

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

**EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO SOBRE EL CONTENIDO
DE CLOROFILA Y DE PROTEÍNAS TIPO ELIPS EN HOJAS
JÓVENES DE *Vitis vinifera L.***

PAMELA A. ÁLVAREZ GÁLVEZ

Santiago de Chile

2011

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

**EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO SOBRE EL CONTENIDO
DE CLOROFILA Y DE PROTEÍNAS TIPO ELIPS EN HOJAS
JÓVENES DE *Vitis vinifera L.***

**Effect of nitric oxide on chlorophyll content and ELIPs- like
proteins in young leaves of *Vitis vinifera L.***

PAMELA A. ÁLVAREZ GÁLVEZ

Santiago de Chile

2011

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Agronómicas

Escuela de Pregrado

EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO SOBRE EL CONTENIDO DE CLOROFILA Y DE PROTEÍNAS TIPO ELIPS EN HOJAS JÓVENES DE *Vitis vinifera L.*

Memoria presentada para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo.
Mención en Producción Frutícola.

PAMELA A. ÁLVAREZ GÁLVEZ

	Calificaciones
Profesor Guía	
Manuel Pinto Contreras Ing. Agrónomo, Mg. Cs., Dr.	5,0 -----
Profesores Evaluadores	
Rodrigo Callejas Rodríguez Ing. Agrónomo, Dr.	6,5 -----
Maruja Cortés Belmar Ing. Agrónomo, Mg.Cs.	6,2 -----
Colaborador	
Alejandro Riquelme Escobar Bioquímico	

Santiago de Chile
2011

ÍNDICE

RESUMEN	5
Palabras claves	5
ABSTRACT	6
Key words	6
INTRODUCCIÓN	7
Hipótesis	9
Objetivo	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Material vegetal y tratamientos	10
Determinación del contenido de clorofila total	13
Método de Arnon	13
Clorofilómetro	14
Determinación de la expresión de ELIPs	15
Extracción de proteínas	15
Cuantificación de proteínas	15
Electroforesis en condiciones desnaturalantes	15
Inmunodetección de ELIPs	15
Análisis de las bandas obtenidas	16
Diseño experimental y análisis estadístico	16

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
Efecto de NO sobre el contenido de clorofila total en plántulas etioladas de trigo.	17
Efecto de NO sobre el contenido de clorofila total en hojas jóvenes de vid.	18
Efecto de NO sobre la expresión de proteínas tipo ELIPs en plántulas etioladas de trigo.	23
Efecto de NO sobre la expresión de proteínas tipo ELIPs en hojas jóvenes de vid.	24
CONCLUSIONES	28
BIBLIOGRAFÍA	29
ANEXOS	31

RESUMEN

Numerosos estudios plantean que el óxido nítrico (NO) cumple una función fundamental en las plantas. Se ha informado que esta molécula actúa en la inhibición de la vía degradativa de la clorofila y que favorece el proceso de síntesis de este pigmento; así también se le atribuye la capacidad de emular algunos efectos dependientes de la luz en las plantas. Debido a esto y los antecedentes sobre el NO donde se demuestra un efectivo aumento en la acumulación de complejos de proteínas en la membrana del tilacoide; se sugiere la posibilidad de que dicha biomolécula se encuentra, directa o indirectamente, formando parte de la vía de inducción de la síntesis de proteínas tempranamente inducidas por luz (ELIPs).

El objetivo del presente estudio es evaluar el efecto de aplicaciones exógenas de óxido nítrico sobre hojas jóvenes etioladas de vid. La información existente sobre el efecto del NO comprende sólo plantas anuales, sin embargo, se espera que actúe como molécula señal en un proceso mediado por luz generando un aumento en el contenido de clorofilas y junto a ello, un aumento en la expresión de proteínas ELIPs en plantas perennes como la vid. Para cumplir este objetivo se realizaron una serie de ensayos para estandarizar las respuestas de la vid, además se realizó un primer ensayo en trigo para corroborar resultados previamente obtenidos en este cereal ante la aplicación exógena de NO. Brotes de vid de la variedad Sultanina fueron mantenidos en oscuridad hasta contar con el material vegetal necesario. Las hojas jóvenes etioladas obtenidas fueron sometidas a los distintos tratamientos según la aplicación de NO, asperjando directamente una solución que genera óxido nítrico (S-nitroso-N-acetilpenicilamina, SNAP) en concentración 100 μM o agua destilada sobre las hojas control sin aplicación de NO. Cada ensayo fue sometido adicional y diferencialmente a un tratamiento de luz. La variación del contenido de clorofila total en el tiempo se midió mediante el método de Arnon (1949) y para medir la expresión de las proteínas ELIPs se realizaron Western Blots.

Los resultados obtenidos indican que la aplicación exógena de NO afecta positivamente la acumulación de clorofila total y no tan claramente la expresión de proteínas tipo ELIPs en hojas jóvenes etioladas de vid y en plántulas etioladas de trigo, sin embargo, dicho efecto se encuentra condicionado a la presencia de luz.

PALABRAS CLAVE: Óxido nítrico - Molécula señal - Inducción - Síntesis - *Vitis vinifera*.

ABSTRACT

Numerous studies show that nitric oxide (NO) has a fundamental function in plants. It has been informed that this molecule acts in the inhibition of the degrading of chlorophyll and contributing to its synthesis, as well as emulating some light depending effects in plants. According to this background, were an effect of significant increases in the accumulation of protein complexes in the thylakoid membrane, suggest the possibility that this biomolecule forms part, directly or indirectly, in the induction of early light inducible proteins synthesis (ELIPs).

The objective of the present study is to evaluate the effect of exogenous applications of nitric oxide on young leaves of etiolated vines. Existing information on NO effect only considers annual plants; however, it is expected to perform as a signal molecule in a light induced process, generating an increase in the chlorophyll content and together with this, an increase in the ELIPs protein expression in perennial plants like vines. To fulfill this objective, a series of trials were performed to standardize the responses of the vine, also a first trial was done on wheat to corroborate results previously obtained in this cereal to the exogenous application of NO.

The results indicate that the exogenous application of NO positively affects the accumulation of total chlorophyll and not so clearly the expression of ELIPs proteins in etiolated young leaves of grapevine and etiolated wheat seedlings, however, this effect is conditional on the presence of light.

KEY WORDS: Nitric oxide – Signal Molecule – Induction – Synthesis - *Vitis vinifera*.

INTRODUCCIÓN

El Óxido Nítrico corresponde a una molécula bioactiva, que de acuerdo a la información existente participa en una serie de procesos biológicos tanto en células animales como vegetales (Zhang *et al.*, 2005). Debido a su carga neutra y a su tamaño pequeño el NO posee una gran capacidad de moverse a través del citoplasma celular y de atravesar libremente membranas biológicas permitiendo su rápida llegada a distintos compartimentos celulares y gatillando así, cambios en la actividad biológica de las moléculas sobre las que actúa (Sánchez, 2009). A esta molécula se le atribuye la capacidad de inhibir la vía degradativa de la clorofila actuando como una molécula antioxidante y de favorecer el proceso de síntesis de ella; así como también el NO es capaz de provocar efectos que son dependientes de la luz en las plantas (Lamattina, 2001).

Dentro de los estudios que se han efectuado en torno a dicha biomolécula están los que comprueban que induce el cierre estomático (Mata y Lamattina, 2001) y el crecimiento de raíces, también estimula la germinación de semillas mantenidas en oscuridad e inhibe la elongación del hipocotilo (Beligni y Lamattina, 1999). Participa además en la resistencia ante el estrés por patógenos y en el retardo de la senescencia de tejidos vegetales. Se sugiere que el NO interactúa con el sistema hormonal de la planta al actuar como un segundo mensajero (Romanov *et al.*, 2008). Lo anterior quedaría demostrado al corroborar su acción en distintos puntos de la planta: mediando la acción del ácido abscísico en el cierre estomático, interfiriendo con el etileno en la senescencia de tejidos, actuar junto con las auxinas en el crecimiento de raíces entre otros efectos. Al respecto se siguen efectuando estudios para verificar su interacción como molécula señal con otras hormonas como las citoquininas y el ácido jasmónico (Romanov *et al.*, 2008) y su implicancia en el mecanismo de “signaling”.

Beligni y Lamattina (1999) demostraron que NO puede regular diversos procesos de crecimiento y desarrollo en las plantas. En su estudio se comprobó la capacidad del NO para reverdecer plántulas etioladas de trigo crecidas en oscuridad. Los experimentos demostraron que, creciendo en oscuridad, las hojas de trigo tratadas con NO contenían 35% más de clorofila que las hojas control asperjadas con agua. Debido a la importancia de dicho estudio para el presente trabajo se adjuntan en el Anexo I los resultados obtenidos en trigo.

El efecto positivo mostrado por esta nueva biomolécula sobre la síntesis de clorofila, aumentando su contenido y junto a ello la acumulación de proteínas de la membrana del tilacoide, tales como el complejo de proteínas cosechadoras de luz del fotosistema II (LHCII) (Zhang *et al.*, 2005), sugiere que también podría participar en la inducción de otras moléculas tanto del aparato fotosintético como de aquellas que ayudan a su ensamblaje.

La molécula de clorofila es la encargada de absorber la energía solar y transportar los electrones a los centros de reacción de los fotosistemas. La mantención de un contenido de clorofilas adecuado para el funcionamiento óptimo de los fotosistemas es el resultado de un equilibrio dinámico entre la síntesis y degradación de ésta. Por otro lado, si bien la presencia de luz es fundamental para que ocurra el proceso fotosintético, cuando los niveles de luz absorbidos exceden la capacidad fotosintética especies reactivas de oxígeno pueden ser generadas causando daño oxidativo en pigmentos, proteínas y lípidos (Hutin *et al.*, 2003). Las plantas han desarrollado frente a esto múltiples sistemas de reparación y protección. Dentro de estas últimas encontramos la síntesis y la acción de moléculas protectoras específicas de los centros de reacción como son las proteínas que unen clorofila y forman complejos más estables que impiden que en su estado libre como triplete puedan reaccionar con moléculas de oxígeno y formen especies reactivas de oxígeno (ROS) causando un daño oxidativo en los fotosistemas y en las membranas celulares (Adamska, 1997).

Las proteínas ELIPs (del inglés “Early Light-Inducible Proteins”) se encuentran entre las primeras proteínas inducidas por la luz y sus transcritos y proteínas aparecen rápida y transitoriamente durante los estados tempranos de desetiolación o verdeamiento (Adamska *et al.*, 2001). Su función fisiológica aún no se ha establecido claramente, aunque se sabe que estas proteínas pertenecen a la familia de las cab (“chlorophyll a/b binding proteins”), lo que les transfiere la característica de poder formar uniones, aunque débiles, con moléculas de clorofila (Grimm *et al.*, 1989); además, están insertas en las membranas tilacoidales asociadas al PSII (Meyer y Kloppstech, 1984). Estas proteínas poseen 3 dominios transmembrana y una masa molecular entre 17-23 kDa.

Debido a su similitud con las proteínas que unen clorofila (Cab), la principal hipótesis respecto a la función de este tipo de proteínas es que son las encargadas de captar pigmentos que quedan en su forma libre cuando es destruido el complejo fotosintético por acción de algún estrés oxidativo (Adamska, 1997; Lindahl *et al.*, 1997; Hutin *et al.*, 2003). Es por ello que se ha sugerido que estarían uniendo clorofilas con la finalidad tanto de ayudar a su ensamblaje en los fotosistemas en hojas jóvenes como en los procesos degenerativos del aparato fotosintético, naturales o por el efecto de algún estrés (Adamska *et al.*, 2001). El mismo autor señala que la inserción, cuantitativa, de las proteínas ELIPs en la membrana de los tilacoides, aumenta casi de forma lineal con la concentración de clorofila “a” (no de clorofila “b” ni de otros pigmentos) y que es dependiente de la intensidad lumínica.

Una de las características de las proteínas ELIPs es que su tasa de degradación depende de la intensidad del estrés y que esta sólo comienza bajo condiciones de luz que permitan la recuperación de la hoja (Adamska *et al.*, 1993; Pötter y Kloppstech, 1993; Lindahl *et al.*, 1997; Heddad *et al.*, 2006).

Si bien las investigaciones en torno al óxido nítrico y a las proteínas ELIPs se encuentran bastante avanzadas, no existen estudios sobre la interacción de estas tres moléculas (NO, clorofilas y ELIPs) y de sus funciones dentro de la célula o más específicamente en el aparato fotosintético. Por otro lado, la mayoría de los estudios realizados con NO y ELIPs se han efectuado en plantas anuales (arveja, cebada, *Arabidopsis* y trigo), por lo que resulta interesante ampliarlos a una planta perenne como la vid. Es por ello, que el presente estudio se planteó como hipótesis que el NO aplicado sobre plantas que han crecido en oscuridad (etioladas) aumentan el contenido de clorofila y la acumulación de proteínas tipo ELIPs al gatillar la síntesis de ambas moléculas, en un proceso que es dependiente de la luz.

Hipótesis.

Tanto el contenido de clorofila como la expresión de proteínas tipo ELIPs aumentan al ser inducidas por aplicación exógena de óxido nítrico.

Objetivo general.

Evaluar el efecto de aplicaciones exógenas de óxido nítrico sobre el contenido de clorofila total y la expresión de ELIPs en hojas jóvenes de vid.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se ejecutó en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de INIA, Centro Regional de La Platina. Santiago. Chile.

Material vegetal y tratamientos

Para cumplir con el objetivo planteado, se realizaron los siguientes ensayos:

Inicialmente se realizó un ensayo procediendo según lo descrito por Beligni y Lamattina (1999). Se utilizaron plántulas etioladas de trigo para verificar experimentalmente los resultados obtenidos en su estudio.

En 4 macetas con arena esterilizada se sembraron alrededor de 100 semillas pregerminadas de trigo (*Triticum aestivum L.*) por cada maceta, luego de ello se trasladaron a una cámara de crecimiento en condiciones de oscuridad con temperatura entre 25-35°C. Al momento de la aplicación del tratamiento de NO, las plántulas estuvieron 7 días creciendo en oscuridad, alcanzando una altura promedio entre 7 y 10 cm (Figura 1). A dos macetas se aplicaron por aspersión directamente sobre cada plántula etiolada 5 ml de una solución generadora de óxido nítrico (S-nitrosotiol S-nitroso-N-acetilpenicilamina: SNAP) en concentración de 100 µM; y las plántulas etioladas de otras dos macetas fueron asperjadas con 5ml de agua destilada (control sin aplicación de NO). Luego de realizar las aplicaciones las plántulas etioladas de trigo de ambos tratamientos (con y sin aplicación de NO) fueron sometidas a un pulso de luz de una intensidad luminosa entre 350-600 µmol·m⁻²·s⁻¹ durante dos horas, suministrada por ampolletas de haluro metálico de 400 watts, regresándolas al pasar dicho período a su condición inicial de oscuridad. El tejido foliar extraído para cada muestra fue pesado, identificado y mantenido a -80°C hasta el momento del análisis.



Figura 1: Plántulas etioladas de trigo. **(a)** Momento de siembra. **(b)** Crecimiento obtenido luego de 4 días en oscuridad desde la siembra. **(c)** Estado de las plántulas de trigo mantenidas durante 7 días en oscuridad, previa aplicación de los tratamientos.

En los ensayos 2, 3 y 4 se utilizaron hojas jóvenes de vid de la variedad Sultanina (*Vitis vinifera L.*), estas hojas fueron obtenidas desde estacas plantadas en un sustrato de perlita y vermiculita (1:1). Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero desde su establecimiento bajo condiciones controladas de luz ($50\text{-}250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y temperatura ($25\text{-}35^\circ \text{C}$). Para iniciar cada ensayo las plantas fueron podadas y colocadas en oscuridad para contar con una brotación homogénea y considerar como hojas jóvenes aquellas con una edad aproximada de 10-15 días y tamaño entre $25\text{-}30 \text{cm}^2$ (Figura 2 a; b). Para asegurar la homogeneidad del contenido de clorofila de todas las hojas seleccionadas, previamente a la aplicación de los tratamientos, se midió el contenido de clorofila de cada hoja mediante un Clorofilómetro (modelo CCM_200. Opti-sciences, USA) que corresponde a un método no destructivo.

Una vez que las hojas alcanzaron el tamaño adecuado y el contenido de clorofila entre 2-3,5 unidades CCM (medido con clorofilómetro), se dividieron en forma aleatoria las plantas en 2 grupos, separándolas de tal forma que no existieran contaminaciones entre los tratamientos, ya que la aplicación de NO fue efectuada sobre cada hoja sin desprenderla de la planta. Sobre un grupo de plantas se asperjó directamente a cada hoja seleccionada 5 ml de agua destilada (plantas control), y sobre el grupo de plantas tratadas con NO se asperjaron 5 ml de la solución $100 \mu\text{M}$ del compuesto generador de óxido nítrico: S-nitrosotiol S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP). Una vez realizada la aplicación de los tratamientos (con y sin aplicación de NO), las plantas fueron expuestas a distintos tiempos de iluminación con una intensidad media entre $350\text{-}600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, suministrada por ampollitas de haluro metálico de 400 watts (Figura 2, c). Las hojas extraídas para cada muestra fueron pesadas, identificadas y mantenidas a -80°C hasta el momento de su análisis.



Figura 2: (a) Plantas de vid mantenidas en condiciones de oscuridad y temperatura entre 25-35°C. (b) Hoja joven de vid previa aplicación de los tratamientos. (c) Exposición de las plantas a una intensidad luminosa promedio de $475 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Se realizó un quinto ensayo bajo condiciones de campo, utilizando brotes etiolados de plantas de 10 años (parrón ubicado en las dependencias de INIA – La Platina, Santiago, Chile), entre los meses de septiembre y octubre. Se escogieron 32 plantas de *Vitis vinifera* cv. Sultanina adultas, sanas y de similar vigor. Una yema hinchada a punto de brotar de cada planta fue cubierta con una bolsa negra. Se mantuvieron en oscuridad por 15 días hasta que los brotes estaban en estado de ramillete etiolado (Figura 1a; b). La aplicación de NO se realizó a las 9 de la mañana, inmediatamente después de destapar los brotes etiolados, mediante la aspersión de una solución $100 \mu\text{M}$ de SNAP (S-nitroso-N-acetilpenicilamina) y luego estas hojas se mantuvieron durante 8 horas bajo luz natural a una alta intensidad luminosa que fluctuó entre $900\text{-}2100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Las muestras obtenidas se identificaron y fueron mantenidas a -80°C hasta el momento de realizar los análisis.



Figura 3: (a) y (b) Brotes etiolados del ensayo 5.

Los ensayos realizados se diferencian en los tiempos de exposición y la intensidad luminosa suministrada luego de la aplicación de NO, siendo definidos de la siguiente forma:

Ensayo 1: Plántulas etioladas de trigo fueron tratadas (con y sin aplicación de NO) y expuestas 2 horas de luz con intensidad $\sim 475 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, luego fueron puestas nuevamente en oscuridad. Las muestras se tomaron a las 0, 24, 48, 72, 120 y 168 horas de oscuridad.

Ensayo 2: Hojas jóvenes etioladas de vid fueron tratadas (con y sin aplicación de NO) y expuestas 2 horas de luz con intensidad $\sim 475 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, luego fueron puestas nuevamente en oscuridad. Las muestras se tomaron a las 0, 24, 48, 72, 120 y 168 horas de oscuridad.

Ensayo 3: Hojas jóvenes etioladas de vid fueron tratadas (con y sin aplicación de NO) y mantenidas en oscuridad sin ser expuestas a la luz en ningún momento. Las muestras se tomaron a las 0, 24, 48, 72 y 120 horas desde la aplicación de NO.

Ensayo 4: Hojas jóvenes etioladas de vid fueron tratadas (con y sin aplicación de NO) y mantenidas bajo un fotoperíodo de 12h luz y 12h oscuridad, la intensidad luminosa entregada fue $\sim 475 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Se tomaron muestras a las 0, 24 (12h luz/12h oscuridad) y 48 horas (24h luz/24h oscuridad) desde la aplicación de NO.

Ensayo 5: Hojas jóvenes etioladas de vid fueron tratadas (con y sin aplicación de NO) y se expusieron durante 8 horas a la luz natural con intensidad luminosa $\sim 1500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Se tomaron muestras a las 0, 2 y 8 horas de exposición a la luz desde de la aplicación de NO.

Determinación del contenido total de clorofila.

Análisis del contenido de clorofila mediante el método de Arnon (1949): Se extrajo clorofila desde las hojas sometidas a los distintos tratamientos macerando 0,15g de la muestra foliar con una solución fría de Acetona al 80%, se obtuvo una solución de color verde parejo que fue transferida cuantitativamente a un tubo eppendorf y enrazado hasta 1,5ml con Acetona 80%. Luego se dejaron reposar en oscuridad a 4°C por 15 minutos y fueron centrifugadas a 10.000 g a 4°C por 10 min. Se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo para cada muestra, eliminando el precipitado.

El contenido de clorofila total es determinado por mediciones espectrofotométricas a 663 y 645 nm (Espectrofotómetro JENWAY 6405 UV/Vis). Los valores registrados se ingresaron en la ecuación 1, obteniéndose el contenido de clorofila para cada muestra.

Ecuación 1:
$$\text{Clor total } (\mu\text{g Clor}\cdot\text{ml}^{-1}) = (8,02\cdot A_{663}) + (20,21\cdot A_{645})$$

Con el fin de tener material relativamente homogéneo para dar los tratamientos de NO se realizó la medición previa del contenido de clorofila mediante un método no destructivo:

Determinación del contenido de clorofila mediante clorofilómetro: El clorofilómetro CCM_200 entrega el índice CCI (Chlorophyll Content Index) que corresponde a un valor relativo de la concentración de clorofila. Se emplearon 64 hojas de distintas etapas de desarrollo y tonalidad para realizar una curva estándar entre el valor relativo CCM y el contenido de clorofila total ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). Se midió cada hoja con el clorofilómetro y adicionalmente, para determinar el contenido de clorofila se extrajo una muestra de área $2,84\text{cm}^2$ para ser analizada por el método de Arnon. 32 muestras del total sirvieron para elaborar la curva de calibración (Figura 4, a) y la ecuación de la recta permitió estimar las equivalencias entre el valor relativo CCM y los μg de clorofila total por muestra (Figura 4, b).

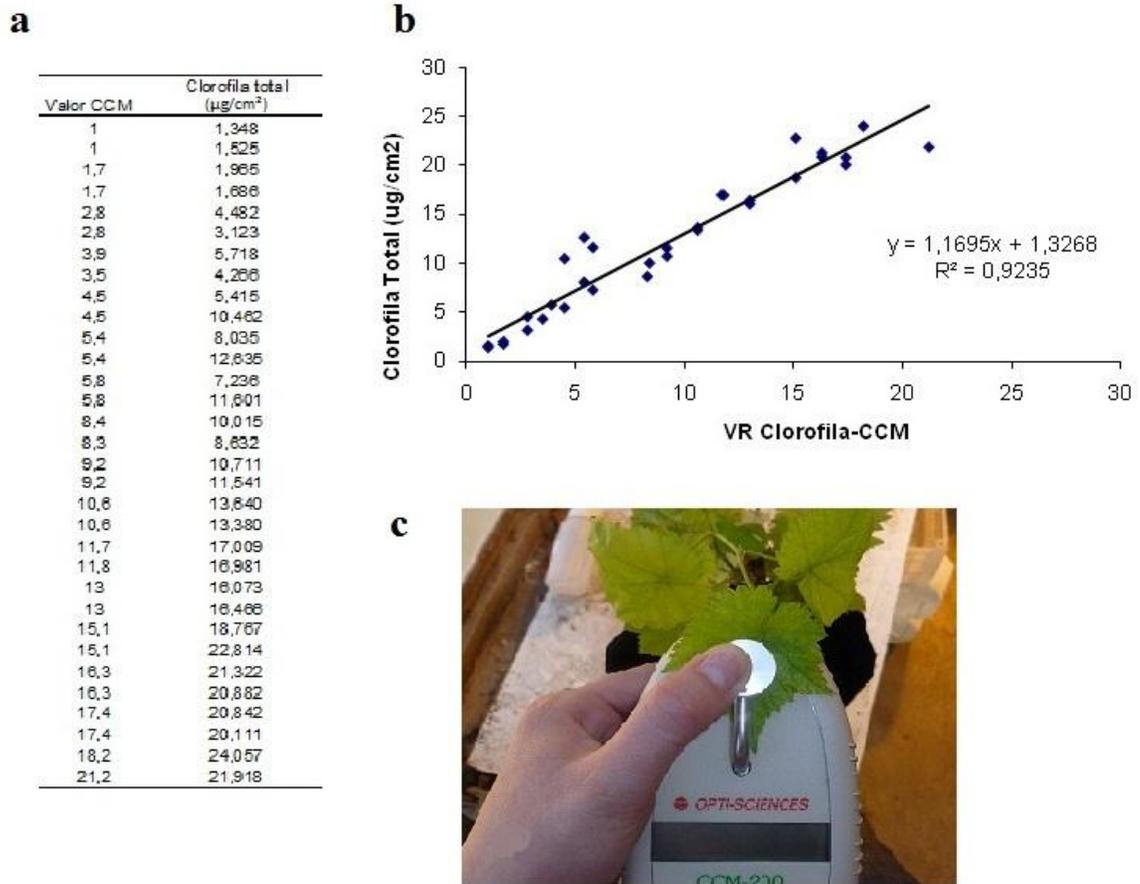


Figura 4: (a) Valores CCM medidos con clorofilómetro y sus respectivas equivalencias obtenidas mediante el método de Arnon. (b) Curva de calibración obtenida entre el valor relativo de clorofila CCM y el contenido de clorofila en $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Valores entregados en (4, a)). (c) Determinación del contenido de clorofila mediante el clorofilómetro.

Determinación de la expresión de ELIPs.

La determinación de la expresión de las proteínas ELIPs se efectuó por medio de Western Blots usando inmunodetección de acuerdo al método descrito por Towbin *et al.* (1979) con algunas modificaciones. Se usó un anticuerpo anti ELIP de arveja, que es capaz de detectar proteínas tipo ELIPs en vid (Pinto *et al.*, 2011). Debido a que la planta de vid es una especie distinta a arveja, es posible que la proteína detectada no sea exactamente la misma, por lo que se denominó como “proteína tipo ELIPs” (PtELIPs).

Para la determinación del nivel de expresión de PtELIPs se procedió de la siguiente manera:

a) Extracción de proteínas totales: la extracción de proteínas totales en la hoja se realizó mediante el método descrito por Pötter y Kloppstech (1993) con algunas modificaciones. Se maceraron 0,1 g de tejido foliar con 1,0 ml de buffer de extracción (21,7 mM Na₂CO₃, 2,0 % SDS, 2 mM EDTA, 1mM PMSF, 2,9 mM ácido aminocaproico, 13,7% glicerina, 56 mM DTT y 0,1% de azul de bromofenol). Luego de incubar a 65° C por 20 min en un baño de agua, la muestra se centrifugó por 10 min a 10.000 g. El sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo y es hervido por 5 min. Luego se centrifugó por 10 min a 10.000 g y se recuperó el sobrenadante.

b) Cuantificación de proteínas totales: Para determinar la cantidad de proteínas totales se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976). Se tomaron 770 µL de agua destilada y se colocaron en un tubo eppendorff al cual se le adicionó 30 µL de una dilución de la muestra (1/5), luego se agregaron 200 µL del reactivo de Bradford concentrado (ácido ortofosfórico al 50%, metanol al 25% y azul de Coomassie 250G al 0,05%). Luego de agitar el tubo las muestras se mantuvieron por 10 min en oscuridad como mínimo para posteriormente medir la absorbancia a 595nm en un espectrofotómetro (Espectrofotómetro JENWAY 6405 UV/Vis). La concentración de proteínas se determinó mediante una curva de calibración realizada con una solución stock de BSA de 1 mg/ml.

c) Electroforesis en condiciones desnaturantes: Con el fin de separar las proteínas por tamaño, se realizó una electroforesis de acuerdo a lo descrito por Laemmli (1970), utilizándose acrilamida al 15% para el gel de concentración y el de separación. En cada carril se cargaron cantidades iguales de proteína (10µg) contenidas en un mismo volumen.

d) Inmunodetección de ELIPs: Las proteínas separadas por electroforesis fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de acuerdo al método de Towbin *et al.* (1979). La membrana, posteriormente, fue incubada con un anticuerpo policlonal primario anti- ELIP de arveja obtenido en cabra, en una dilución de 1: 1000 en leche descremada al 5% durante 12 horas a 4°C. Se lavó la membrana con buffer PBST (Phosphate Buffer Saline Tween-20) y la detección de las bandas se llevó a cabo incubándola durante 1h a temperatura ambiente con un suero anti- IgG de cabra conjugado con fosfatasa alcalina en una dilución de 1:20000 (en leche al 5%). Este segundo anticuerpo

tiene afinidad con el anticuerpo primario por lo que quedó fijado en las bandas obtenidas. Luego de un nuevo lavado con buffer PBST, se procedió al revelado, donde la membrana se remojó con los sustratos 5- bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato p-toluidina/ cloruro de nitroazul- tetrasolio en buffer TMN (Tris-MgCl₂-NaCl) pH 9,5 (Harlow y Lane, 1988).

e) Análisis de las bandas obtenidas: Se utilizó el programa computacional 1D Image Analysis 3,0 (Kodak Digital Science, EE.UU.) para estimar la expresión de la proteína ELIPs a través de la medición de la intensidad de cada banda obtenida por la inmunodetección, la cual será expresada como porcentaje, considerando el 100% como la máxima intensidad de banda (píxeles/cm²) encontrada experimentalmente en cada ensayo.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño en bloques temporales completamente aleatorizados con 3 repeticiones para cada muestra. Los tiempos desde el momento de la aplicación actuaron como bloques sobre los tratamientos (Con/Sin aplicación de NO). La unidad experimental fue la hoja.

Los resultados obtenidos de cada tratamiento fueron sometidos a distintas pruebas mediante el software estadístico InfoStat para verificar si efectivamente cumplían con los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianzas. Al no cumplirse dichos supuestos en ciertos rangos de datos, se decidió compararlos mediante un análisis de varianza no paramétrica (Kruskal Wallis), con un nivel de significancia del 5%.

Los gráficos fueron obtenidos con Sigma Plot 10.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de NO sobre el contenido de clorofila total en plántulas etioladas de trigo.

Ensayo 1: Para evaluar el efecto del NO, se realizó el primer ensayo con plántulas etioladas de trigo para verificar si NO actúa de manera similar a lo descrito por Beligni y Lamattina en su estudio con esta especie (1999). Con posterioridad a la aplicación de NO las plántulas etioladas fueron expuestas a una intensidad luminosa promedio de $475 \mu\text{mol PAR m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante 2 h; las muestras se tomaron a las 0, 24, 48, 72, 120 y 168 h desde que las plántulas volvieron a la condición inicial de oscuridad (Figura 5, a). En efecto este cereal mostró un aumento lineal del contenido de clorofila cuando se aplicó NO (Figura 5, b). Después de 5 días de tratamiento con NO se presentó la mayor respuesta llegando a la concentración de $108,9 \mu\text{g clorofila}\cdot\text{gPF}^{-1}$, mientras que las plántulas sin aplicación de NO aumentaron hasta $60,4 \mu\text{g clorofila}\cdot\text{gPF}^{-1}$; lo que significa un incremento por parte de las plántulas con aplicación de NO de 1,8 veces sobre el nivel presentado por las plántulas sin aplicación de NO a las 120 h. Esto indica que trigo posee una tasa de acumulación del contenido de clorofila debido a NO de $0,4 \mu\text{g de clorofila}\cdot\text{gPF}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Por su parte, la tasa de acumulación de clorofila para las plántulas control sin aplicación de NO fue casi nula ($0,02 \mu\text{g de clorofila}\cdot\text{gPF}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) ya que después de 120h en oscuridad el contenido de clorofila tiene un valor estadísticamente igual al valor inicial.

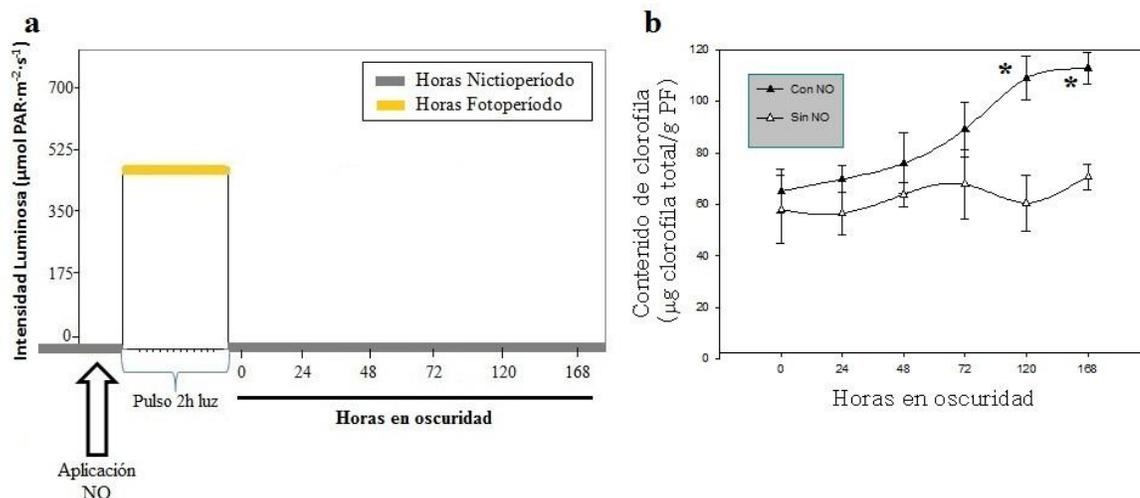


Figura 5: (a) Esquema del ensayo 1 realizado con plántulas etioladas de trigo, expuestas luego de la aplicación de NO a un pulso de 2h a la luz. (b) Acumulación de clorofila en plántulas tratadas (\blacktriangle) y no tratadas (\triangle) con NO, que posterior al pulso de luz fueron mantenidas en oscuridad. Las barras indican la desviación estándar y los puntos con * indican diferencias entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

Los resultados obtenidos demuestran que efectivamente NO cumple la función de activar la acumulación de clorofila en plántulas etioladas de trigo, tal como lo proponen Beligni y Lamattina en su estudio (1999), al observarse un aumento considerable en el tiempo del contenido de clorofila en las plántulas de trigo tratadas con NO respecto a plántulas sin aplicación de NO. En función a estos resultados se realizó el siguiente ensayo con hojas jóvenes etioladas de vid.

Efecto de NO sobre el contenido de clorofila total en hojas jóvenes de vid.

Ensayo 2: En el segundo ensayo se repitió el esquema utilizado en el ensayo 1, esta vez con hojas jóvenes etioladas de vid que fueron tratadas con la misma dosis de NO (100 μM SNAP), expuestas a igual intensidad luminosa durante 2 horas y posteriormente dejadas en oscuridad por 7 días, período durante el cual se tomaron muestras a las 0, 24, 48, 72, 120 y 168 h (Figura 6, a). Los resultados obtenidos (Figura 6, b) muestran que las hojas con aplicación de NO presentaron la mayor acumulación de clorofila después de 24 h de tratamiento con 67,3 μg clorofila $\cdot\text{gPF}^{-1}$ y una tasa de acumulación de 1,4 μg de clorofila $\cdot\text{gPF}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Por su parte las hojas sin NO aumentaron el contenido de clorofila en el mismo período de tiempo a 41,6 μg clorofila $\cdot\text{gPF}^{-1}$, con una tasa de acumulación de 0,3 μg de clorofila $\cdot\text{gPF}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Se corrobora con estos resultados la acción de NO sobre la síntesis de clorofila en vid al obtenerse un aumento de 1,6 veces en la acumulación de clorofila en las hojas tratadas con NO respecto a las hojas control tratadas con agua.

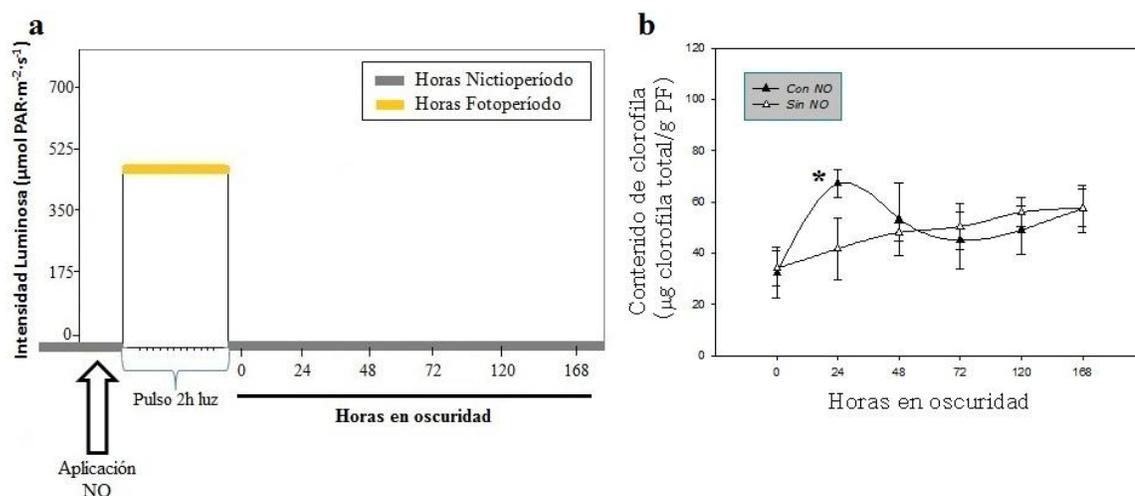


Figura 6: (a) Esquema del ensayo 2 realizado con hojas jóvenes etioladas de vid, expuestas luego de la aplicación de NO a un pulso de 2 h a la luz. (b) Acumulación de clorofila en hojas tratadas (\blacktriangle) y no tratadas (\triangle) con NO, que posterior al pulso de luz fueron mantenidas en oscuridad. Las barras indican la desviación estándar y los puntos con * indican diferencias entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

Si comparamos las tasas de acumulación de clorofila obtenidas en el punto donde se presenta el mayor contenido de clorofila total para las hojas con aplicación de NO de los ensayos 1 y 2, resulta ser mayor el valor de la tasa de acumulación de clorofila del ensayo 2 en vid ($1,4 \mu\text{g}$ de clorofila $\cdot \text{gPF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) respecto al valor obtenido en el ensayo 1 en trigo ($0,4 \mu\text{g}$ de clorofila $\cdot \text{gPF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) debido al tiempo de reacción frente a la aplicación de NO. En vid la acción de NO presenta el máximo contenido de clorofila a las 24h en oscuridad observándose luego de ello una disminución y estancamiento en la acumulación de clorofila en horas posteriores de muestreo, lo cual indica que en vid la acción positiva de NO sobre la síntesis de clorofila es momentánea y dependiente de al menos 2 horas de iluminación; en trigo, en cambio, el efecto del NO sobre la acumulación de clorofila perdura mas allá de las 24h en oscuridad, continuando dicha acumulación hasta presentar un máximo a las 120h bajo esta condición, lo que sugiere que efectivamente NO ejerce acción sobre un proceso dependiente de la luz (Lamattina, 2001).

Ensayo 3: Se realizó un tercer ensayo que mantuvo las mismas características del ensayo 2, solo difiere en la no aplicación de un pulso de luz luego de tratar las hojas etioladas con NO (Figura 7, a). Los resultados obtenidos se ilustran en la figura 7, b, los cuales indican que no hay efectos de NO sobre la acumulación de clorofila cuando se hace el tratamiento en oscuridad sin dar ningún tipo de pulso de luz, lo cual demuestra que la acción del NO sobre la acumulación de clorofila en vid es luz- dependiente.

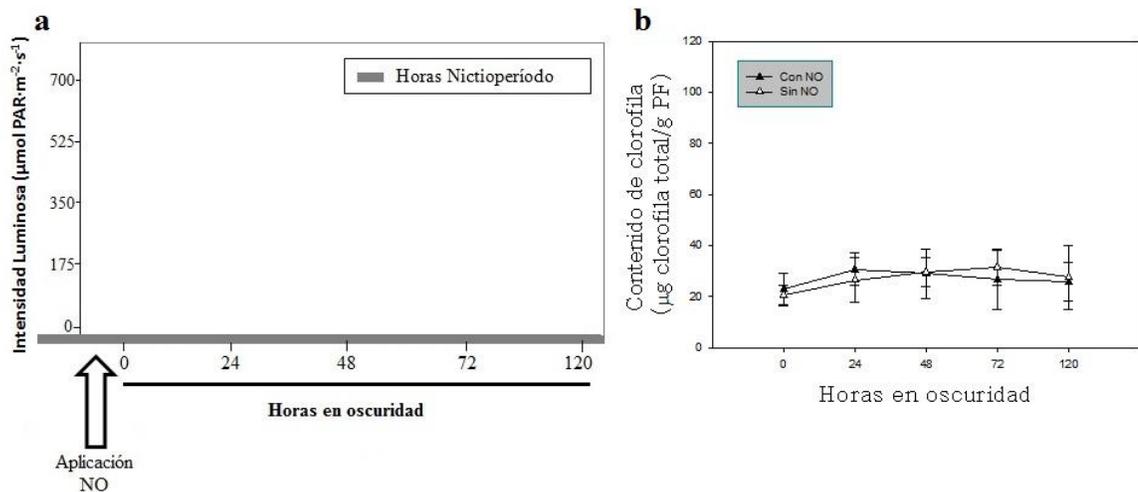


Figura 7: (a) Esquema del ensayo 3 planteado en hojas jóvenes etioladas de vid, mantenidas en oscuridad permanente. (b) Acumulación de clorofila en hojas tratadas (▲) y no tratadas (Δ) con NO. Las barras indican la desviación estándar. Ensayo no presenta diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

Ensayo 4: En el cuarto ensayo las hojas jóvenes etioladas fueron expuestas con posterioridad a la aplicación de los tratamientos, a un fotoperíodo de 12h luz/12h oscuridad con una intensidad luminosa promedio de $475 \mu\text{mol PAR m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante 48 h, distribuido como se muestra en la figura 8, a. Los resultados obtenidos (Figura 8, b) indican que en las hojas con aplicación de NO la mayor acumulación de clorofila ocurre a 24h de iniciado el tratamiento ($12\text{h luz/ } 12\text{h oscuridad}$) con $70,9 \mu\text{g clorofila}\cdot\text{gPF}^{-1}$, presentando una tasa de acumulación de clorofila de $2,3 \mu\text{g de clorofila}\cdot\text{gPF}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Las hojas sin aplicación de NO por su parte acumularon hasta el mismo período de tiempo $42,6 \mu\text{g clorofila}\cdot\text{gPF}^{-1}$, correspondientes a una tasa de acumulación de clorofila de $1,1 \mu\text{g de clorofila}\cdot\text{gPF}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Estos resultados reflejan un aumento en el contenido de clorofila de 1,6 veces en las hojas tratadas con NO por sobre las hojas sin aplicación de NO, a las 24h.

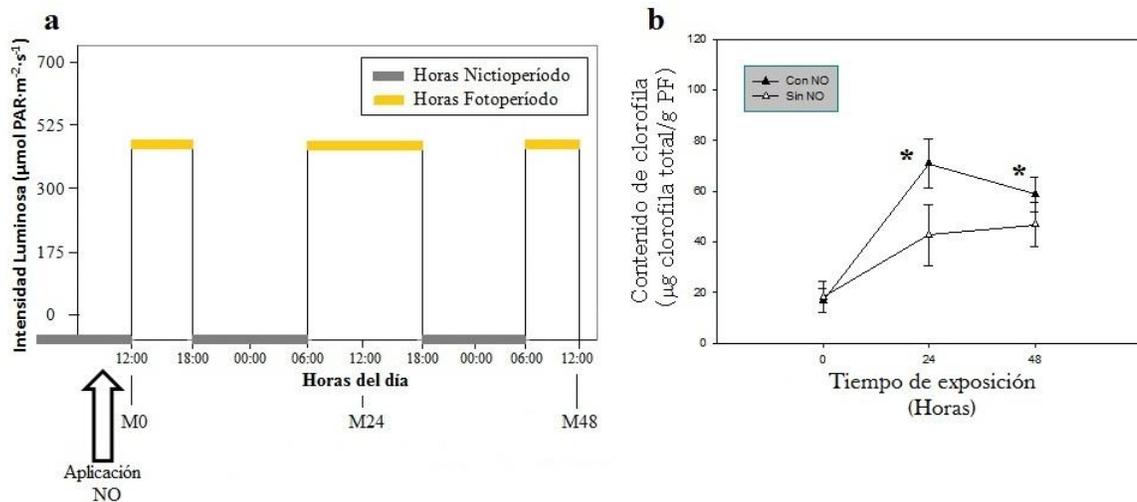


Figura 8: (a) Esquema del ensayo 4 planteado en hojas jóvenes etioladas de vid, expuestas luego de la aplicación de NO a un fotoperíodo de 12h luz/12h oscuridad. Momentos de muestreo a las 0 horas (M0), 24 horas (M24) y 48 horas (M48) desde la aplicación. (b) Acumulación de clorofila en hojas tratadas (\blacktriangle) y no tratadas (\triangle) con NO. Las barras indican la desviación estándar y los puntos con * indican diferencias entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

En las condiciones experimentales, las hojas con aplicación de NO del ensayo 2 y 4 mostraron un incremento similar en el contenido de clorofila respecto a las hojas sin aplicación de NO (1,6 veces) a las 24 h, esta respuesta positiva para las hojas tratadas con NO se generó a pesar de que ambos ensayos recibieran distintos tiempos de exposición a una misma intensidad luminosa. Por un lado las hojas etioladas del ensayo 2 recibieron un pulso de 2h de luz y 24h de oscuridad, y en el caso del ensayo 4 las hojas etioladas recibieron 12h de luz y 12h de oscuridad. Dicha diferencia en los tiempos de exposición a la luz generó además una mayor tasa de acumulación de clorofila en el ensayo 4 respecto al ensayo 2 ($2,3 \mu\text{g de clorofila}\cdot\text{gPF}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ y $1,4 \mu\text{g de clorofila}\cdot\text{gPF}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente).

Lo planteado anteriormente determina que el tiempo de exposición a la luz influye positivamente sobre la tasa de acumulación de clorofila en hojas etioladas de vid tratadas con NO; sin embargo, dicho tiempo de exposición no interviene en la acción de NO sobre la acumulación de clorofila total de hojas asperjadas con NO comparadas con hojas sin aplicación de NO.

A 48h de iniciado el tratamiento (24h luz/24h oscuridad) se registra una baja en la tasa de acumulación de clorofila a $0,9 \mu\text{g}$ de clorofila $\cdot\text{gPF}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ para las hojas con aplicación de NO, la misma baja ocurre en las hojas control que llegan a $0,6 \mu\text{g}$ de clorofila $\cdot\text{gPF}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. A pesar de dicha disminución en las tasas de acumulación de clorofila, las hojas tratadas con NO siguen manteniendo una diferencia en el contenido de clorofila de 1,2 veces sobre las hojas sin aplicación de NO. Ello sugiere que la síntesis de clorofilas no se detiene gracias al régimen de luz al que fueron expuestas las hojas etioladas en este ensayo, al ser expuestas periódicamente a la luz. Nuevamente se demuestra que la acción de NO es dependiente de la presencia de luz al comparar lo sucedido en este ensayo (mantención de síntesis de clorofila) con en el ensayo 2 donde las hojas etioladas reaccionaron de forma positiva pero momentánea ante el NO y al pulso de 2h luz, mostrando ya a las 48h en oscuridad una marcada caída del contenido de clorofila que se vuelve permanente en las horas posteriores de su mantención en oscuridad.

Ensayo 5: En el último ensayo las hojas etioladas fueron mantenidas 8 horas bajo luz natural, período en el cual la intensidad luminosa fluctuó entre $900\text{-}2100 \mu\text{mol PAR m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Figura 9, a). Durante este período se siguió la evolución del contenido de clorofila, efectuando muestreos a las 0, 2 y 8h. Los resultados se ven en la figura 9, b; donde después de 8 h de iniciado el ensayo las hojas sin NO presentaron un incremento en el contenido de clorofila de $37,1 \mu\text{g}$ de clorofila $\cdot\text{gPF}^{-1}$, con una tasa de acumulación de clorofila de $2,5 \mu\text{g}$ de clorofila $\cdot\text{gPF}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Por su parte, las hojas con NO mostraron un mayor contenido de clorofila total $112,3 \mu\text{g}$ de clorofila $\cdot\text{gPF}^{-1}$ y una tasa de acumulación de $11,9 \mu\text{g}$ de clorofila $\cdot\text{gPF}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. La aplicación de NO produjo un incremento de tres veces en el contenido del pigmento fotosintético, comparado con las hojas sin aplicación de NO. Esto sugiere que NO participa efectivamente en el proceso de inducción de la acumulación de clorofila.

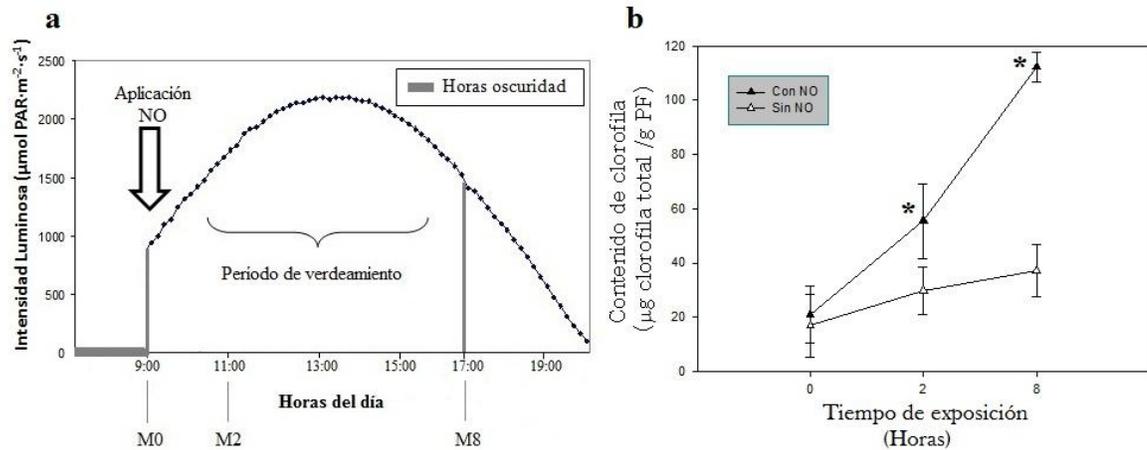


Figura 9: (a) Evolución de la intensidad luminosa durante el período de verdeamiento en el ensayo 5 con hojas jóvenes etioladas de vid, expuestas luego de la aplicación de NO a la luz natural. Momentos de muestreo a las 0 horas (M0), 2 horas (M2) y 8 horas (M8) de exposición. (b) Acumulación de clorofila en hojas tratadas (\blacktriangle) y no tratadas (\triangle) con NO. Las barras indican la desviación estándar y los puntos con * indican diferencias entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

Los resultados obtenidos en este ensayo sugieren que la respuesta de las hojas jóvenes al NO es dependiente de la intensidad y calidad de luz empleada, esto último se refiere a que en condiciones de invernadero no se suministro todo el espectro solar, excluyéndose por ejemplo la luz UV, radiación que podría inducir síntesis de clorofila (Jayakumar *et al.*, 2004). Lo anterior queda demostrado al comparar el contenido de clorofila total de una hoja tratada con NO y luego expuesta por 2h a luz de mediana intensidad (ensayo 2) con el contenido de clorofila que alcanza una hoja tratada con NO y expuesta a luz natural de alta intensidad luminosa (32,36 y 55,47 μg de clorofila $\cdot\text{gPF}^{-1}$, respectivamente). Las hojas etioladas tratadas con NO del ensayo efectuado en condiciones de campo acumulan en 2h de exposición a una alta intensidad luminosa 1,7 veces más clorofila total que las hojas etioladas tratadas con NO del ensayo 2 expuestas a una intensidad luminosa media por 2h.

Efecto de NO sobre la expresión de la proteína tipo ELIPs en plántulas etioladas de trigo.

Se determinó la expresión de la proteína tipo ELIPs mediante la medición de la intensidad de cada banda obtenida. El material vegetal analizado fue tomado de las mismas muestras utilizadas para la determinación del contenido de clorofila.

Ensayo 1: En este ensayo realizado con plántulas etioladas de trigo se observó una gran expresión de PtELIPs (Figura 10, a) ya que, después de la aplicación del tratamiento de NO y de la exposición de las plántulas a un pulso de luz por 2 h con la posterior mantención en oscuridad durante 7 días, se vió un aumento lineal de la inducción de síntesis de PtELIPs a partir de las 24h en oscuridad (Figura 10, b), alcanzando un máximo a los siete días con aplicación de NO. El tratamiento sin NO muestra un aumento en la expresión de PtELIPs a las 24 h de mantener a las plántulas etioladas en oscuridad, estancando luego este crecimiento en la expresión de la proteína en las horas posteriores que fueron mantenidas en oscuridad.

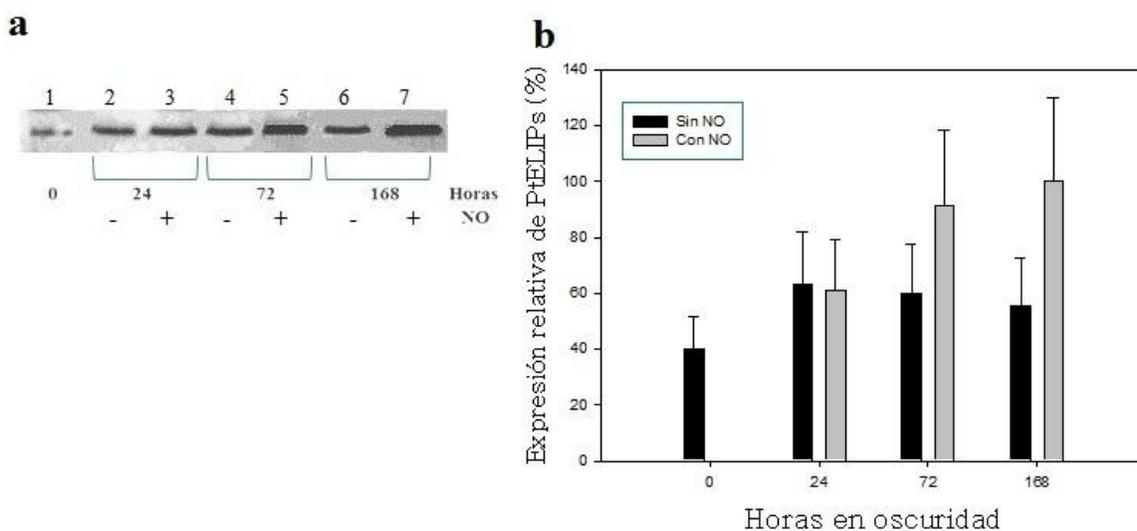


Figura 10: Efecto de NO sobre la expresión de Proteínas tipo ELIPs en plántulas etioladas de trigo mantenidas en oscuridad, expuestas luego de la aplicación de NO a un pulso de 2h a la luz. **(a)** Western blot utilizando anticuerpo de ELIP de arveja: 1) Tiempo cero; 2) 24h sin NO; 3) 24h con NO; 4) 72h sin NO; 5) 72h con NO; 6) 168h sin NO; 7) 168h con NO. **(b)** Expresión relativa de PtELIPs para ambos tratamientos (100% corresponde a la máxima intensidad registrada en el ensayo 1). Las barras indican la desviación estándar.

Los resultados indican que en trigo se necesitaron solo 2 h de exposición a una intensidad media de radiación ($\sim 475 \mu\text{mol PAR m}^{-2}\text{s}^{-1}$) para inducir la síntesis de proteínas tipo ELIPs. Si bien, la expresión de PtELIPs en las plántulas tratadas con NO tendió a aumentar

en el tiempo, las diferencias entre los tratamientos no fueron significativas. Por otro lado, dicha tendencia de expresión de PtELIPs se comporta de manera similar a lo ocurrido con la acumulación de clorofila para este ensayo, ello podría ratificar lo planteado por Adamska *et al.* (2001), que aumentando el contenido de clorofilas aumenta la expresión de las proteínas PtELIPs linealmente.

Efecto de NO sobre la expresión de la proteína tipo ELIPs en hojas jóvenes de vid.

Ensayo 2: En el segundo ensayo donde se emplearon hojas jóvenes etioladas de vid utilizando el mismo esquema del ensayo 1 en trigo, exponiendo las hojas etioladas a un pulso de 2h luz luego de la aplicación de NO para luego mantenerlas durante 7 días en oscuridad, se observó en general una baja expresión de PtELIPs (Figura 11, a). La máxima intensidad se registró a las 24 h de oscuridad con aplicación de NO (Figura 11, b), mostrándose luego una disminución en la expresión de PtELIPs para ambos tratamientos (Con y Sin NO) durante las horas posteriores en que las hojas fueron mantenidas en oscuridad.

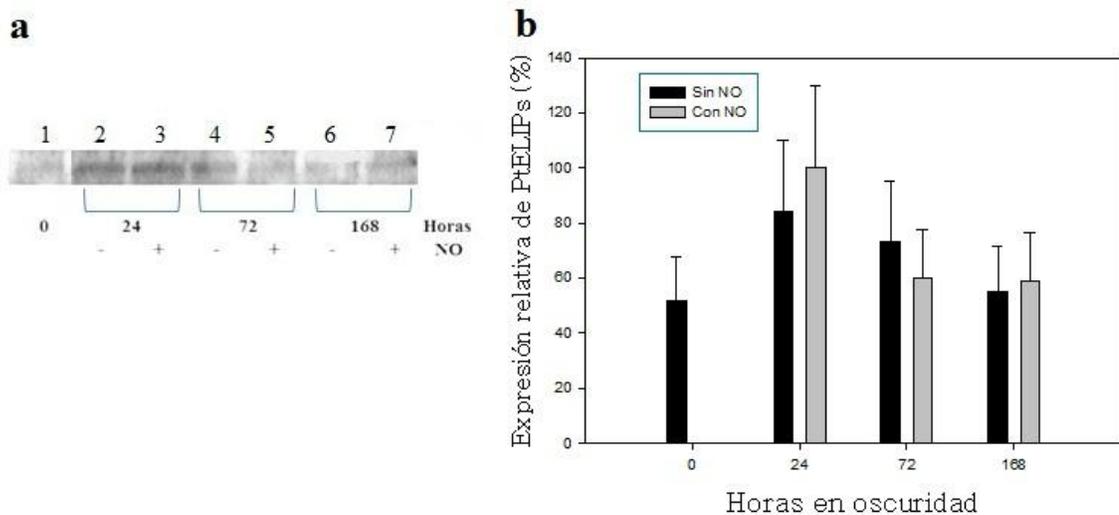


Figura 11: Efecto de NO sobre la expresión de PtELIPs en hojas jóvenes etioladas de vid mantenidas en oscuridad, expuestas luego de la aplicación de NO a un pulso de 2h a la luz. (a) Western blot utilizando anticuerpo de ELIP de arveja: 1) Tiempo cero; 2) 24h sin NO; 3) 24h con NO; 4) 72h sin NO; 5) 72h con NO; 6) 168h sin NO; 7) 168h con NO. (b) Expresión relativa de PtELIPs para ambos tratamientos (100% corresponde a la máxima intensidad registrada en el ensayo 2). Las barras indican la desviación estándar.

Adamska *et al.* (1993) observó una respuesta similar en arveja, en donde la proteína ELIPs se mantuvo estable durante las horas que duró el tratamiento de luz (a una alta intensidad) y sólo comenzó a degradarse cuando la hoja se recuperaba bajo condiciones de oscuridad. Por

ello, se sugiere que en vid se produjo esta leve alza en la expresión de PtELIPs por la exposición al pulso de 2h luz (intensidad media) generando una tendencia de aumento solo en las primeras 24h, de manera similar a lo observado en la acumulación de clorofila, con posterior degradación de PtELIPs al mantener la condición de oscuridad, sin observarse una respuesta clara del efecto de NO. Lo anterior corrobora nuevamente lo planteado por Adamska *et al.* (2001) donde la expresión de PtELIPs es función del contenido de clorofila.

Ensayo 3: En este ensayo no se cuenta con los datos correspondientes a la expresión de PtELIPs.

Ensayo 4: Las hojas etioladas de este ensayo que fueron sometidas a un fotoperíodo de 12h luz y 12h oscuridad posterior a la aplicación de NO, tendieron a incrementar la expresión de PtELIPs a medida que pasaron las horas bajo este régimen luminoso (Figura 12, a) presentando la máxima expresión 48 h después de la aplicación de los tratamientos (Figura 12, b).

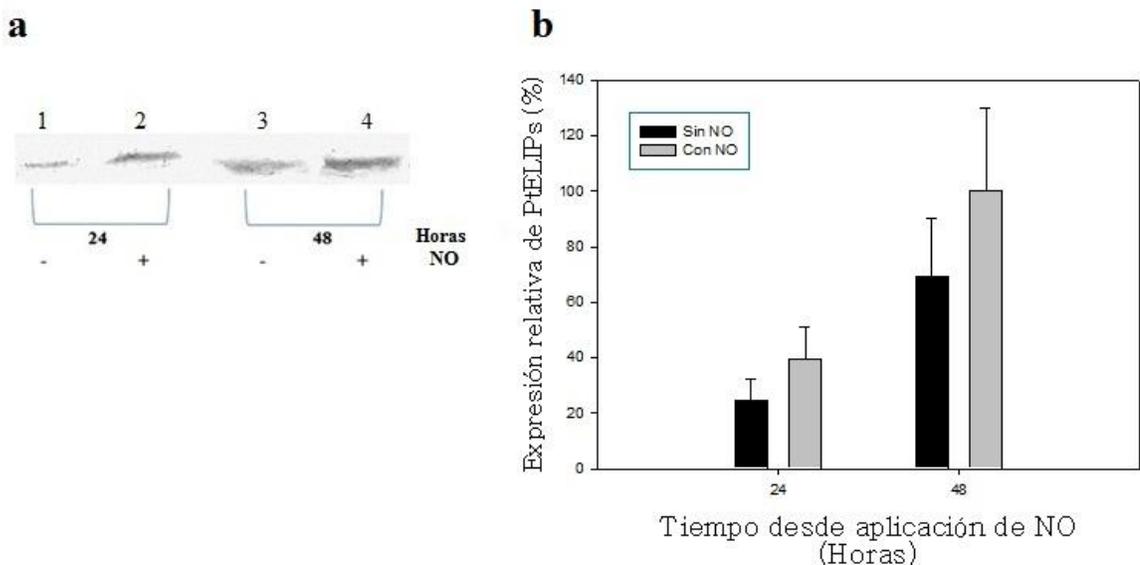


Figura 12: Efecto de NO sobre la expresión de PtELIPs en hojas jóvenes etioladas de vid, expuestas luego de la aplicación de NO a un fotoperíodo de 12h luz/12h oscuridad. **(a)** Western blot utilizando anticuerpo de ELIP de arveja: 1) 24h sin NO; 2) 24h con NO; 3) 48h sin NO; 4) 48h con NO. **(b)** Expresión relativa de PtELIPs para ambos tratamientos (100% corresponde a la máxima intensidad registrada en el ensayo 4). Las barras indican la desviación estándar.

La acumulación y expresión de PtELIPs en el tiempo pudo ser influenciada por el régimen de luz al que fueron sometidas las hojas etioladas, ya que no se mantuvieron en oscuridad constante luego de la aplicación de los tratamientos como en el ensayo 2, sino que aumentó considerablemente el tiempo de exposición a igual intensidad luminosa (~ 475 $\mu\text{mol PAR}$

$m^{-2}s^{-1}$). En este ensayo nuevamente parece tener una mayor influencia en la expresión de la proteína la exposición a cierto régimen luminoso ya que ambos tratamientos tienden a aumentar la acumulación de PtELIPs en el tiempo. Sin embargo, a pesar de existir una leve alza en la expresión de PtELIPs en las hojas tratadas con NO respecto a las hojas control sin aplicación de NO, no se muestran diferencias significativas entre los tratamientos.

Ensayo 5: En la figura 13a, se puede observar la expresión de PtELIPs obtenida en el quinto ensayo, donde las hojas jóvenes etioladas de vid fueron expuestas a luz solar posteriormente a la aplicación de NO. A partir de las 2 h de exposición se muestra una tendencia de aumento en la expresión de PtELIPs (Figura 13, b). Si bien en este ensayo se acentúa la expresión de PtELIPs en las hojas tratadas con NO sobre las hojas tratadas con agua en los tiempos muestreados, nuevamente se observa que la aplicación de NO exógeno no altera significativamente el contenido de proteínas ELIPs.

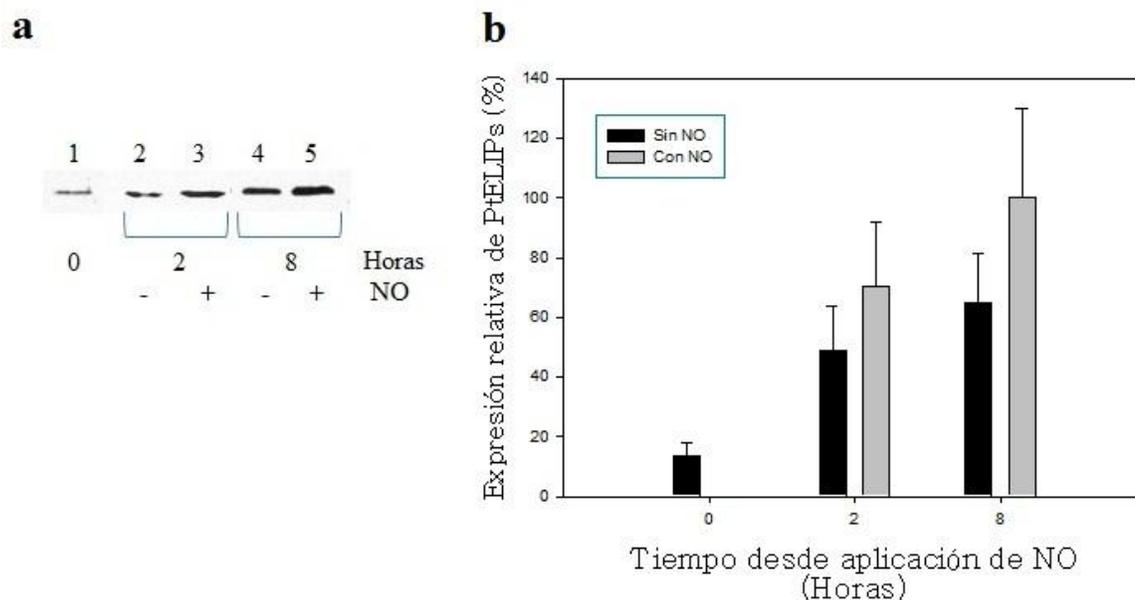


Figura 13: Efecto de NO sobre la expresión de PtELIPs en hojas jóvenes etioladas de vid, expuestas luego de la aplicación de NO a la luz natural (alta intensidad) durante 2 y 8h. **(a)** Western blot utilizando anticuerpo de ELIP de arveja: 1) Tiempo 0; 2) 2h sin NO; 3) 2h con NO; 4) 8h sin NO; 5) 8h con NO. **(b)** Expresión relativa de PtELIPs para ambos tratamientos (100% corresponde a la máxima intensidad registrada en el ensayo 5). Las barras indican la desviación estándar.

Los resultados obtenidos en este ensayo, concuerdan con los obtenidos por Pinto *et al.* (2011), donde la expresión de PtELIPs es función del tiempo de exposición a la radiación solar, como también de la intensidad y calidad de la radiación solar en el rango visible. Se observa una tendencia similar a la registrada en este ensayo sobre el contenido de clorofila, donde la expresión de la proteína aumenta según las horas de exposición a la luz.

La expresión de PtELIP en vid claramente estuvo influenciada por el tiempo de exposición de la hoja y las características de la radiación incidente sobre esta, lo cual indica que su expresión está estrechamente relacionada con este factor ambiental.

CONCLUSIONES

La aplicación exógena de NO afecta positivamente la acumulación de clorofila total tanto en trigo como en vid.

La acción del NO sobre el contenido de clorofila es dependiente del tiempo de exposición a la luz: en ambas especies estudiadas se necesitan a lo menos dos horas de exposición a la luz ($\sim 475 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) para inducir la acumulación de dicho pigmento.

La acción del NO en hojas jóvenes de vid es dependiente de la intensidad y calidad lumínica. La exposición a una alta intensidad luminosa ($\sim 1500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) promueve una mayor y más rápida acumulación de clorofila respecto a similares hojas expuestas a una intensidad lumínica media ($\sim 475 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Tanto en trigo como en vid, la expresión de PtELIPs es dependiente de la presencia de luz. A mayor tiempo de exposición e intensidad de la radiación se produjo una mayor inducción de la síntesis de esta proteína.

La hipótesis planteada para este estudio es rechazada ya que, a diferencia del efecto positivo que produce el NO en clorofila, la aplicación exógena de óxido nítrico no muestra una respuesta clara frente a la expresión de la proteína ELIPs, tanto en trigo como en vid.

BIBLIOGRAFÍA

Arnon, DI. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology 24: 1–15.

Adamska, I. 1997. ELIPs-Light-induced stress proteins. Physiologia Plantarum 100: 794-805.

Adamska, I., K. Kloppstech and I. Ohad. 1993. Early Light- inducible protein in pea is stable during light stress but is degraded during recovery at low light intensity. Journal of Biological Chemistry 268 (8): 5438- 5444.

Adamska, I., E. Kruse and K. Kloppstech. 2001. Stable Insertion of the Early Light-induced Proteins into Etioplast Membranes Requires Chlorophyll a. The Journal of Biological Chemistry 276: 8582-8587.

Belgini, MV. and L. Lamattina. 1999. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyls elongation, three light-inducible responses in plants. Planta 210 : 215-221.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Grimm, B., E. Kruse and K. Kloppstech. 1989. Transiently expressed early light- inducible thylakoid proteins share transmembrane domains with light- harvesting chlorophyll binding proteins. Plant molecular Biology 13: 583- 593.

Harlow, E. and D. Lane. 1988. Antibodies : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Heddad, M., H. Norén, V. Reiser, M. Dunaeva, B. Andersson and I. Adamska. 2006. Differential expresión and localization of early light- induced proteins in Arabidopsis. Plant Physiology 142: 75- 87.

Hutin, C., L. Nussaume, N. Moise, I. Moya, K. Kloppstech and M. Havaux. 2003. Early light-induced proteins protect Arabidopsis from photooxidative stress. Plant Biology 100(8):4921-4926.

Jayakumar, M., P. Amudha and G. Kulandaivelu. 2004. Effect of low doses of UV-A and UV-B radiation on photosynthetic activities in *Phaseolus mungo* L. Journal of Plant Physiology. Volume 47, Number 2, 105-110.

Laemmli, U K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227: 680- 685.

Lamattina, L. 2001. Óxido Nítrico en plantas: La historia recién comienza. Disponible en: <http://www.mdp.edu.ar/rectorado/secretarias/investigacion/nexos/13/oxido.htm>. Leído el 20 de Octubre de 2008.

Lindahl, M., C. Funk, J. Webster, S. Bingsmark, I. Adamska and B. Andersson. 1997. Expresión of ELIPs and PS II-S protein in spinach during acclimative reduction of the Photosystem II antenna in response to increased Light intensities. *Photosynthesis Research* 54: 227-236.

Mata, CG. and L. Lamattina. 2001. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptative plant responses against drought stress. *Plant Physiol* 126: 196-204.

Meyer, G. and K. Kloppstech. 1984. A rapidly light- induced chloroplast protein with high turnover coded for by pea nuclear DNA. *European Journal of Biochemistry* 138: 201- 207.

Pinto, F., M. Berti, D. Olivares, W.D. Sierralta, P. Hinrichsen and M. Pinto. 2011. Leaf development, temperature and light stress control of the expression of early light-inducible proteins (ELIPs) in *Vitis vinifera* L. *Environmental and Experimental Botany*. Volume 72, Issue 2, 278-283.

Pötter, E. and K. Kloppstech. 1993. Effects of light stress on the expression of early light-inducible proteins in barley. *European Journal of Biochemistry* 214: 779- 786.

Romanov, G., S. Lomin, N. Rakova, A. Heyl and T. Schmulling. 2008. Does NO play a role in cytokinin signal transduction? *FEBS Letter* 582: 874-880.

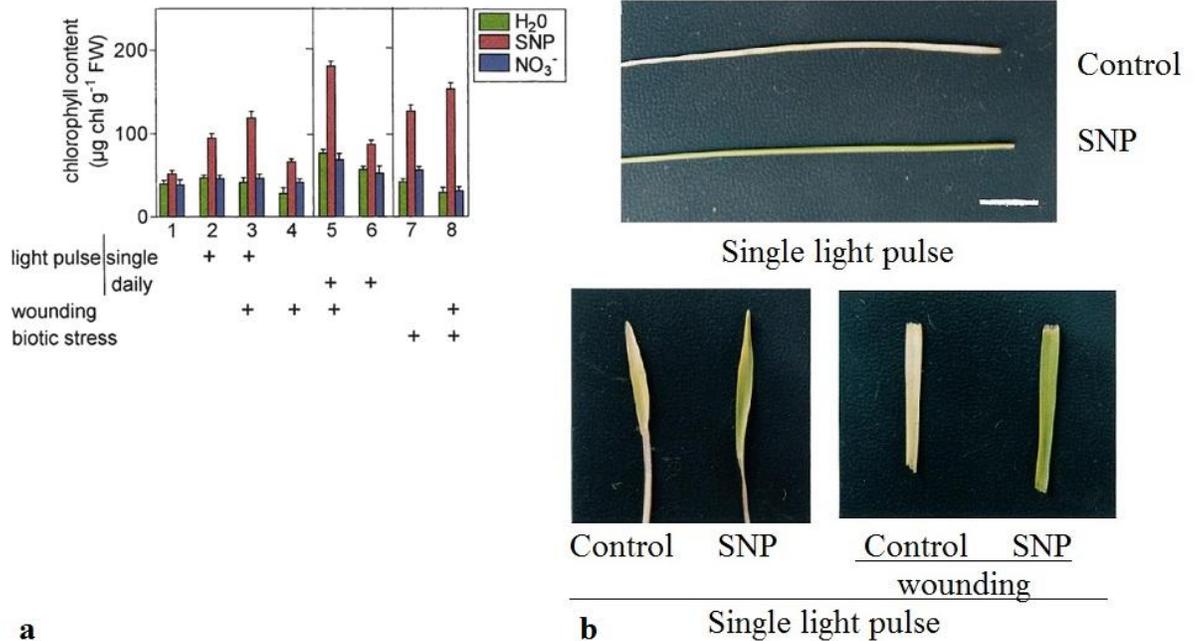
Sánchez, C. 2009. Producción de Óxido Nítrico en nódulos de Soja. Implicación de la desnitrificación. Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos. Universidad de Granada. Disponible en: <http://0-hera.ugr.es.adrastea.ugr.es/tesisugr/18324587.pdf>. Leído el 08 de enero del 2011.

Towbin, H., T. Stachelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*

Zhang, L., Y. Wang, L. Zhao, S. Shi and L. Zhang. 2005. Involvement of nitric oxide in light-mediated greening of barley seedlings. *Journal of Plant Physiology* 163: 818-826.

ANEXOS

Anexo I: Resultados obtenidos por Beligni y Lamattina, 1999.



Efecto del óxido nítrico sobre el verdeamiento de plántulas etioladas de trigo. Plántulas de trigo fueron cultivadas a 18°C en oscuridad y asperjadas con $100\ \mu\text{M}$ SNP, H_2O (control) o $\text{NaNO}_2/\text{NaNO}_3$ (control). Las plántulas fueron mantenidas en oscuridad durante 10 días donde fueron ejecutados los diferentes tratamientos. **(a)** Determinación del contenido de clorofila. 1) Algunos potes fueron mantenidos con sus plántulas en constante oscuridad, 2) Otros recibieron un pulso de 2 horas de luz blanca. Alternativamente, otras plántulas crecieron por 7 días bajo oscuridad y se les ejecutó una herida. 3) Plántulas que recibieron el pulso de luz y la herida a nivel foliar. 4) Plántulas mantenidas en oscuridad y adicionalmente se le produjo una herida. 5) Otras plántulas recibieron el pulso de luz blanca (2 hrs.) durante 7 días consecutivos, más la herida. 6) Plántulas que sólo recibieron el pulso de 2 hrs. /7 días. 7) A otras plántulas se les incorporó un estrés biótico, inoculando con *Septoria tritici* al tercer día, para luego mantenerlas en oscuridad por otros 5 días. 8) Las plántulas recibieron la inoculación de *septoria tritici* y adicionalmente la herida. **(b)** Imágenes muestran la mediación del NO en el verdeamiento. Paneles de arriba y abajo-izquierda corresponden a la 1^{era} y 2^{da} hoja, respectivamente, del tratamiento 2) descrito en (a). El panel de abajo-derecha corresponde a la 1^{era} hoja del tratamiento 3).