

Estudio de las especies de nitrógeno reactivo en plantas durante el proceso de estrés biótico en la interacción girasol-mildiu

Mounira Chaki, Alfonso Carreras, Raquel Valderrama, Francisco J. Esteban, Victoria Gómez-Rodríguez, José R. Pedrajas, Ana M. Fernández Ocaña, Juan B. Barroso.

Programa de Doctorado "Biología Molecular y Celular". Departamento de Biología Experimental. Universidad de Jaén. Campus Las Lagunillas s/n, 23071, Jaén.

jbarroso@ujaen.es

Resumen

En hipocótilos de plántulas de girasol sensibles y resistentes a la infección por el hongo parásito *Plasmopara halstedii*, responsable del mildiu, los análisis mediante quimioluminiscencia de ozono revelaron una mayor producción de óxido nítrico en la variedad sensible frente a la resistente, tanto en plantas controles como en plantas inoculadas.

La inmunolocalización mediante microscopía de fluorescencia y microscopía confocal láser mostró la localización extensiva de NOS (Óxido nítrico sintasa) y S-nitrosoglutation (GSNO) en células parenquimáticas. La localización tisular preferente del GSNO en la zona de entrada del patógeno en el hipocótilo, evidencia la posible participación del óxido nítrico en los mecanismos de defensa celulares de respuesta inmediata frente a la invasión por patógenos y antes de la inducción de la producción de óxido nítrico por las proteínas responsables de su generación.

El análisis de estos resultados evidencia la presencia en células de hipocótilos de girasol de proteínas tipo NOS y sugiere la participación de la NOS, del óxido nítrico (NO[·]) y del GSNO en la respuesta de la planta frente al estrés biótico por el hongo *Plasmopara halstedii*.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha demostrado la participación de especies de oxígeno y nitrógeno reactivo (RONS) en la modulación de procesos de señalización celular (Chandok et al., 2003, *Cell* 113: 469-482). Sin embargo, y aunque se ha descrito de forma general su intervención en fenómenos como la respuesta hipersensible de la planta a patógenos, activación de procesos de muerte celular programada o apoptosis y procesos de crecimiento y desarrollo celular, es escasa la información disponible respecto de las proteínas responsables de la generación de óxido nítrico en organismos vegetales y en particular en procesos de estrés biótico (Neill et al., 2003, *New Phytol.* 159:11-35).

Se ha visto que el NO[·] se acumula durante las interacciones planta-patógeno incompatibles, pero no en las compatibles, además, la utilización de inhibidores farmacológicos de las NOS reducen la resistencia de la planta a la infección (Delledone et al., 1998, *Nature* 394: 585-588). Del mismo modo, en los casos de estrés biótico se ha descrito la participación del NO[·] durante la inducción de la

respuesta de hipersensibilidad (HR) que se produce tras la infección avirulenta de patógenos (Romero-Puertas y Delledone, 2003, *IUBMB Life* 55:579-583). Esta respuesta se caracteriza por la rápida muerte, normalmente en 24 horas de las células cercanas a la zona de penetración del patógeno, restringiendo la lesión a una zona claramente delimitada por tejido sano evitando el crecimiento y dispersión del patógeno. La HR se considera como una forma de muerte celular programada (Klessig et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 8849-8855) y se caracteriza por una rápida acumulación en el sitio de infección de óxido nítrico y de especies de oxígeno reactivo (ROS) principalmente H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$, proceso que se conoce como "explosión oxidativa". Diferentes evidencias indican que el NO^{\cdot} que sintetizan los patógenos, vía NOS, podría interactuar con el H_2O_2 para mediar la HR. También se ha sugerido la participación del NO^{\cdot} en el desarrollo de la resistencia sistémica adquirida (SAR) (Durner et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 10328-10333) y, probablemente, existe una relación de señalización entre el H_2O_2 , NO^{\cdot} y el ácido salicílico durante la HR y la SAR. La SAR se desarrolla en tejidos alejados de la zona de infección y provoca la inducción de un conjunto de respuestas que proporcionan resistencia frente a un segundo ataque del mismo patógeno o de patógenos diferentes, esta respuesta comparte ciertas características con el sistema inmune innato que presentan los animales (Klessig et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 8849-8855).

En diferentes trabajos llevados a cabo por este equipo en los últimos años, se ha conseguido la caracterización molecular de un sistema tipo óxido nítrico sintasa (NOS) en peroxisomas vegetales (Barroso et al., 1999, *J. Biol. Chem.* 274: 36729-36733; Corpas et al., 2004, *Plant Physiol.* 136: 2722-2733) lo que implica la participación de estos orgánulos no sólo en el metabolismo de especies reactivos de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS), sino también en los mecanismos de transducción de señales celulares a través de la generación de óxido nítrico (NO^{\cdot}).

A la vista de estos antecedentes, el objetivo fundamental de este trabajo ha consistido en el estudio de la presencia y distribución de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), responsable de la generación endógena de óxido nítrico, y del principal reservorio biológico de óxido nítrico celular, el S-nitrosoglutation (GSNO), utilizando como modelo experimental una situación de estrés biótico mediante la infección de hipocótilos de plántulas de girasol con diferente susceptibilidad a la infección por el hongo parásito *Plasmopara halstedii*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal. Se utilizaron plántulas de girasol (*Helianthus annuus*, L.) obtenidas a partir de semillas de tres variedades de girasol. Peredovik (P), es una variedad sensible que se ha utilizado para el mantenimiento del cultivo del patógeno. A partir de estas plántulas, se obtuvo el inóculo que se ha utilizado en todos los tratamientos de infección. La línea X55 (R), resistente al mildiu (interacción incompatible), tiene una resistencia frente a las razas 1 a 10 de *Plasmopara halstedii*. La línea HA89 (S), sensible al mildiu (interacción compatible), no presenta ningún gen de resistencia a *Plasmopara halstedii*, y finalmente *Plasmopara halstedii* (raza 6), hongo parásito obligatorio (biotrofo) que causa el mildiu del girasol. Las plántulas germinadas sensibles y resistentes se infectaron durante 10 minutos en oscuridad con el hongo *Plasmopara halstedii*, posteriormente, se sembraron sobre perlita humedecida y las macetas se mantuvieron en la cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, y una temperatura de 19 a 21°C durante nueve días.

Determinación de óxido nítrico por reacción de quimioluminiscencia con ozono. Al objeto de determinar la medida de nitritos y nitratos derivados de la producción del óxido nítrico a partir de L-Arg en hipocótilos de girasol, se homogenizaron en mortero con nitrógeno líquido hipocótilos congelados (-80°C) de plántulas de girasol de nueve días de variedades sensibles y resistentes, infectados y no infectados por el hongo *Plasmopara halstedii* utilizando un tampón en la proporción 1/5 (p/v) conteniendo: Trizma-base 100 mM pH 8.0; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; NaCl 0.1 M; PVPP 7%; cocktail inhibidores de proteasas 2x; PMSF 1 mM; BH_4 10 μM ; CaM 10 $\mu\text{g/ml}$. Las muestras se centrifugaron a $3000\times g$ durante 6 minutos a 4°C , se tomó el sobrenadante, que posteriormente se pasó a través de una columna NAP-10 para eliminar las sales y las moléculas de bajo peso molecular. La columna NAP-10 se lava con el tampón HEPES 40mM a pH 7,2, que contiene: CHAPS 0.2 mM; FAD 10 μM ; FMN 10 μM ; BH_4 10 μM y CaM 10 $\mu\text{g/ml}$; CaCl_2 1.25 mM y DTT 15 mM, a continuación, se añadió 1 ml de muestra en la columna y se recogió 1,5 ml de muestra eluyendo con el mismo tampón, y al eluido se le añadió PMSF 1mM e inhibidores de proteasas 2x. Se determinó la producción de $\text{NO}\cdot$ dependiente de L-Arg, tras incubar la muestra durante 30 minutos a 37°C , tal y como describe Corpas et al., 2004, *Plant Physiol.* 136: 2722-2733.

Localización inmunohistológica de S-nitrosoglutation y de proteínas tipo óxido nítrico sintasa en hipocótilos de girasol mediante microscopía de fluorescencia y microscopía confocal láser. Se realizaron cortes la parte inferior de los hipocótilos en piezas de 4 a 5 mm. A continuación, se fijaron en Formaldehído 4% (p/v) en tampón fosfato (PB) 0.1 M durante 3 horas a temperatura ambiente, tras lo cual se sumergieron en una solución de sacarosa al 30% (p/v) en PB 0.1 M a 4°C durante toda la noche para su crioprotección. Posteriormente, se hicieron cortes con un grosor de 60 μm con un criostato (2800 Frigocut E, Reichert-Jung, Vienna, Austria). Los cortes se incubaron en libre flotación con anticuerpo frente a iNOS (dilución 1/2500) y frente a GSNO (dilución 1/2000) en tampón Trizma 5mM y NaCl 0.9%, conteniendo azida sódica 0.05%, BSA 0.1%, Triton X-100 0.1% (TBSA-BSAT) toda la noche a temperatura ambiente. Tras varios lavados con TBSA-BSAT, los cortes se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG biotina diluido 1/1000 en TBSA-BSAT, durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se incubaron con estreptavidina conjugada con Cy2 (Amersham) diluida 1/1000 en TBS-BSAT durante 90 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Se realizó la observación mediante filtro DAPI para la fluorescencia del hongo y a unas λ_{ex} y λ_{em} de 495 nm y 515 nm respectivamente, en las observaciones a microscopía de fluorescencia y microscopía confocal láser (Leica TCS SL).

RESULTADOS

Detección de óxido nítrico mediante quimioluminiscencia de ozono. La producción de óxido nítrico en los sobrenadantes de hipocótilos de plántulas de girasol, de variedades sensibles y resistentes, controles e inoculadas, se determinó a partir de la formación de NO_2^- y NO_3^- obtenidos, durante 30 minutos (37°C), a partir de L-Arg 1mM, mediante quimioluminiscencia de ozono y tras llevar a cabo la reacción de la NOS en presencia de calcio. El análisis de integración a partir de los datos obtenidos reveló un incremento en la producción de $\text{NO}\cdot$ de un 42% y 177% en las cepas control e inoculada respectivamente, de la variedad sensible. Sin embargo, y aunque se apreció un incremento significativo en la producción de $\text{NO}\cdot$ en la variedad resistente (25%), no se observaron diferencias significativas

entre las cepas control e inoculada (Figura 1).

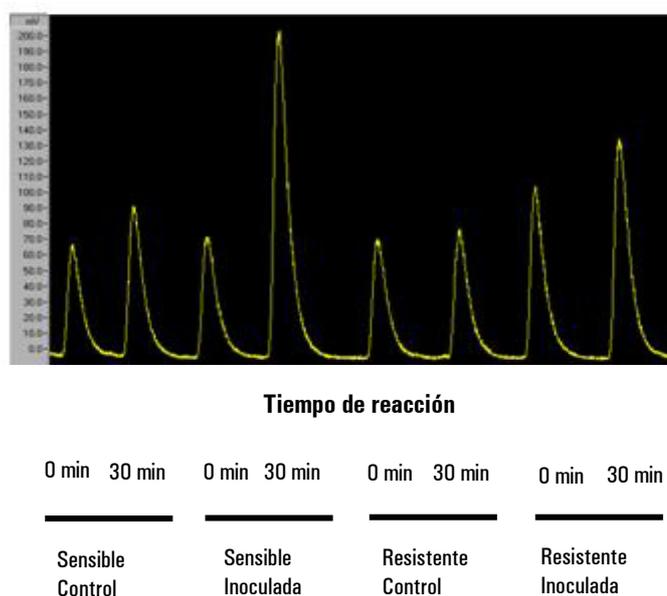


Figura 1. Detección de óxido nítrico por quimioluminiscencia de ozono. Los análisis se realizaron en hipocótilos de girasol de variedades sensibles y resistentes a la infección por *Plasmopara halstedii* tras llevar a cabo la reacción de la NOS a partir de L-Arg 1 mM.

Inmunolocalización de óxido nítrico sintasa y S-nitrosoglutation en hipocótilos de girasol mediante microscopía de fluorescencia y microscopía confocal láser. Los estudios se realizaron sobre secciones de hipocótilos de variedades sensibles y resistentes, controles e inoculadas por *P. halstedii*, y mediante la utilización de anticuerpos frente a la isoforma inducible de la NOS y frente a S-nitrosoglutation (GSNO), en ambos casos conjugados con Cy2. El análisis mediante microscopía de fluorescencia reveló la presencia de inmunomarcaje frente a iNOS y GSNO extensivamente en células parenquimáticas de hipocótilos no inoculados, tanto en la variedad resistente como en la sensible, y acentuándose la intensidad del inmunomarcaje frente a GSNO en esta última en el cortex y la epidermis. En ningún caso se observó interferencia en el inmunomarcaje con la autofluorescencia debida al tejido. (Figuras 2-4).

En el caso de hipocótilos inoculados con *P. halstedii*, se observó un incremento significativo del inmunomarcaje frente a iNOS y GSNO en la variedad sensible frente a la resistente, no obstante, en la variedad resistente se apreció un aumento de la intensidad del inmunomarcaje debido a GSNO en cortex y epidermis, y sin que se observase ningún tipo de interferencia en el inmunomarcaje con la autofluorescencia debida al hongo o al tejido (Figuras 5-7).

Además, el estudio del inmunomarcaje para proteínas tipo óxido nítrico sintasa mediante microscopía confocal láser en la variedad sensible, tanto en cepas controles como inoculadas, y en células parenquimáticas de hipocótilos, confirmó la inmunolocalización de iNOS detectada por microscopía de fluorescencia y evidenció la presencia de inmunoreactividad no sólo en las zonas de tejido

parenquimático donde estaba presente el hongo sino también en el resto del tejido parenquimático del hipocótilo (Figura 8).

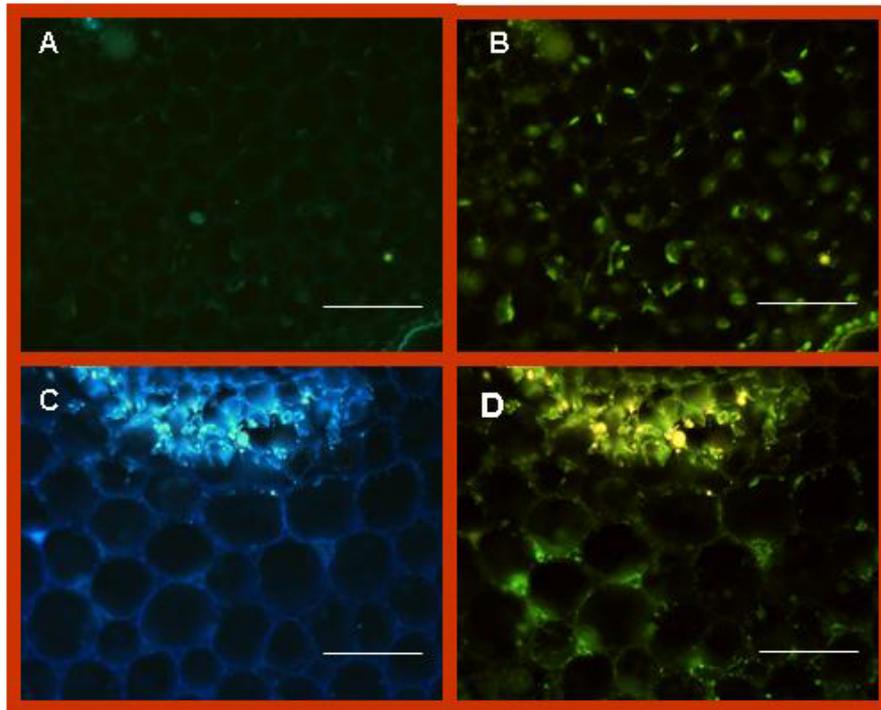


Figura 2. Inmunofluorescencia de óxido nítrico sintasa en hipocótilos de plántulas de girasol de variedades sensibles y resistentes no inoculadas. En cortes de hipocótilos de la variedad sensible, los paneles A y B muestran la autofluorescencia del tejido parenquimático y la inmunoreactividad frente a iNOS , respectivamente. En cortes de hipocótilos de la variedad resistente, los paneles C y D muestran la autofluorescencia del tejido parenquimático y la inmunoreactividad frente a iNOS , respectivamente. Barras = 200 μ m.

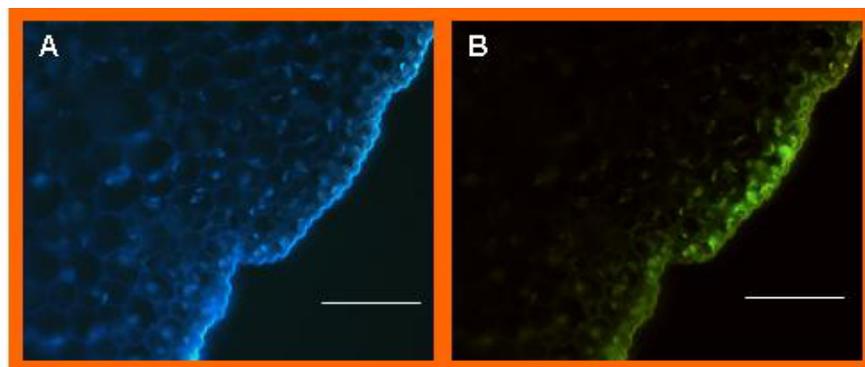


Figura 3. Inmunofluorescencia de S-nitrosoglutation (GSNO) en hipocótilos de girasol de variedades sensibles no inoculadas. Los paneles A y B muestran la autofluorescencia del tejido parenquimático y la inmunoreactividad frente a GSNO, respectivamente. Barras = 200 μ m

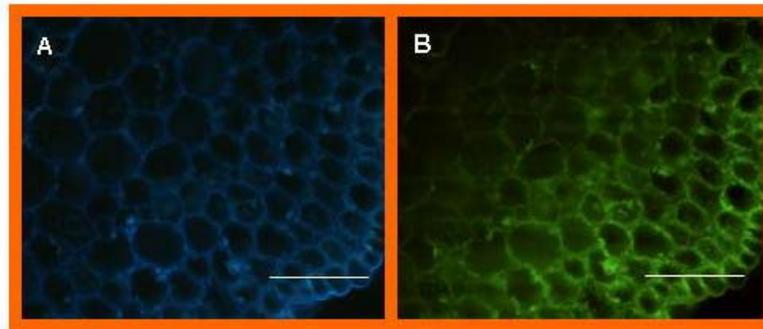


Figura 4. Inmunofluorescencia de S-nitrosoglutation (GSNO) en hipocótilos de plántulas de girasol de variedades resistentes no inoculadas. Los paneles A y B muestran la autofluorescencia del tejido parenquimático y la inmunoreactividad frente a GSNO, respectivamente. Barras = 200 μ m.

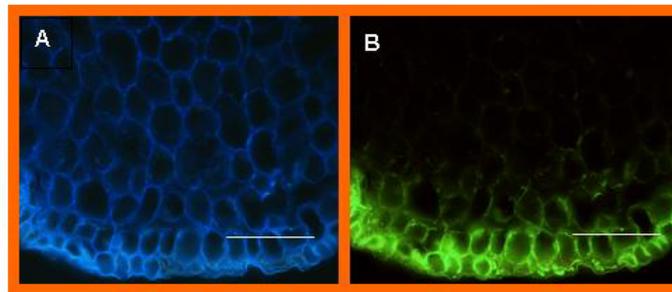


Figura 5. Inmunofluorescencia de la óxido nítrico sintasa en hipocótilos de plántulas de girasol de variedades sensibles y resistentes inoculadas por el hongo parásito *Plasmopara halstedii*. En cortes de hipocótilos de la variedad sensible, los paneles A y B muestran la autofluorescencia del tejido parenquimático y/o del hongo y la inmunoreactividad frente a iNOS, respectivamente. En cortes de hipocótilos de la variedad resistente, los paneles C y D muestran la autofluorescencia del tejido parenquimático y/o del hongo y la inmunoreactividad frente a iNOS, respectivamente. Barras = 200 μ m.

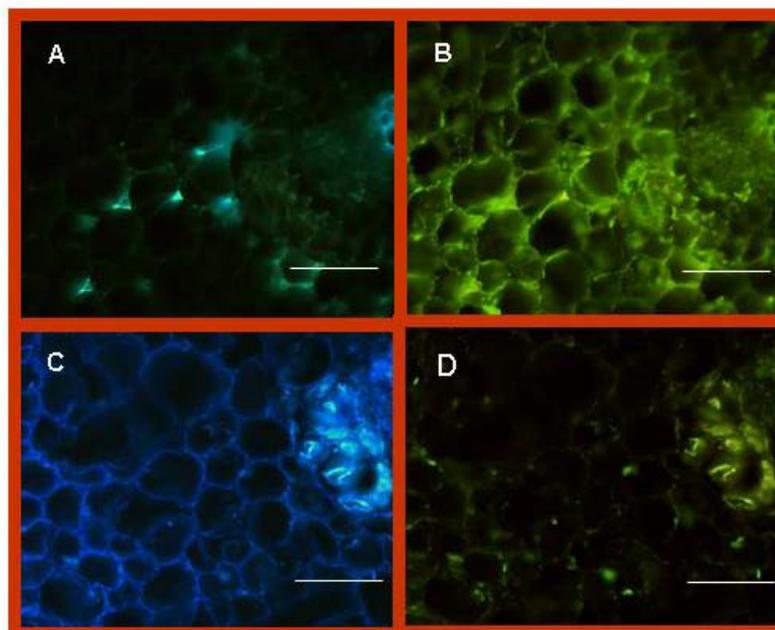


Figura 6. Inmunofluorescencia de S-nitrosoglutation (GSNO) en hipocótilos de plántulas de girasol de variedades sensibles inoculadas por el hongo *Plasmopara halstedii*. El panel A muestra la autofluorescencia del hongo. El panel B muestra la inmunoreactividad frente a GSNO.

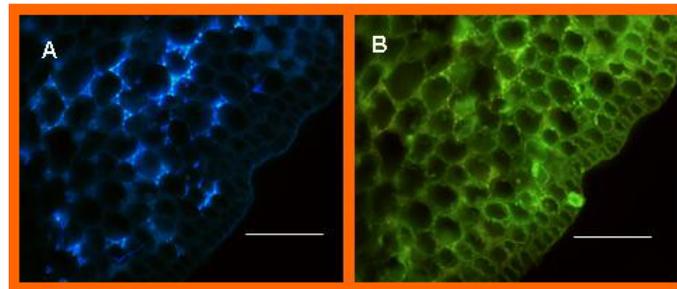


Figura 7. Inmunofluorescencia de S-nitrosoglutation (GSNO) en hipocótilos de plántulas de girasol de variedades resistentes inoculadas por el hongo parásito *Plasmopara halstedii*. Los paneles A y B muestran la autofluorescencia del tejido parenquimático y/o del hongo, y la inmunoreactividad frente a GSNO, respectivamente.

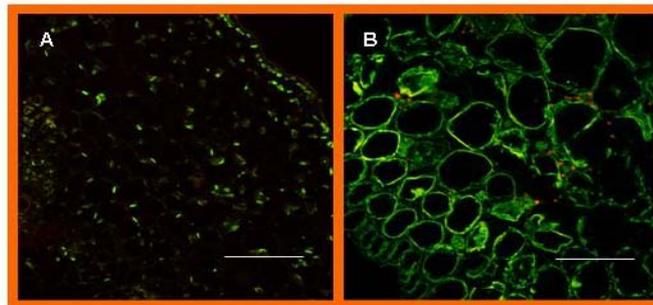


Figura 8. Inmunolocalización de la óxido nítrico sintasa en hipocótilos de plántulas de girasol por microscopía confocal láser. El panel A muestra la distribución de la inmunoreactividad frente a iNOS en tejido parenquimático de hipocótilos de plántulas de girasol de la variedad sensible no inoculadas. El panel B muestra la distribución de la inmunoreactividad frente a iNOS en tejido parenquimático de hipocótilos de plántulas de girasol de la variedad sensible inoculadas con el hongo *Plasmopara halstedii*. La inmunoreactividad frente a iNOS se muestra en verde y la debida al hongo en rojo. Barras= 200 μ m

DISCUSIÓN

El objetivo fundamental del presente trabajo ha consistido en el estudio de la presencia y distribución de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), responsable de la generación endógena de óxido nítrico, en hipocótilos de girasol (*Helianthus annuus* L.), mediante aproximaciones bioquímicas, inmunológicas y de microscopía, y utilizando como modelo experimental una situación de estrés biótico consistente en la infección de hipocótilos de plántulas de girasol con diferente susceptibilidad a la infección por el hongo parásito *Plasmopara halstedii*, responsable de la generación del mildiu en el girasol.

Con objeto de elucidar la presencia de proteínas con capacidad de producción de NO \cdot en plantas de girasol y dado que es en el hipocótilo donde residen los principales mecanismos moleculares de defensa de la plántula, se procedió inicialmente a la detección de óxido nítrico mediante quimioluminiscencia de ozono en los sobrenadantes obtenidos de variedades sensibles y resistentes, controles e inoculadas, y tras llevar a cabo la reacción de la NOS a partir de L-Arg y en presencia de calcio. El análisis de integración a partir de los datos obtenidos reveló

un incremento significativo en la producción de óxido nítrico en la variedad sensible frente a la resistente, y tanto en plantas controles como en plantas inoculadas. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la producción de óxido nítrico entre las cepas control e inoculada de la variedad resistente a la infección por *P. halstedii*. Este comportamiento diferencial sugiere la participación del NO[•] en los mecanismos de defensa del hipocótilo de girasol en la variedad susceptible, donde se aprecian graves lesiones causadas por el proceso de infección y propagación del hongo y que desencadenan diferentes mecanismos de respuesta entre los que se puede encontrar un incremento en la generación de óxido nítrico.

En este sentido, y al objeto, tanto de confirmar los datos obtenidos referentes a la producción de óxido nítrico como de identificar la localización tisular de los sitios de producción de esta molécula, se procedió a la inmunolocalización de óxido nítrico sintasa y de S-nitrosoglutation (GSNO), uno de los principales reservorios biológicos de óxido nítrico celulares, en hipocótilos de girasol mediante microscopía de fluorescencia y microscopía confocal láser. El análisis mediante microscopía de fluorescencia reveló la presencia extensiva de inmunomarcaje frente a iNOS y GSNO fundamentalmente en células parenquimáticas de hipocótilos de plántulas no inoculadas, tanto en la variedad resistente como en la sensible, apreciándose además en esta última incremento del inmunomarcaje en el cortex y en la epidermis. Sin embargo, en el caso de hipocótilos de plántulas inoculadas con *P. halstedii*, se observó un incremento significativo del inmunomarcaje frente a iNOS y GSNO en la variedad sensible frente a la resistente. No obstante, en la variedad resistente se apreció un aumento de la intensidad del inmunomarcaje debido a GSNO en cortex y epidermis. Esta localización tisular preferente del GSNO en la zona de entrada del patógeno en el hipocótilo, evidencia la posible participación del óxido nítrico en los mecanismos de defensa celulares de respuesta inmediata frente a la invasión por patógenos y antes de la inducción de la producción de óxido nítrico por las proteínas responsables de su generación.

Por otra parte, el estudio del inmunomarcaje para óxido nítrico sintasa por microscopía confocal láser en la variedad sensible, tanto en cepas controles como inoculadas, confirmó la inmunolocalización de iNOS detectada por microscopía de fluorescencia y evidenció la presencia de inmunoreactividad no sólo en las zonas de tejido parenquimático donde estaba presente el hongo sino también en el resto del tejido parenquimático del hipocótilo, indicando que efectivamente, en esta situación experimental existe una inducción de esta proteína inmunoreactiva

Este comportamiento no sólo corrobora los datos de producción de NO[•] obtenidos por quimioluminiscencia de ozono, sino que sugiere además que tanto el incremento de proteínas tipo NOS en esos tejidos como la presencia de GSNO, puede ser uno de los mecanismos de defensa celular de la planta durante el proceso de infección por el hongo.

AGRADECIMIENTOS

Financiado por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (MCYT Proy. AGL 2003 05524) y por la Junta de Andalucía (CVI-0286).