of a regulatory mechanism based on the differential effect of a post-translationally modified protein relies on the conservation of that residue in others proteins with the same activity. This work reports the negative effect of Tyr³⁰² nitration on the OASTL activity of OASA1. This protein, which represents the main isoform in *Arabidopsis*, contains 7 Tyr residues spanning the whole primary sequence of the protein. Three-dimensional structure of OASA1 allowed the spatial location of different Tyr residues respect to the surface molecule and proximity to the catalytic site (Fig. 4). Table 2 summarizes the parameters defining the position and the microenvironment of every Tyr residue in OASA1 protein. Among seven Tyr residues of OASA1 only two, Tyr⁹¹ and Tyr³⁰², are located in loops, are conserved in the family of OASTL *Arabidopsis* proteins (3) and have both negatively and positively charged amino acids close enough (Table 2) to fulfill theoretical requirements for being targets of nitration (19, 33). In our approach using purified recombinant OASA1 protein nitrated *in vitro*, only Tyr³⁰² was identified as 3-nitroTyr (Fig. 3). The identification of Tyr³⁰² in nitrated OASA1 that lost most of its OASTL activity is consistent with the location of this residue very close to the active site of the enzyme (Fig. 4). In fact, Tyr³⁰² is only 4.7 Å from the Asn⁷⁷, which is a key amino acid for the efficient binding of the substrate *O*-acetylserine to OASA1 (21). Moreover, Asn⁷⁷ and other closely located amino acids including Ser²⁶⁹, Gly¹⁸¹, Gly¹⁸³, Thr¹⁸³, and

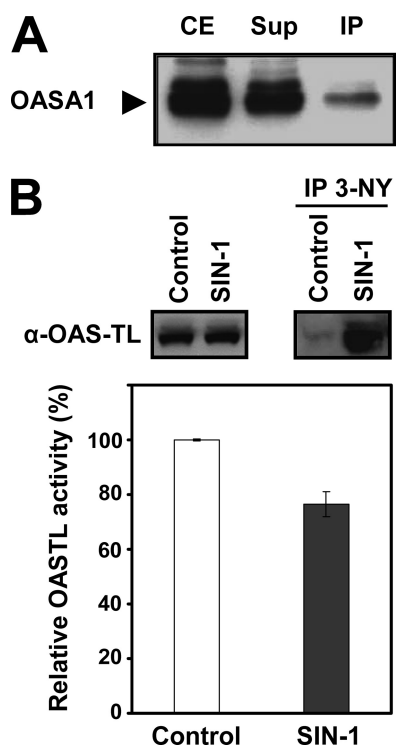


FIGURE 6. Analysis of *in vivo* Tyr-nitration of OASA1. Crude extracts from wild-type *A. thaliana* seedlings were immunoprecipitated with anti-3-nitroTyr antibody, and the presence of OASA1 in crude extract (CE) input and the resulting supernatant (Sup) and immunoprecipitate (IP) was analyzed by Western blot with anti-OASA1 antibody (A). Leaves were infiltrated with 2 mM SIN-1 for 90 min and then crude protein extracts were prepared for OASTL activity measurement (bottom panel) and for immunoprecipitation with 3-nitroTyr (IP 3-NY) antibodies. Western blot with anti-OASA1 (α -OASA1) was performed with protein extracts (left up panel) or IP (right up panel). OASTL activity values are the mean values of three replicates \pm standard deviation (B).

TABLE 2

Theoretical requirements of Tyr residues of OASA1 to be nitrated and *in silico* prediction of phosphorylation potential

Distances between residues were calculated from the three-dimensional structure model shown in Fig. 4 with the analysis performed with Yasara software as indicated under "Experimental Procedures." Prediction of phosphorylation potential was analyzed with the NetPhos 2.0 software from CBS.

Tyr	Conserved	Distance to Asp/Glu	Proximal basic amino acids in primary sequence	Location in loop	Tyr phosphorylation score
20	No	-	No	No	0.156
91	Yes	3.9 Å to Glu ⁵⁸	Lys ⁹²	Yes	0.043
143	Yes	8.1 Å to Asp ⁵⁶	No	No	0.050
158	No	4.3 Å to Glu ¹⁹⁵	His ¹⁵⁷	No	0.912 ^a
192	Yes	7.6 Å to Glu ¹⁹⁵	Lys ¹⁹¹	No	0.138
203	No	5.7 Å to Glu ²⁴²	Lys ²⁰¹	No	0.032
302	Yes	11.2 Å to Glu ³⁰⁰	Arg ³⁰¹	Yes	0.718 ^a

^a Significant score for Tyr phosphorylation site prediction.

Thr¹⁸⁵ are all involved in stabilizing PLP through hydrogen bonds with the phosphate group of the cofactor (21). It is tempting to propose that 3-nitroY³⁰² might introduce a perturbation in the microenvironment of PLP cofactor leading to a more restricted accessibility of the substrates to the catalytic site or to unproductive substrate binding. Productive *O*-acetylserine binding to OASA1 can be easily tested because the conversion to cysteine is mediated by the formation of an α -aminoacrylate intermediate with PLP that show a maximum of absorbance at 470 nm. An increase in A_{470} should be detected when appropriate *O*-acetylserine binding occurs and that is what we observed with purified OASA1 (Fig. 4C). However, a similar assay with the nitrated Tyr³⁰²-containing protein led to no increase in A_{470} (Fig. 4C), suggesting that modification of this amino acid either drastically hinder binding of the substrate to the enzyme, or the conformation of the active site has been altered enough to allow binding of the substrate but not close enough to PLP to form the α -aminoacrylate intermediate required to complete the transformation of *O*-acetylserine to cysteine. By contrast, Tyr⁹¹ is located in a surface loop far from the catalytic site of the enzyme (Fig. 3A) and thus, even if nitrated under certain conditions, less effect on catalytic activity should be expected. Because phosphorylation of Tyr is a post-translational modification with a big impact on general plant signaling (34), and particularly in hormone-derived signaling (35–37), nitration of Tyr may have not only an effect itself but may interfere also with phosphorylation, thus being doubly important in regulating function of the modified protein. Interestingly, prediction of Tyr phosphorylation sites in OASA1 gave a high score only to Tyr¹⁵⁸ and Tyr³⁰² (Table 2). The potential modification of Tyr³⁰² by either phosphorylation or nitration may represent also a new still unexplored regulatory mechanism in controlling OASA1 function. Moreover, it has been demonstrated that *O*-acetylserine and the C terminus of SAT compete for the same binding site (38), and the modification of Tyr³⁰² (Fig. 4B) may have influence on the formation or disruption of the Cys synthase complex. It is clear whatsoever that Tyr³⁰² is an essential residue for OASTL activity of OASA1 as demonstrated by the drastically reduced activity detected in a Y302A-mutated version of OASA1 (Fig. 5).

The fact that even under an extensive *in vitro* nitration assay on OASA1 only one of the Tyr residues of the protein has been identified as nitrated tells about the selectivity of the Tyr nitration process. Alternatively, the ratio of nitrated molecules to the non-nitrated protein molecules present in the sample may be very low thus making the MS-based identification difficult. This may explain why we could not identify the 3-nitro Tyr³⁰² modification *in vivo*. Nevertheless, crude extracts that were not exogenously nitrated should contain nitrated forms of OASA1, as immunoprecipitation with anti-3-nitroTyr antibody and further detection by Western blot with a specific anti-OASA1 antibody allowed the recovery and detection of OASA1 protein in the immunoprecipitated fraction (Fig. 6A). Because immunoprecipitation did not certainly lead to an OASA1 enrichment (Fig. 6A) compared with levels detected in the crude extracts, it is likely that the amount of nitrated forms *in vivo* are far below the levels of non-nitrated

form of the protein. We have anyway confirmed the *in vivo* effect of nitration on OASA1 by infiltration of leaves with SIN-1 and further protein and activity analysis.

Post-translational modification of OASA1 by Y-nitration may represent a rapid and efficient regulatory mechanism to control the biosynthesis of cysteine and glutathione in response to stress factors. Both abiotic and biotic stress factors lead often to the production of reactive oxygen and nitrogen species in the stressed plants. Simultaneous production of NO (39) and superoxide anion in cells of stressed plants correlates with the production of strong nitrating peroxyntirite, which can nitrate Tyr residues of proteins. Cytosolic OASA1 is the main OASTL enzyme so an efficient control of its activity is crucial for controlling cysteine homeostasis under stress conditions. Recently, new insights on the function of this enzyme as a determinant of the antioxidative capacity of the cytosol have been proposed (9). Heavy metals have been characterized as inducers of cysteine biosynthesis (7, 8), and also as activators of NO production in eukaryotic algae and plants (40, 41). NO-derived and peroxyntirite-mediated Tyr-nitration of OASA1 may represent a rapid mechanism to control the amplitude and duration of the responses triggered by heavy metals or any other stress factors in plants. Alternatively, this sort of rapid inactivation mechanism could be operative only in tissues undergoing the direct effect of the stress factor, thus allowing the execution of the stress-activated responses in the rest of the plant. This local inactivation mechanism of OASA1 could be useful to avoid an extra production of cysteine and/or glutathione, which may act as a strong scavenger of the reactive oxygen and nitrogen species in the stressed area, thus limiting the activation of downstream signaling processes required for an efficient stress-related response in the whole plant. Rapid and local inactivation of enzymes could represent not only an efficient mechanism to modulate responses to stress, but also as a way to restrict enzyme activities in certain plant organs or under specific developmental stages, what makes this post-translational modification a relevant level for the regulatory effects exerted by sulfur-containing compounds on development and responses to stress. The identification of the Tyr nitration site in OASA1 protein and the subsequent inhibition of enzyme activity represent, to our knowledge, the first report identifying a post-translational modification of plant OASTLs and the first identification and further characterization of a nitration site in a plant protein with strong impact on its function.

Acknowledgments—We thank Rafael Ruiz-Partida from Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) for helpful assistance with three dimensional protein structure analysis. Proteomic analysis was performed in the Laboratorio de Proteómica from CIPF.

REFERENCES

1. Wirtz, M., Droux, M., and Hell, R. (2004) *J. Exp. Bot.* **55**, 1785–1798
2. Haas, F. H., Heeg, C., Queiroz, R., Bauer, A., Wirtz, M., and Hell, R. (2008) *Plant Physiol.* **148**, 1055–1067
3. Heeg, C., Kruse, C., Jost, R., Gutensohn, M., Ruppert, T., Wirtz, M., and Hell, R. (2008) *Plant Cell* **20**, 168–185
4. Krueger, S., Niehl, A., Lopez Martin, M. C., Steinhauser, D., Donath, A.,

- Hildebrandt, T., Romero, L. C., Hoefgen, R., Gotor, C., and Hesse, H. (2009) *Plant Cell Environ.* **32**, 349–367
5. Watanabe, M., Kusano, M., Oikawa, A., Fukushima, A., Noji, M., and Saito, K. (2008) *Plant Physiol.* **146**, 310–320
 6. Watanabe, M., Mochida, K., Kato, T., Tabata, S., Yoshimoto, N., Noji, M., and Saito, K. (2008) *Plant Cell* **20**, 2484–2496
 7. Dominguez-Solis, J. R., Gutierrez-Alcalá, G., Vega, J. M., Romero, L. C., and Gotor, C. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 9297–9302
 8. Dominguez-Solis, J. R., López-Martin, M. C., Ager, F. J., Ynsa, M. D., Romero, L. C., and Gotor, C. (2004) *Plant Biotechnol. J.* **2**, 469–476
 9. López-Martin, M. C., Becana, M., Romero, L. C., and Gotor, C. (2008) *Plant Physiol.* **147**, 562–572
 10. Yi, H., Galant, A., Ravilious, G. E., Preuss, M. L., and Jez, J. M. (2010) *Mol. Plant* **3**, 269–279
 11. Barroso, C., Romero, L. C., Cejudo, F. J., Vega, J. M., and Gotor, C. (1999) *Plant Mol. Biol.* **40**, 729–736
 12. Wirtz, M., and Hell, R. (2006) *J. Plant Physiol.* **163**, 273–286
 13. Droux, M. (2004) *Photosynth. Res.* **79**, 331–348
 14. Leustek, T., Martin, M. N., Bick, J. A., and Davies, J. P. (2000) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**, 141–165
 15. Lindermayr, C., and Durner, J. (2009) *J. Proteomics* **73**, 1–9
 16. Corpas, F. J., Chaki, M., Letierrier, M., and Barroso, J. B. (2009) *Plant Signal. Behav.* **4**, 920–923
 17. Szabó, C., Ischiropoulos, H., and Radi, R. (2007) *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 662–680
 18. Thomas, D. D., Espey, M. G., Vitek, M. P., Miranda, K. M., and Wink, D. A. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 12691–12696
 19. Ischiropoulos, H. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**, 776–783
 20. Abello, N., Kerstjens, H. A., Postma, D. S., and Bischoff, R. (2009) *J. Proteome Res.* **8**, 3222–3238
 21. Bonner, E. R., Cahoon, R. E., Knapke, S. M., and Jez, J. M. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 38803–38813
 22. Atanassov, I. I., Atanassov, I. I., Etschells, J. P., and Turner, S. R. (2009) *Plant Methods* **5**, 14
 23. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
 24. Radi, R. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 4003–4008
 25. Zhang, Y., Lu, N., and Gao, Z. (2009) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 907–915
 26. Schroeder, P., Klotz, L. O. Buchczyk, D. P., Sadik, C. D. Schewe, T., and Sies, H. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 782–787
 27. Barroso, C., Vega, J. M., and Gotor, C. (1995) *FEBS Lett.* **363**, 1–5
 28. Gaitonde, M. K. (1967) *Biochem. J.* **104**, 627–633
 29. Tai, C. H., and Cook, P. F. (2001) *Acc. Chem. Res.* **34**, 49–59
 30. Koprivova, A., North, K. A., and Kopriva, S. (2008) *Plant Physiol.* **146**, 1408–1420
 31. Rinalducci, S., Murgiano, L., and Zolla, L. (2008) *J. Exp. Bot.* **59**, 3781–3801
 32. Durzan, D. J., and Pedroso, M. C. (2002) *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **19**, 293–337
 33. Souza, J. M., Daikhin, E., Yudkoff, M., Raman, C. S., and Ischiropoulos, H. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* **371**, 169–178
 34. de la Fuente van Bentem, S., and Hirt, H. (2009) *Trends Plant Sci.* **14**, 71–76
 35. Ghelis, T., Bolbach, G., Clodic, G., Habricot, Y., Miginiac, E., Sotta, B., and Jeannette, E. (2008) *Plant Physiol.* **148**, 1668–1680
 36. Oh, M. H., Wang, X., Kota, U., Goshe, M. B., Clouse, S. D., and Huber, S. C. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 658–663
 37. Kim, T. W., Guan, S., Sun, Y., Deng, Z., Tang, W., Shang, J. X., Sun, Y., Burlingame, A. L., and Wang, Z. Y. (2009) *Nat. Cell Biol.* **11**, 1254–1260
 38. Francois, J. A., Kumaran, S., and Jez, J. M. (2006) *Plant Cell* **18**, 3647–3655
 39. Lozano-Juste, J., and León, J. (2010) *Plant Physiol.* **152**, 891–903
 40. Zhang, L. P., Mehta, S. K., Liu, Z. P., and Yang, Z. M. (2008) *Plant Cell Physiol.* **49**, 411–419
 41. De Michele, R., Vurro, E., Rigo, C., Costa, A., Elviri, L., Di Valentin, M., Careri, M., Zottini, M., Sanità di Toppi, L., and Lo Schiavo, F. (2009) *Plant Physiol.* **150**, 217–228

Running head: NO regulates photomorphogenesis in Arabidopsis

Corresponding author: José León

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas
(CSIC-UPV), Ciudad Politécnica de la Innovación,
Edificio 8E, Ingeniero Fausto Elio s/n, 46022 Valencia,
Spain

Tel: +34 963877882; Fax: +34 963877859;

e-mail: jleon@ibmcp.upv.es

Research category: Development and Hormone Action

Title: Nitric Oxide Regulates DELLA Content and *PIF* Expression to Promote
Photomorphogenesis in *Arabidopsis*^[W].

Authors: Jorge Lozano-Juste and José León*

Address : Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV),
Ciudad Politécnica de la Innovación, Edificio 8E, Ingeniero Fausto Elio
s/n, 46022 Valencia, Spain

Footnotes:

¹ This work was supported by grants BIO2008-00839 and CSD2007-0057 CONSOLIDER TRANSPLANTA from Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain to J.L.

* Corresponding author, José León, e-mail: jleon@ibmcp.upv.es

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: José León (jleon@ibmcp.upv.es)

^[W] The online version of this article contains Web-only data.

The transition from etiolated to green seedlings involves a shift from hypocotyl growth promoting conditions to growth restraint. These changes occur through a complex light-driven process involving multiple and tightly coordinated hormonal signaling pathways. Nitric oxide (NO) has been lately characterized as a regulator of plant development interacting with hormone signaling. Here, we show that NO-deficient mutant hypocotyls are longer than those from wild type seedlings under red light but not under blue or far-red lights. Accordingly, exogenous treatment with the NO donor SNP and mutant plants with increased endogenous NO levels resulted in reduced hypocotyl length. In addition to increased hypocotyl elongation, NO-deficiency, led to increased anthocyanin levels and reduced PHYB content under red light, all processes governed by Phytochrome Interacting Factors (PIFs). NO-deficient plants showed accordingly an enhanced expression of *PIF3*, *PIF1* and *PIF4*. Moreover, exogenous NO increased the levels of the gibberellin (GA)-regulated DELLA proteins and shortened hypocotyls, likely through the negative regulation on GID1-SLY1 module. Consequently, NO-deficient seedlings displayed up-regulation of *SLY1*, defective DELLA accumulation and altered GA sensitivity, thus resulting in defective de-etiolation under red light. Accumulation of NO in wild type seedlings undergoing red light-triggered de-etiolation, and elevated levels of NO in the GA-deficient *gal-3* mutant in darkness, suggest a mutual NO-GA antagonism in controlling photomorphogenesis. PHYB-dependent NO production promotes photomorphogenesis by a GID1-GA-SLY1-mediated mechanism based on the coordinated repression of growth promoting *PIF* genes and the increase in the content of DELLA proteins.

Light controls plant development through a complex mechanism that is dependent on the quality, intensity, timing and duration of the incoming light. After embryonic development, germinated seeds can follow two main developmental programs depending on whether early post-germination occurs in darkness or light. The most common situation in nature is that germinated seeds grow initially skotomorphogenically till cotyledons emerge from the ground. De-etiolation program starts with the lost of the apical hook and the opening of cotyledons to display maximal surface for photosynthesis (Alabadí and Blázquez, 2009). The dark to light transition is accompanied by an extensive transcriptional re-programming that is mostly controlled by the function of two kinds of photoreceptors, phytochromes and cryptochromes, for red/far-red and UV/blue lights, respectively (Jiao et al., 2007). The common understanding sustains that photomorphogenesis is the default program in plant development in such a way that skotomorphogenesis is the result of the efficient repression of the photomorphogenic program. Repression is based on the action of COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1) E3 ubiquitin ligase (Osterlund et al., 1999), which targets several photomorphogenesis-promoting transcription factors for degradation including LAF1, HFR1, HY5 and HYH (Holm et al., 2002; Seo et al., 2003; Yang et al., 2005; Jang et al., 2005), but not others driving etiolated growth such as PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS PIF1, PIF3 and PIF4 (Castillon et al., 2007; Leivar et al., 2008b). To avoid skotomorphogenic growth in light, PIFs are rapidly phosphorylated and degraded by light-activated phytochromes (Shen et al., 2005; 2007; Al-Sady et al., 2006). The balance between the activities of both groups of transcription factors is thus determinant in the transition from skotomorphogenesis to photomorphogenesis (Huq 2006; Shin et al., 2009; Leivar et al., 2009). However, light is not the only factor controlling this developmental transition. Plant development is tightly subjected to hormonal control and this regulatory level represents an integration point between endogenous cues and stress-related environmental factors (Nemhauser 2008; Alabadí and Blázquez, 2009; Wolters and Jürgens, 2009). Among major hormonal growth regulators, it is well known that gibberellin (GA) signaling exerts an essential role in repressing photomorphogenesis under darkness (Alabadí et al., 2008; de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008). Repression is achieved through the GA-induced degradation of DELLA proteins, which are indeed negative modulators of PIF function (Achard et al., 2007; de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008; Alabadí et al., 2008), thus leading to hypocotyl elongation. The function of the GAs and its receptor GID1 on

DELLAs represent a regulatory module able to control plant growth under fluctuating environmental conditions (Harberd et al., 2009). This signaling module could allow growth arrest when plants face adverse environmental conditions, and it might function potentially as a link between stress-triggered responses and development (Achard et al., 2006; Achard et al., 2008; Navarro et al., 2008).

Many stress factors share the activation of rapid responses in the plant characterized by the production of reactive oxygen and nitrogen species. Some of these molecules have been characterized as potential primary modulators because of their ubiquity and strong reactivity. Among them, nitric oxide (NO) has been extensively characterized as a regulator of stress-related responses (Hong et al., 2008; Neill et al., 2008) and developmental processes too (He et al., 2004; Prado et al., 2004; Hu et al., 2005; López-Bucio et al., 2006). NO often exerts its regulatory activity in tight coordination with other regulators including salicylic acid (SA) (Mur et al., 2008), jasmonic acid (JA) (Saito et al., 2009), ABA (Saito et al., 2009) and ethylene (Ederli et al., 2006; Wang et al., 2009). It has been also reported that NO may function as a modulator of auxins on root development (Pagnussat et al., 2003; Guo et al., 2008; Lanteri et al., 2008). Conversely, NO production is activated by different hormones including ABA (Guo et al., 2003; Bright et al., 2006), cytokinins (Tun et al., 2008), auxins (Kolbert et al., 2008), JA (Huang et al., 2004) or SA (Zottini et al., 2007; Hao et al., 2010). We have recently demonstrated that production of NO through two biosynthetic pathways involving nitrate reductase (NR/NIA) and nitric oxide associated 1 (NOA1) activities is essential for the correct development of Arabidopsis, affecting to a wide range of processes including seed production, germination, vegetative growth, and the control of stomata closure (Lozano-Juste and León, 2010). NO effect on seed germination is exerted in tight coordination with ABA (Lozano-Juste and León, 2010), but the participation of others hormones such as GAs is also very likely. In fact, there are evidences about the interaction between GAs and NO in regulating germination (Beligni et al., 2002; Bethke et al., 2007). Interestingly, there are also some reports proposing that NO controls other aspects of development where GAs have an essential role including hypocotyl elongation, the acquisition of photomorphogenic traits (Beligni and Lamattina, 2000; Toñón et al., 2010) and the growth and re-orientation of pollen tubes (Prado et al., 2004). However, the underlying mechanism explaining how NO controls plant growth in connection with hormones remains to date unknown. Here, we show that NO counteracts GA signaling and thus promotes photomorphogenesis

through a regulatory mechanism affecting positively to DELLA protein accumulation and negatively to *PIFs* expression.

RESULTS

Increased Hypocotyl Elongation in Light-Grown NO-Deficient *nial,2noal-2* Mutant

Despite the delayed vegetative growth characteristic of *nial,2noal-2* seedlings (Lozano-Juste and León, 2010), we observed that their hypocotyls were unusually long, reaching a size that doubled that of wild-type seedlings five days after germination under white light (Fig. 1A). Enhanced hypocotyl elongation caused by NO deficiency was not evident under every growth condition; for instance, *nial,2noal-2* seedlings were as long as the wild type in darkness (Fig. 1A). Moreover, it was not either the result of a negative effect of NO on the growth of the whole seedling since the *nial,2noal-2* mutant displayed the opposite pattern in root elongation, with shorter roots than wild type seedlings in light but no significant differences in darkness (Fig. 1B). The differential effect on hypocotyl elongation and root growth in light but not in darkness suggests that *nial,2noal-2* mutant is fully able to repress photomorphogenesis in darkness, thus indicating NO is not required for it. However, it displayed a defect in light-induced de-etiolation, suggesting that NO is necessary for the repression of growth by light. To investigate whether NO would act in a specific branch of the light signalling pathway, we tested the ability of different light qualities to repress hypocotyl elongation in different NO-deficient mutant backgrounds. Figure 1C shows that blue and far-red lights were able to repress hypocotyl elongation in all NO-deficient genotypes to the same extent observed in wild type seedlings. However, under red light conditions, NO-deficient seedlings showed longer hypocotyls than wild type seedlings, being the effect mild in the backgrounds with partial NO deficiency, and additive in the triple mutant (Fig. 1C). Further characterization of the reduced inhibition of hypocotyl elongation of NO-deficient seedlings by red light showed that the differential effect was already significant by four days after germination. Up to 5 days after germination, when wild type hypocotyls started to slow growing, the triple *nial,2noal-2* hypocotyls are still growing at the maximal rate (Fig. S1A). The differential effect was also dependent on the fluence rate of red light, with significant differences in the inhibition of

hypocotyl elongation of *noal-2* and *nial,noal-2* mutants at fluence rate as low as 1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. S1B). At 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of red light, 40 % inhibition in wild type hypocotyl length was observed, whereas only 25 % was observed for *nialnia2* and less than 5 % for *noal-2* and the triple mutant (Fig. S1B). Importantly, differential hypocotyl elongation of *nial,2noal-2* vs Col-0 seems to be due to reduced NO content since both, exogenous application of NO by the NO donor sodium nitroprusside (SNP), and the *nox1* mutant plant with increased NO content (He et al., 2004), resulted in shorter hypocotyls (Fig. 1D, E), clearly showing that NO controls hypocotyl elongation.

PHYB Levels and Signaling are Altered in a NO-deficient Mutant

The reduced inhibition of hypocotyl elongation observed for NO-deficient seedlings only under red light conditions suggests that mutant seedlings are partially blind to red light, which may be caused by changes in the levels or activity of the PHYB photoreceptor, or by interference with PHYB signaling. If *nial,2noal-2* mutant had altered PHYB levels or it was impaired in PHYB function it would be expected to phenocopy most if not every phenotype displayed by *phyB* mutant seedlings. Table I summarizes some of the traits characteristic of the *phyB* mutant phenotype, and the correspondence in *nial,2noal-2* seedlings. Both mutants share overlapping traits, such as elongated hypocotyls under red light, pale green leaves with reduced chlorophyll content, low transpiration rates, accumulation of anthocyanins and reduced branching. However, the elongated petioles, long root hairs, elongated stems and early flowering phenotype under short day photoperiod, which are characteristic of *phyB* mutant, were not evident in *nial,2noal-2* mutant plants. In fact, the triple mutant is not impaired in PHYB production since its level in the NO-deficient mutant did not differ significantly from those in wild-type seedlings in darkness (Fig. 2A, B). However, a significant reduced content of PHYB was detected in *nial,2noal-2* when compared to wild type seedlings under red light (Fig. 2A, B). Nevertheless, *phyB* mutant were not altered in NO-triggered inhibition of hypocotyl elongation (Fig. 2C). All these observations suggest that NO-deficient plants might be altered in red light signaling not in PHYB protein activity and that NO acts downstream of PHYB in this process.

PIFs are Targets of the NO-triggered Inhibition of Hypocotyl Growth

Since *nial,2noal-2* seedlings contained around three-fold more anthocyanins than wild type seedlings in light (Fig. 3C), and given that many of the genes encoding the enzymes of flavonol and anthocyanin biosynthesis are targets of the PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3 (PIF3) transcription factor (Shin et al., 2007), NO might interfere with PHYB signaling through PIF3. As previously reported, PIF3, together with PIF4, negatively regulates PHYB content under red light conditions (Al-Sady et al., 2008; Leivar et al., 2008a), which is in fully agreement with the reduced levels of PHYB detected in *nial,2noal-2* seedlings only under red light (Fig. 2). Supporting this hypothesis, we have found that *nial,2noal-2* hypocotyls accumulate more *PIF3* transcript than wild type seedlings under red light (Fig. 3A), and this increase was also detected for other bHLH members of the *PIF* family such as *PIF1* and *PIF4* (Fig. 3A). Accordingly, the levels of these three *PIF* transcripts were significantly reduced upon treatment of wild type seedlings with SNP (Fig. 3A). Furthermore, as expected for plants with enhanced PIF function (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008), *nial,2noal-2* seedlings had an altered response to both GA₃ and the GA biosynthetic inhibitor paclobutrazol (PAC). Figure 3B shows that wild type and *nial,2noal-2* hypocotyls treated with 200 nM of the GA biosynthetic inhibitor paclobutrazol (PAC) were 70 % and 50 % shorter, respectively, than those from untreated seedlings. At lower PAC concentrations *nial,2noal-2* hypocotyls were always hyposensitive to PAC (Fig. 3C). Altered sensitivity to gibberellins was also observed in the *nial,2noal-2* mutant. Whereas *nial,2noal-2* hypocotyls reached their maximum length at GA₃ concentrations around 1 μM, wild type hypocotyls increased elongation to at least 5 μM GA₃ (Fig. 3D). On the other hand, the hypocotyls of seedlings overexpressing *PIF3* were significantly more sensitive (p-value < 0.05) than wild type seedlings to NO-mediated inhibition of hypocotyl elongation (Fig. 3F). By contrast, a quadruple *pif1pif3pif4pif5* (*pifQ*) mutant was almost completely insensitive to NO-triggered hypocotyl shortening (Fig. 3E, F). All these data strongly suggest that there is an enhanced PIF function in NO-deficient mutants and also that PIFs are targets of the NO-triggered inhibition of hypocotyl growth.

NO Promotes DELLA Protein Accumulation

PIFs activity is controlled by its association with DELLA proteins (Feng et al., 2008; de Lucas et al., 2008), which levels are regulated by GAs through proteasomal-

mediated degradation (Dill et al., 2004; Achard et al., 2007; Harberd et al., 2009). The altered sensitivity of *nial,2noal-2* seedlings to PAC and gibberellins could be also explained by reduced levels of DELLAs in the NO-deficient seedlings. To test the possible effect of NO on DELLA accumulation, transgenic seedlings expressing a GFP-tagged version of the DELLA protein RGA under its endogenous promoter (*pRGA::GFP-RGA*) were treated with SNP. Figure 4A shows that accordingly with GA promoting DELLA degradation (Dill et al., 2004; Achard and Genschik, 2009), GFP-RGA fluorescence was absent both in roots and hypocotyls from GA-treated seedlings but, in turn, GFP-RGA associated fluorescence, at nuclei, increased in NO exposed seedlings (Fig. 4A). The increased amount of GFP-RGA protein was also detected in whole seedlings by Western blot with anti-GFP antibodies (Fig. 4A). To check whether endogenous NO controls RGA levels we generated *pRGA::GFP-RGA* transgenic plants in the *nial,2noal-2* background. Figure 4B shows GFP-RGA fluorescence in different backgrounds after transferring seedlings from darkness to light. Fluorescence was detected as soon as 2 h after shift in hypocotyls of wild type background, when almost no fluorescence was detected in hypocotyls of the NO-deficient background plants (Fig. 4B). By 4 h after shift, GFP-RGA started to accumulate in *nial,2noal-2* background although its level was significantly lower than in the wild type background, suggesting that NO is necessary for the timely light-dependent GFP-RGA accumulation. By contrast, hypocotyls of *gal-3* background showed enhanced GFP-RGA fluorescence even in darkness (Fig. 4B) due to the lack of gibberellins in this mutant (Achard et al., 2007). Moreover, we have further checked that this effect was not specific for RGA and it is extended to all DELLAs. By using transgenic lines expressing TAP-tagged versions of the five DELLAs, we have analyzed the levels of DELLA proteins after treatment with the NO donor or GA₃. Western blots with anti-myc antibody of whole seedling extracts showed increased protein content of every DELLA in seedlings exposed to NO and decreased levels in GA-treated seedlings (Fig. 4C). Besides, pre-treatment with the NO donor and further application of GAs did not prevent GA-induced degradation of DELLAs (Fig. 4C), suggesting that NO is not modifying DELLA proteins turning them resistant to proteolysis. We confirmed this idea by following TAP-RGA degradation upon exposure to increasing concentrations of gibberellins in NO-treated and untreated seedlings. Figure 4D shows that TAP-RGA was efficiently degraded in NO-treated seedlings to levels similar to those detected in untreated control seedlings. In fact, the degradation of TAP-RGA by GA₃ seemed to be more efficient in NO-treated seedlings.

Then, we explored whether active degradation of DELLAs in NO-treated seedlings is also mediated by the ATP-consuming proteasome by a previously reported cell-free assay system (Wang et al., 2009). Figure 4E shows no significant degradation of TAP-RGA proteins in the absence of exogenously added ATP in untreated seedlings but degradation was observed in NO-treated seedlings, indicating that TAP-RGA in these extracts could be degraded by a proteasome-independent mechanism. However, both untreated and NO-treated TAP-RGAs were progressively degraded with time in ATP-treated extracts being the latter more susceptible to degradation (Fig. 4F). Moreover, the proteasome inhibitor MG132 retarded TAP-RGA degradation in untreated controls but only to a limited extent in NO-treated samples (Fig. 4F), suggesting that in NO-treated samples proteasome-independent hydrolysis also occurred. This alternative degradation mechanism could also explain the more efficient degradation of TAP-RGA in NO-treated seedling upon GA₃ treatment (Fig. 4D) or in the absence of ATP (Fig. 4E).

We have also checked that increased tagged DELLA levels are not the result of an enhancing effect of NO on 35S-driven expression, as *35S::TAP-GFP* seedlings showed similar levels of GFP in NO-treated and control untreated seedlings (Fig. S2). Moreover, *35S::TAP-GAIΔ17* and *35S::TAP-RGAΔ17* seedlings, expressing truncated versions of GAI and RGA resistant to GA-induced proteolysis, showed unaltered protein levels upon treatments (Fig. 4C). Increased DELLA levels upon NO treatment in *35S::TAP-DELLAs* transgenic plants were then not likely due to transcriptional activation of *DELLA* genes because the expression of these genes is under the control of the constitutive 35S promoter. Nevertheless, to check whether the enhanced accumulation of GFP-RGA in *pRGA::GFP-RGA* lines were due to the transcriptional control of *RGA* by NO, quantitative RT-PCR with RNA extracted from hypocotyls of wild type seedlings exposed to the NO donor SNP was performed. We did not find significant changes in the transcript levels of *DELLA* genes in response to NO (Fig. S3). Moreover, *DELLA* transcript levels were neither altered in the NO-deficient *nial,2noal-2* mutant compared to wild type seedlings (Fig. S3). Only *RGL1* transcripts were significantly changed in the NO-deficient mutant when compared to Col-0, and it was not certainly down-regulated as expected for a putative role of NO as a gene activator (Fig. S3).

Alternatively, the control of endogenous GA levels by NO might explain the accumulation of DELLAs in NO-treated seedlings. Regarding this, we have quantified the levels of GA biosynthesis and metabolism gene transcripts. Only *GA20ox3* gene was

down-regulated by NO treatment and up-regulated in the NO-deficient *nial,2noal-2* mutant (Fig. S4). These data suggest that NO might reduce the biosynthesis of active GAs through the specific effects on GA20ox3. However, this effect should be restricted to hypocotyl because no other GA-related phenotype was observed in NO-deficient seedlings.

NO induces DELLA accumulation by repressing *SLY1*

Wild type hypocotyls grown in red light under increasing NO concentrations were progressively shortened. At 0.5 mM SNP, hypocotyl length was below 10 % of those from untreated seedlings (Fig. 5A). Shortening of hypocotyls with increasing SNP concentrations correlated well with accumulation of all DELLAs, being GAI the less sensitive to NO (Fig. 5B). Besides, Figure 5C shows that the inhibition of hypocotyl elongation exerted by NO under red light conditions was partially dependent on DELLA function, as revealed by the slightly reduced response to NO detected in *rgagai* double mutant and the more pronounced insensitivity detected in the quadruple *4della*, lacking all DELLAs but RGL3 (Achard et al., 2006), and *5della* global knock-out mutants (Fig. 5C). In the concentration range from 0.1 to 0.5 mM SNP tested, the length of *4della* and *5della* hypocotyls were always from 20 to 35 % longer than wild type hypocotyls (Fig. 5C). These data suggest that NO inhibits hypocotyl growth mostly through DELLAs function. However, even at the lower NO donor concentration tested around a quarter of the effect was exerted via DELLA-independent mechanisms. These data point to DELLAs as the main but not only target for NO action in controlling growth, which is in agreement with the proposed regulation of *PIF1*, *PIF3* and *PIF4* expression by NO indicated above.

DELLA levels are controlled by GAs through a mechanism dependent on GA perception by *GID1*, ubiquitination by the ubiquitin ligase *SLY1* and further degradation by the proteasome. Whereas transcripts of genes coding for *GID1s* were not significantly affected by exogenous NO and only *GID1b* was down-regulated in *nial,2noal-2* seedlings (Fig. 6A), *SLY1* expression was significantly down-regulated by NO and up-regulated in the NO-deficient *nial,2noal-2* mutant (Fig. 6B). In agreement with an important role of *SLY1* in NO-mediated inhibition of hypocotyl elongation, the loss- and gain-of-function mutants of *SLY1*, *sly1-10* and *sly1-D*, were less and more sensitive to NO, respectively, than wild type seedlings (Fig. 6D, F). Again, the

insensitivity of *sly1-10* mutant to NO was not complete indicating the existence of another pathway for NO-regulation of hypocotyl elongation. Interestingly, although no transcriptional regulation of *GIDI* genes by NO was observed (Fig. 6A), the double *gid1a,c* mutant hypocotyls were less sensitive to NO-triggered shortening (Fig. 6C, E), thus suggesting NO action requires the activity of both GID1a and GID1c receptors.

NO Production Is Negatively Regulated by Gibberellins

The proposed role of NO on photomorphogenesis would require of physiological support to have a functional significance in the de-etiolation process. We have tested whether the transition from darkness to light is accompanied by the endogenous production of NO in Arabidopsis. Endogenous NO content analysis in dark-grown hypocotyls shifted to red light has been performed by using DAF-FM DA fluorescein that specifically detect NO. Figure 7 shows that NO-associated fluorescence was very low in dark-grown wild type hypocotyls. However, by one hour after shift to red light NO-associated fluorescence raised along the hypocotyls (Fig. 7A). However, the increased NO-associated fluorescence upon transition to red light was not detected either in the *nial,2noal-2* or in the *phyB* mutant hypocotyls (Fig. 7A). Interestingly, the GA-deficient mutant *gal-3* contained NO levels in darkness significantly higher than those detected in wild type plants (Fig. 7A), suggesting that gibberellins exert a negative control on NO production in hypocotyls. In addition, no increase in NO was detected in *gal-3* mutant upon shift to red light (Fig. 7A). As a further support for the negative regulation exerted by GAs on NO production, both wild type and the *gal-3* mutant displayed reduced NO-associated fluorescence in GA₃-treated seedlings compared to untreated controls (Fig. 7B). By contrast, the GA-insensitive *gai-1D* mutant did not change its NO content upon treatment with exogenously supplied gibberellins (Fig. 7B).

DISCUSSION

Oxygen and nitrogen reactive species have important roles on plant development being characteristic of developmental transitions (Gapper and Dolan, 2006; Tsukagoshi et al., 2010). These molecules have well documented roles regulating the adaptation to changes in temperature (Allakhverdiev et al., 2008) or light (Li et al., 2009), conditions that regulate developmental processes like seed germination and seedling establishment

(Bailly et al., 2008), hypocotyl elongation (Stavang et al., 2009), flowering (Ye et al., 2000), leaf senescence (Jing et al., 2008) and tuber formation (Agrawal et al., 2008). Among reactive species produced in plants in response to changes in their environment, NO has been the focus of increasing interest during the last years since it participates in both defensive (Romero-Puertas et al., 2004; Wendehenne et al., 2004; Hong et al., 2008) and developmental (He et al., 2004; López-Bucio et al., 2006) processes. It has been reported that the addition of a NO donor to etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings promotes de-etiolation and inhibits hypocotyl elongation (Beligni and Lamattina, 2000). In addition, a severe heat shock treatment (45°C) leads to a NO burst and the concomitant hypocotyl growth inhibition (Lee et al., 2008). Furthermore, *hot 5-1* mutant, impaired in S-nitrosogluthione reductase, which metabolizes the NO adduct S-nitrosogluthione, was markedly susceptible to hot temperatures, accumulated increased concentrations of NO and presented a de-etiolated phenotype in darkness (Lee et al., 2008), being the latter dependent of the increased NO accumulation of the mutant (Lee et al., 2008). Accordingly we have found that *nial,2noal-2* seedlings severely impaired in NO biosynthesis displayed elongated hypocotyls under red light conditions in accordance with the previously reported data for a mutant impaired in the regulation of nitrate reductase gene expression (Lin and Cheng, 1997). Moreover, as presented in this study, a mutant that accumulates increased NO levels presented shorter hypocotyls than the wild type under the same conditions. All these evidences point to a positive role of NO in promoting photomorphogenesis. However, nothing is known to date about the molecular mechanism by which NO is regulating photomorphogenesis. The observation that the triple mutant only showed elongated hypocotyls under red and not under far-red or blue light conditions, and because PHYB is the main photoreceptor mediating de-etiolation in red light (de Lucas et al., 2008), we first focused on PHYB as the target of NO. After comparing *phyB* mutant phenotypes with those of *nial,2noal-2* plants and importantly, once we notice that *nial,2noal-2* seedlings were able to produce wild type levels of PHYB protein in darkness and also that *phyB* mutant responds to NO as wild type plants, it seemed to us that PHYB-dependent signaling and not its function was impaired in *nial,2noal-2* seedlings. This hypothesis agrees with previously reported data supporting a role for the NO second messenger cGMP in controlling phytochrome signaling involved in some process such as chloroplast development (Bowler et al., 1994). It is noteworthy to mention that by comparing the effect of NO on hypocotyl elongation under dark and red light conditions, we observed

essentially similar responses (Fig. S5A-D). This suggests NO in darkness can modulate the same signaling components than in red light. There are several essential downstream components of PHYB in red light signaling, but maybe the interaction of PHYB with the PIF transcription factors is one of the earliest. The fact that *nia1,2noa1-2* presented longer hypocotyls and contained more anthocyanins than wild type seedlings pointed to an enhanced expression of *PIFs* genes, and particularly of *PIF3*, in this mutant. In addition, the reduced accumulation of PHYB protein in *nia1,2noa1-2* mutant under red light conditions fits well with an enhanced expression of *PIF3* in this mutant because the previously described negative regulation of PHYB levels by PIF3 and PIF4 (Leivar et al., 2008a). Therefore, it is reasonable that the reduction in PHYB protein levels of *nia1,2noa1-2* mutant in red light contribute significantly to the observed hypocotyl phenotype. We demonstrated that *PIF3* together with *PIF1* and *PIF4* were down-regulated by NO and up-regulated in NO-deficient seedlings. Interestingly, it has been described an interaction between HY5, HYH and PIF4 regulating the light-activation of *NR2/NIA2* expression in Arabidopsis (Jonassen et al., 2009). These data suggest the existence of a regulatory loop between NR/NIA and PIFs with potential as a mechanism to integrate light- and NO-related factors controlling plant development.

Although it has been previously proposed that NO regulate hypocotyl elongation (Beligni and Lamattina, 2000; Toñón et al., 2010), no mechanism has been reported to our knowledge for explaining the control of hypocotyl growth by NO. We have identified PIFs as important regulators of hypocotyl elongation phenotypes observed in NO-deficient seedlings. Furthermore, we found that *pifQ* mutant is almost insensitive to the inhibition of the hypocotyl elongation by NO. However, neither *pif3* nor *pif4* single mutants exhibited that phenotype, likely due to redundancy of PIF members in the NO control of hypocotyl length. Anyway, the trans-activating activity of PIFs is finely regulated through heterodimerisation (Hornitschek et al., 2009) and/or interaction with other proteins, such as DELLAs, inhibiting their activity (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008). The negative regulation of PIF function by NO (Fig. 3A) is accompanied by an increase in the accumulation of DELLA proteins (Fig. 4). It is well known that PIF3 and PIF4 physically interacts with members of the DELLA family such as RGA resulting in a reduction of the PIF3- and PIF4-triggered activation of their targets (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008; Gallego-Bartolomé et al., 2010). After darkness to light transition, the NO production leads to repressed *PIF* expression and enhanced DELLA accumulation, thus resulting in a very limited pool of trans-activating PIFs. So,

how is DELLA accumulation promoted by NO? First, we checked that NO-treated seedlings could degrade DELLA proteins in response to exogenously applied GAs (Fig. 4). Surprisingly, it seemed that NO-treated seedlings degraded DELLAs more efficiently in response to GAs than control treated ones. This mechanism, far from being unusual operates in other conditions where exaggerated DELLAs accumulation is achieved due to altered expression of important genes (Silverstone et al., 2007; Willige et al., 2007; Richter et al., 2010) or to inhibition of GA synthesis by PAC (Muangprom et al., 2005). After cell-free assays we can propose that this is due to a proteasome-independent mechanism (Fig. 4). Then, we explored the possibility of NO regulating transcription of genes coding for *DELLAs*. However, NO did not affect DELLA gene expression either in NO-deficient mutants or after NO-treatment of wild type plants (Fig. S3). Eventually, NO might be controlling GA biosynthesis or catabolism. After an extensive analysis of the expression of *GA20oxidase* and *GA3oxidase* biosynthetic genes as well as *GA2oxidase* catabolic genes, only *GA20ox3* fulfill the criteria to be considered a potential target of NO in controlling GA production, as it was down-regulated upon exogenous NO treatment and up-regulated in the NO-deficient triple mutant (Fig. S4). Nevertheless, we anticipate that changes in GA-biosynthetic or catabolic gene expression in NO-treated or NO-deficient plants, if any, should be restricted to an organ, tissue or limited number of cells, but certainly not to the whole seedling. *nial,2noal-2* plants did not show any general phenotype characteristic of GA overproducers, but on the contrary, it had small shoots and it produced seeds with low germination potential and increased dormancy (Lozano-Juste and León, 2010). An increase in GA levels specifically in the elongation zone of the hypocotyls might explain the phenotype of long hypocotyls of NO-deficient seedlings in red light, but this is technically difficult and new methodologies or sensor tools should be developed in the future to accomplish this purpose.

Despite potential fine regulatory functions of NO on GA levels, NO certainly regulates GA signaling through the control of DELLA abundance and function. Our data support a role for NO inducing the accumulation of DELLAs (Fig. 4) despite no transcriptional induction of DELLA genes was detected (Fig. S3). Because DELLA protein levels are regulated through ubiquitin-proteasome-dependent degradation by the *GID1-SCF^{SLY1}* complex, we next focus our attention on this module as a possible target of NO action. First, *GID1a,b* and *c* genes were not transcriptionally regulated by NO. However, the *gid1a,c* mutant, affected in the *GID1* receptor isoforms which are more

involved in hypocotyl elongation (Griffiths et al., 2006; Stavang et al., 2009), showed a NO-resistant phenotype. Second, down-regulation of *SLY1* expression by NO and the up-regulation detected in the *nia1,2noa1-2* hypocotyls might explain well the control of DELLA accumulation by NO. Moreover, the loss-of-function mutant *sly1-10* was partially insensitive in the inhibition of hypocotyl elongation by NO under red light (Fig. 6D,F). In contrast to short hypocotyl phenotype of *sly1-10*, we have not found an altered hypocotyl length in *sly1-D* mutant seedlings under red light (Fig. 6D, F), thus suggesting the previously reported enhanced DELLA degradation by SLY1-D protein in roots (Fu et al., 2004) is not functional in the regulation of hypocotyl length under red light conditions. Besides, *sly1-D* mutant seedlings responded unexpectedly stronger than wild type seedlings to NO-triggered hypocotyl shortening (Fig. 6D, F). It has been proposed that the SLY1-D protein interact more efficiently than SLY1 with DELLAs, and also that the interaction is increased by DELLA phosphorylation (Fu et al., 2004). In addition to the transcriptional regulation of *SLY1* gene by NO described in this work, we can not rule out interferences of NO in SLY1-DELLA interaction or even NO-mediated modifications of any of the components of the GA perception and signaling complex.

The fact that mutants in DELLA proteins, the GID1 receptor or the SLY1 F-Box behaves as partially insensitive to NO, strongly suggest that the GID1-DELLA-SLY1 complex is a target of NO in the control of hypocotyl length. Interestingly, *sly1-10* mutant responded differentially to NO-triggered hypocotyl shortening under dark and red light conditions (Fig. 6D, F and Fig. S5E). Wild type response to NO of *sly1-10* mutant in darkness suggests that transcriptional control of *SLY1* by NO is mainly functional in light. This also points to PIFs as important targets of NO in darkness. Moreover, *pifQ* mutant is almost completely insensitive to NO, thus suggesting PIF proteins should have a pivotal role in the negative regulation exerted by NO on basic GA signaling module. Furthermore, negative functional interaction between NO and GAs in controlling photomorphogenesis is somehow potentiated by the reciprocal negative effect of GAs on NO production as demonstrated by the enhanced NO content, which can be reverted by GA₃ application, in the GA-deficient *gal-3* mutant.

A model integrating the putative function of NO, GAs, DELLA and PIF proteins in controlling photomorphogenesis can be depicted as shown in Figure 8. Darkness to light transition leads to increase levels of NO and decrease of GAs, which in turn would lead to a rapid increase in DELLA content as a result of less GID1-GA-DELLA-SLY1

functional interactions. The large pool of DELLA protein would associate to transcription factors, such as PIFs, whose transcription has been nevertheless repressed by NO. DELLAs acting as efficient scavengers of the free form of those transcription factors would lead to the arrest of hypocotyl growth among other processes characteristics of photomorphogenesis. In the *nia1,2noa1-2* mutant, which is severely impaired in NO biosynthesis, dark to light transition leads to a deficient production of NO and, therefore, to a loss of NO-mediated repression of *PIFs*. Simultaneously, ubiquitination by SLY1 and further degradation of DELLAs may be enhanced under low NO conditions, thus leading to a decrease in DELLA content. As a result, the enlarged pool of free PIFs and/or their enhanced performance in *nia1,2noa1-2* seedlings, would be responsible for a partially etiolated phenotype under light conditions.

METHODS

Plan Material and Treatments

Arabidopsis thaliana accession Col-0 was the wild type control of *nia1nia2*, *noa1-2*, *nia1,2noa1-2*, *gid1a,b*, *gid1a,c*, *gid1b,c*, *pif3-3*, *pif4-2* and *pifQ* mutants. The single *gal-3*, *gai-1D*, *sly1-10*, *sly1-D*, double *rga-24 gai-t6*, quadruple *4della* and quintuple *5della* mutants and the transgenic plants, *35S::TAP-RGA*, *35S::TAP-GAI*, *35S::TAP-RGL1*, *35S::TAP-RGL2*, *35S::TAP-RGL3*, *35S::TAP-RGAI17*, *35S::TAP-GAI17* and *pRGA::GFP-RGA* were used along with its *Ler* wild type background accession. Seeds were surface sterilized with 30 % bleach and 0.01 % Tween-20, washed extensively with miliQ sterile water and sown in MS media supplemented with 0.8 % agar and 1 % sucrose. After 3 days of stratification at 4 °C, germination was synchronized by 3 hours of illumination with white light and subsequent incubation in the dark for 22 hours before transfer to the different growth conditions. White-light-grown seedlings were grown at 19°C to 23°C under fluorescent white light (fluence rate of 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) with a 16 h light/ 8 h dark photoperiod. For different light quality treatments, seedlings were grown under continuous blue, far red or red lights, provided by LEDs (Percival Sci., USA), at the indicated fluence rates (blue light: 16.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; far red light: 5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; red light 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

NO treatments were performed by photochemically mediated release of NO gas from a solution of sodium nitroprusside (SNP) (Fluka) always contained in internal vessels separated from MS medium, as reported previously (Lozano-Juste and León, 2010; Bethke et al., 2006). For gene expression or protein analysis pulse treatments (2 h) of SNP were done. To test the SNP effect on hypocotyl growth, SNP treatment was performed upon seeds were synchronized for germination and then maintained till the end point of the experiment. Freshly prepared GA₃ (Duchefa) and Paclobutrazol (PAC; Duchefa) were added at the indicated concentrations.

Seedlings were manipulated in darkness under dim (below 0.05 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) green safelight when required.

For the generation of *pRGA::GFP-RGA* in the *nia1,2noal-2* background, *pRGA::GFP-RGA* plants were crossed with *nia1,2noal-2* and F₂ and F₃ progenies PCR-genotyped for *nia1*, *nia2* and *noal-2* mutations as previously reported (Lozano-Juste and León, 2010), and selected with kanamycin for *pRGA::GFP-RGA* construct.

Hypocotyl Length Measurements

Seedlings were harvested from Petri dishes, laid on acetate sheet and scanned at 600 d.p.i. The resulting images were used for measuring hypocotyls length by using the Image J software. Values of hypocotyl length are the mean \pm standard error of three independent experiments (at least 20 seedlings per experiment were measured).

Protein Extraction and Western Blot

Protein extraction and quantification was performed as previously reported (Lozano-Juste et al., 2011). Samples (15 μg) were separated in 8 % polyacrylamide minigels (Bio-RAD; <http://www.bio-rad.com>) and transferred, when required, onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare España; <http://www.gehealthcare.com/eses/index.html>).

GFP-tagged proteins were detected with a 1:8000 dilution of a monoclonal anti-GFP antibody (Clontech) and TAP-tagged proteins were detected with a 1:10000 dilution of anti-C-Myc tag-peroxidase conjugate antibody (Sigma, USA). PHYB protein levels were detected with a 1:2500 dilution of anti-PHYB monoclonal antibody from Akira Nagatani lab. Loading controls were performed with anti-tubulin (Sigma) or anti-OAS A1 antibodies from Cecilia Gotor lab. The secondary antibody was anti-mouse

(1:10000) or anti-rabbit (1:10000) coupled to horseradish peroxidase and the further detection was performed with ECL or ECL Advance kit (GE Healthcare Spain; <http://www.gehealthcare.com/eses/index.html>). Images were captured with LAS3000 (Fuji) and quantified by using Image Gauge software (Fuji) where indicated.

Quantitative Real-Time PCR

Total RNA was isolated from hypocotyls of 5 day-old seedlings and further analyzed by quantitative RT-PCR techniques as described previously (Castillo and León, 2008). Transcript levels of *PIF1*, *PIF3*, *PIF4*, *RGA*, *GAI*, *RGL1*, *RGL2* and *RGL3* genes coding for PIF and DELLA proteins, respectively, as well as gibberellin biosynthetic and catabolic genes, were analyzed by quantitative RT-PCR using specific primers as previously reported (Frigerio et al., 2006; Alabadí et al., 2008). *GID1a*, *1b*, *1c* and *SLY1* were analyzed with primers as follows: qGID1a-F 5' gtagcggtagagaccgcga 3'; qGID1a-R 5' tcctcgggtaaaaacgctt 3'; qGID1b-F 5' ttacggtcaaggaactcggc 3'; qGID1b-R 5' tcgccctgacggttcttctt 3'; qGID1c-F 5' cggctcaaattctcgatctgg 3'; qGID1c-R 5' ttggcattgcagggac tttc 3'; qSLY1-F 5' gggcagaaccagctcagatc 3'; qSLY1-R 5' tcttcggaagccaccaagc 3'.

Anthocyanin Extraction and Quantification

Samples of 100 mg of fresh weight 5 day-old seedlings grown in darkness or white light were harvested and anthocyanin extracted and quantified on acidic methanol buffer overnight at 4°C as previously reported (Francis, 1982). Anthocyanin content is expressed as absorbance at 530 nm per mg of fresh weight.

NO and GFP Detection by Fluorescence and Confocal Microscopy

The endogenous levels of NO in hypocotyls were determined by seedling staining with 15 µM DAF-FM DA for 1 hour as described (Guo et al., 2003). NO-associated fluorescence was detected under UV-illumination with a fluorescence Nikon Eclipse microscope using unchanged parameters for every measurement. Fluorescence intensity was quantified as previously reported (Lozano-Juste and Leon, 2010).

Fluorescence from *pRGA::GFP-RGA* was detected using TCS SL confocal laser scanning microscope (Leica) with a 40X oil immersion objective lens. For GFP and

chloroplast autofluorescence, samples were excited with an Argon laser at 488 nm. The fluorescence emission was collected between 497-537 nm for GFP (rendered in green) and 579-647 nm band pass for chloroplast autofluorescence (rendered in red). TCS SL average projections of the Z-stack reconstructions (10 slices, 3 µm each) were taken and presented in Figure 4. Ten seedlings were analyzed per experiment in three independent experiments.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are especially grateful to Miguel A. Blázquez, David Alabadí and Oscar Lorenzo for helpful discussions and suggestions and also for comments on this manuscript and to Javier Gallego-Bartolomé and Verónica Arana for experimental advices. We are indebted to the following colleagues for sharing biological material as follows: Tai-Pin Sun for transgenic *pRGA::GFP-RGA*, *sly1-10* and *sly1-D* mutants; X.W. Deng for transgenic lines overexpressing the TAP-tagged version of DELLAs and the *5della* mutant; Peter Quail for *pif3 pif4* and *pifQ* mutants; Giltsu Choi for *PIF3OX* and Christian Fankhauser for *PIF4OX* transgenic lines; Steve Thomas for *gid1* double mutants; David Alabadí for *pRGA::GFP-RGA/gal-3*; Vicente Rubio for *35S::TAP-GFP* seeds and Akira Nagatani and Cecilia Gotor for the generous gift of anti-PHYB and anti-OAS A1 antibodies, respectively. We also thank Marisol Gascón for her technical assistance with confocal microscopy.

LITERATURE CITED

- Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, Van Der Straeten D, Peng J, Harberd NP** (2006) Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **311**:91–94
- Achard P, Liao L, Jiang C, Desnos T, Bartlett J, Fu X, Harberd NP** (2007) DELLAs contribute to plant photomorphogenesis. *Plant Physiol* **143**:1163-1172
- Achard P, Renou J-P, Berthomé R, Harberd NP and Genschik P** (2008) Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Curr Biol* **18**:656–660
- Achard P, Genschik P** (2009) Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *J Exp Bot* **60**:1085-1092

- Agrawal L, Chakraborty S, Jaiswal DK, Gupta S, Datta A, Chakraborty N** (2008) Comparative proteomics of tuber induction, development and maturation reveal the complexity of tuberization process in potato (*Solanum tuberosum* L.). *J Proteome Res* **7**:3803-3817
- Al-Sady B, Ni W, Kircher S, Schafer E, Quail PH** (2006). Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation as a prelude to proteasome-mediated degradation. *Mol Cell* **23**:439–446
- Al-Sady B, Kikis EA, Monte E, Quail PH** (2008) Mechanistic duality of transcription factor function in phytochrome signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:2232-2237
- Alabadí D, Blázquez MA** (2009) Molecular interactions between light and hormone signaling to control plant growth. *Plant Mol Biol* **69**:409-417
- Alabadí D, Gallego-Bartolomé J, Orlando L, García-Cárcel L, Rubio V, Martínez C, Frigerio M, Iglesias-Pedraz JM, Espinosa A, Deng XW, Blázquez MA** (2008) Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent Arabidopsis seedling de-etiolation in darkness. *Plant J* **53**:324-335
- Allakhverdiev SI, Kreslavski VD, Klimov VV, Los DA, Carpentier R, Mohanty P** (2008) Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynth Res* **98**:541-550
- Bailly C, El-Maarouf-Bouteau H, Corbineau F** (2008) From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C R Biol* **331**:806-814
- Beligni MV, Lamattina L** (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* **210**:215-221
- Beligni MV, Fath A, Bethke PC, Lamattina L, Jones RL** (2002) Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. *Plant Physiol* **129**: 1642-1650
- Bethke PC, Libourel IGL, Jones RL** (2006) Nitric oxide reduces seed dormancy in Arabidopsis. *J Exp Bot* **57**: 517–526
- Bethke PC, Libourel IG, Aoyama N, Chung YY, Still DW, Jones RL** (2007) The Arabidopsis aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Physiol* **143**:1173-1188

- Boccalandro HE, Rugnone ML, Moreno JE, Ploschuk EL, Serna L, Yanovsky MJ, Casal JJ** (2009) Phytochrome B enhances photosynthesis at the expense of water-use efficiency in Arabidopsis. *Plant Physiol* **150**:1083-1092
- Bowler C, Yamagata H, Neuhaus G, Chua NH** (1994) Phytochrome signal transduction pathways are regulated by reciprocal control mechanisms. *Genes Dev* **8**:2188-2202
- Bright J, Desikan R, Hancock JT, Weir IS, Neill SJ** (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J* **45**:113-122
- Castillo MC, León J** (2008) Expression of the beta-oxidation gene *3-ketoacyl-CoA thiolase 2 (KAT2)* is required for the timely onset of natural and dark-induced leaf senescence in Arabidopsis. *J Exp Bot* **59**: 2171–2179
- Castillon A, Shen H, Huq E** (2007) Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends Plant Sci* **12**:514-321.
- Correll MJ, Kiss JZ** (2005) The roles of phytochromes in elongation and gravitropism of roots. *Plant Cell Physiol* **46**:317-323
- de Lucas M, Davière JM, Rodríguez-Falcón M, Pontin M, Iglesias-Pedraz JM, Lorrain S, Fankhauser C, Blázquez MA, Titarenko E, Prat S** (2008) A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451**:480-484
- Dill A, Thomas SG, Hu J, Steber CM, Sun TP** (2004) The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* **16**:1392-1405
- Ederli L, Morettini R, Borgogni A, Wasternack C, Miersch O, Reale L, Ferranti F, Tosti N, Pasqualini S** (2006) Interaction between nitric oxide and ethylene in the induction of alternative oxidase in ozone-treated tobacco plants. *Plant Physiol* **142**:595-608
- Feng S, Martinez C, Gusmaroli G, Wang Y, Zhou J, Wang F, Chen L, Yu L, Iglesias-Pedraz JM, Kircher S, Schäfer E, Fu X, Fan LM, Deng XW** (2008) Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light and gibberellins. *Nature* **451**:475-479
- Francis FJ** (1982) Analysis of anthocyanins, in *Anthocyanins as Food Colors*, Ed by Markakis P, Academic Press, New York, pp 181–207

- Frigerio M, Alabadí D, Pérez-Gómez J, García-Cárcel L, Phillips AL, Hedden P, Blázquez MA** (2006) Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **142**: 553–563
- Fu X, Richards DE, Fleck B, Xie D, Burton N, Harberd NP** (2004) The *Arabidopsis* mutant *sleepy1gar2-1* protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCF^{SLY1} E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell* **16**:1406-18
- Gallego-Bartolomé J, Minguet EG, Marín JA, Prat S, Blázquez MA, Alabadí D** (2010) Transcriptional diversification and functional conservation between DELLA proteins in *Arabidopsis*. *Mol Biol Evol* **27**:1247-56.
- Gapper C, Dolan L** (2006) Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiol* **141**:341–345
- Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang ZL, Powers SJ, Gong F, Phillips AL, Hedden P, Sun TP, Thomas SG** (2006) Genetic characterization and functional analysis of the *GID1* gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**:3399-414
- Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM** (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* **302**:100–103
- Guo K, Xia K, Yang ZM** (2008) Regulation of tomato lateral root development by carbon monoxide and involvement in auxin and nitric oxide. *J Exp Bot* **59**:3443-3452
- Guo H, Yang H, Mockler T, Lin C** (1998) Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science* **279**: 1360-1363
- Hao F, Zhao S, Dong H, Zhang H, Sun L, Miao C** (2010) *Nia1* and *Nia2* are involved in exogenous salicylic acid-induced nitric oxide generation and stomatal closure in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol* **52**:298-307
- Harberd NP, Belfield E, Yasumura Y** (2009) The angiosperm gibberellin-*GID1*-DELLA growth regulatory mechanism: how an "inhibitor of an inhibitor" enables flexible response to fluctuating environments. *Plant Cell* **21**:1328-1339
- He Y, Tang RH, Hao Y, Stevens RD, Cook CW, Ahn SM, Jing L, Yang Z, Chen L, Guo F, Fiorani F, Jackson RB, Crawford NM, Pei ZM** (2004) Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* **305**:1968-1971

- Holm M, Ma LG, Qu LJ, Deng XW** (2002) Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in Arabidopsis. *Genes Dev* **16**:1247-1259
- Hong JK, Yun BW, Kang JG, Raja MU, Kwon E, Sorhagen K, Chu C, Wang Y, Loake GJ** (2008) Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance. *J Exp Bot* **59**:147-154
- Hornitschek P, Lorrain S, Zoete V, Michielin O, Fankhauser C** (2009) Inhibition of the shade avoidance response by formation of non-DNA binding bHLH heterodimers. *EMBO J* **28**:3893-3902
- Huang X, Stettmaier K, Michel C, Hutzler P, Mueller MJ, Durner J** (2004) Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in Arabidopsis thaliana. *Planta* **218**: 938-946
- Hu X, Neill SJ, Tang Z, Cal W** (2005) Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiol* **137**: 663-70
- Huq E** (2006) Degradation of negative regulators: a common theme in hormone and light signaling networks? *Trends Plant Sci* **11**:4-7
- Jang IC, Yang JY, Seo HS, Chua NH** (2005) HFR1 is targeted by COP1 E3 ligase for post-translational proteolysis during phytochrome A signaling. *Genes & Dev* **19**:593-602
- Jiao Y, Lau OS, Deng XW** (2007) Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat Rev Genet* **8**:217-230
- Jing HC, Hebel R, Oeljeklaus S, Sitek B, Stühler K, Meyer HE, Sturre MJ, Hille J, Warscheid B, Dijkwel PP** (2008) Early leaf senescence is associated with an altered cellular redox balance in Arabidopsis cpr5/old1 mutants. *Plant Biol (Stuttg)* **10 Suppl 1**:85-98
- Jonassen EM, Sandsmark BA, Lillo C** (2009) Unique status of NIA2 in nitrate assimilation: NIA2 expression is promoted by HY5/HYH and inhibited by PIF4. *Plant Signal Behav.* **4**: 1084-6
- Kolbert Z, Bartha B, Erdei L** (2008) Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in Arabidopsis thaliana root primordia. *J Plant Physiol* **165**:967-975
- Lanteri ML, Laxalt AM, Lamattina L** (2008) Nitric oxide triggers phosphatidic acid accumulation via phospholipase D during auxin-induced adventitious root formation in cucumber. *Plant Physiol* **147**:188-198

- Lee U, Wie C, Fernandez BO, Feelisch M, Vierling E** (2008) Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 786-802.
- Leivar P, Monte E, Al-Sady B, Carle C, Storer A, Alonso JM, Ecker JR, Quail PH** (2008a) The Arabidopsis phytochrome-interacting factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels. *Plant Cell* **20**:337-352
- Leivar P, Monte E, Oka Y, Liu T, Carle C, Castillon A, Huq E, Quail PH** (2008b) Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness. *Curr Biol* **18**:1815-1823
- Leivar P, Tepperman JM, Monte E, Calderon RH, Liu TL, Quail PH** (2009) Definition of early transcriptional circuitry involved in light-induced reversal of PIF-imposed repression of photomorphogenesis in young Arabidopsis seedlings. *Plant Cell* **21**:3535-3553
- Li Z, Wakao S, Fischer BB, Niyogi KK** (2009) Sensing and responding to excess light. *Annu Rev Plant Biol* **60**:239-260
- Lin Y, Cheng CL** (1997) A chlorate-resistant mutant defective in the regulation of nitrate reductase gene expression in Arabidopsis defines a new HY locus. *Plant Cell*. **9**: 21-35.
- López-Bucio J, Acevedo-Hernández G, Ramírez-Chávez E, Molina-Torres J, Herrera-Estrella L** (2006) Novel signals for plant development. *Curr Opin Plant Biol* **9**:523-529
- Lozano-Juste J, León J** (2010) Enhanced abscisic acid-mediated responses in *nia1nia2noa1-2* triple mutant impaired in NIA/NR- and AtNOA1-dependent nitric oxide biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiol* **152**:891-903
- Lozano-Juste J, Colom-Moreno R, León J** (2011) In vivo protein tyrosine nitration in Arabidopsis thaliana. *J. Exp. Bot.* doi 10.1093/jxb/err042
- Muangprom A, Thomas SG, Sun TP, Osborn TC** (2005) A novel dwarfing mutation in a green revolution gene from Brassica rapa. *Plant Physiol* **137**:931-938
- Mur LA, Laarhoven LJ, Harren FJ, Hall MA, Smith AR** (2008) Nitric oxide interacts with salicylate to regulate biphasic ethylene production during the hypersensitive response. *Plant Physiol* **148**:1537-1546

- Navarro L, Bari R, Achard P, Lisón P, Harberd NP, Jones JDG** (2008) DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signalling. *Curr Biol* **18**:650–655
- Neill S, Barros R, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Morris P, Ribeiro D, Wilson I** (2008) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J Exp Bot* **59**:165-176
- Nemhauser JL** (2008) Dawning of a new era: photomorphogenesis as an integrated molecular network. *Curr Opin Plant Biol* **11**:4-8
- Osterlund MT, Ang LH, Deng XW** (1999) The role of COP1 in repression of Arabidopsis photomorphogenic development. *Trends Cell Biol* **9**:113-118
- Pagnussat GC, Lanteri ML, Lamattina L** (2003) Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiol* **132**:1241-1248
- Prado AM, Porterfield DM, Feijó JA** (2004) Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development* **131**:2707-2714
- Reed JW, Nagpal P, Poole DS, Furuya M, Chory J** (1993) Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout Arabidopsis development. *Plant Cell* **5**: 147-157
- Richter R, Behringer C, Müller IK, Schwechheimer C** (2010) The GATA-type transcription factors GNC and GNL/CGA1 repress gibberellin signaling downstream from DELLA proteins and PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS. *Genes Dev* **24**:2093-2104
- Romero-Puertas MC, Perazzolli M, Zago ED, Delledonne M** (2004) Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol* **6**:795-803
- Saito N, Nakamura Y, Mori IC, Murata Y** (2009) Nitric oxide functions in both methyl jasmonate signaling and abscisic acid signaling in Arabidopsis guard cells. *Plant Signal Behav* **4**:119-120
- Seo HS, Yang JY, Ishikawa M, Bolle C, Ballesteros ML, Chua NH** (2003) LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature* **26**:995–999
- Shen Y, Khanna R, Carle CM, Quail PH** (2007) Phytochrome induces rapid PIF5 phosphorylation and degradation in response to red-light activation. *Plant Physiol* **145**:1043-51

- Shen H, Moon J, Huq E** (2005). PIF1 is regulated by light-mediated degradation through the ubiquitin-26S proteasome pathway to optimize photomorphogenesis of seedlings in *Arabidopsis*. *Plant J* **44**:1023–1035
- Shin J, Park E, Choi G** (2007) PIF3 regulates anthocyanin biosynthesis in an HY5-dependent manner with both factors directly binding anthocyanin biosynthetic gene promoters in *Arabidopsis*. *Plant J* **49**:981-994.
- Shin J, Kim K, Kang H, Zulfugarov IS, Bae G, Lee CH, Lee D, Choi G** (2009) Phytochromes promote seedling light responses by inhibiting four negatively-acting phytochrome-interacting factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:7660-7665
- Shinomura T, Nagatani A, Chory J, Furuya M** (1994) The induction of seed germination in *Arabidopsis thaliana* is regulated principally by phytochrome B, and secondarily by phytochrome A. *Plant Physiol* **104**: 363-371
- Silverstone AL, Tseng TS, Swain SM, Dill A, Jeong SY, Olszewski NE, Sun TP** (2007) Functional analysis of SPINDLY in gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **143**:987-1000
- Stavang JA, Gallego-Bartolomé J, Gómez MD, Yoshida S, Asami T, Olsen JE, García-Martínez JL, Alabadí D, Blázquez MA** (2009) Hormonal regulation of temperature-induced growth in *Arabidopsis*. *Plant J* **60**:589-601
- Toñón C, Cecilia Terrile M, José Iglesias M, Lamattina L, Casalengué C** (2010) Extracellular ATP, nitric oxide and superoxide act coordinately to regulate hypocotyl growth in etiolated *Arabidopsis* seedlings. *J Plant Physiol* **167**:540-546
- Tsukagoshi H, Busch W, Benfey PN** (2010) Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* **143**:606-616
- Tun NN, Livaja M, Kieber JJ, Scherer GF** (2008) Zeatin-induced nitric oxide (NO) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* mutants of NO biosynthesis and of two-component signaling genes. *New Phytol* **178**:515-531
- Wang H, Liang X, Wan Q, Wang X, Bi Y** (2009) Ethylene and nitric oxide are involved in maintaining ion homeostasis in *Arabidopsis* callus under salt stress. *Planta* **230**:293-307.
- Wendehenne D, Durner J, Klessig DF** (2004) Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr Opin Plant Biol* **7**:449-455
- Willige BC, Ghosh S, Nill C, Zourelidou M, Dohmann EM, Maier A, Schwechheimer C** (2007) The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates

the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of Arabidopsis. *Plant Cell* **19**:1209-1220

Wolters H, Jürgens G (2009) Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nat Rev Genet* **10**:305-317

Yang J, Lin R, Sullivan J, Hoecker U, Liu B, Xu L, Deng XW, Wang H (2005) Light regulates COP1-mediated degradation of HFR1, a transcription factor essential for light signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**:804–821

Ye Z, Rodriguez R, Tran A, Hoang H, de los Santos D, Brown S, Vellanoweth RL (2000) The developmental transition to flowering represses ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in Arabidopsis thaliana. *Plant Sci* **158**:115-127

Zottini M, Costa A, De Michele R, Ruzzene M, Carimi F, Lo Schiavo F (2007) Salicylic acid activates nitric oxide synthesis in Arabidopsis. *J Exp Bot* **58**:1397-1405

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Hypocotyl and root elongation of NO-deficient plants under different light conditions. (A) and (B) Hypocotyl and root length, respectively, of wild type and *nial,2noal-2* mutant under white light (Light) or darkness (Dark). Hypocotyl and root length was measured in 5 and 10 day-old seedlings, respectively. (C) Hypocotyl length was measured in 5 day-old seedlings grown under $16.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of blue light, $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of far-red light and $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of red light. (D) Hypocotyl length in untreated (gray bars) and NO-treated ($250 \mu\text{M}$ SNP; dark bars) Col-0 and *nial,2noal-2* seedlings. (E) Length of the hypocotyls of Col-0 and the NO overproducer *nox1* seedlings. Values are the mean \pm standard error of three independent experiments (at least 20 seedlings per experiment were measured). * and ** represent statistically significant differential values with $p < 0.005$ and $p < 0.001$, respectively, when compared mutant vs wild type under the same treatment conditions.

Figure 2. PHYB protein levels in wild type Col-0, NO-deficient *nial,2noal-2*, *phyA* and *phyB* mutants grown in darkness or red light. (A) Western blots with anti-PHYB antibodies of protein samples from representative hypocotyls of the indicated genotypes

grown for 3 days under darkness or $7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of red light. Western blots with anti-tubulin (TUB) are shown as loading control. (B) Quantification of the PHYB levels normalized to TUB and expressed relative to the levels of Col-0. Values are the mean of three independent experiments \pm standard deviation. (C) Relative hypocotyl length of untreated (black bars) and NO-treated ($250 \mu\text{M}$ SNP; gray bars) Col-0 and *phyB* seedlings under dark and red light conditions. Values are the mean \pm standard error of three independent experiments (at least 20 seedlings per experiment were measured). Asterisks represent statistically significant differential values with $p < 0.05$ when compared mutant vs wild type under the same treatment conditions.

Figure 3. Functional connection between NO, gibberellins and PIF proteins. (A) *PIF1*, *PIF3* and *PIF4* transcript levels in Col-0 or *nial,2noa1-2* hypocotyls and on wild type hypocotyls either treated with 1 mM SNP (NO donor) for 2 h or untreated as control. (B) Relative length of Col-0 and *nial,2noa1-2* hypocotyls (mean \pm standard error) in seedlings exposed to the indicated concentrations of PAC. (C) Anthocyanin levels in Col-0 and *nial,2noa1-2* seedlings under dark or white light conditions expressed in arbitrary units of absorbance at 530 nm. (D) Length of Col-0 and *nial,2noa1-2* hypocotyls (mean \pm standard error) treated with the indicated concentration of GA₃. (E) and (F) Total and relative length, respectively, of control untreated and SNP-treated hypocotyls in the indicated genotypes and concentrations. All the experiments were performed with seedlings grown under $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of red light unless otherwise mentioned. Values are the mean of three biological replicates \pm standard error. For hypocotyl length at least 20 seedlings per independent experiment were measured. The asterisks represent statistically significant differential values with at least $p < 0.05$ when compared mutant vs wild type for the same treatment conditions (A-D) or untreated vs treated sample in each genotype (E-F).

Figure 4. Effect of NO on DELLA protein accumulation. (A) GFP-RGA in *pRGA::GFP-RGA* roots and hypocotyls, either untreated (C, control) or treated for 2 h with $50 \mu\text{M}$ of GA₃ or $250 \mu\text{M}$ SNP as source of nitric oxide (NO), visualized by confocal microscopy. GFP-RGA levels and the loading control tubulin (TUB) were analyzed by Western blot. (B) GFP-RGA protein in hypocotyls of *pRGA::GFP-RGA* in wild type, *nial,2noa1-2* and *gal-3* backgrounds, at different times after shift from

darkness to red light, as indicated in the left bar of the panel. (C) TAP-tagged versions of every DELLA protein were used to analyze the levels of each protein in seedlings treated (+) or not (-) with 50 μM of GA_3 and/or 250 μM SNP (NO) for 2.5 h. TAP-DELLAs were detected with anti-MYC antibodies and the levels of tubulin (TUB) are shown as loading control. The values normalized with tubulin and relative to control untreated samples were quantified and the values shown in the bottom panel correspond to the mean of three independent experiments \pm standard deviation. Asterisks represent statistically significant differential values with at least $p < 0.05$ when compared treated vs untreated controls in each genotype. (D) GA-induced degradation of RGA in untreated (Control) and NO-treated (NO; as described in panel C) *35S-TAP-RGA* seedlings exposed to increasing GA_3 concentrations (0, 50, 100 and 200 μM). Values normalized to tubulin were quantified and shown in the bottom panel as the mean of three independent experiments \pm standard error. (E) and (F) Cell-free degradation assay of RGA in the absence (E) or presence (F) of ATP and the proteasome inhibitor MG132. Protein samples were incubated at room temperature for the indicated times and treatment conditions and detected with anti-MYC antibodies. Tubulin or O-acetylserine(thiol)lyase 1 (OAS) were detected as loading control (D-F). ATP and MG132 were used at 10 mM and 100 μM , respectively. The protein levels detected in Western blots of panel (E) and (F) were quantified and normalized to TUB or OAS content.

Figure 5. Effect of NO on hypocotyl elongation and DELLA content under red light. Hypocotyl length of wild type Ler (A), *rga-24gai-t6*, quadruple (*4della*) and quintuple (*5della*) DELLA mutants and its wild type (Ler) background (C) was measured after growing seedlings in the indicated SNP concentrations for 3 days. Values of hypocotyl length are the mean \pm standard error of three independent experiments (at least 20 seedlings per experiment were measured). Asterisks represent statistically significant differential values with at least $p < 0.05$ when compared hypocotyls of treated vs untreated wild type seedlings (A) or mutant vs wild type hypocotyls from different genotypes under the same treatment conditions (C). (B) TAP-DELLAs accumulation under the SNP concentrations shown in panel A were detected with anti-MYC antibodies and the loading controls of tubulin are included.

Figure 6. Functional connection between NO and the gibberellin signaling components GID1s and SLY1. (A) and (B) *GID1s* and *SLY1* transcript levels normalized to actin (ACT) in hypocotyls of untreated (Control) and 1 mM SNP (SNP) treated wild type seedlings as well as in the *nia1,2noa1-2* mutants and its wild type background Col-0. Values are the mean \pm standard error of three experiments. (C) and (E) Total and relative hypocotyls length, respectively, of different combination of double *gid1* mutants, in untreated (white bars) and 100 μ M SNP-treated (black bars) seedlings. (D) and (F) Total and relative hypocotyls length of Col-0 and the loss-of function mutant *sly1-10* and the gain-of-function mutant *sly1-D* at the SNP indicated concentrations. (C-F) Values of hypocotyl length are the mean \pm standard error of three independent experiments (at least 20 seedlings per experiment were measured). Asterisks represent statistically significant differential values with $p < 0.05$ when compared mutant vs wild type hypocotyls under the same treatment conditions (A, B, D, F) or treated vs untreated hypocotyls in each genotype (B, C, E).

Figure 7. NO levels in the wild type Col-0 and Ler, as well as in *nia1,2noa1-2*, *phyB*, *gal-3* and *gai-1D* mutant plants. (A) Endogenous NO was visualized with the cell-permeable DAF-FM DA fluorescein in seedlings grown in darkness for 4 days and 1 h after shift to red light (20 μ mol $m^{-2} s^{-1}$). (B) NO-related fluorescence in Ler, *gal-3* and *gai-1D* mutants in untrated (Control) and 50 μ M GA₃ treated seedlings for 2.5 h. Values are shown relative to untreated wild type levels. The right panel of A and panel B shows the quantification of three independent experiments as mean values of fluorescence (arbitrary units, a.u.) \pm standard error. Asterisks represent statistically significant differential values with $p < 0.05$ when compared to controls in darkness (A) or untreated (B).

Figure 8. Scheme integrating NO and GAs antagonist functions on the control of light regulated photomorphogenesis through the balance between DELLAs and PIFs.

Table I. Comparative phenotypical analysis of *phyB* and *nial,2noal-2* mutants

Trait	<i>phyB</i>	<i>nial,2noal-2</i>	Reference
Elongated hypocotyls	Yes	Yes	Reed et al., 1993
Long petioles	Yes	Yes	Reed et al., 1993
Pale leaves in light	Yes	Yes	Reed et al., 1993
Elongated stems	Yes	No	Reed et al., 1993
Reduced root elongation	Yes	Yes	Correll and Kiss, 2005
Long root hairs	Yes	No	Reed et al., 1993
Early flowering	Yes	No	Reed et al., 1993; Guo et al., 1998
Lower transpiration rate	Yes	Yes	Boccalandro et al., 2009
Reduced branching	Yes	Yes	Reed et al., 1993
Reduced seed germination	Yes	Yes	Shinomura et al., 1994

Traits analyzed in the cited references were compared to those reported for the *nial,2noal-2* mutant (Lozano-Juste and León, 2010).

Fig. 1

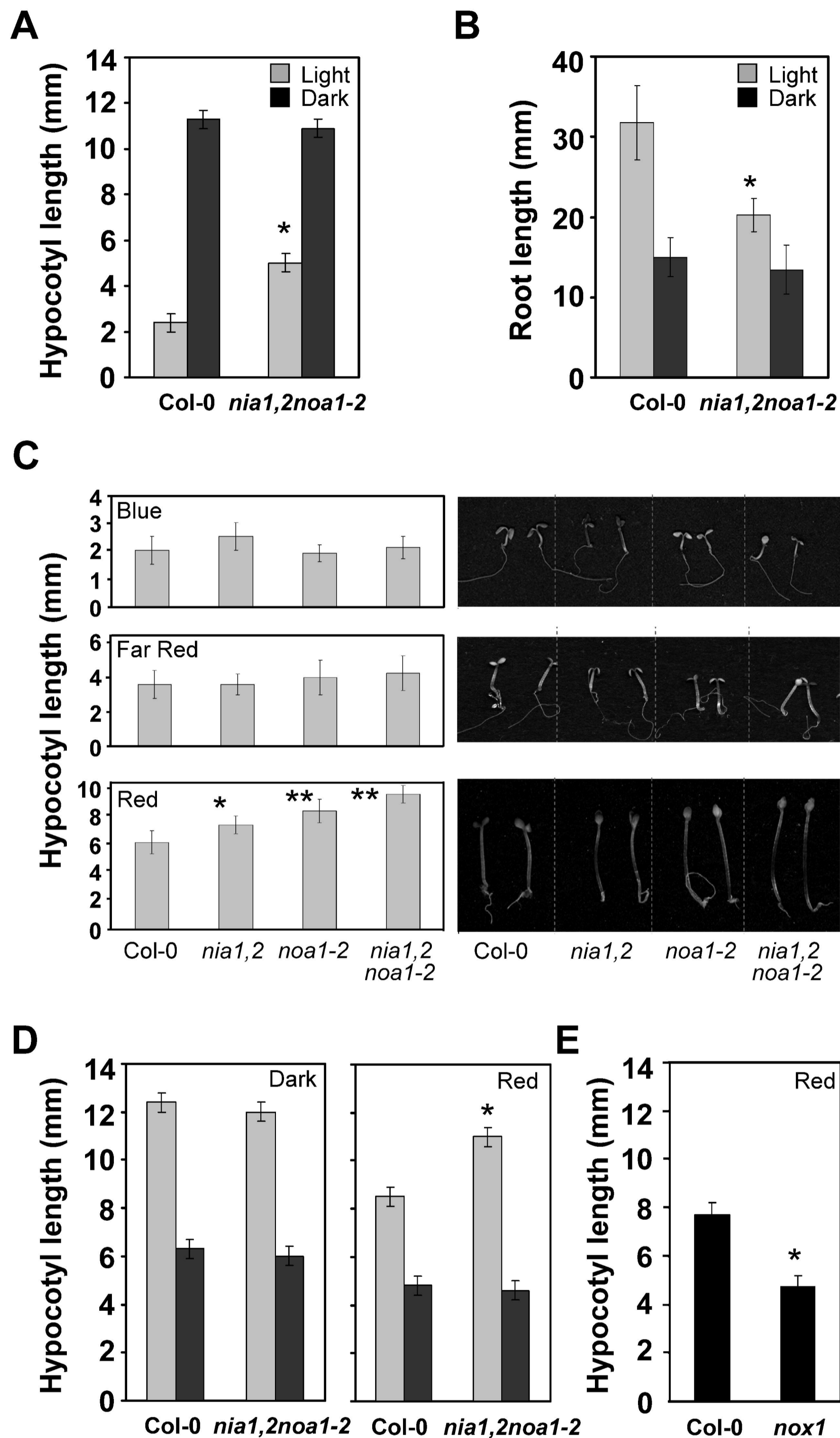


Figure 1. Hypocotyl and root elongation of NO-deficient plants under different light conditions. (A) and (B) Hypocotyl and root length, respectively, of wild type and *nia1,2noa1-2* mutant under white light (Light) or darkness (Dark). Hypocotyl and root length was measured in 5 and 10 day-old seedlings, respectively. (C) Hypocotyl length was measured in 5 day-old seedlings grown under $16.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of blue light, $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of far-red light and $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of red light. (D) Hypocotyl length in untreated (gray bars) and NO-treated ($250 \mu\text{M}$ SNP; dark bars) Col-0 and *nia1,2noa1-2* seedlings. (E) Length of the hypocotyls of Col-0 and the NO overproducer *nox1* seedlings. Values are the mean \pm standard error of three independent experiments (at least 20 seedlings per experiment were measured). * and ** represent statistically significant differential values with $p < 0.005$ and $p < 0.001$, respectively, when compared mutant vs wild type under the same treatment conditions.

Fig. 2

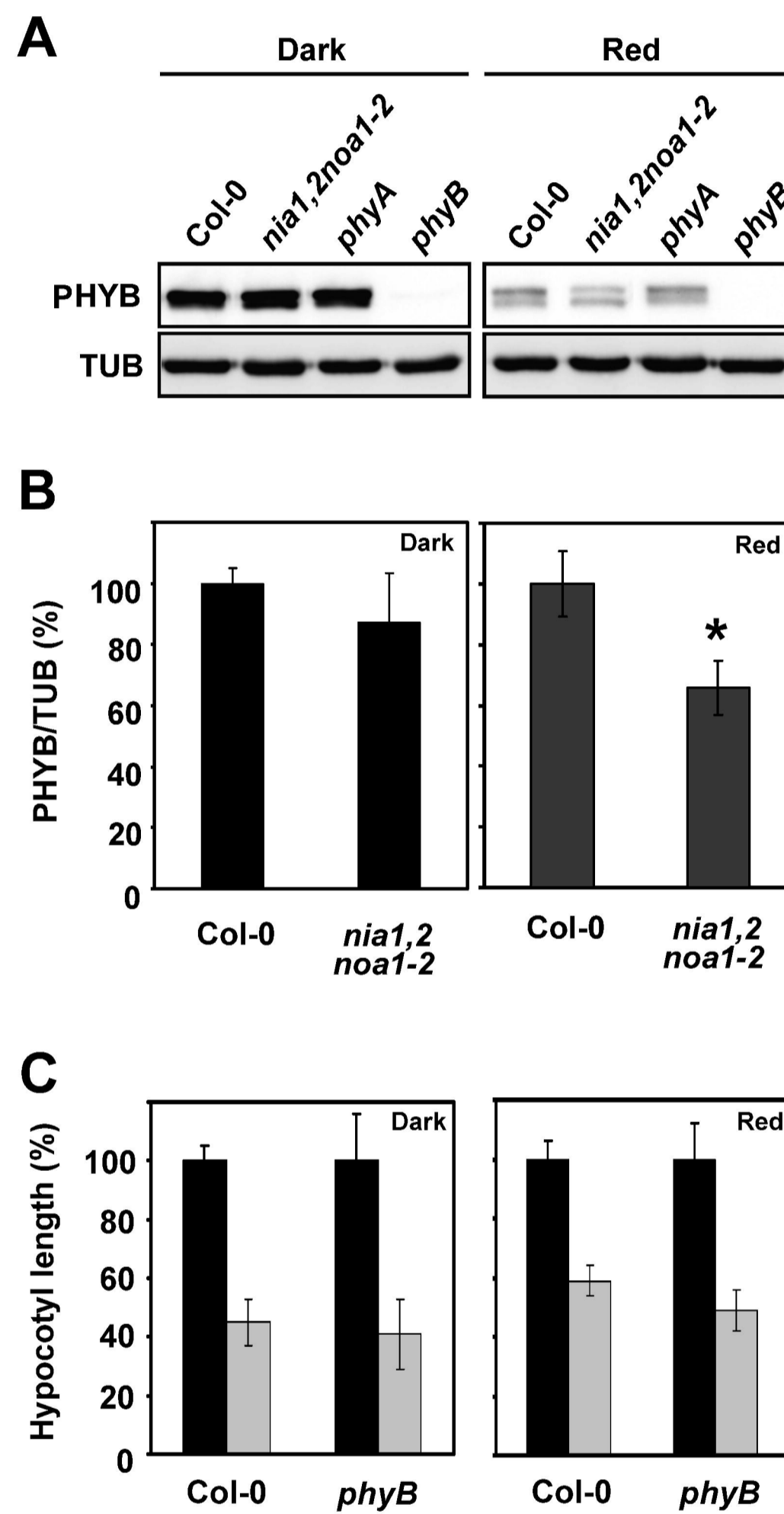


Figure 2. PHYB protein levels in wild type Col-0, NO-deficient *nia1,2noa1-2*, *phyA* and *phyB* mutants grown in darkness or red light. (A) Western blots with anti-PHYB antibodies of protein samples from representative hypocotyls of the indicated genotypes grown for 3 days under darkness or 7 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of red light. Western blots with anti-tubulin (TUB) are shown as loading control. (B) Quantification of the PHYB levels normalized to TUB and expressed relative to the levels of Col-0. Values are the mean of three independent experiments \pm standard deviation. (C) Relative hypocotyl length of untreated (black bars) and NO-treated (250 mM SNP; gray bars) Col-0 and *phyB* seedlings under dark and red light conditions. Values are the mean \pm standard error of three independent experiments (at least 20 seedlings per experiment were measured). Asterisks represent statistically significant differential values with $p < 0.05$ when compared mutant vs wild type under the same treatment conditions.

Fig. 3

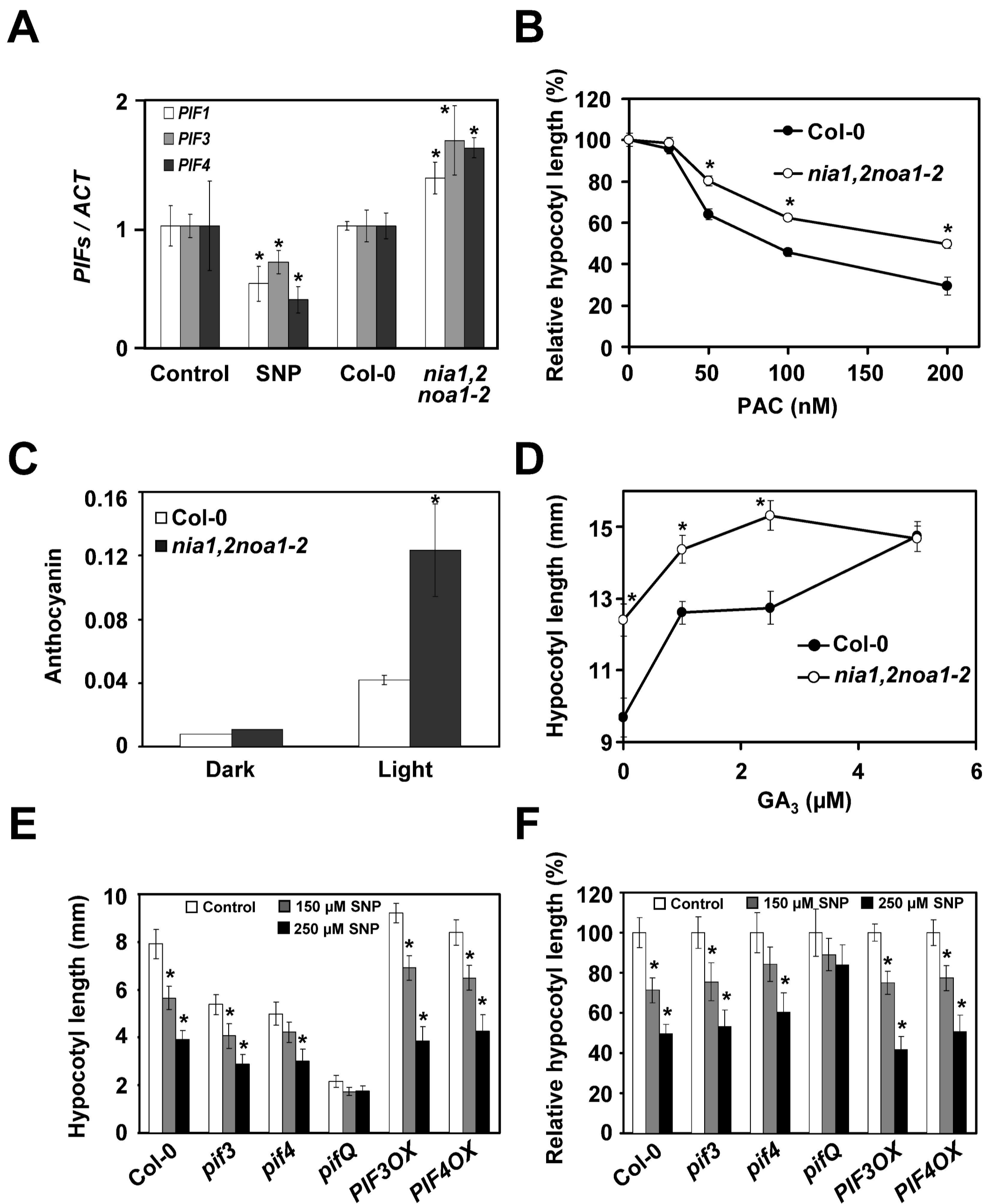


Figure 3. Functional connection between NO, gibberellins and PIF proteins. (A) *PIF1*, *PIF3* and *PIF4* transcript levels in Col-0 or *nia1,2noa1-2* hypocotyls and on wild type hypocotyls either treated with 1 mM SNP (NO donor) for 2 h or untreated as control. (B) Relative length of Col-0 and *nia1,2noa1-2* hypocotyls (mean \pm standard error) in seedlings exposed to the indicated concentrations of PAC. (C) Anthocyanin levels in Col-0 and *nia1,2noa1-2* seedlings under dark or white light conditions expressed in arbitrary units of absorbance at 530 nm. (D) Length of Col-0 and *nia1,2noa1-2* hypocotyls (mean \pm standard error) treated with the indicated concentration of GA₃. (E) and (F) Total and relative length, respectively, of control untreated and SNP-treated hypocotyls in the indicated genotypes and concentrations. All the experiments were performed with seedlings grown under 20 mmol m⁻² s⁻¹ of red light unless otherwise mentioned. Values are the mean of three biological replicates \pm standard error. For hypocotyl length at least 20 seedlings per independent experiment were measured. The asterisks represent statistically significant differential values with at least $p < 0.05$ when compared mutant vs wild type for the same treatment conditions (A-D) or untreated vs treated sample in each genotype (E-F).

Fig. 4

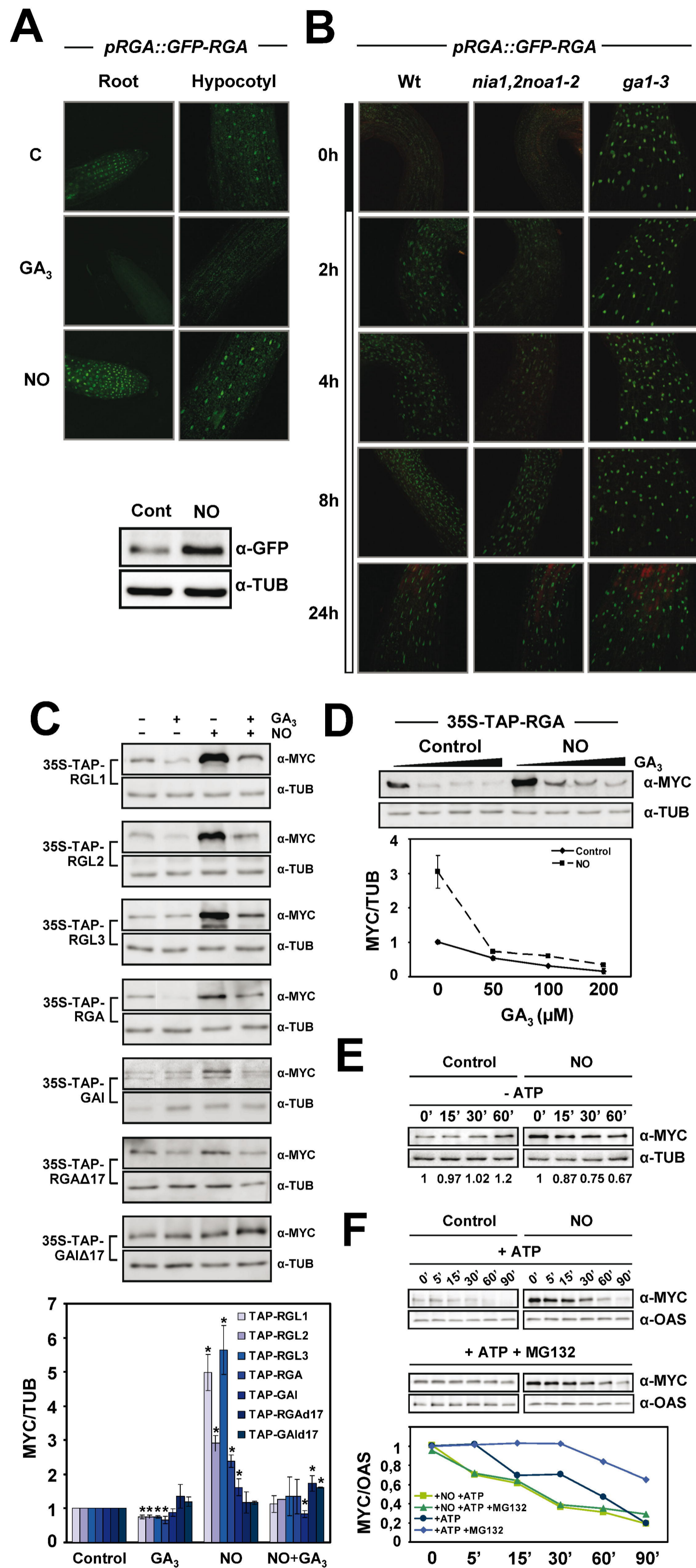


Figure 4. Effect of NO on DELLA protein accumulation. (A) GFP-RGA in *pRGA::GFP-RGA* roots and hypocotyls, either untreated (C, control) or treated for 2 h with 50 mM of GA₃ or 250 mM SNP as source of nitric oxide (NO), visualized by confocal microscopy. GFP-RGA levels and the loading control tubulin (TUB) were analyzed by Western blot. (B) GFP-RGA protein in hypocotyls of *pRGA::GFP-RGA* in wild type, *nia1,2noa1-2* and *ga1-3* backgrounds, at different times after shift from darkness to red light, as indicated in the left bar of the panel. (C) TAP-tagged versions of every DELLA protein were used to analyze the levels of each protein in seedlings treated (+) or not (-) with 50 mM of GA₃ and/or 250 mM SNP (NO) for 2.5 h. TAP-DELLAs were detected with anti-MYC antibodies and the levels of tubulin (TUB) are shown as loading control...

Fig. 5

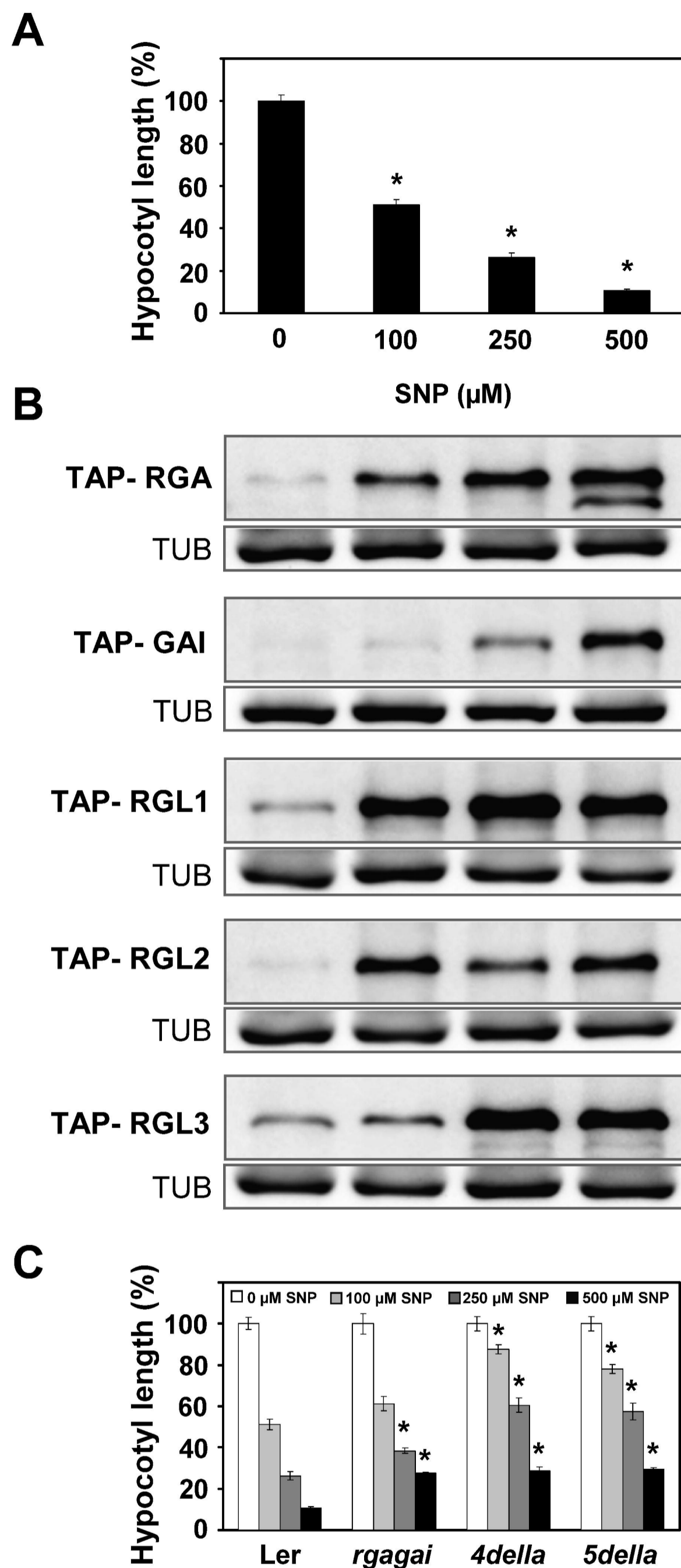


Figure 5. Effect of NO on hypocotyl elongation and DELLA content under red light. Hypocotyl length of wild type Ler (A), *rga-24gai-t6*, quadruple (*4della*) and quintuple (*5della*) DELLA mutants and its wild type (Ler) background (C) was measured after growing seedlings in the indicated SNP concentrations for 3 days. Values of hypocotyl length are the mean \pm standard error of three independent experiments (at least 20 seedlings per experiment were measured). Asterisks represent statistically significant differential values with at least $p < 0.05$ when compared hypocotyls of treated vs untreated wild type seedlings (A) or mutant vs wild type hypocotyls from different genotypes under the same treatment conditions (C). (B) TAP-DELLAs accumulation under the SNP concentrations shown in panel A were detected with anti-MYC antibodies and the loading controls of tubulin are included.

Fig. 6

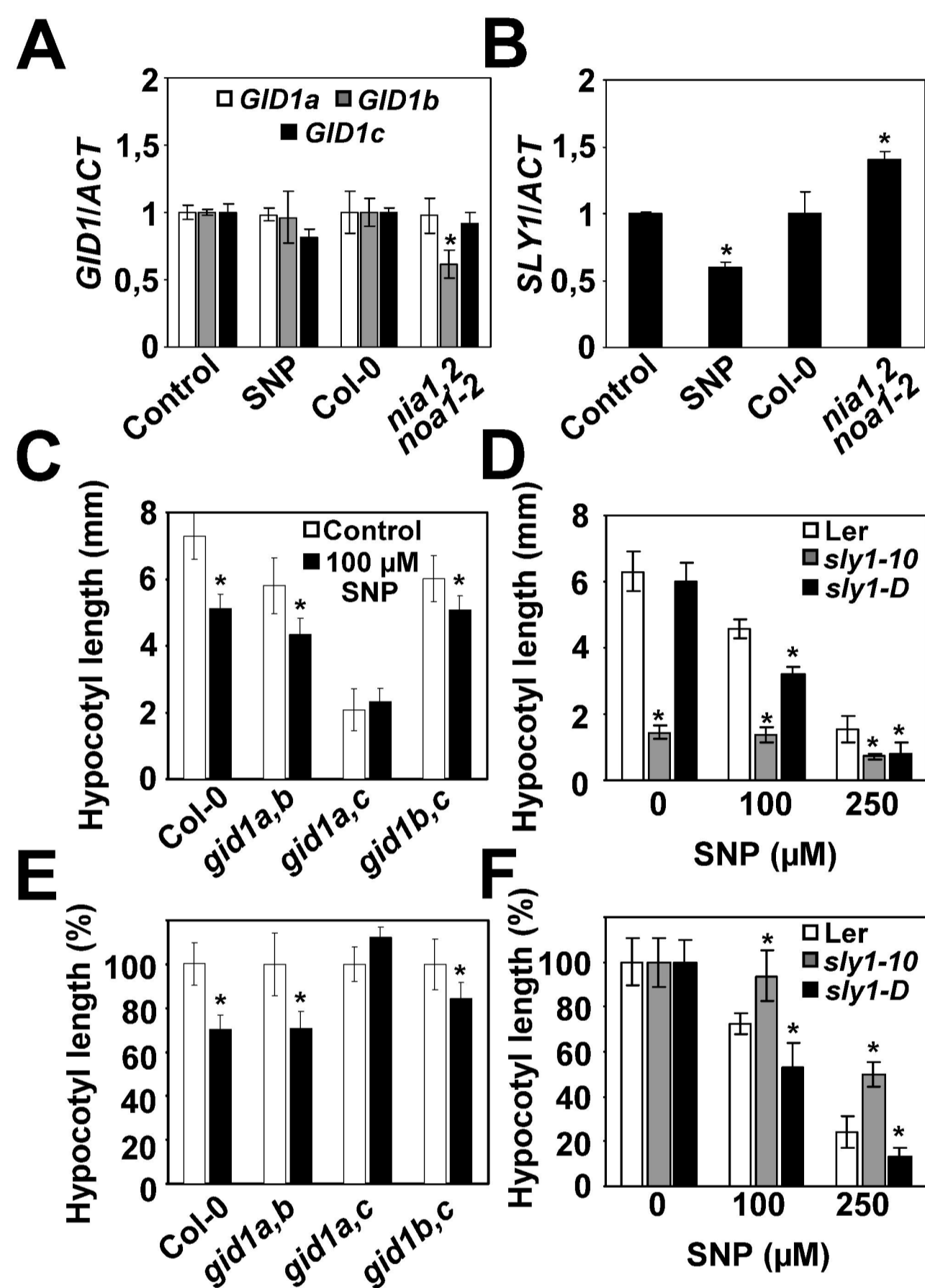


Figure 6. Functional connection between NO and the gibberellin signaling components GID1s and SLY1. (A) and (B) *GID1s* and *SLY1* transcript levels normalized to actin (ACT) in hypocotyls of untreated (Control) and 1 mM SNP (SNP) treated wild type seedlings as well as in the *nia1,2noa1-2* mutants and its wild type background Col-0. Values are the mean \pm standard error of three experiments. (C) and (E) Total and relative hypocotyls length, respectively, of different combination of double *gid1* mutants, in untreated (white bars) and 100 mM SNP-treated (black bars) seedlings. (D) and (F) Total and relative hypocotyls length of Col-0 and the loss-of function mutant *sly1-10* and the gain-of-function mutant *sly1-D* at the SNP indicated concentrations. (C-F) Values of hypocotyl length are the mean \pm standard error of three independent experiments (at least 20 seedlings per experiment were measured). Asterisks represent statistically significant differential values with $p < 0.05$ when compared mutant vs wild type hypocotyls under the same treatment conditions (A, B, D, F) or treated vs untreated hypocotyls in each genotype (B, C, E).

Fig. 7

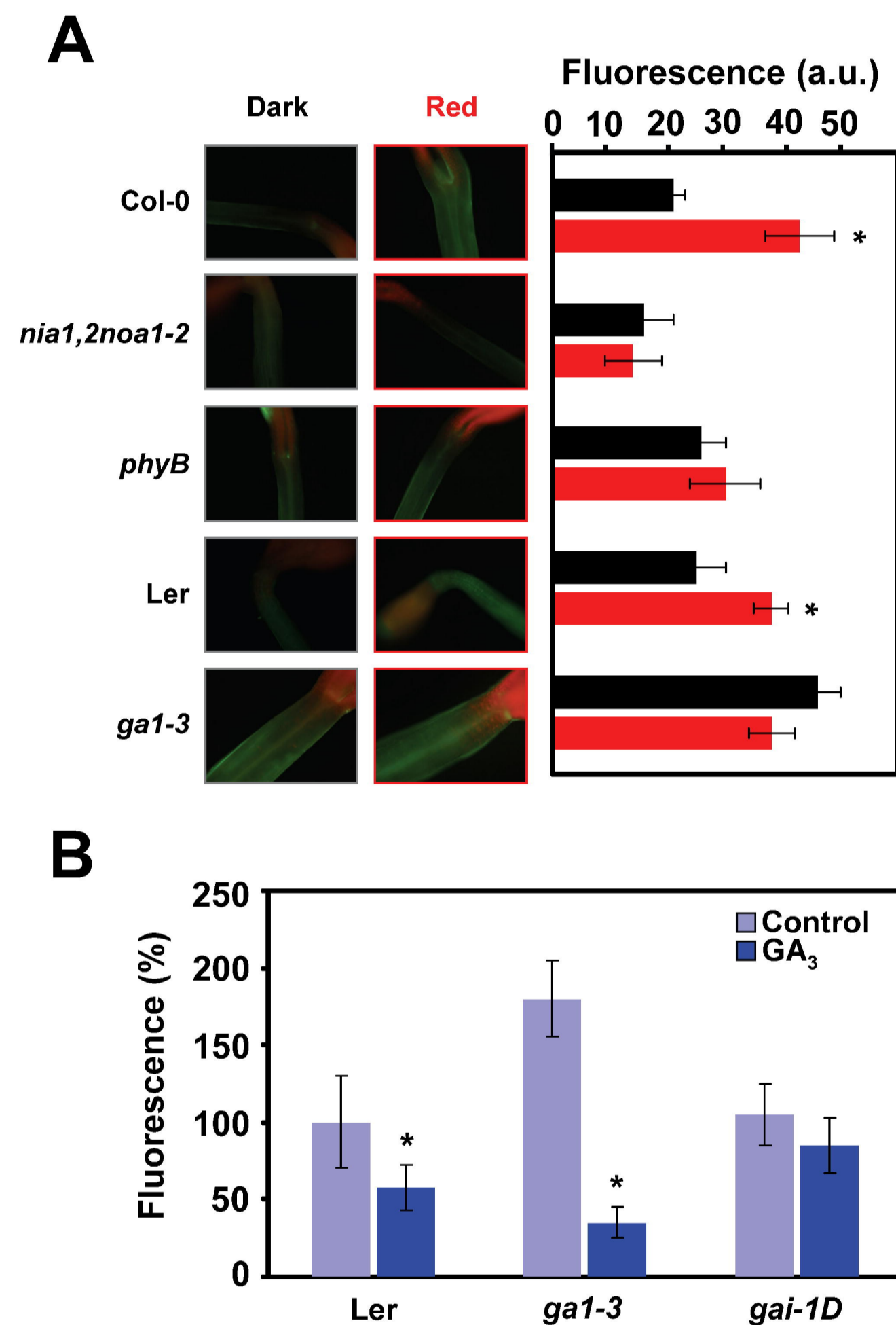


Figure 7. NO levels in the wild type Col-0 and Ler, as well as in *nia1,2noa1-2*, *phyB*, *ga1-3* and *gai-1D* mutant plants. (A) Endogenous NO was visualized with the cell-permeable DAF-FM DA fluorescein in seedlings grown in darkness for 4 days and 1 h after shift to red light (20 mmol m⁻² s⁻¹). (B) NO-related fluorescence in Ler, *ga1-3* and *gai-1D* mutants in untrated (Control) and 50 mM GA₃ treated seedlings for 2.5 h. Values are shown relative to untreated wild type levels. The right panel of A and panel B shows the quantification of three independent experiments as mean values of fluorescence (arbitrary units, a.u.) ± standard error. Asterisks represent statistically significant differential values with $p < 0.05$ when compared to controls in darkness (A) or untreated (B).

Fig. 8

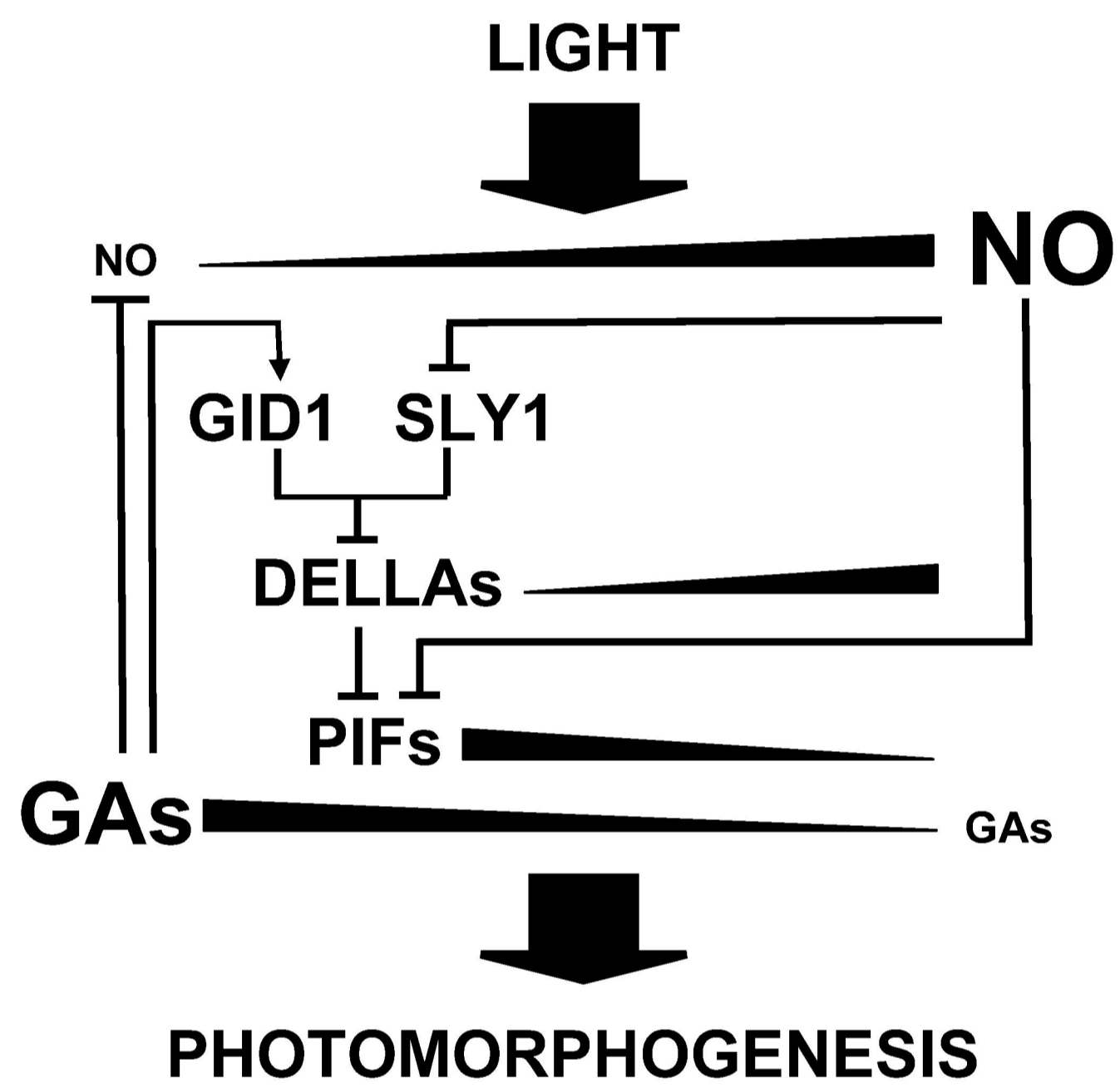


Figure 8. Scheme integrating NO and GAs antagonist functions on the control of light regulated photomorphogenesis through the balance between DELLAs and PIFs.