



Reseña bibliográfica

ÓXIDO NÍTRICO Y SU PAPEL EN LAS RESPUESTAS DE LAS PLANTAS AL ESTRÉS HÍDRICO

Review

Nitric oxide and its role in plant responses to water stress

Yamile Vidal Aguiar¹✉, Akira Pérez Márquez¹ y Loiret Fernández García²

ABSTRACT. Water deficit is currently the abiotic stress with highest incidence on growth and crop productivity. Numerous reports affirm that nitric oxide (NO) is a signaling molecule involved in mechanisms of response to this stress condition. Through the application of NO donor compounds have been obtained experimental evidence in support these functions for NO, but it's little known about the natural production of NO in response to drought stress and its implication for the plant. Likewise, the mechanism by which this molecule exerts its effects and the molecular targets of NO in plants under water stress have not yet been described. Additionally various data indicate that stomatal closure is effected through intracellular signaling in which NO is a component too. Thus, these data suggest an emerging model of drought stress response in which NO has been included.

RESUMEN. El déficit hídrico constituye en la actualidad el estrés abiótico de mayor incidencia en el crecimiento y productividad de los cultivos. Numerosos reportes afirman que el óxido nítrico (NO) es una molécula señal involucrada en los mecanismos de respuestas ante esta condición de estrés. Mediante la aplicación de compuestos donadores de NO se han obtenido evidencias experimentales que apoyan estas funciones para el NO, pero poco se sabe acerca de la producción natural de NO en respuesta al estrés por sequía y su implicación para la planta. Asimismo, el mecanismo por el cual dicha molécula ejerce sus efectos y las dianas moleculares del NO en plantas sometidas a déficit hídrico aún no han sido descritas. Adicionalmente varios datos indican que el cierre de los estomas se efectúa a través de la señalización intracelular, en cual el NO es un componente. Por lo tanto, estos datos sugieren un nuevo modelo en la respuesta de la planta al estrés hídrico en la cual el NO debe ser incluido.

Key words: growth, stoma, stress, productivity

Palabras clave: crecimiento, estoma, estrés, productividad

INTRODUCCIÓN

El déficit hídrico es el estrés abiótico de mayor incidencia en el crecimiento de las plantas (1, 2). Durante los últimos años, los cambios globales en las condiciones climáticas han propiciado la intensificación y la prolongación de la sequía (1, 3).

Este tipo de estrés ocurre en las plantas cuando la pérdida de agua por transpiración excede la capacidad de absorción por las raíces, resultando en deshidratación celular, con el consecuente daño en las células, lo que puede desencadenar la muerte celular.

A nivel celular el déficit hídrico induce una sobreproducción de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*), las cuales son las responsables del daño oxidativo a biomoléculas

asociado con este tipo de estrés. Normalmente las plantas responden a esta condición modificando la expresión génica, relacionada con la producción de enzimas claves en síntesis de osmólitos, proteínas con función protectora, enzimas antioxidantes, factores de transcripción y otras proteínas involucradas en las respuestas al estrés hídrico (4). La mayoría de estas respuestas están reguladas por el ácido abscísico (ABA), aunque también se han descrito vías de regulación independientes de esta hormona (5).

¹ Instituto Nacional Ciencias Agrícolas (INCA),
gaveta postal 1, San José de las Lajas,
Mayabeque, Cuba, CP 32700.

² Facultad Biología, Universidad de La Habana.
✉ yvidalaguiar@gmail.com

Bajo estas condiciones, uno de los mecanismos de defensa más importantes es el cierre estomático inducido por la redistribución y síntesis de ABA. Entre las moléculas que participan en la señalización mediada por ABA, el óxido nítrico (NO) es un importante intermediario.

El requerimiento de NO endógeno durante el cierre estomático inducido por esta hormona ha sido demostrado mediante el empleo de herramientas genéticas y bioquímicas (6).

Reportes recientes implican, además, la participación del NO y otras especies reactivas del nitrógeno como mecanismos de respuestas sistémicas de las plantas al déficit hídrico. Sin embargo, la información disponible del metabolismo de NO en plantas sometidas a déficit hídrico es limitada y aún cuando las investigaciones sobre el papel de esta molécula en numerosas respuestas fisiológicas ha aumentado en los últimos años, las fuentes de producción así como los mecanismos moleculares mediante los cuales el NO ejerce su respuesta, son todavía poco conocidos, por lo que es objeto de estudio de numerosos laboratorios en todo el mundo.

El objetivo de este artículo es mostrar información actualizada sobre los mecanismos de acción del NO así como las vías involucradas en su producción y el papel de esta molécula en la respuesta al déficit hídrico. Este es un tópico con importancia para esclarecer las bases moleculares, bioquímicas y fisiológicas, donde el NO constituye un intermediario que pudiera actuar de manera concertada con ROS en el mecanismo de respuesta de la planta ante esta condición y también para un uso práctico en la agricultura.

ESPECIES REACTIVAS DEL NITRÓGENO

El término de especies reactivas del nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés *Reactive Nitrogen Species*) se introdujo en la literatura para designar al NO y otras moléculas relacionadas con el NO, como por ejemplo los S-nitrosotioles (SNOs), S-nitrosoglutatión (GSNO), peroxinitrito y otros compuestos que poseen un rol relevante en múltiples procesos fisiológicos en células vegetales (7).

Evidencias experimentales en animales, demuestran la interacción del NO con diferentes biomoléculas como los lípidos (8), ácidos nucleicos (9) y proteínas, modificando sus funciones. Sin embargo, es esta última la más estudiada.

En plantas, numerosos reportes afirman que las RNS ejercen su señalización a través de modificaciones postraduccionales de proteínas específicas. En ese sentido el NO puede reaccionar con las proteínas de distintas formas; metales de transición presentes en la proteína dando complejos llamados metales nitrosilados (10), grupos sulfidrilos de residuos de cisteína mediante un proceso de S-nitrosilación (11) y por adición de un grupo nitro en residuos de tirosina mediado por un proceso de nitración (12, 13).

Una especial atención se ha dado al proceso de S-nitrosilación del tripéptido glutatión (GSH) para formar el S-nitrosoglutatión (GSNO) ya que esta molécula puede funcionar como reserva móvil del NO (14, 15) y puede regular el equilibrio entre GSNO y las proteínas nitrosiladas por un proceso de trasnitrosilación. En ese sentido la enzima GSNO reductasa parece ser un elemento clave porque cataliza la reducción de GSNO dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) a glutatión oxidado (GSSG) y NH_3 . Por

consiguiente, esta enzima controla el nivel de GSNO intracelular y como resultado los efectos de NO en las células (16, 17). En plantas la información disponible respecto al metabolismo de SNOs y RNS es todavía limitada comparada con los modelos animales.

SÍNTESIS DE NO EN PLANTAS

En la pasada década el NO ha emergido como una importante molécula señal en plantas. La síntesis de este compuesto es un mecanismo bien establecido en animales, catalizado enzimáticamente por tres óxido nítrico sintasa (NOS), las cuales presentan diferentes localizaciones y funciones. Esta enzima convierte la L-Arginina a L-Citrulina y NO que requiere para su catálisis diversos cofactores enzimáticos (18).

Sin embargo, en plantas, la generación de NO es más controversial. Hasta la actualidad diversos sistemas generadores de NO, tanto enzimáticos como no-enzimáticos, han sido descritos.

En 1996 se reportó por primera vez la presencia de actividad NOS en raíces y nódulos de *Lupinus albus* mediante el empleo de Arginina marcada radioactivamente, así como de un inhibidor de la actividad NOS en animales NG-monometil-L-Arginina (NMMA) (19).

Adicionalmente dicha actividad ha sido descrita en otras especies como *Nicotiana tabacum* (20) y *Zea mays* (21), así como en diferentes compartimentos celulares como cloroplastos de *Glycine max* (22) y peroxisomas de *Pisum sativum* (23).

En el 2003 se identificó el gen AtNOS1 en *Arabidopsis*, el cual codificaba para una proteína que poseía actividad NOS y dicha actividad requería los mismos cofactores descritos en animales, pero el gen no presentaba homología de secuencia con

ninguna de las isoformas descritas en mamíferos. De acuerdo con estos datos, los autores reportaron el descubrimiento de una NOS diferente a las descritas hasta el momento en la literatura, capaz de regular el crecimiento y la señalización hormonal en plantas (24). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que la proteína recombinante AtNOS1 no exhibía actividad NOS (25) y que dicha proteína era en realidad una GTPasa que pudiera ser necesaria para la producción de NO *in vivo* (26).

A pesar de que varios autores plantean la presencia de dicha actividad en plantas, el gen que codifica para esta enzima aún no ha sido caracterizado y esto constituye uno de los puntos más controversiales en lo referente a esta enzima en plantas (25, 27).

Por su parte, la nitrato reductasa (NR) constituye una de las enzimas reportadas, capaz de producir NO en plantas, y a su vez reduce el nitrito a NO en una reacción dependiente de NAD(P)H (28, 29). En el 2002 se demostró que la generación de NO mediada por esta enzima es estimulada en condiciones de hipoxia y puede ser modulada por el estatus de fosforilación de la enzima (30). Estos datos sugieren que un potencial mecanismo regulatorio puede existir *in vivo*.

Una proteína unida a membrana plasmática, específica de raíces: nitrito-NO reductasa (NI-NOR) ha sido descrita como fuente de NO. Dicha enzima usa Citocromo c como un donador de electrones *in vivo* y cataliza la producción de NO a partir de nitrito. Sin embargo, ni su rol fisiológico ni el gen que codifica para esta enzima ha sido reportado hasta el momento (31).

La formación de NO a partir de reacciones no enzimáticas han sido referidas en plantas de *Nicotiana tabacum* a partir de la reducción mitocondrial de nitrito a NO (32) y dicha reacción es favorecida a pH ácido, donde el nitrito puede

dismutar a NO (33). Por su parte la generación de NO *in vivo* por reacción de H₂O₂ y L-Arginina se reportó en el año 1997 (34). Adicionalmente una reacción mediada por la luz, donde el nitrito es reducido por carotenoides ha sido también demostrado como fuente de producción de NO (35).

Estudios recientes demostraron que células vegetales libres de nitrato reductasa son capaces de formar NO a partir del suplemento exógeno de Hidroxilamina (36), una vía que ha sido caracterizada en bacterias y animales (37). Así mismo las poliaminas pueden inducir la producción de NO, pero el mecanismo bajo el cual ocurre esto todavía no ha sido descrito (38). Análisis futuros en este sentido podrían definir nuevas vías de señalización, teniendo en cuenta que las poliaminas están involucradas en los mecanismos de respuesta frente a condiciones de estrés (39).

PAPEL DEL NO EN EL ESTRÉS HÍDRICO

Muchos autores plantean que las plantas producen determinados niveles de NO en su ambiente natural (40) como una respuesta generalizada frente al estrés ambiental (41). Asimismo el rol protector de NO en plantas sometidas a estrés hídrico ha sido reportado por varios investigadores. Dos mecanismos interrelacionados por el cual el NO puede mitigar los efectos del estrés han sido descritos.

El NO puede funcionar como antioxidante, mediante la eliminación directa de ROS que son generadas en estas condiciones, con la consecuente formación de peroxinitrito o mediante la expresión de enzimas antioxidantes (42). Además, el NO puede actuar como molécula señalizadora permitiendo la expresión de genes involucrados en la respuesta de la planta

al déficit hídrico y modificar la actividad de proteínas mediante modificaciones postraduccionales (43). Las propiedades químicas del NO (molécula pequeña, tiempo de vida medio corto, ausencia de carga y alta difusibilidad) sugieren que el NO pudiera funcionar como molécula señal en respuesta al estrés celular (44).

La mayoría de las investigaciones previas que estudian el efecto del NO y su papel en el estrés hídrico utilizan donadores químicos de NO, además compuestos que eliminan esta molécula o inhibidores de las enzimas envueltas en la producción de NO. Sin embargo, pocas son las publicaciones que han monitoreado la velocidad de producción de NO de forma natural y como respuesta al estrés hídrico.

Estudios anteriores han demostrado que el NO reduce la pérdida de agua en hojas de trigo y que dichos resultados están en correspondencia con una disminución en un 20 % de la tasa transpiratoria. Además, la exposición de la planta a SNP (Nitroprusiato de sodio, donador de NO) disminuye en un 25 % la pérdida de iones así como el daño celular y estos resultados son atribuidos a esta molécula porque incubación previa de SNP con compuestos eliminadores de NO revierten dichos efectos (45). Estos resultados sugieren que la aplicación exógena de NO puede conferir a las plantas un incremento en la tolerancia a las condiciones de estrés hídrico.

Publicaciones recientes han demostrado que el NO exógeno incrementa la tolerancia a la sequía en plantas de trigo (46). Dicho tratamiento aumenta el crecimiento de la plántula, manteniendo un elevado contenido de agua y disminuyendo el daño oxidativo por la producción de enzimas antioxidantes (47). Sin embargo, altas dosis de NO (2 mM SNP) aumentan el efecto del estrés como resultado de una sobreproducción

de ROS y una ineficiencia en la capacidad de controlar las especies reactivas del oxígeno mediante la expresión de sistemas antioxidantes. Estos datos indican que la habilidad potencial del NO de eliminar el peróxido de hidrógeno es, en parte, debido a la inducción del mecanismo de defensa antioxidante (46).

Otros estudios en plantas de maíz sometidas a estrés hídrico mediante la aplicación del 10 % de polietilenglicol mostraron un rápido incremento de NO en células del mesófilo. La actividad NOS fue inducida bajo estas condiciones en fracciones citosólicas y microsomal, siendo en esta última más elevada. Pre-tratamientos con inhibidores de la actividad NOS y NR disminuyen la producción de NO sugiriendo que dicha molécula es producida por la acción sinérgica de estas dos enzimas en plantas de maíz expuestas a déficit hídrico. Junto con la expresión de NO se induce adicionalmente la actividad enzimática de la superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa y glutatión reductasa (48).

Por su parte, en plántulas de *Cucumis sativus*, ha sido descrito un ligero incremento en las síntesis de NO en la punta de las raíces y en la región próxima a la zona de elongación. Esta producción fue reducida por pre-tratamiento con inhibidores de NOS y NR. Aplicación exógena de NO (SNP y GSNO) indica una respuesta adaptativa de las raíces al estrés hídrico, encontrándose una correlación positiva entre los niveles de NO y el estatus hídrico de la planta (49). Estos resultados evidencian que el aumento de NO está estrechamente vinculado a los mecanismos por los cuales la planta logra disminuir los efectos provocados por el déficit hídrico.

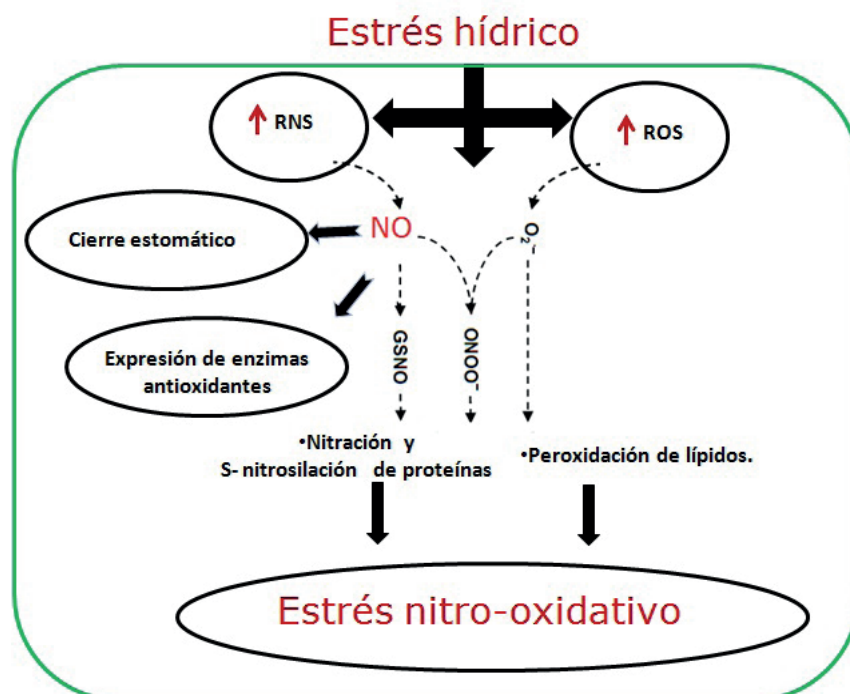
A pesar de este efecto protector que representa la aplicación exógena de NO a concentraciones específicas de este compuesto, estudios recientes demuestran, que una sobreproducción de

dicha molécula producida como respuesta fisiológica de las plantas al estrés hídrico en conjunto con un incremento en las ROS, puede mediar el daño a biomoléculas, siendo las modificaciones de proteínas las más estudiadas.

Estudios recientes demostraron que plantas de *Lotus japonicus* expuestas a estrés hídrico presentaron cambios significativos en los niveles de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno. Dichos cambios se acompañaron de aumentos en la peroxidación lipídica y nitración de proteínas respectivamente, indicando que bajo estas condiciones el estrés hídrico provocó un estrés oxidativo y nitrosativo (50). Estos resultados sugieren que el aumento de los niveles de NO pueden tener múltiples funciones en el mecanismo de adaptación al estrés hídrico y las modificaciones de proteínas pudieran estar envueltas en mecanismos de señalización específicas mediadas por estas moléculas.

Estas dos familias de moléculas (ROS y RNS) pueden considerarse como moléculas señales endógenas envueltas en el mecanismo de respuesta de las plantas a condiciones de sequía, pero una sobreproducción de ambas pueden provocar un estrés nitro-oxidativo con consecuencias tóxicas para la planta.

La figura muestra un modelo del metabolismo del NO en células vegetales bajo estrés hídrico y su interacción con ROS. Bajo estas condiciones y en dependencia de su concentración el NO puede funcionar como antioxidante mediante la eliminación directa de ROS o por la expresión de enzimas antioxidantes, o puede estar involucrado en el cierre estomático por vías de señalización dependientes de ABA. Una sobreproducción de RNS y ROS pueden provocar la modificación de proteínas y peroxidación de lípidos respectivamente provocando, a su vez, un estrés nitro-oxidativo en plantas sometidas a estrés por sequía (51).



Tomado de Francisco J Corpas y Juan B. Barroso, 2013 con algunas modificaciones.
 RNS: especies reactivas del nitrógeno ROS: especies reactivas del oxígeno
 NO: óxido nítrico GSNO: S-nitrosoglutatión
 ONOO: peroxinitrito

Modelo del metabolismo del NO en células vegetales sometidas a estrés hídrico

CIERRE ESTOMÁTICO DURANTE ESTRÉS HÍDRICO. PAPEL DE NO

El cierre estomático en respuesta al ABA es mediado por una red de señalización que envuelve vías dependientes e inactivadas por una serie de intermediarios que incluye el peróxido de hidrógeno (54, 55) y el NO (56).

El descubrimiento de que el NO es una molécula clave que media la respuesta por ABA en células oclusivas en plantas de guisante (57), ha sido confirmada en *Vicia faba* (58) y *Arabidopsis* (28). Se conoce que esta respuesta es dependiente del tiempo y de la concentración de NO y es mediada por un proceso completamente reversible (57). El empleo de sondas fluorescentes tal como el 4,5- diacetato de diaminofluoresceína (DAF-2DA) ha sido ampliamente reportada en la literatura para la detección de la producción de NO en tiempo real.

Incrementos en la fluorescencia de DAF-2DA fue observada en el citoplasma y alrededor de los cloroplastos de células oclusivas tratadas con ABA. Esta fluorescencia es específica para el NO, y cuando se empleó la sonda inactiva 4-diacetato de diaminofluoresceína (4AF-DA) no se observó incrementos en esta señal.

La aplicación exógena de 2-fenil-5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido (PTIO) o 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido (cPTIO), compuestos que eliminan el NO, inhiben el cierre estomático inducido por esta hormona, demostrando el papel endógeno de dicha molécula en esta respuesta (45, 57, 58). Estos estudios demostraron que la síntesis de NO es esencial para el cierre estomático inducido por ABA en varias especies (28, 45, 57).

Para corroborar el papel de NO en el cierre estomático, varios estudios han empleado donadores exógenos de NO, como por ejemplo el uso de SNP. Mediante el uso de este compuesto se observó que el mismo induce el cierre estomático y reduce la transpiración en tres especies diferentes de plantas: *Tradescantia* sp. (monocotiledóneas) y dos dicotiledóneas (*Vicia faba* y *Salpichroa organifolia*) (45). Estos resultados han sido corroborados por otros autores en guisante y plantas de *Arabidopsis* (28, 57).

En el 2002 se demostró que el cierre de los estomas es dependiente de la síntesis de NO mediada por la NR en células oclusivas y que el tratamiento de estas células de *Arabidopsis* con nitrito induce la síntesis de NO y consecuentemente el cierre estomático (28). El empleo de tungstato, un inhibidor de la actividad de la NR inhibe la síntesis de NO inducida por nitrito y ABA (59). Adicionalmente el empleo de NG-nitro-L-Arginina metil éster (L-NAME, inhibidor de la actividad de NOS) no inhibe la síntesis de NO inducido por ABA o el cierre estomático en la epidermis de *Arabidopsis* (28). Todos estos datos sugieren que la NR actúa como fuente de NO inducida por ABA en células oclusivas de *Arabidopsis*.

En células epidérmicas del doble mutante *nia1 nia2* (el cual exhibe menos del 0,5 % de la actividad de NR), ni ABA ni nitrito inducen el cierre estomático ni la síntesis de NO (28).

Curiosamente fue encontrado que las células oclusivas del mutante *nia1/nia2* no responden a otros estímulos de cierre estomático como oscuridad, peróxido de hidrógeno y empleo de donadores de NO, demostrando un rol importante en la funcionalidad de este tipo de células (28). Estos resultados brindan evidencias

genéticas del papel de la NR como fuente de NO durante el cierre estomático mediado por ABA en *Arabidopsis*.

Específicamente, de las dos isoformas de NR codificadas por los genes *nia1* y *nia2*, el cierre estomático es altamente dependiente de la isoforma codificada por el gen *nia1* (28).

Esta regulación mediada por NO puede ser por modulación del Ca^{2+} en células oclusivas. Esta reportado que el NO activa selectivamente los canales de Ca^{2+} intracelular en *Vicia faba* a través de vías de señalización dependientes de cGMP/cADPR, sugiriendo el papel del NO como molécula señal en el cierre estomático inducido por ABA (57, 60).

CONCLUSIONES

A pesar de los avances significativos en el metabolismo celular del NO en las plantas, se debe reconocer que es muy limitado el conocimiento sobre la función de esta molécula y otras RNS, que pudieran estar involucrados en el estrés hídrico. Un factor limitante es la necesidad de identificar las fuentes de producción de NO en cada órgano de la planta y cuáles son determinantes para esta condición de estrés.

Investigaciones futuras deben ir dirigidas a estudiar los mecanismos de transducción de señales involucradas en el mecanismo de respuesta del NO, así como a la identificación y caracterización de sus dianas moleculares.

Una interpretación completa de los fenómenos de estrés hídrico requiere el estudio no sólo del papel de las ROS, sino también de las RNS y dilucidar como estas dos clases de moléculas pueden interactuar durante el estrés hídrico.

BIBLIOGRAFÍA

- Chaves, M. M.; Maroco, J. P. y Pereira, J. S. "Understanding plant responses to drought-from genes to the whole plant". *Functional Plant Biology*, vol. 30, no. 3, 2003, pp. 239-264, ISSN 1445-4408, DOI <http://dx.doi.org/10.1071/FP02076>.
- Shao, H. B.; Chu, L. Y.; Jaleel, C. A.; Manivannan, P.; Panneerselvam, R. y Shao, M. A. "Understanding water deficit stress-induced changes in the basic metabolism of higher plants – biotechnologically and sustainably improving agriculture and the ecoenvironment in arid regions of the globe". *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 29, no. 2, 2009, pp. 131-151, ISSN 0738-8551, DOI [10.1080/07388550902869792](https://doi.org/10.1080/07388550902869792).
- Chaves, M. M. y Oliveira, M. M. "Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture". *Journal of Experimental Botany*, vol. 55, no. 407, 11 de enero de 2004, pp. 2365-2384, ISSN 0022-0957, 1460-2431, DOI [10.1093/jxb/erh269](https://doi.org/10.1093/jxb/erh269).
- Bray, E. A. "Plant responses to water deficit". *Trends in Plant Science*, vol. 2, no. 2, 1 de febrero de 1997, pp. 48-54, ISSN 1360-1385, DOI [10.1016/S1360-1385\(97\)82562-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)82562-9).
- Roychoudhury, A.; Paul, S. y Basu, S. "Cross-talk between abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways during abiotic stress". *Plant Cell Reports*, vol. 32, no. 7, 2013, pp. 985-1006, ISSN 0721-7714, 1432-203X, DOI [10.1007/s00299-013-1414-5](https://doi.org/10.1007/s00299-013-1414-5).
- Neill, S.; Barros, R.; Bright, J.; Desikan, R.; Hancock, J.; Harrison, J.; Morris, P.; Ribeiro, D. y Wilson, I. "Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress". *Journal of Experimental Botany*, vol. 59, no. 2, 2008, pp. 165-176, ISSN 0022-0957, 1460-2431, DOI [10.1093/jxb/erm293](https://doi.org/10.1093/jxb/erm293).
- Durzan, D. J. y Pedrosa, M. C. "Nitric Oxide and Reactive Nitrogen Oxide Species in Plants". *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, vol. 19, no. 1, 2002, pp. 293-338, ISSN 0264-8725, DOI [10.1080/02648725.2002.10648032](https://doi.org/10.1080/02648725.2002.10648032).
- Desel, C. y Krupinska, K. "The impact of tocopherols on early seedling development and NO release". *Journal of Plant Physiology*, vol. 162, no. 7, 2005, pp. 771-776, ISSN 0176-1617, DOI [10.1016/j.jplph.2005.04.008](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.04.008).
- Akuta, T.; Zaki, M. H.; Yoshitake, J.; Okamoto, T. y Akaike, T. "Nitrate stress through formation of 8-nitroguanosine: Insights into microbial pathogenesis". *Nitric Oxide*, vol. 14, no. 2, 2006, pp. 101-108, ISSN 1089-8603, DOI [10.1016/j.niox.2005.10.004](https://doi.org/10.1016/j.niox.2005.10.004).
- Gupta, K. J.; Hebelstrup, K. H.; Mur, L. A. J. y Igamberdiev, A. U. "Plant hemoglobins: Important players at the crossroads between oxygen and nitric oxide". *FEBS Letters*, vol. 585, no. 24, 2011, pp. 3843-3849, ISSN 0014-5793, DOI [10.1016/j.febslet.2011.10.036](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.10.036).
- Astier, J.; Rasul, S.; Koen, E.; Manzoor, H.; Besson-Bard, A.; Lamotte, O.; Jeandroz, S.; Durner, J.; Lindermayr, C. y Wendehenne, D. "S-nitrosylation: An emerging post-translational protein modification in plants". *Plant Science*, vol. 181, no. 5, 2011, pp. 527-533, ISSN 0168-9452, DOI [10.1016/j.plantsci.2011.02.011](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.02.011).
- Besson, B. A.; Pugin, A. y Wendehenne, D. "New Insights into Nitric Oxide Signaling in Plants". *Annual Review of Plant Biology*, vol. 59, no. 1, 2008, pp. 21-39, ISSN 1543-5008, 1545-2123, DOI [10.1146/annurev.arplant.59.032607.092830](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092830).
- Cecconi, D.; Orzetti, S.; Vandelle, E.; Rinalducci, S.; Zolla, L. y Delledonne, M. "Protein nitration during defense response in *Arabidopsis thaliana*". *Electrophoresis*, vol. 30, no. 14, 1 de julio de 2009, pp. 2460-2468, ISSN 1522-2683, DOI [10.1002/elps.200800826](https://doi.org/10.1002/elps.200800826).
- Durner, J. y Klessig, D. F. "Nitric oxide as a signal in plants". *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 2, no. 5, 1999, pp. 369-374, ISSN 1369-5266, DOI [10.1016/S1369-5266\(99\)00007-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)00007-2).
- Barroso, J. B.; Corpas, F. J.; Carreras, A.; Rodríguez, S. M.; Esteban, F. J.; Fernández, O. A.; Chaki, M.; Romero, P. M. C.; Valderrama, R.; Sandalio, L. M. y Río, L. A. del. "Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress". *Journal of Experimental Botany*, vol. 57, no. 8, 2006, pp. 1785-1793, ISSN 0022-0957, 1460-2431, DOI [10.1093/jxb/erj175](https://doi.org/10.1093/jxb/erj175).
- Leterrier, M.; Chaki, M.; Airaki, M.; Valderrama, R.; Palma, J. M.; Barroso, J. B. y Corpas, F. J. "Function of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress". *Plant Signaling & Behavior*, vol. 6, no. 6, 2011, pp. 789-793, ISSN 1559-2316, 1559-2324, DOI [10.4161/psb.6.6.15161](https://doi.org/10.4161/psb.6.6.15161).
- Corpas, F. J.; Alché, J. de D. y Barroso, J. B. "Current overview of S-nitrosoglutathione (GSNO) in higher plants". *Plant Physiology*, vol. 4, 2013, p. 126, ISSN 0032-0889, 1532-2548, DOI [10.3389/fpls.2013.00126](https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00126).
- Mayer, B. y Hemmens, B. "Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells". *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 22, no. 12, 1997, pp. 477-481, ISSN 0968-0004, DOI [10.1016/S0968-0004\(97\)01147-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(97)01147-X).
- Cueto, M.; Hernández, P. O.; Martín, R.; Bentura, M. L.; Rodrigo, J.; Lamas, S. y Golvano, M. P. "Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*". *FEBS Letters*, vol. 398, no. 2, 1996, pp. 159-164, ISSN 0014-5793, DOI [10.1016/S0014-5793\(96\)01232-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01232-X).
- Durner, J.; Wendehenne, D. y Klessig, D. F. "Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 95, no. 17, 18 de agosto de 1998, pp. 10328-10333, ISSN 0027-8424, 1091-6490, DOI [10.1073/pnas.95.17.10328](https://doi.org/10.1073/pnas.95.17.10328).

21. Ribeiro, E. A.; Cunha, F. Q.; Tamashiro, W. M. S. C. y Martins, I. S. "Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells". *FEBS Letters*, vol. 445, no. 2, 1999, pp. 283-286, ISSN 0014-5793, DOI 10.1016/S0014-5793(99)00138-6.
22. Jasid, S.; Simontacchi, M.; Bartoli, C. G. y Puntarulo, S. "Chloroplasts as a Nitric Oxide Cellular Source. Effect of Reactive Nitrogen Species on Chloroplastic Lipids and Proteins". *Plant Physiology*, vol. 142, no. 3, 11 de enero de 2006, pp. 1246-1255, ISSN 1532-2548, DOI 10.1104/pp.106.086918.
23. Barroso, J. B.; Corpas, F. J.; Carreras, A.; Sandalio, L. M.; Valderrama, R.; Palma, J.; Lupiáñez, J. A. y Río, L. A. del. "Localization of Nitric-oxide Synthase in Plant Peroxisomes". *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 51, 1999, pp. 36729-36733, ISSN 0021-9258, 1083-351X, DOI 10.1074/jbc.274.51.36729.
24. Guo, F. Q.; Okamoto, M. y Crawford, N. M. "Identification of a Plant Nitric Oxide Synthase Gene Involved in Hormonal Signaling". *Science*, vol. 302, no. 5642, 2003, pp. 100-103, ISSN 0036-8075, 1095-9203, DOI 10.1126/science.1086770.
25. Zemojtel, T.; Fröhlich, A.; Palmieri, M. C.; Kolanczyk, M.; Mikula, I.; Wyrwicz, L. S.; Wanker, E. E.; Mundlos, S.; Vingron, M.; Martasek, P. y Durner, J. "Plant nitric oxide synthase: a never-ending story?". *Trends in Plant Science*, vol. 11, no. 11, 2006, pp. 524-525, ISSN 1360-1385, DOI 10.1016/j.tplants.2006.09.008.
26. Moreau, M.; Lee, G. I.; Wang, Y.; Crane, B. R. y Klessig, D. F. "AtNOS/AtNOA1 Is a Functional *Arabidopsis thaliana* cGTPase and Not a Nitric-oxide Synthase". *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 47, 2008, pp. 32957-32967, ISSN 0021-9258, 1083-351X, DOI 10.1074/jbc.M804838200.
27. Gupta, K. J.; Fernie, A. R.; Kaiser, W. M. y van Dongen, J. T. "On the origins of nitric oxide". *Trends in Plant Science*, vol. 16, no. 3, 2011, pp. 160-168, ISSN 1360-1385, DOI 10.1016/j.tplants.2010.11.007.
28. Desikan, R.; Griffiths, R.; Hancock, J. y Neill, S. "A new role for an old enzyme: Nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 99, no. 25, 12 de octubre de 2002, pp. 16314-16318, ISSN 0027-8424, 1091-6490, DOI 10.1073/pnas.252461999.
29. Kaiser, W. M.; Weiner, H.; Kandlbinder, A.; Tsai, C.-B.; Rockel, P.; Sonoda, M. y Planchet, E. "Modulation of nitrate reductase: some new insights, an unusual case and a potentially important side reaction". *Journal of Experimental Botany*, vol. 53, no. 370, 2002, pp. 875-882, ISSN 0022-0957, 1460-2431, DOI 10.1093/jexbot/53.370.875.
30. Rockel, P.; Strube, F.; Rockel, A.; Wildt, J. y Kaiser, W. M. "Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro". *Journal of Experimental Botany*, vol. 53, no. 366, 1 de enero de 2002, pp. 103-110, ISSN 0022-0957, 1460-2431, DOI 10.1093/jexbot/53.366.103.
31. Stöhr, C. y Stremmler, S. "Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots". *Journal of Experimental Botany*, vol. 57, no. 3, 2006, pp. 463-470, ISSN 0022-0957, 1460-2431, DOI 10.1093/jxb/erj058.
32. Planchet, E.; Jagadis, G. K.; Sonoda, M. y Kaiser, W. M. "Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport". *The Plant Journal*, vol. 41, no. 5, 2005, pp. 732-743, ISSN 1365-313X, DOI 10.1111/j.1365-313X.2005.02335.x.
33. Bethke, P. C.; Badger, M. R. y Jones, R. L. "Apoplastic Synthesis of Nitric Oxide by Plant Tissues". *The Plant Cell*, vol. 16, no. 2, 2004, pp. 332-341, ISSN 1532-298X, DOI 10.1105/tpc.017822.
34. Nagase, S.; Takemura, K.; Ueda, A.; Hirayama, A.; Aoyagi, K.; Kondoh, M. y Koyama, A. "A Novel Nonenzymatic Pathway for the Generation of Nitric Oxide by the Reaction of Hydrogen Peroxide and D- or L-Arginine". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 233, no. 1, 1997, pp. 150-153, ISSN 0006-291X, DOI 10.1006/bbrc.1997.6428.
35. Cooney, R. V.; Harwood, P. J.; Custer, L. J. y Franke, A. A. "Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids". *Environmental Health Perspectives*, vol. 102, no. 5, 1994, pp. 460-462, ISSN 0091-6765.
36. Rümer, S.; Kapuganti, J. G. y Kaiser, W. M. "Oxidation of hydroxylamines to NO by plant cells". *Plant Signaling & Behavior*, vol. 4, no. 9, 2009, pp. 853-855, ISSN 1559-2316, 1559-2324, DOI 10.4161/psb.4.9.9378.
37. Vetrovsky, P.; Stoclet, J. C. y Entlicher, G. "Possible mechanism of nitric oxide production from NG-hydroxy-L-arginine or hydroxylamine by superoxide ion". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 28, no. 12, 1996, pp. 1311-1318, ISSN 1357-2725, DOI 10.1016/S1357-2725(96)00089-1.
38. Tun, N. N.; Santa, C.; Begum, T.; Silveira, V.; Handro, W.; Floh, E. I. S. y Scherer, G. F. E. "Polyamines Induce Rapid Biosynthesis of Nitric Oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* Seedlings". *Plant and Cell Physiology*, vol. 47, no. 3, 2006, pp. 346-354, ISSN 0032-0781, 1471-9053, DOI 10.1093/pcp/pci252.
39. Groppa, M. D. y Benavides, M. P. "Polyamines and abiotic stress: recent advances". *Amino Acids*, vol. 34, no. 1, 2007, pp. 35-45, ISSN 0939-4451, 1438-2199, DOI 10.1007/s00726-007-0501-8.
40. Wildt, J.; Kley, D.; Rockel, A.; Rockel, P. y Segschneider, H. J. "Emission of NO from several higher plant species". *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, vol. 102, no. D5, 1997, pp. 5919-5927, ISSN 2156-2202, DOI 10.1029/96JD02968.

41. Magalhaes, J. R.; Pedroso, M. C. y Durzan, D. "Nitric Oxide Apoptosis and Plant Stresses". *Physiology and Molecular Biology of Plants*, vol. 5, 1999, pp. 115-125, ISSN 0971-5894.
42. Radi, R.; Beckman, J. S.; Bush, K. M. y Freeman, B. A. "Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 288, no. 2, 1991, pp. 481-487, ISSN 0003-9861, DOI 10.1016/0003-9861(91)90224-7.
43. Wendehenne, D.; Pugin, A.; Klessig, D. F. y Durner, J. "Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells". *Trends in Plant Science*, vol. 6, no. 4, 2001, pp. 177-183, ISSN 1360-1385, DOI 10.1016/S1360-1385(01)01893-3.
44. Foissner, I.; Wendehenne, D.; Langebartels, C. y Durner, J. "In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco". *The Plant Journal*, vol. 23, no. 6, 2000, pp. 817-824, ISSN 1365-313X, DOI 10.1046/j.1365-313X.2000.00835.x.
45. García, M. C. y Lamattina, L. "Nitric Oxide Induces Stomatal Closure and Enhances the Adaptive Plant Responses against Drought Stress". *Plant Physiology*, vol. 126, no. 3, 2001, pp. 1196-1204, ISSN 1532-2548, DOI 10.1104/pp.126.3.1196.
46. Tian, X. y Lei, Y. "Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings". *Biologia Plantarum*, vol. 50, no. 4, 2006, pp. 775-778, ISSN 0006-3134, 1573-8264, DOI 10.1007/s10535-006-0129-7.
47. Hao, G. P. y Zhang, J. H. "The Role of Nitric Oxide as a Bioactive Signaling Molecule in Plants under Abiotic Stress" [en línea]. En: eds. Hayat S., Mori saki, Pichtel J., y Ahmad A., *Nitric Oxide in Plant Physiology*, edit. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009, pp. 115-138, ISBN 978-3-527-62913-8, [Consultado: 29 de noviembre de 2015], Disponible en: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527629138.ch9/summary>>.
48. Sang, J.; Jiang, M.; Lin, F.; Xu, S.; Zhang, A. y Tan, M. "Nitric Oxide Reduces Hydrogen Peroxide Accumulation Involved in Water Stress-induced Subcellular Anti-oxidant Defense in Maize Plants". *Journal of Integrative Plant Biology*, vol. 50, no. 2, 2008, pp. 231-243, ISSN 1744-7909, DOI 10.1111/j.1744-7909.2007.00594.x.
49. Arasimowicz, J. M.; Floryszak, W. J. y Kubiś, J. "Involvement of nitric oxide in water stress-induced responses of cucumber roots". *Plant Science*, vol. 177, no. 6, 2009, pp. 682-690, ISSN 0168-9452, DOI 10.1016/j.plantsci.2009.09.007.
50. Signorelli, S.; Corpas, F. J.; Borsani, O.; Barroso, J. B. y Monza, J. "Water stress induces a differential and spatially distributed nitro-oxidative stress response in roots and leaves of *Lotus japonicus*". *Plant Science*, vol. 201-202, marzo de 2013, pp. 137-146, ISSN 0168-9452, DOI 10.1016/j.plantsci.2012.12.004.
51. Corpas, F. J. y Barroso, J. B. "Nitro-oxidative stress vs oxidative or nitrosative stress in higher plants". *New Phytologist*, vol. 199, no. 3, 2013, pp. 633-635, ISSN 1469-8137, DOI 10.1111/nph.12380.
52. Webb, A. A. R.; Larman, M. G.; Montgomery, L. T.; Taylor, J. E. y Hetherington, A. M. "The role of calcium in ABA-induced gene expression and stomatal movements". *The Plant Journal*, vol. 26, no. 3, 2001, pp. 351-362, ISSN 1365-313X, DOI 10.1046/j.1365-313X.2001.01032.x.
53. Kim, T. H.; Böhmer, M.; Hu, H.; Nishimura, N. y Schroeder, J. I. "Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Absciscic Acid, CO₂, and Ca²⁺ Signaling". *Annual Review of Plant Biology*, vol. 61, no. 1, 2010, pp. 561-591, ISSN 1543-5008, 1545-2123, DOI 10.1146/annurev-arplant-042809-112226.
54. Yuchen, M.; Chunpeng, S.; Facai, D. y Xuechen, W. "ABA-induced hydrogen peroxide generation in guard cells of *Vicia faba*". *Acta phytophysiologica Sinica / Zhongguo zhi wu sheng li xue hui zhu bian*, vol. 26, no. 1, 1999, pp. 53-58, ISSN 0257-4829.
55. Wang, P. y Song, C. P. "Guard-cell signalling for hydrogen peroxide and abscisic acid". *New Phytologist*, vol. 178, no. 4, 2008, pp. 703-718, ISSN 1469-8137, DOI 10.1111/j.1469-8137.2008.02431.x.
56. Desikan, R.; Cheung, M. K.; Bright, J.; Henson, D.; Hancock, J. T. y Neill, S. J. "ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells". *Journal of Experimental Botany*, vol. 55, no. 395, 2004, pp. 205-212, ISSN 0022-0957, 1460-2431, DOI 10.1093/jxb/erh033.
57. Neill, S. J.; Desikan, R.; Clarke, A. y Hancock, J. T. "Nitric Oxide Is a Novel Component of Absciscic Acid Signaling in Stomatal Guard Cells". *Plant Physiology*, vol. 128, no. 1, 2002, pp. 13-16, ISSN 1532-2548, DOI 10.1104/pp.010707.
58. García, M. C. y Lamattina, L. "Nitric Oxide and Absciscic Acid Cross Talk in Guard Cells". *Plant Physiology*, vol. 128, no. 3, 2002, pp. 790-792, ISSN 1532-2548, DOI 10.1104/pp.011020.
59. Bright, J.; Desikan, R.; Hancock, J. T.; Weir, I. S. y Neill, S. J. "ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis". *The Plant Journal*, vol. 45, no. 1, 2006, pp. 113-122, ISSN 1365-313X, DOI 10.1111/j.1365-313X.2005.02615.x.
60. García, M. C. y Lamattina, L. "Absciscic acid, nitric oxide and stomatal closure – is nitrate reductase one of the missing links?". *Trends in Plant Science*, vol. 8, no. 1, 2003, pp. 20-26, ISSN 1360-1385, DOI 10.1016/S1360-1385(02)00009-2.

Recibido: 7 de octubre de 2014

Aceptado: 18 de marzo de 2015