

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS



ANTIOXIDANTES DE PIMIENTO (*Capsicum annuum* L.):
ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA
MADURACIÓN DEL FRUTO Y DE LA RESPUESTA A
ESTRÉS ABIÓTICO

Rosa María Mateos Bernal

TESIS DOCTORAL

2006

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Rosa María Mateos Bernal
D.L.: Gr. 1121 - 2006
ISBN: 84-338-3868-7

**Antioxidantes de pimiento (*Capsicum annuum* L.):
Estudio bioquímico y molecular de la maduración del
fruto y de la respuesta a estrés abiótico**

Memoria que presenta la Licenciada en Bioquímica
Rosa María Mateos Bernal para optar al grado de Doctor.

Fdo. Rosa María Mateos Bernal

Vº Bº

LOS DIRECTORES DEL TRABAJO

Fdo. Dr. José Manuel Palma Martínez
Dr. en Ciencias Biológicas
Investigador Científico del CSIC

Fdo. Dr. Francisco Javier Corpas Aguirre
Dr. en Ciencias Biológicas
Científico Titular del CSIC

Granada, Junio 2006

El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, de la Estación Experimental del Zaidín de Granada (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), con ayuda de una beca del Plan de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia, y ha sido financiado por la CICYT (proyecto AGL2002-00988) y la Junta de Andalucía (grupo de investigación CVI 192).

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos y reuniones científicas:

- IX Simposio Ibérico sobre Nutrición Mineral de las Plantas (Zaragoza, España, Septiembre de 2002).
- IVth Conference on Plant Stress, Reactive Oxygen and Antioxidants (Freising-Weihenstephan, Alemania, Septiembre de 2003).
- XIIth Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research Internacional (Buenos Aires, Argentina, Mayo de 2004).
- IInd Spanish and Portuguese Congress on Free Radicals (Leioa, España, Noviembre de 2004).
- IX Congreso Luso-Español de Fisiología Vegetal (Évora, Portugal, Septiembre de 2005).
- Conference on Oxygen Metabolism, ROS and Redox Signaling in Plants” (Bristol, Inglaterra, Diciembre de 2005).
- VIII Reunión de Biología Molecular de Plantas (Pamplona, España, Junio de 2006).



Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones:

- Mateos, R.M., León, A.M., Sandalio, L.M., Gómez, M., del Río, L.A., Palma, J.M. (2002) Peroxisomas de frutos de pimiento (*Capsicum annuum* L.): Caracterización bioquímica y actividad metabólica durante la maduración del fruto. En *Comunicaciones del IX Simposio Ibérico sobre Nutrición Mineral de las Plantas*. Págs.: 17-20. Editorial Institución Fernando el Católico. ISBN: 84-7820-657-4
- Mateos, R.M., León, A.M., Sandalio, L.M., Gómez, M., del Río, L.A., Palma, J.M. (2003) Peroxisomes from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.): purification, characterisation and antioxidant activity. *Journal of Plant Physiology* **160**: 1507-1516
- Mateos, R.M., León, A.M., Gómez, M., del Río, L.A., Palma, J.M. (2003) NADP-dehydrogenases and superoxide dismutase in the response of pepper plants to abiotic stress. *Free Radical Research* **37**: 27-28
- Mateos, R.M., Román, P., Corpas, F.J., Bacarizo, S., del Río, L.A., Palma, J.M. (2004) Role of the pentose phosphate pathway dehydrogenases in the ripening of pepper fruits. *Free Radical Biology and Medicine* **36**: S137
- Palma, J.M., Mateos R.M., Jiménez, A., Corpas, F.J., Lundkvist, M., Bacarizo, S., van Doorn, H., García, P., Sevilla, F., del Río, L.A. (2006) Caracterización de marcadores moleculares implicados en la síntesis de ascorbato, capacidad antioxidante y maduración de frutos de diferentes variedades de pimiento. En *Pimientos*, 2ª Edición (ed. A. Namesny) Ediciones de Horticultura, S.L., Reus, en prensa



Aportaciones más significativas de esta Tesis Doctoral a la comunidad científica:

- ∅ Se han estudiado los antioxidantes enzimáticos de pimiento, no de una manera analítica y estática, sino con una proyección hacia el empleo de los mismos como marcadores de identificación de variedades y de la calidad de los frutos. Para nuestro conocimiento, ésta es la primera vez que se acomete una investigación de este calibre en uno de los productos hortícolas de mayor consumo mundial.
- ∅ Conocimiento del contenido y la participación de los sistemas enzimáticos antioxidantes en un producto de gran valor comercial como es el fruto de pimiento, en distintos estados de maduración.
- ∅ Aportar datos sobre la regulación de la síntesis de ascorbato o vitamina C en plantas de pimiento y su evolución durante la maduración del fruto, lo cual es de gran interés científico, comercial y nutricional dado que el pimiento posee un alto contenido en vitamina C.
- ∅ En esta Tesis se ha puesto a punto un método de aislamiento de peroxisomas en frutos de pimiento, algo que no se había descrito anteriormente en frutos de plantas superiores. Esto confiere a la tesis un valor científico adicional, ya que permite estudiar la relevancia de estos orgánulos en el metabolismo celular.
- ∅ Se han depositado en el banco de datos nuevas secuencias de cDNA de frutos de pimiento (*Capsicum annuum* L.). En concreto, se ha obtenido el cDNA total de la GalLDH (**AY547352**), y los cDNA parciales correspondientes a la GR (número de acceso **AY547351**), G6PDH (**AY652703**), ICDH (**AY572426**), 6PGDH (**AY532646**), MDAR (**AY652702**), GalDH (**AY995156**), actina (**AY572427**) y Fe-SOD (**AY173123**).
- ∅ Se ha investigado la participación de los sistemas antioxidantes de la hoja en los mecanismos de defensa frente situaciones de estrés abiótico.

Durante estos años de entrega a la realización de esta Tesis he conocido, convivido, trabajado y/o recibido el cariño y apoyo de muchas personas a las que debo mis más sinceros agradecimientos.

A mis directores de Tesis, el Dr. José Manuel Palma, por guiarme durante todos estos años, por su entrega y dedicación a este proyecto y por la confianza que depositó en mí para la realización de este trabajo y el Dr. Fco. Javier Corpas, por iniciarme en el mundo de la biología molecular y su ayuda en la elaboración de esta Tesis.

Al Dr. Luis Alfonso del Río por estar siempre dispuesto a ofrecer su ayuda cuando la necesité y por transmitirme ese cariño especial por la ciencia y, en concreto, por los peroxisomas.

A la Dra. Luisa M^a Sandalio, por su ayuda con las técnicas de microscopía y, por supuesto, a su José Álvaro, que más de una tarde nos deleitó con sus agradables conversaciones.

Al Dr. Manuel Gómez, por su gran labor y dedicación durante tantos años a este, nuestro grupo y, en especial, a mis “plantitas” de pimiento.

A las Dras. Francisca Sevilla y Ana Jiménez del CEBAS (C.S.I.C.) de Murcia por su trabajo conjunto en este proyecto.

A los Drs. Juan Bautista y Alfonso Carreras por su ayuda y colaboración en todo lo que hacemos, y por su afecto.

Al Dr. Nicholas Smirnoff, de la Universidad de Exeter, por transmitirme su pasión por el ascorbato y una modesta parte de sus conocimientos en este campo.

Al Dr. Takahiro Ishikawa por ser mi guía y compañero durante mi estancia en el laboratorio de Exeter. Gracias por su buen humor, apoyo y amistad.

A la gente de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada, por su ayuda con la microscopía electrónica.

A Syngenta Seeds, especialmente, a Sierra Bacarizo, por proporcionarnos los frutos de pimiento siempre que lo requeriáramos, y a Hans por su ayuda con el PCA.

Durante todos estos años he compartido “poyata” con muchos compañeros a los que quiero agradecer los buenos “ratitos” pasados. A Marina, a la que agradezco su amistad, cariño e inestimable ayuda con la “molecular” y la que siempre recordará su viaje a Rota... A María I por transmitirme esa pasión por las verduras (mejor que los “bishos”) y por su gran legado (su Tesis). A María II por los buenos momentos. A Iva por su gran ayuda con el 2,4-D. A “Anita”, por ser una gran compañera, por su amistad y su ayuda desde los comienzos de esta Tesis. A “Elenita”, porque siempre estuvo ahí cuando más la necesité, fuera y dentro del laboratorio, por su ayuda y comprensión y, sobre todo, su amistad. A ella y Javi, por los buenos “ratitos” pasados. A Carmelo, por su ayuda, tanto en el laboratorio como en las sesiones de masaje para superar mis dolores de cabeza, así como por los buenos momentos pasados. A Diana por ser mi rayito de luz en el laboratorio durante esta última etapa de la Tesis. A Mari Pepa por mantener limpio el material de laboratorio así como por sus ratitos de conversación. A las Jienenses, Raquel y Pilar, por su cariño y amistad durante sus respectivas estancias en nuestro laboratorio. A los que, aunque tuve poco tiempo para conocer, me hicieron pasar momentos agradables, Lara, Paloma y Jorge. A Marisol por contagiarnos en muchos momentos de su alegría y simpatía. A mis compañeros en el laboratorio de Exeter: Louise, Jhon, Collen, Felicia, Olli, Sabine y Friang.

A los “vecinos”, Juan Pedro, Andrés, Pilar, Kees, Raquel, Ana, Mamen, Frank, Nieves, etc. por estar siempre dispuestos a ofrecer una mano cuando la necesité. Y al “laboratorio” de Juan A. Ocampo por el buen ambiente que allí se respira, en especial a mi Inmita, por compartir conmigo tantas emociones y ser mi amiga y consejera en los momentos más difíciles. A ella y Alfonso por las inolvidables historias sobre barcos, orujo...

A mis compañeros en las clases de inglés: Carlota, Amada, Estefanía, Laura, Antonio y Belén, por esas horitas de aprendizaje y risas en las que mi acento gaditano a veces aparecía.

A los que habéis estado ahí durante todos estos años ofreciéndome vuestra amistad: Juan, Marina, Raul, Quina, Juande, Ana, Jose Ángel, Rosa, Carlos, M^a Eugenia, Patri y Antoñito, porque siempre encontrarás un roteño allá donde vayas. A Manolo y Sonia por ayudarme con la técnica de PCR a tiempo real. A Licy por compartir conmigo algunos “cafelitos” y consejos. A Belén por trasmitirme su afecto y ayuda cuando tanto la necesité y por enseñarme tanto en tan poco tiempo.

A mis amigas/os, Susana, Laura, Mauri, Jose, Lara y Nacho porque juntos hemos compartido grandes momentos. A Eduardo y Ana por “esas barbacoas”...

A mi familia política por hacerme un huequito allá por mi querida Jaén: Pepi, Paco, Juan, Ana Belén, Antonio José y Alberto.

A toda mi familia, especialmente a mi abuela Mercedes, “la Tata”, porque siempre supiste transmitir tu fuerza, energía y alegría por la vida a todo el que estaba a tu lado. Por su cariño y dulzura que nunca olvidaré. A mis tíos y primos. A Juani y Pedro, porque siempre aportáis vuestro cariño en nuestras visitas a Rota.

A mi hermano, por toda la alegría, cariño y fuerza que me trasmite. Porque a su lado se huele la brisa gaditana, el carnaval y el “tangai”. A Jessi, por tu amistad, cariño y ayuda en los momentos en los que más lo necesité.

A mis padres, por vuestra ayuda, apoyo y comprensión incondicional en todo lo que me propuse. Gracias por ayudarme a conseguir, lo que vosotros sabéis que era uno de mis sueños y retos en la vida, la Tesis. Gracias por ser como sois y guiarme en el arduo camino de la vida y sobre todo, por estar siempre ahí cuando os necesité. Os quiero.

A mi Visi, porque ésta es también tu Tesis, por que sin ti esto no hubiese sido posible. Gracias porque la vida a tu “laito” es más dulce y agradable. Gracias por todo tu apoyo y confianza durante todos estos años. Te quiero.

*El mar. La mar.
El mar. ¡Sólo la mar!
¿Por qué me trajiste, padre,
a la ciudad?
¿Por qué me desenterraste
del mar?
En sueños, la marejada
me tira del corazón.
Se lo quisiera llevar.
Padre, ¿por qué me trajiste
Acá?*

Rafael Alberti

A mi familia

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	
1.1. El fruto de pimiento (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	1
1.1.1. Características, desarrollo y condiciones de cultivo.....	1
1.1.2. Importancia económica y distribución geográfica.....	3
1.1.3. Valor nutricional.....	4
1.2. Especies de oxígeno reactivo (ROS).....	5
1.2.1. Radical superóxido.....	6
1.2.2. Peróxido de hidrógeno.....	8
1.2.3. Radical hidroxilo.....	10
1.2.4. Oxígeno singlete.....	10
1.2.5. ROS y estrés abiótico en plantas.....	11
1.3. Antioxidantes.....	13
1.3.1. Antioxidantes enzimáticos.....	14
1.3.1.1. Superóxido dismutasa.....	14
1.3.1.2. Catalasa.....	16
1.3.1.3. Peroxidasas.....	17
1.3.1.4. Ciclo ascorbato-glutation.....	17
- Ascorbato peroxidasa.....	18
- Monodeshidroascorbato reductasa.....	19
- Deshidroascorbato reductasa.....	19
- Glutation reductasa.....	20
1.3.1.5. Otros sistemas antioxidantes enzimáticos.....	21
- Glutation peroxidasa.....	21
- Glutation S-transferasa.....	21
- Tiorredoxinas.....	22
- Peroxirredoxinas.....	22
1.3.1.6. Defensas secundarias.....	23
- Deshidrogenasas dependientes de NADP ⁺	23
1.3.2. Antioxidantes no enzimáticos.....	23
1.3.2.1. Liposolubles.....	23
- α -tocoferol.....	23
- Carotenoides.....	24
- Flavonoides.....	24
- Otras sustancias consideradas antioxidantes.....	24
1.3.2.2. Hidrosolubles.....	25
- Ascorbato.....	25
- Glutation.....	25
1.3.3. Ascorbato: metabolismo y función.....	26
1.3.3.1. Biosíntesis.....	27
1.3.3.2. Función.....	29
1.3.4. Antioxidantes en productos hortícolas.....	32
1.4. Peroxisomas, ROS y antioxidantes.....	34
1.4.1. Metabolismo peroxisomal.....	34
1.4.2. Metabolismo oxidativo.....	35
1.5. El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Herbicida y auxina sintética.....	36
1.5.1. Mecanismos de acción del 2,4-D y otros herbicidas auxínicos.....	38
2. OBJETIVOS.....	43

3. MATERIAL Y MÉTODOS	45
3.1. Material vegetal y condiciones de cultivo	45
3.2. Variedades de pimiento	45
3.3. Aplicación del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	46
3.4. Preparación de extractos crudos para ensayos bioquímicos	46
3.4.1. Homogenados de hojas	46
3.4.2. Homogenados de frutos	47
3.5. Aislamiento y purificación de peroxisomas de fruto de pimiento	48
3.6. Determinación de actividades enzimáticas	49
3.6.1. Xantina oxidasa	49
3.6.2. Superóxido dismutasa	49
3.6.2.1. Actividad total	49
3.6.2.2. Actividad isoenzimática	50
3.6.3. Catalasa	50
3.6.4. Ascorbato peroxidasa	50
3.6.5. Glutation reductasa	51
3.6.6. Guayacol peroxidasa	51
3.6.7. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	52
3.6.8. 6-Fosfogluconato deshidrogenasa	52
3.6.9. NADP-isocitrato deshidrogenasa	52
3.6.10. Enzima málico	52
3.6.11. L-Galactono-γ-lactona deshidrogenasa	52
3.6.12. L-Galactosa deshidrogenasa	53
3.6.13. Nucleósido difosfato quinasa	53
3.6.14. Hidroxipiruvato reductasa	54
3.6.15. Glicolato oxidasa	54
3.6.16. Acil-CoA oxidasa	54
3.6.17. Tiolasa	54
3.6.18. Isocitrato liasa	55
3.6.19. Malato sintasa	55
3.6.20. Fumarasa	56
3.6.21. NADPH-citocromo <i>c</i> reductasa	56
3.6.22. Fructosa 1,6-bifosfatasa	56
3.6.23. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	57
3.6.24. Glutation S-transferasa	57
3.6.25. Actividad endopeptidasa	58
3.6.25.1. Actividad total	58
3.6.25.2. Actividad isoenzimática	58
3.7. Otras determinaciones bioquímicas	58
3.7.1. Peroxidación lipídica	58
3.7.2. Oxidación de proteínas	59
3.7.2.1. Medida en solución	59
3.7.2.2. Detección inmunológica	60
3.7.3. Medida del contenido de ascorbato	60
3.7.4. Contenido de glutacion	61
3.7.5. Determinación de proteínas	61
3.7.6. Determinación de densidad	62
3.8. Electroforesis en geles de poliacrilamida (EGPA)	62

3.8.1. EGPA en condiciones nativas.....	62
3.8.2. Isoelectroenfoque.....	62
3.8.3. EGPA en condiciones desnaturalizantes.....	63
3.8.4. Tinción de geles con azul Coomassie.....	63
3.8.5. Tinción con plata.....	63
3.9. Transferencia e inmunodetección de proteínas (Técnica de Western).....	64
3.9.1. Transferencia de proteínas.....	64
3.9.2. Inmunodetección por quimioluminiscencia.....	64
3.10. Obtención, caracterización y purificación del antisuero de la Fe-SOD.....	65
3.11. Extracción, cuantificación y análisis electroforético del RNA.....	66
3.11.1. Extracción de RNA total.....	66
3.11.2. Cuantificación de RNA y DNA.....	66
3.11.3. Electroforesis en geles de agarosa.....	66
3.12. Síntesis de cDNA, transformación y aislamiento de plásmidos recombinantes.....	67
3.12.1. Obtención de cDNA por transcripción inversa (RT).....	67
3.12.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	68
3.12.3. Diseño y síntesis de oligonucleótidos para la obtención del cDNA total de la GalLDH y de cDNA parciales.....	68
3.12.4. Purificación de fragmentos de cDNA y ligación en vectores de clonación.....	70
3.12.5. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	71
3.12.6. Transformación de bacterias competentes.....	71
3.12.7. Aislamiento de plásmidos recombinantes.....	72
3.13. Obtención del extremo 5' de la GalLDH mediante RACE (<i>Rapid Amplification C End</i>).....	73
3.14. PCR semicuantitativa.....	75
3.15. PCR cuantitativa a tiempo real.....	76
3.15.1. Cebadores usados.....	77
3.15.2. Optimización de la PCR a tiempo real.....	77
3.15.3. Protocolo.....	78
3.15.4. Análisis de los datos.....	79
3.16. Microscopía electrónica.....	79
3.16.1. Ultraestructura de frutos de pimiento.....	79
3.16.2. Peroxisomas purificados.....	80
4. RESULTADOS.....	81
4.1. Efecto del 2,4-D en el metabolismo oxidativo de hojas de pimiento.....	81
4.1.1. Crecimiento y concentración de proteínas.....	81
4.1.2. Enzimas de la fotorrespiración.....	83
4.1.3. Enzimas relacionadas con el metabolismo oxidativo.....	84
4.1.3.1. Catalasa.....	84
4.1.3.2. Guayacol peroxidasa.....	84
4.1.3.3. Xantina oxidasa.....	84
4.1.3.4. Superóxido dismutasa.....	85
4.1.3.5. Glutation reductasa.....	87
4.1.3.6. Glutation S-transferasa.....	87
4.1.4. Deshidrogenasas productoras de NADPH. NADPH total.....	88
4.1.4.1. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.....	88
4.1.4.2. 6-fosfogluconato deshidrogenasa.....	88
4.1.4.3. NADP-isocitrato deshidrogenasa.....	88

4.1.4.4. Enzima málico.....	89
4.1.4.5. NADPH total.....	90
4.1.5. Parámetros de estrés oxidativo.....	90
4.1.5.1. Peroxidación lipídica y oxidación de proteínas.....	90
4.1.5.2. Actividad proteolítica.....	91
4.2. Antioxidantes enzimáticos de frutos de pimiento. Efecto de la maduración.....	92
4.2.1. Selección de las variedades y diseño experimental.....	93
4.2.2. Catalasa.....	94
4.2.3. Superóxido dismutasa.....	94
4.2.4. Ascorbato peroxidasa.....	96
4.2.5. Glutation reductasa.....	96
4.2.6. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.....	98
4.2.7. 6-Fosfogluconato deshidrogenasa.....	98
4.2.8. NADP-isocitrato deshidrogenasa.....	100
4.2.9. Enzima málico.....	100
4.2.10. NADPH total.....	100
4.2.11. L-Galactono- γ -lactona deshidrogenasa	102
4.3. Peroxisomas y maduración de frutos de pimiento.....	103
4.3.1. Morfología de los peroxisomas.....	103
4.3.2. Purificación de los peroxisomas de frutos de pimiento.....	105
4.3.3. Morfología de los peroxisomas purificados de frutos de pimiento.....	107
4.3.4. Enzimas de la fotorrespiración: GOX y HPR.....	108
4.3.5. Enzimas de la β -oxidación: ACOX y TIO.....	108
4.3.6. Enzimas del ciclo del glioxilato: MS y ICL.....	108
4.3.7. Enzimas del metabolismo de ROS: CAT, XOD, GR y SOD.....	108
4.3.8. NADP-deshidrogenasas: G6PDH, 6PGDH e ICDH.....	110
4.3.9. Contenido en ascorbato y glutacion.....	110
4.4. Antioxidantes enzimáticos de frutos de pimiento. Efecto de las variaciones ambientales.....	112
4.4.1. Condiciones meteorológicas.....	112
4.4.2. Selección de las variedades y diseño experimental.....	113
4.4.3. Catalasa.....	114
4.4.3.1. Actividad total.....	114
4.4.3.2. Expresión de mRNA.....	115
4.4.4. Superóxido dismutasa.....	115
4.4.4.1. Actividad total.....	115
4.4.4.2. Isoenzimas.....	116
4.4.4.3. Expresión de mRNA.....	117
4.4.5. Ascorbato peroxidasa.....	120
4.4.5.1. Actividad total.....	120
4.4.5.2. Expresión mRNA.....	120
4.4.6. Glutation reductasa.....	121
4.4.6.1. Actividad total.....	121
4.4.6.2. Aislamiento del cDNA parcial.....	122
4.4.6.3. Expresión de mRNA.....	122
4.4.7. Monodeshidroascorbato reductasa.....	122
4.4.7.1. Aislamiento del cDNA parcial.....	122
4.4.7.2. Expresión de mRNA.....	123
4.4.8. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.....	124

4.4.8.1. Actividad total.....	124
4.4.8.2. Aislamiento del cDNA parcial.....	125
4.4.8.3. Expresión de mRNA.....	125
4.4.9. 6-Fosfogluconato deshidrogenasa.....	126
4.4.9.1. Actividad total.....	126
4.4.9.2. Aislamiento del cDNA parcial.....	126
4.4.9.3. Expresión de mRNA.....	127
4.4.10. NADP-isocitrato deshidrogenasa.....	128
4.4.10.1. Actividad total.....	128
4.4.10.2. Aislamiento del cDNA parcial.....	128
4.4.10.3. Expresión de mRNA.....	129
4.4.11. Enzima málico.....	130
4.4.12. NADPH total.....	130
4.4.13. L-Galactono- γ -lactona deshidrogenasa.....	131
4.4.13.1. Actividad total.....	131
4.4.13.2. Expresión de mRNA.....	132
4.5. Síntesis de ascorbato en plantas de pimiento.....	133
4.5.1. L-Galactosa deshidrogenasa en plantas de pimiento.....	133
4.5.1.1. Actividad total.....	133
4.5.1.2. Aislamiento del cDNA parcial.....	133
4.5.2. L-Galactono- γ -lactona deshidrogenasa en plantas de pimiento.....	134
4.5.2.1. Actividad total.....	134
4.5.2.2. Expresión de la GalLDH en plantas de pimiento mediante PCR cuantitativa.....	134
4.5.3. Nucleósido difosfato quinasa.....	135
4.6. Caracterización molecular de la L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa de frutos de pimiento.....	136
4.6.1. Aislamiento del cDNA.....	136
4.6.2. Propiedades moleculares de la GalLDH.....	136
5. DISCUSIÓN.....	139
5.1. El 2,4-D genera estrés oxidativo en plantas de pimiento.....	139
5.2. Función de las ROS y antioxidantes en la maduración de los frutos de pimiento.....	145
5.3. Función de los peroxisomas en la maduración de fruto de pimiento.....	151
5.4. Los antioxidantes como marcadores de las variedades de pimiento y de la respuesta a variaciones ambientales.....	155
5.5. Síntesis de ascorbato en frutos de pimiento.....	159
6. CONCLUSIONES.....	165
7. BIBLIOGRAFÍA.....	167
8. ANEXOS.....	195
- Anexo I.....	201
- Anexo II.....	209
- Relación de Tablas.....	213
- Relación de Figuras.....	215
- Abreviaturas.....	221

INTRODUCCIÓN

1.1. EL FRUTO DE PIMIENTO (*Capsicum annuum*. L.)

1.1.1. Características, desarrollo y condiciones de cultivo

El pimiento es originario de la zona de Bolivia y Perú, donde además de *Capsicum annuum* L. se cultivaban al menos otras cuatro especies. Su cultivo se difundió desde comienzos del siglo XVI por el Viejo Mundo, desde que fuera traído por Cristóbal Colón en su primer viaje (1493).

El pimiento (*Capsicum annuum* L.) es una hortaliza de carácter anual, cuyo fruto no climatérico es en forma de baya hueca, de diferente coloración y tamaño de acuerdo a la variedad. Las semillas se encuentran insertas en una placenta cónica de disposición central (Fig. 1.1A). Son redondeadas, ligeramente reniformes, de color amarillo pálido y longitud variable entre 3 y 5 milímetros (Fig. 1.1B). Pertenecen a la familia *Solacaceae* y es una planta herbácea perenne de porte variable entre los 0,5 metros y más de 2 metros, cuando es cultivado en invernadero. Su sistema radicular es pivotante y profundo, con numerosas raíces adventicias. Presenta un tallo principal de crecimiento limitado y, dependiendo de la variedad, presentan un número determinado de tallos secundarios que a su vez se ramifican de forma dicotómica. En cuanto a la hoja, ésta es entera, lampiña, lanceolada, con un ápice muy pronunciado y pecíolo largo y poco aparente. Las flores aparecen solitarias en cada nudo del tallo, con inserción en las axilas de las hojas. Son pequeñas y constan, en la mayoría de los casos, de una corola blanca (Fig. 1.1C). La polinización es autógama, aunque puede presentarse un porcentaje de alogamia que no supera el 10% (www.infoagro.com/hortalizas/pimiento.htm).

Según su sabor, los frutos de pimiento se clasifican en frutos dulces o picantes. Los frutos picantes suelen ser variedades de fruto largo y delgado. La capsaicina es el componente responsable del sabor amargo o picante de los frutos de la familia *Capsicum*, y se concentra en los tabiques divisorios, placenta y en las semillas.

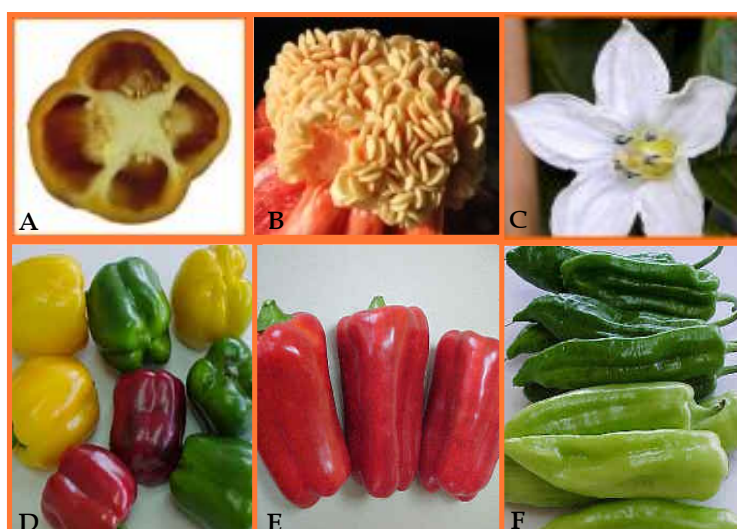


Fig. 1.1. Características del pimiento. A, corte transversal del fruto de pimiento. B, semillas insertas en una placenta cónica. C, flor de la planta de pimiento. D-E, tipos de frutos de pimiento según su forma (California, Lamuyo y Dulce Italiano, respectivamente). F, pimientos verdes.

Dentro de las variedades de fruto dulce se pueden diferenciar tres tipos de pimientos:

- Tipo California: son frutos cortos (7-10 cm), anchos (6-9 cm), con tres o cuatro cascotes bien marcados, con el cáliz y la base del pedúnculo por debajo o a nivel de los hombros y de carne más o menos gruesa (3-7 mm). Son los cultivares más exigentes en temperatura, por lo que la plantación se realiza temprano (desde mediados de mayo a comienzos de agosto, dependiendo de la climatología de la zona), para alargar el ciclo productivo y evitar problemas de cuajado con el descenso excesivo de las temperaturas nocturnas (Fig. 1.1D).
- Tipo Lamuyo: Son frutos largos y cuadrados de carne gruesa. Los cultivares pertenecientes a este tipo suelen ser más vigorosos (de mayor porte y entrenudos más largos) y menos sensibles al frío que los de tipo California, por lo que es frecuente cultivarlos en ciclos más tardíos (Fig.1.1E).
- Tipo Italiano: frutos alargados, estrechos, acabados en punta, de carne fina, más tolerantes al frío, que se cultivan normalmente en ciclo único, con plantación tardía en septiembre u octubre y recolección entre diciembre y mayo, dando producciones de 6-7 Kg m⁻² (Fig. 1.1F).

Para el cultivo de pimiento, es necesaria una temperatura ambiente media de 20°C, sin demasiados cambios bruscos de temperatura y con una tasa de humedad no demasiado alta. Requiere gran cantidad de luz, sobre todo durante el primer periodo de crecimiento, después de la germinación. El suelo ideal son los que poseen buen drenaje, con presencia de arenas y materia orgánica. Todos estos requerimientos hacen que sean cultivados en invernaderos, donde el manejo de las condiciones exteriores son más controlables. La Figura 1.2. nos muestra la temperatura crítica en las distintas fases de crecimiento del fruto.

FASES DEL CULTIVO	TEMPERATURA (°C)		
	ÓPTIMA	MÍNIMA	MÁXIMA
Germinación	20-25	13	40
Crecimiento vegetativo	20-25 (día) 16-18 (noche)	15	32
Floración y fructificación	26-28 (día) 18-20 (noche)	18	35

Fig. 1.2. Temperaturas críticas para pimiento en las distintas fases de desarrollo

Recientemente, se ha estudiado el efecto de las altas temperaturas en el desarrollo de la flor de la planta de pimiento así como en la posterior producción de frutos (Erickson & Markhart, 2002). La exposición de las plantas de pimiento a altas temperaturas durante la polinización producía un menor número y tamaño de frutos y un menor número de semillas (Erickson & Markhart, 2001; 2002). A su vez, cuando las altas temperaturas

afectan al desarrollo temprano de la flor, ésta presenta una suave reducción del número de semillas y una gran disminución de la viabilidad del polen.

1.1.2. Importancia económica y distribución geográfica

El pimiento es el segundo vegetal más consumido en el mundo después del tomate. Por ello, este fruto es de una gran importancia agronómica, nutricional y comercial. Posiblemente debido a su triple destino de consumo, pimiento en fresco, para pimentón y para conserva, este producto ha alcanzado un gran valor comercial, principalmente en España, donde el cultivo de pimiento ha crecido espectacularmente y ha tenido como consecuencia el desarrollo del cultivo en invernaderos en todo el litoral mediterráneo español (Namesny, 1996; 2006).

En cuanto a la campaña de 1996, el 43,9% de los pimientos producidos en el mundo proceden de la Cuenca del Mediterráneo (Nuez et al., 1996). En ella, los principales productores son, de mayor a menor, Turquía (produce una cuarta parte de todo lo que se obtiene en esta zona del mundo), España e Italia (ambas sumaban el 30% de la producción de la Cuenca del Mediterráneo). El otro gran productor del mundo es China, en la que prácticamente se obtiene una cuarta parte del total. Le siguen Nigeria, Méjico, Indonesia y Estados Unidos (Fig. 1.3).

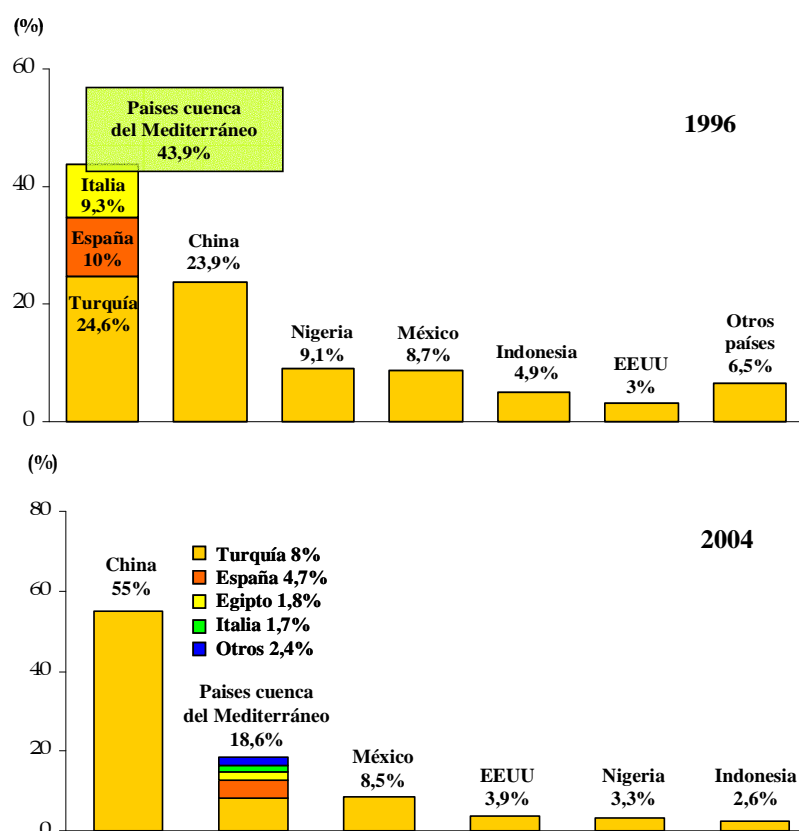


Fig. 1.3. Principales productores de pimiento en el mundo durante las campañas de 1996 y 2004. Datos en porcentaje. Total en 1996, 9.638.000 toneladas y en 2004, 21.821.280 toneladas.

España es uno de los principales productores europeos de pimiento y sus principales zonas de cultivo son Almería (8.000 hectáreas) y Murcia (1.500 hectáreas). En la primera se emplean todos los tipos de pimiento en cultivo de otoño e invierno y la cosecha se realiza de octubre a marzo. En Murcia se comercializa con cultivos de primavera-verano, desarrollándose la cosecha entre marzo y julio. En este caso, se cultivan principalmente frutos de tipo lamuyo.

Dos terceras partes de la producción española de pimiento va destinada al mercado nacional, mientras que el resto es exportada a otros países europeos (www.horticom.com). En otoño-invierno el liderazgo de las exportaciones lo tiene España, mientras que en primavera-verano lo comparte con Holanda, en un flujo de producto que complementa las respectivas producciones locales (Namesny, 1996).

Respecto al pimiento en fresco, por su carácter perecedero, los intercambios internacionales están concentrados en tres áreas. Una es la ya comentada para abastecer a Europa, básicamente proveniente de países europeos y Cuenca del Mediterráneo. Otra es la formada por los envíos de Méjico hacia Estados Unidos. Una tercera, la que se produce en el este asiático, con producto procedente de China e India. No obstante, el pimentón y pimiento deshidratado sí son objeto de un activo intercambio a nivel mundial, siendo los principales exportadores, siempre en datos de la FAO, España, China y Méjico.

1.1.3. Valor nutricional

Además del agua, la cual representa más del 90% del contenido del fruto de pimiento fresco, fibra, pectinas, glucosa, y fructosa representan los principales componentes. Esto hace que sea una hortaliza con un bajo aporte calórico y, al igual que el resto de verduras, su contenido proteico es muy bajo y apenas aporta grasas. Los frutos de pimiento son además, importantes fuentes naturales de antioxidantes como los carotenoides, vitamina C o ascorbato y vitamina E o α -tocoferol, entre otros (Howard et al., 2000; Navarro, et al., 2006). Los carotenoides (carotenos y xantofilas) son los responsables del color en los frutos de pimiento, propiedad que deben principalmente a la capsantina, y entre sus propiedades destaca el que son precursores de la vitamina A o retinol (Amit Krishna De, 2003). Además, el fruto fresco de pimiento destaca por su alto contenido en vitamina C, pudiendo ser éste más del doble del que se encuentra en frutas como las naranjas y las fresas (Davey et al., 2000; Proteggente et al., 2002; Mateos et al., 2003; Martínez et al., 2005). Por otro lado, la vitamina E retarda o inhibe la oxidación lipídica, ya que actúa como un secuestrador de radicales lipídicos (Smirnoff, 2000). En menor cantidad están presentes otras vitaminas del grupo B (B6, B3, B2 y B1). El contenido de algunos antioxidantes en el pimiento depende además de muchos factores, como el estado de maduración, las condiciones medioambientales o el almacenamiento de dichos frutos (Jiménez et al., 2003; Martínez et al., 2005; Navarro et al., 2006). Entre los minerales, cabe

destacar la presencia de hierro y potasio, y en menor proporción están presentes el magnesio, el fósforo y el calcio (Amit Krishna De, 2003).

La turgencia y picor de las especies del género *Capsicum* se deben, como se comentó anteriormente, principalmente a compuestos relacionados con la capsaicina, los capsaicionoides. Debido a sus acciones específicas, la capsaicina es utilizada en los laboratorios de investigación neuronal ya que, dependiendo de su dosis puede provocar efectos analgésicos, antiinflamatorios o, por el contrario, favorecer la muerte neuronal (Amit Krishna De, 2003).

Desde hace algunos años, se relaciona el consumo de frutas y verduras, debido a su contenido en antioxidantes, con la prevención de enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo así como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares. De hecho, estudios recientes indican que los frutos de pimiento se encuentran dentro de los alimentos vegetales más ricos en actividad antioxidante (Chu et al., 2002; Mariko et al., 2005). Otros estudios demuestran que los frutos de pimiento presentan un alto contenido en zeaxantina, antioxidante que previene la degeneración macular (Sommerburg et al., 1998).

1.2. ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVO (ROS)

Todos los organismos aerobios están afectados por la paradójica situación de que el oxígeno, fuente de su existencia, también es una sustancia tóxica en cuya presencia solo pueden sobrevivir gracias a un elaborado sistema de defensa. La toxicidad del oxígeno es debida principalmente a los productos de su reducción y a su forma excitada, el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$). La reducción completa del oxígeno requiere cuatro electrones, con producción de una molécula de agua. Sin embargo, la reducción también puede ocurrir en pasos univalentes, dando lugar al radical libre superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y al radical libre hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) (Fig. 1.4) (Salin, 1988). Durante este proceso se forman moléculas radicales, es decir que presentan un electrón desapareado ocupando un orbital atómico o molecular, (Halliwell & Gutteridge, 2000) y no radicales, todas ellas constituyen junto a otras las denominadas especies de oxígeno reactivo (ROS) (Tabla 1.1).

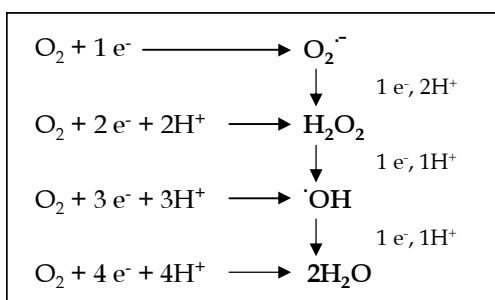


Fig. 1.4. Formación de especies de oxígeno reactivo (ROS) durante la reducción del oxígeno a H_2O (Salin, 1988). La reducción completa del O_2 requiere cuatro electrones, con producción de dos moléculas de agua. Sin embargo, la reducción también puede ocurrir en pasos univalentes, dando lugar sucesivamente al radical libre superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y al radical libre hidroxilo ($\cdot\text{OH}$).

Tabla 1.1. Principales especies de oxígeno reactivo (ROS)

Radicales	No radicales
Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)
Hidroxilo ($\cdot OH$)	Ácido hipocloroso ($HOCl$)
Peroxilo ($RO_2\cdot$)	Ozono (O_3)
Alcoxilo ($RO\cdot$)	Oxígeno singlete (1O_2)
Hidroperoxilo ($HO_2\cdot$)	Peroxinitrito ($ONOO\cdot$)

En plantas se han detectado un gran número de sitios de producción de ROS a nivel subcelular (Tabla 1.2). Algunas de estas reacciones están implicadas en el metabolismo normal de la célula, como la fotosíntesis y la respiración y otras se inducen en ciertas condiciones de estrés, como la fotorrespiración (Mittler, 2002).

Tabla 1.2. Sitios de producción de ROS a nivel subcelular en plantas.

Mecanismo	Localización	ROS principales	Referencias
CTE fotosintética y PS I o II	Chl	$O_2^{\cdot-}$	Asada & Takahashi, 1987; Asada, 1999
CTE respiratoria	Mit	$O_2^{\cdot-}$	Dat et al., 2000; Moller et al., 2001
Glicolato oxidasa	Per	H_2O_2	Corpas et al., 2001; del Río et al., 2003a
Clorofila excitada	Chl	1O_2	Asada y Takahashi, 1987
NADPH oxidasa	MP	$O_2^{\cdot-}$	Foreman et al., 2003
β -oxidación de ácidos grasos	Per	H_2O_2	Corpas et al., 2001; del Río et al., 2003a
Oxalato oxidasa	Apo	H_2O_2	Dat et al., 2000
Xantina oxidasa	Per	$O_2^{\cdot-}$	Corpas et al., 2001; del Río et al., 2003a; 2006
Peroxidasas, Mn^{2+} y NADPH	PC	H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$	Grant & Loake, 2000; Polle, 2001
Amina oxidasa	Apo	H_2O_2	Allan y Fluhr, 1997
Superóxido dismutasa	Chl, Cit, Mit, Per, Apo	H_2O_2	Alscher et al., 2002; del Río, 2006

Abreviaturas: Apo, apoplasto; Chl, cloroplasto; Cit, citosol; CTE, cadena de transporte de electrones; PS, fotosistema; Mit, mitocondria; MP, membrana plasmática; 1O_2 , oxígeno singlete; PC, pared celular; H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; Per, peroxisoma; $O_2^{\cdot-}$, radical superóxido; ROS, especie de oxígeno reactivo.

1.2.1. Radical Superóxido

El radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) se produce por la reducción del oxígeno con un solo electrón (Halliwell & Gutteridge, 2000). Su estabilidad es mayor en disolventes orgánicos que en soluciones acuosas, pues en éstas desaparece rápidamente por dismutación espontánea.

El radical $O_2^{\cdot-}$ es inestable, con una vida media de milisegundos (Donnelly & Robinson, 1995) y puede reaccionar con los peróxidos lipídicos generados bajo su acción y oxidar aminoácidos específicos tales como histidina, metionina o triptófano (Dat et al., 2000). El radical $O_2^{\cdot-}$ también puede reaccionar con el óxido nítrico (NO), conduciendo a

la formación de peroxinitrito (ONOO^-), que es una molécula con mayor capacidad oxidante (Dat et al., 2000). Uno de los efectos más tóxicos del O_2^- surge cuando éste reacciona con H_2O_2 en presencia de metales como Fe o Cu, llevándose a cabo la reacción Haber-Weiss (Fig. 1.5) con la consiguiente producción de radical hidroxilo (OH^\cdot), uno de los oxidantes más potentes que se conocen.

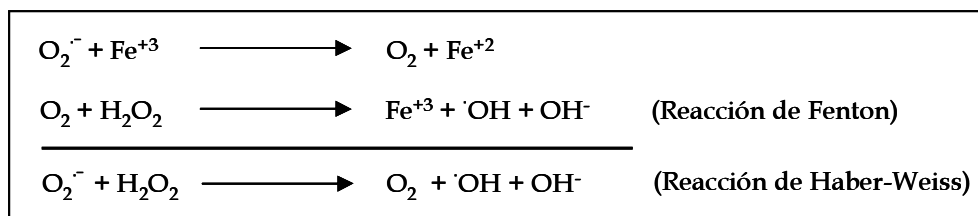


Fig. 1.5. Formación de radicales OH^\cdot por la reacción de Haber-Weiss. Esta reacción está catalizada por metales como Fe o Cu.

A nivel subcelular, el radical O_2^- se origina como consecuencia del desvío hacia el oxígeno de los electrones de las cadenas de transporte electrónico ubicadas en las membranas de los orgánulos celulares (Donnelly & Robinson, 1995; Lledías et al., 1998). También es generado por enzimas oxigenasas y oxidasas capaces de reducir directamente el O_2 a O_2^- , como la xantina oxidasa, la galactosa oxidasa o peroxidasas inespecíficas. Otra fuente es la autooxidación de compuestos reducidos, tales como mioglobina, hemoglobina, citocromo *c*, ferredoxina, catecolaminas, fenoles, flavinas e hidroquinonas (Halliwell & Gutteridge, 2000).

Los principales orgánulos vegetales productores de radicales superóxido son los cloroplastos, las mitocondrias y los peroxisomas. También se producen radicales superóxido en la pared celular y en la membrana plasmática. En cloroplastos, el principal sitio de generación de O_2^- es el fotosistema I, a nivel de la ferredoxina-NADP-reductasa y la forma reducida de la monodeshidroascorbato reductasa (MDAR) (Asada & Takahashi, 1987; Asada, 1992; 1994; 2000; Corpas et al., 2001; Halliwell & Gutteridge, 2000). Asimismo, recientemente se ha descrito la generación de radicales O_2^- en el fotosistema II, por el P_{680} , la feofitina y la proteína Q_A (Annanyev et al., 1994; Navari-Izzo & Rascio, 1999). Los radicales O_2^- son productos inevitables de la cadena de transporte electrónico de los cloroplastos durante la fotosíntesis, incluso en condiciones óptimas (Lascano et al., 1998). Ciertas situaciones medioambientales, como una alta intensidad de luz y/o una baja concentración de CO_2 , disminuyen la posibilidad de NADP^+ en el cloroplasto, incrementándose el flujo electrónico hasta el O_2 y conduciendo esto a una mayor producción de O_2^- (Casano et al., 1997; Karpinski et al., 1997; Lascano et al., 1998).

En mitocondrias vegetales, la generación de radicales O_2^- ocurre por autooxidación de los componentes reducidos de la cadena de transporte electrónico respiratoria (Dat et al., 2000), en particular, a nivel de la ubiquinona-citocromo *b* (complejo II) y la NADH deshidrogenasa (complejo I) (Boveris, 1984; González-Flecha & Boveris,

1995; Dat et al., 2000). Además, el ubiquinol (UQ) puede ceder electrones al complejo III en dos sitios, uno a nivel de la superficie interna y otro junto a la superficie externa de la membrana mitocondrial interna, dando lugar a la liberación de radical superóxido a ambos lados de dicha membrana (Raha & Robinson, 2000; Moller, 2001).

En peroxisomas de hojas de guisante y de cotiledones de sandía se han descrito al menos dos sitios para la regeneración de radicales O_2^- : en la matriz, por acción de la xantina oxidasa (XOD), y en la membrana, dependiente de NAD(P)H (Sandalio & del Río, 1988; del Río et al., 1992; López-Huertas et al., 1997; 1999; Corpas et al., 2001).

Otras fuentes celulares de producción de radicales O_2^- son las peroxidasa de la pared celular, que producen O_2^- a expensas del NADH en una reacción dependiente de Mn^{2+} (Bolwell et al., 1995; Dat et al., 2000) y las NAD(P)H oxidorreductoras de la membrana plasmática, que producen O_2^- y H_2O_2 , y están asociadas a cadenas de transporte electrónico (Vianello et al., 1990; Vianello & Macri, 1991; Hicks & Morre, 1998).

De las oxidasas y oxigenasas, la forma O de la xantina oxidorreductasa (xantina oxidasa, XOD), es uno de los principales sistemas enzimáticos celulares generadores de O_2^- (Fridovich, 1986; Halliwell & Gutteridge, 2000; Palma et al., 2002). La XOD, cuya función fisiológica es convertir xantina e hipoxantina procedentes de la degradación de ácidos nucleicos en ácido úrico, es una flavoproteína con muy baja especificidad de sustrato, lo que la capacita para generar radicales O_2^- a partir de una amplia gama de compuestos, entre los que se encuentran pirimidinas, pterinas y aldehídos (Fridovich, 1986; Nichols & Low, 1986; Nishino, 1994; Harrinson, 2002). En plantas, se ha observado la presencia de XOD en el citosol y en los peroxisomas de hojas y nódulos (Nguyen et al., 1986; Nguyen, 1986; Datta et al., 1991; Corpas et al., 1997), y su función se ha relacionado con la fijación del nitrógeno y la biosíntesis de ureidos en nódulos (Hanks et al., 1981; Atkins et al., 1984), y con el catabolismo de ácidos nucleicos y nucleótidos en el resto de tejidos (Corpas et al., 1997), especialmente durante la senescencia (Nguyen, 1986; Pastori & del Río, 1997) y durante las relaciones patógeno-hospedador (Montalbini, 1992).

1.2.2. Peróxido de hidrógeno

De todas las ROS, el H_2O_2 es el más estable en solución, tiene una vida media relativamente alta, y puede comportarse como oxidante o reductor, aunque tiene baja capacidad para reaccionar con la mayoría de las moléculas orgánicas si no existen catalizadores metálicos (Karpinski et al., 1997; Halliwell & Gutteridge, 2000; Dat et al., 2000). Existen distintos sistemas celulares de generación de peróxido de hidrógeno. El H_2O_2 se origina por desproporcionamiento espontáneo o enzimático de los radicales superóxido por la superóxido dismutasa (SOD) (Halliwell & Gutteridge, 2000). Además, la reducción de los radicales O_2^- por ascorbato, tioles, ferredoxina o iones Mn^{2+} , lleva también consigo la producción de H_2O_2 (Asada & Takahashi, 1987; Miller et al., 1990). El H_2O_2 es asimismo producido durante la acción enzimática de diversas oxidasas (glucosa

oxidasa, D-aminoácido oxidasa, prostaglandina sintetasa, monoamino oxidasa, etc. (Ballou et al., 1969; Halliwell, 1987); de flavín oxidasas (glicolato oxidasa, xantina oxidasa (indirectamente), urato oxidasa, etc.) (Lledías et al., 1998); y, de peroxidasas, como las implicadas en la explosión oxidativa provocada por patógenos (Dat et al., 2000).

Una de las causas de la toxicidad biológica del H_2O_2 proviene de su capacidad para oxidar a los grupos $-\text{SH}$, la cual puede incrementarse en presencia de catalizadores metálicos por las reacciones Fenton o Haber-Weiss (Dat et al., 2000).

La producción de H_2O_2 en la mayoría de las células aerobias ocurre en los peroxisomas, las mitocondrias, los microsomas y los cloroplastos (Halliwell & Gutteridge, 2000). En los cloroplastos y mitocondrias, el H_2O_2 se origina por dismutación espontánea del $\text{O}_2^{\cdot -}$ y por la acción de las superóxido dismutasas que allí se ubican (Asada, 2000; Raha & Robinson, 2000). En los peroxisomas, las principales fuentes de H_2O_2 son la glicolato oxidasa, la acil-CoA oxidasa y otras flavín oxidasas (urato oxidasa, xantina oxidasa, etc) y la superóxido dismutasa (del Río et al., 2002a; 2002b).

Un aspecto importante del H_2O_2 es que puede intervenir como molécula señalizadora (Noctor et al., 2002a; 2002b; Mittler et al., 2004; Foyer & Noctor, 2005), dada su relativa estabilidad, pequeño tamaño y a que hay muchos mecanismos implicados en su producción, algunos de los cuales son rápidos y controlables, y otros en su eliminación (Hancock et al., 2001; Foyer & Noctor, 2005). En este caso, el H_2O_2 interviene como segundo mensajero en muchos procesos asociados con el crecimiento y desarrollo de la planta (Shoroeder et al., 2001a; 2001b; Foreman et al., 2003). Como segundo mensajero de la acción hormonal, el H_2O_2 y el ABA interactúan controlando la apertura estomática, y ambos están implicados en la activación de los canales de Ca^{2+} (Pei et al., 2000), que a su vez activa a las NADPH oxidasas de membrana, generadoras de $\text{O}_2^{\cdot -}$ (Hancock et al., 2001; Foreman et al., 2003). En este caso, el H_2O_2 , a través de las NADPH oxidasas productoras de ROS y las peroxidasas, activa procesos tan diversos como la expresión de genes, cierre estomático, crecimiento de la raíz y la muerte celular programada (Foyer & Noctor, 2005). De hecho, la acumulación de H_2O_2 está asociada con la expresión de genes de defensa frente a la respuesta hipersensible o a heridas (Foyer et al., 1997; Noctor et al., 2002a; 2002b). Además, el H_2O_2 parece intervenir en mecanismos de señalización mediante la alteración del estado redox de la célula, el cual es crucial para el correcto funcionamiento de muchas enzimas (Hancock et al., 2001). Este hecho también le permite alterar el estado redox de ciertos antioxidantes como el glutatión y el ascorbato, lo cual afecta a la expresión y traducción de algunos genes (Noctor et al., 2002a; 2002b; Foyer & Noctor, 2005). No obstante, los cambios más importantes en el estado redox celular, provocados por un aumento en la producción de H_2O_2 en respuesta a estrés o a hormonas, tienen lugar a nivel apoplástico donde la capacidad de regeneración del ascorbato es reducida y los niveles de glutatión son escasos o ausentes (Noctor et al., 2002a).

1.2.3. Radical hidroxilo

El radical $\cdot\text{OH}$ es considerado el oxidante más potente entre todas las especies de oxígeno reactivo. Su vida media es muy corta de aproximadamente 1×10^{-9} segundos. Son capaces de reaccionar con proteínas, ácidos nucleicos y lípidos de membrana (Lledías et al., 1998; Halliwell & Gutteridge, 2000). Además, los radicales $\cdot\text{OH}$ son capaces de reaccionar con gran cantidad de moléculas orgánicas, tales como azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, nucleótidos y ácidos orgánicos (Hoey et al., 1988; Halliwell & Gutteridge, 1992; 2000; Mittler et al., 2004). Además de la reacción Haber-Weiss, descrita anteriormente, otra de las fuentes de $\cdot\text{OH}$ es la reacción de determinadas semiquinonas con el H_2O_2 , habiéndose postulado que puede ser posible sin la necesidad de que iones metálicos actúen como catalizadores (Kappus, 1985).

1.2.4. Oxígeno singlete

El oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), una forma de estado excitado del oxígeno no radical, es una especie muy reactiva (Asada & Takahashi, 1987; Lledías et al., 1998). La excitación del O_2 ocurre cuando determinados compuestos, como tetrapirroles, flavinas, uterinas, clorofilas, retinoides y varias porfirinas, son iluminados con luz de una determinada longitud de onda, produciéndose después las llamadas reacciones fotodinámicas o de fotosensibilización (Lledías et al., 1998; Halliwell & Gutteridge, 2000; Fufezan et al., 2002; op den Camp et al., 2003). La energía de excitación que se acumula en compuestos como la clorofila, se transmite entonces al O_2 , formándose el $^1\text{O}_2$. La capacidad oxidativa del $^1\text{O}_2$ es mayor que la del oxígeno molecular, pudiendo oxidar a algunas enzimas como la catalasa. Esta ROS tiene, además, gran afinidad por ambientes lipofílicos, donde muestra una vida media más alta y puede promover la peroxidación lipídica (Halliwell & Gutteridge, 2000; Affek & Yakir, 2002; Bonini et al., 2002; Trebst et al., 2002).

Como hemos ido observando las especies de oxígeno reactivo son generadas en los procesos metabólicos habituales en todos los organismos aerobios. De hecho, ya en los años 70, se estimó que el 1% del O_2 consumido por la mitocondria se desviaba hacia la formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Boveris & Chance, 1973). Los daños producidos por las ROS, incluidos la mutación del DNA, la oxidación de proteínas y la peroxidación lipídica contribuyen a la aparición de cáncer, diabetes, arteriosclerosis, inflamación y envejecimiento de la piel (Finkel, 2000). En los últimos años, la prevención de cáncer y enfermedades cardiovasculares está asociada al consumo de fruta fresca, vegetales y té rico en antioxidantes naturales (Cao et al., 1996). Esto sugiere que a mayor consumo de estas sustancias el riesgo de muerte en estas enfermedades sea menor (Willcox et al., 2004). Por ello desde hace algunos años se está llevando a cabo el estudio del contenido en antioxidantes en muchas especies de interés agroalimentario como verduras y frutos.

1.2.5. ROS y estrés abiótico en plantas

En situaciones normales, las ROS que se generan por el propio metabolismo celular no actúan de forma tóxica, puesto que son eliminadas por los sistemas de defensa de la célula, pero en ciertas situaciones de estrés, la síntesis de ROS se vuelve más activa, siendo los sistemas antioxidantes incapaces de eliminar el exceso de ROS y provocando, en la mayoría de los casos, estrés oxidativo o daños en las células y tejidos donde se producen.

Actualmente se conocen muchas situaciones de estrés que producen una respuesta oxidativa en la planta como pueden ser el estrés térmico, hídrico, por anaerobiosis, por xenobióticos, por procesos patogénicos y por nutrientes, entre otros. A continuación se muestra un ligero resumen de los resultados descritos en la literatura y que relacionan el estrés abiótico con la sobreproducción de ROS.

Los daños ocasionados en situaciones de *estrés hídrico* parecen guardar una relación directa con la generación de radicales superóxido en cloroplastos. A su vez dicho radical O_2^- podría generar radical hidroxilo por reacción con Fe, que se encuentra en concentración elevada en condiciones limitantes de agua (Price & Hendry, 1989; Noctor et al., 2002a).

En plantas acuáticas, donde en ocasiones el oxígeno puede ser un factor limitante, originándose *estrés por anoxia*, parece que la producción de radicales O_2^- puede deberse a la actividad xantina oxidasa (XOD; EC 1.1.3.22) o por la oxidación espontánea de compuestos reducidos acumulados en el periodo anóxico. En plantas sensibles a dicho estrés la restauración de la concentración de oxígeno va acompañada de un incremento de la concentración de malondialdehído, un producto de la peroxidación lipídica, lo que provoca daños oxidativos durante la fase de recuperación (Monk et al., 1987; 1989).

Ciertos *herbicidas* ejercen su toxicidad a través de la producción de ROS provocando un estrés oxidativo en cloroplastos. Este es el caso del paraquat y diquat que son reducidos en el cloroplasto, con formación de su radical catiónico que reacciona con el O_2 dando lugar a la producción de radicales O_2^- y el H_2O_2 (Halliwell, 1987; Elstner, 1987). Los radicales $\cdot OH$ también ejercen su efecto tóxico al formar radicales lipídicos. Otros herbicidas como el DMCU (diclorofenil dimetil urea), ejercen su toxicidad a través de la generación de oxígeno singlete, o bien por inhibición del transporte electrónico fotosintético, o por represión de la síntesis de carotenoides. Por último, se ha postulado que los herbicidas auxínicos ejercen su acción propiciando una sobreproducción de ROS (Grossmann, 2000a; Romero-Puertas et al., 2004).

Existen *contaminantes atmosféricos* como el SO_2 que puede ser reducido en el cloroplasto a radical HSO_3^- , el cual puede producir una reacción en cadena con formación de $\cdot OH$, lo que a su vez originaría peroxidaciones lipídicas y conduciría a la destrucción de las clorofilas y lípidos de membrana (Elstner, 1987; Sandmann & González, 1989). La polución medioambiental provoca, además, la proliferación de peroxisomas debido a una sobreproducción de ROS (López-Huertas et al., 2000; Cajaraville et al., 2003).

También se han observado formación de ROS en situaciones de *estrés salino*. En plantas de *Pisum sativum* sometidas a estrés salino parece tener lugar un incremento en la producción de radicales O_2^- y H_2O_2 en mitocondrias y cloroplastos, con un aumento en la peroxidación lipídica y oxidación de proteínas y un incremento de algunas de las defensas enzimáticas (Hernández et al., 1993; 1995; Gómez et al., 1999; 2004).

Se relaciona los efectos tóxicos de las altas concentraciones de *metales* con la producción de ROS. En cloroplastos aislados de espinaca, concentraciones elevadas de Cu provocan una inhibición del transporte fotosintético, lo que conduciría al desvío de los electrones hacia el oxígeno con producción de oxirradicales y radicales lipídicos (Shioi et al., 1978; Sandmann & Boger, 1980). En plantas de guisante tratadas con Cd la sobreproducción de ROS también genera un descenso de la tasa fotosintética y un incremento de la peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y de la actividad proteasa (Sandalio et al., 2001; Romero-Puertas et al., 2002a).

El daño oxidativo a las biomoléculas está con frecuencia asociado a cualquier clase de estrés. Todas las ROS generadas pueden reaccionar con el DNA, proteínas y lípidos (Dat et al., 2000). Las principales reacciones de las ROS con las moléculas de los componentes celulares incluyen el inicio de procesos de autooxidación de biomoléculas por radicales $\cdot OH$ e hidropéroxilo ($HO_2\cdot$), reacciones de ramificación por radicales alcoxilo (RO \cdot), reacciones de adición por radicales $\cdot OH$ y por 1O_2 a dobles enlaces, reacciones de abstracción de hidrógenos de carbonos arílicos por radicales $\cdot OH$, y la oxidación de grupos -SH, grupos tioéter (R-S-R) y grupos amino (-NH $_2$) (Cerutti, 1985). Las consecuencias más drásticas son mutaciones, intercambios de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas, citotoxicidad, carcinogénesis (inducción de las fases de promoción y progresión) y degeneración celular relacionada con el envejecimiento (Cerutti, 1985).

A nivel proteico, altos niveles de ROS causan modificaciones oxidativas en las proteínas (Reinheckel et al., 1998; Palma et al., 2002), que terminan inactivándolas y haciéndolas mucho más susceptibles a la actividad proteolítica endógena (Stadtman, 1992; Lledías et al., 1998; Lascano et al., 1998; Doulis et al., 1998). En proteínas, los sitios directos expuestos a la acción de ROS son los aminoácidos aromáticos y los grupos -SH (Lascano et al., 1998). El daño funcional de las proteínas por ROS puede ocurrir por oxidación directa de las cadenas laterales de los aminoácidos, por cambios redox de los metales presentes en los grupos prostéticos (Stadtman, 1992), o por reacciones secundarias con productos aldehídicos de la peroxidación lipídica (Levine et al., 1990). Todas estas reacciones pueden resultar en la formación de grupos carbonilo en la molécula proteica, cuya determinación se ha convertido en un marcador ampliamente usado para estimar el grado de modificación oxidativa de las proteínas (Levine et al., 1994; Reinheckel et al., 1998; Romero-Puertas et al., 2004).

Los daños en el DNA pueden ser indirectos, como la activación de endonucleasas dependientes de Ca^{2+} debido al incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , y la inactivación de enzimas implicadas en la reparación y/o replicación del DNA, o directos, debido a la modificación de las bases (púricas y pirimidínicas) y de los azúcares que componen las dos hebras del DNA (Halliwell & Gutteridge, 2000). En este sentido, el $\cdot\text{OH}$ es el más activo de las ROS, por ser capaz de alterar tanto la replicación, la transcripción y la reparación del DNA, como de provocar mutaciones y alteraciones en la estructura del DNA y la cromatina (Nunoshiba et al., 1999; Halliwell & Gutteridge, 2000).

A nivel de membranas, las ROS pueden causar la peroxidación lipídica (Apostol et al., 1989), proceso que se ve favorecido por la presencia de ciertos metales como el Cu^{+2} y el Fe^{+3} (Casano et al., 1997). La peroxidación lipídica altera la funcionabilidad de las membranas, siendo los ácidos grasos poliinsaturados lo más susceptibles a este ataque (Halliwell & Gutteridge, 2000). La peroxidación lipídica puede ser iniciada por los radicales $\cdot\text{OH}$, y ser acompañada generalmente de la formación de productos secundarios derivados de la rotura de cadenas de los ácidos grasos (Reinheckel et al., 1998). Entre ellos, se encuentra el malondialdehído (MDA), producto de la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos, cuya determinación se ha convertido en una herramienta básica indicadora de la severidad del daño celular durante el estrés oxidativo (Gechev et al., 2002).

1.3. ANTIOXIDANTES

Según Halliwell y Gutteridge (2000), los antioxidantes son aquellas sustancias que, a baja concentración, disminuyen o previenen de forma significativa la oxidación del sustratos potencialmente oxidables. Estos sistemas antioxidantes ayudan a mantener concentraciones controladas de ROS bajo condiciones fisiológicas, de forma que no puedan producir situaciones prooxidantes (Cerutti, 1985; Halliwell & Gutteridge, 2000). Entre los antioxidantes se incluyen moléculas de bajo peso molecular (antioxidantes no enzimáticos) y enzimas (antioxidantes enzimáticos). Estos sistemas previenen la formación incontrolada de especies de oxígeno reactivo, o inhiben su reacción con estructuras biológicas. Esta función antioxidante puede inducir cambios en el metabolismo y juega un importante papel en la regulación trascricional y/o postrascricional de la expresión y actividad de determinadas proteínas (Chaudiere & Ferrari-Iliou, 1999). En la Tabla 1.3. se detallan los antioxidantes más importantes descritos en plantas.

Se piensa que los antioxidantes fueron desarrollados por los organismos aerobios para adaptarse a los niveles actuales (21%) de oxígeno atmosférico y así protegerse de la toxicidad de éste y llegar a utilizarlo en sus reacciones metabólicas (oxidadas, oxigenasas y enzimas hidroxilasas), así como para la obtención de energía utilizando cadenas de transporte electrónico con O_2 (Halliwell & Gutteridge, 2000).

La capacidad antioxidante de estas biomoléculas depende de la especie reactiva sobre la que actúan, donde y como se genera ésta, así como del daño que la misma produce. Los antioxidantes pueden actuar en los distintos procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción (Halliwell & Gutteridge, 2000).

Tabla 1.3. Principales sistemas antioxidantes descritos en plantas

Antioxidantes no enzimáticos	Antioxidantes enzimáticos
Hidrosolubles	Superóxido dismutasa
Ácido ascórbico	Catalasa
Glutation	Ciclo ascorbato-glutation
N-acetilcisteína	Ascorbato peroxidasa
Ácido Úrico	Monodeshidroascorbato reductasa
Glucosa	Deshidroascorbato reductasa
Manitol	Glutation reductasa
Albúmina	Peroxidasas
Liposolubles	Glutation S-transferasa
α -tocoferol	Tiorredoxinas
Carotenoides	Peroxirredoxinas
Flavonoides	NADP-deshidrogenasas
Quelantes de metales	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
	6-fosfogluconato deshidrogenasa
	Isocitrato deshidrogenasa
	Enzima málico

1.3.1. Antioxidantes enzimáticos

Son agentes que eliminan catalíticamente radicales libres y otras especies reactivas impidiendo así la iniciación de oxidaciones en cadena (Winston, 1990). A nivel subcelular, los antioxidantes enzimáticos están presentes en distintos orgánulos cerca de los lugares de producción de ROS para prevenir el daño oxidativo en ellos (Dhaunsi et al., 1993). Las principales enzimas con propiedades antioxidantes son la superóxido dismutasa, catalasa, las enzimas del ciclo ascorbato-glutation como la ascorbato peroxidasa, glutacion reductasa, monodeshidroascorbato reductasa y la deshidroascorbato reductasa. Recientemente se empieza a considerar a las deshidrogenasas dependientes de NADP⁺, implicadas en la generación de NADPH, como enzimas antioxidantes, ya que soportan el buen funcionamiento del ciclo ascorbato-glutation (Corpas et al., 1998a; 1999b; Valderrama et al., 2006).

1.3.1.1. Superóxido dismutasas (SOD; EC 1.15.1.1)

La superóxido dismutasa se encuentra presente en todos los organismos vivos salvo algunos estrictamente anaerobios, así como en la mayor parte de los compartimentos celulares. Desde los años 60, cuando fue descubierta, se le ha dado mucha importancia a

esta enzima por su papel detoxificador al transformar $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 (McCord & Fridovich, 1969).



Las SODs pertenecen a una familia de metaloenzimas que según el metal presente en su grupo prostético se clasifican en Fe-SODs, Mn-SODs y CuZn-SODs. Dichas isoenzimas pueden ser identificadas experimentalmente debido a su sensibilidad diferencial a inhibidores como CN^- y H_2O_2 . La CuZn-SOD se caracteriza por ser sensible a ambos. La Fe-SOD es sólo sensible al H_2O_2 , mientras que la Mn-SOD es resistente a ambos inhibidores (Bridges & Salin, 1981). Una característica importante de las SODs en plantas es que el tipo de SOD presente como su localización celular varía entre las distintas especies vegetales, estado de desarrollo y en respuesta a estreses medioambientales. Todas las SODs se codifican en el núcleo y su localización subcelular se muestra en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. Distribución subcelular de SODs en plantas superiores

Isoenzima	Nº de subunidades	Localización	Referencias
CuZn-SOD	2 x 16-17 kDa	Citoplasma	Sandalio et al. (1997); Palma et al. (1997) Kanematsu & Asada (1990)
		Cloroplastos	Hernández et al. (1994); Ogawa et al. (1995)
		Peroxisomas	Sandalio et al. (1987; 1988; 1997) Corpas et al. (1998b; 2006) Bueno & del Río (1992)
		Núcleo	Ogawa et al. (1996); Corpas et al. (2006)
		Extracelular	Streller & Wigsle (1994); Ogawa et al. (1996)
Mn-SOD	4 x 24-27 kDa	Peroxisomas	del Río et al. (1983) Sandalio et al. (1988; 1997) del Río & Donalson (1995) Palma et al. (1998)
		Mitocondrias	Sandalio et al. (1987); Sakamoto et al. (1992) Zhu & Scandalios (1995); Corpas et al. (2006)
Fe-SOD	2 x 20-24 kDa	Citoplasma	Becana et al. (1989)
		Cloroplastos	Salin & Bridges (1980); Corpas et al. (2006)
		Peroxisomas	Droillard & Paulin (1990)
		Mitocondrias	Droillard & Paulin (1990)

Actualmente, la función más aceptada para las superóxido dismutasas es la protección frente a las especies de oxígeno derivadas del radical superóxido, como los radicales $\cdot\text{OH}$, pues el radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ tiene una reactividad limitada (Fridovich, 1983; Bannister et al., 1987; Halliwell & Gutteridge, 2000; Nyska & Kohen, 2002). Por ello, se ha propuesto para la SOD una función protectora frente a efectos fotodinámicos, estrés térmico y daños ocasionados por el ozono (Rabinowitch & Fridovich, 1983). De hecho, se ha observado la presencia de SOD en el medio apoplástico, donde junto a la ascorbato oxidasa y el ascorbato, juega un papel importante como primera barrera de defensa frente a oxidantes externos como el Ozono, SO_2 , etc. (Concklin & Barth, 2004). No obstante, también se ha propuesto que las SODs participan en la modulación de los niveles de superóxido cuando esta molécula está implicada en procesos de señalización celular (del Río et al., 2002a). Se ha considerado que el H_2O_2 , más que los radicales $\text{O}_2^{\cdot-}$, podría jugar un papel como factor señalizador en la regulación de genes SOD, por ser la molécula señal más estable y universal en estreses medioambientales tales como frío, sequía e infección patogénica (Kaminaka et al., 1999).

1.3.1.2. Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6)

La catalasa es una enzima hemínica ampliamente distribuida en microorganismos aerobios (bacterias, protozoos, algas unicelulares), plantas y animales (Lledías et al., 1998; Turcsányi et al., 1998), que cataliza la reacción de descomposición del H_2O_2 , en la que una molécula de H_2O_2 es reducida a agua, mientras que la otra es oxidada a O_2 :

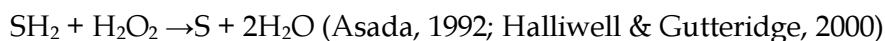


Esta reacción se encuentra favorecida a altas concentraciones de H_2O_2 (Chance et al., 1979). A pH básico, la catalasa también puede catalizar peroxidaciones con el H_2O_2 , actuando sobre algunos alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos (Butt, 1980; Halliwell & Gutteridge, 2000). La mayoría de las células aerobias contienen actividad catalasa (Chance et al., 1979), estando ausente tan solo en algunos organismos inferiores aerobios tales como ciertas bacterias (*Bacillus popilliae* y *Mycoplasma pneumoniae*), algunas algas verdes y verdeazuladas (*Euglena* y *Gleocapsa*) y algunos helmintos. La mayoría de los organismos anaerobios carecen de catalasa (Halliwell & Gutteridge, 2000). La catalasa es una enzima altamente eficiente y difícilmente puede saturarse con H_2O_2 debido a su alta K_m (1-5 M) (Escher & Widmer, 1997; Lledías et al., 1998). Por ello es frecuente su implicación en procesos metabólicos en los que la producción de H_2O_2 es considerable, como la β -oxidación de ácidos grasos. Quizás por ello su ubicación celular sean los peroxisomas, orgánulos donde se produce mucho H_2O_2 y para cuya identificación se emplea normalmente a la catalasa como enzima marcadora (Huang et al., 1983). Las catalasas de origen vegetal son proteínas hemínicas, tetraméricas y con una masa molecular de 54-59 KDa por subunidad (Eising et al., 1990; Corpas et al., 1999a). Recientemente se han identificado mediante isoelectroenfoque 5 isoenzimas de catalasa diferentes (Cat 1 - Cat 5)

en peroxisomas de hojas de guisante (Corpas et al., 1999a). La expresión de genes de catalasa, los cuales pertenecen a una familia multigénica (Ni & Trelease, 1991; Frugoli et al., 1996), no sólo se regula por el desarrollo (Kunce & Trelease, 1986), sino que también es sensible a varias señales medioambientales y diversos factores de estrés (Willekens et al., 1994; Dat et al., 2000).

1.3.1.3. Peroxidasas

Las peroxidasas son un grupo heterogéneo de enzimas hemínicas, cuya función consiste en oxidar un amplio grupo de sustratos (SH₂) empleando para ello al H₂O₂ a través de la siguiente reacción:



Las peroxidasas se clasifican atendiendo a propiedades estructurales y catalíticas, e intervienen en distintos procesos de las células vegetales, tales como el crecimiento, la organogénesis, la formación de la pared celular, el desarrollo y maduración de frutos, la biosíntesis de etileno, la senescencia, la respuesta frente a heridas y patógenos, y en las respuestas de estrés en general. Además, al consumir H₂O₂ minimizan su acúmulo en la célula vegetal, por lo que algunas isoenzimas también están directamente implicadas en la defensa vegetal frente a ROS. Las peroxidasas se presentan bajo múltiples isoformas, cada una con un papel específico en el metabolismo (Schneide & Wightman, 1974; Butt, 1980; O'Neill & Scott, 1987; Limam et al., 1998; Gechev et al., 2002). De forma genérica a las peroxidasas inespecíficas celulares se las denomina guayacol peroxidasas (GPX), por ser este fenol el principal sustrato usado en la determinación bioquímica de estas enzimas (Halliwell & Gutteridge, 2000).

1.3.1.4. Ciclo ascorbato-glutation

El ciclo ascorbato-glutation, también denominado ciclo de Foyer-Halliwell-Asada, es un sistema antioxidante exclusivo de plantas y muy importante para la eliminación de H₂O₂, especialmente en compartimentos celulares donde se produce este metabolito y no existe catalasa como son los cloroplastos y citosol (Doulis et al., 1998; Halliwell & Gutteridge, 2000). En este ciclo participan los antioxidantes no enzimáticos ascorbato y glutatión, NADPH como poder reductor, y cuatro enzimas: la ascorbato peroxidasa (APX), la monodeshidroascorbato reductasa (MDAR), la deshidroascorbato reductasa (DHAR) y la glutatión reductasa (GR) (Fig. 1.6.) (Halliwell & Foyer, 1976; Asada & Badger, 1984; Foyer et al., 1997; del Río et al., 2002b).

Las enzimas de este ciclo se han hallado en cloroplastos, citosol, mitocondrias y peroxisomas (Halliwell & Foyer, 1976; Foyer & Halliwell, 1977; Jiménez et al., 1997; Foyer et al., 1997; del Río et al., 2002a; Mittova et al., 2002; 2003a). La exposición a estrés oxidativo frecuentemente conduce al incremento de uno o más de los componentes del ciclo, aunque las localizaciones subcelulares de los cambios observados no han sido con

frecuencia identificadas. Por ello, el ciclo ascorbato-glutation ha sido descrito como un componente importante de los mecanismos de defensa antioxidante de las células vegetales que confieren resistencia frente al estrés (Doulis et al., 1998).

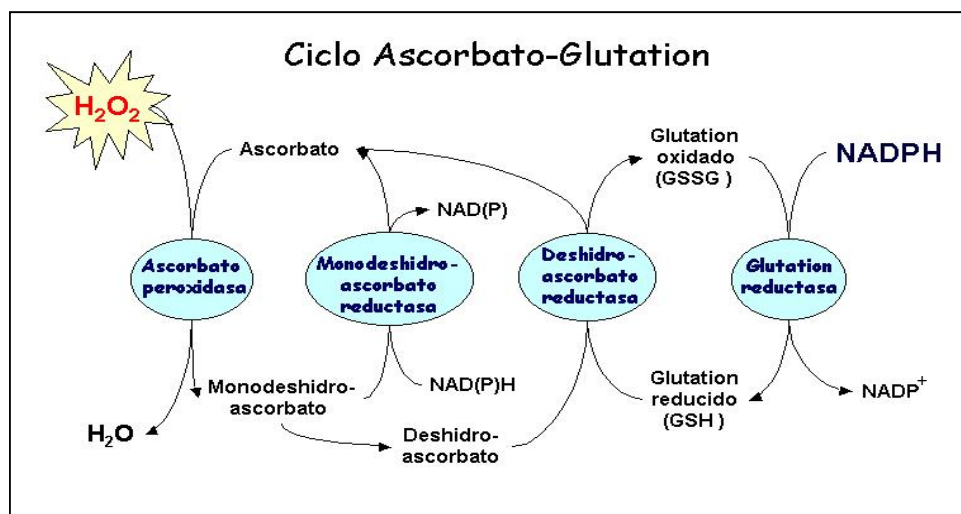
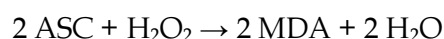


Fig. 1.6. Ciclo ascorbato-glutation. Las enzimas que intervienen en dicho proceso son la ascorbato peroxidasa (APX), monodeshidroascorbato reductasa (MDAR), deshidroascorbato reductasa (DHAR) y glutacion reductasa (GR).

Ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11)

La ascorbato peroxidasa es una peroxidasa hemínica que lleva a cabo la primera reacción del ciclo ascorbato-glutation, al reducir el H_2O_2 a H_2O empleando ascorbato como sustrato reductor, el cual se oxida a monodeshidroascorbato (MDA), según la reacción:



Esta enzima juega un papel fundamental en la eliminación de H_2O_2 en plantas y está presente en el estroma (sAPX) y en los tilacoides (tAPX) dentro del cloroplasto, en el citosol (cAPX), mitocondrias y peroxisomas (Chen & Asada, 1989; Miyake & Asada, 1992; Bunkelmann & Trelease, 1996; Jiménez et al., 1997; Foyer et al., 1997; Ishikawa et al., 1998; López-Huertas et al., 1999). Las APXs son enzimas fundamentalmente monoméricas, de 30-40 kDa de masa molecular (Tanaka et al., 1991; Ishikawa et al., 1996; Morimura et al., 1996), aunque también se han descrito algunas formas diméricas (Mittler & Zilinskas, 1991). Las APX cloroplastídicas de algunas plantas superiores como espinaca, tabaco y calabaza son codificadas por un único gen, y sus mRNAs se generan mediante splicing alternativo de dos exones del extremo 3' de éste (Ishikawa et al., 1997). Contrariamente, en *Arabidopsis* y arroz existen dos genes distintos que codifican la APX estromática y tilacoidal (Teixeira et al., 2006).

Ha sido ampliamente descrito que la expresión de APX se incrementa bajo condiciones de sobreproducción de H_2O_2 , como las inducidas por estrés biótico o abiótico, lo que puede indicar que variaciones en la producción de H_2O_2 también regulan la APX (De Gara et al., 1997; Dat et al., 2000). Asimismo, se ha descrito un papel regulador para el ascorbato en la actividad APX durante la diferenciación celular, y bajo condiciones

experimentales de depleción o enriquecimiento de ascorbato (De Gara et al., 1997). Además, el control de la expresión de los genes que codifican para las APXs es sensible a diversos estímulos como el estrés provocado por agua, salinidad, altas temperaturas, congelación, ataque por patógenos, tratamiento con peróxido de hidrógeno y ácido abscísico (Zhang et al., 1997; Mittler et al., 1998; Yoshimura et al., 2000; Agrawal et al., 2003; Menezes-Benavente et al., 2004a; 2004b; Teixeira et al., 2006). También, la expresión de las distintas isoformas de APX puede variar de un tejido a otro (Teixeira et al., 2006).

Monodeshidroascorbato reductasa (MDAR; EC 1.6.5.4)

La MDAR cataliza la reducción del MDA a ascorbato usando NAD(P)H como donador de electrones (Asada & Takahashi, 1987). La MDAR es una enzima que contiene FAD y es la única enzima que usa un radical orgánico como sustrato. También se ha descrito que reduce los radicales fenoxil (Sakihama et al., 2000). La actividad MDAR está ampliamente distribuida en plantas, pero también se ha descrito en *Euglena* (Shigeoka et al., 1987), *Neurospora crassa* (Munkres et al., 1984) y eritrocitos humanos (Goldenberg et al., 1983).

En plantas, la MDAR ha sido descrita en diversos compartimentos celulares como cloroplastos (Hossain et al., 1984; Sano et al., 2005), citosol, mitocondrias, (Jiménez et al., 1997; Mittova et al., 2003b), glioxisomas (Bowditch & Donaldson, 1990) y peroxisomas de hojas (Jiménez et al., 1997; López-Huertas et al., 1999; Mittova et al., 2003b; Leterrier et al., 2005). La MDAR ha sido purificada hasta homogeneidad en frutos de pepino (Hossain & Asada, 1985) y nódulos de raíz de soja (Dalton et al., 1992), y su cDNA ha sido aislado en un número considerable de especies (Sano & Asada, 1994; Murthy & Zilinskas, 1994; Grantz et al., 1995; Leterrier et al., 2005). Recientemente, se ha descrito que *Arabidopsis* tiene 5 genes de MDAR y uno de ellos presenta múltiples puntos de transcripción lo cual permite dirigir la enzima a cloroplastos, mitocondrias (Obara et al., 2002; Chew et al., 2003) o peroxisomas (Lisenbee et al., 2005).

En cloroplastos, la MDAR puede tener dos funciones fisiológicas, la regeneración del ascorbato a partir del monodeshidroascorbato (MDA), y mediar la fotorreducción del dioxígeno a radical superóxido cuando el sustrato MDA está ausente (Miyake et al., 1998). En mitocondrias la posible función de la MDAR no está aún clara.

Deshidroascorbato reductasa (DHAR; EC 1.8.5.1)

La DHAR cataliza la reducción divalente del deshidroascorbato (DHA) a ascorbato (ASC) empleando para ello glutatión reducido (GSH) (Hossain & Asada, 1984a; Villalba et al., 1995). Es una enzima poco caracterizada, debido a su baja estabilidad (Foyer & Halliwell, 1977; Trumper et al., 1994), lo que, unido a su escasa afinidad por su sustrato (Minetti et al., 1992), ha llevado a sugerir que la DHAR *in vivo* no parece ser fundamental en el mantenimiento del ascorbato en su forma reducida. La DHAR se ha sido purificada a partir de hojas de espinaca y se sabe que es un monómero de unos 23 kDa (Hossain &

Asada, 1984b; Foyer & Halliwell, 1977). También se ha purificado la enzima de tallos de guisante (Jablonski & Anderson, 1981), tubérculos de patata (Dipierro & Borraccino, 1991) y de una monocotiledónea como el arroz (Kato et al., 1997). Recientemente se ha descrito la clonación y caracterización del gen que codifica la DHAR en esta última especie vegetal (Urano et al., 2000) y en *Arabidopsis* (Creissen et al., 2001).

Glutation reductasa (GR; EC 1.6.4.2)

La GR es una flavoproteína que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH), utilizando NADPH como donador de electrones. Es una proteína dimérica con FAD en el centro activo de cada subunidad (Halliwell & Gutteridge, 2000). Esta actividad enzimática se encuentra ampliamente distribuida en eucariotas y procariotas, implicándose en procesos metabólicos vitales para la célula y siendo crucial para el mantenimiento de su capacidad antioxidante (Meister & Anderson, 1983; Creissen et al., 1994). La GR se ha purificado y caracterizado en numerosas especies y tejidos vegetales (Guy & Carter, 1984; Wingsle, 1989; Anderson et al., 1990; Asada, 1994; Romero-Puertas et al., 2006), siendo las GRs más estudiadas las de guisante, particularmente, las isoformas localizadas en cloroplastos, citosol y mitocondrias (Kalt-Torres et al., 1984; Bielawski & Joy, 1986; Edwards et al., 1990; Madamanchi et al., 1992; Creissen et al., 1995; Stevens et al., 1997; 2000; Rudhe et al., 2004). Sin embargo, fue en 1997 cuando se evidenció por primera vez la localización de actividad GR peroxisomal (Jiménez et al., 1997). La forma nativa de la mayoría de las GRs es un homodímero de unas 100-120 kDa, y el tamaño de su subunidad está en un rango de 53-59 kDa (Wingsle, 1989; Edwards et al., 1990; Anderson et al., 1990; Madamanchi et al., 1992).

Es una enzima importante en la protección de la planta frente a diferentes tipos de estrés que implican estrés oxidativo, tales como los producidos por herbicidas, contaminantes atmosféricos, bajas temperaturas, estrés fotooxidativo y estrés hídrico (Rennenberg, 1982; Smith et al., 1989; Foyer et al., 1991; Mullineaux et al., 1994; Navarri-Izzo & Izzo, 1994; Lascano et al., 1998; Schulz & Hartling, 2001; Schutzendubel & Polle, 2002; Gechev et al., 2003).

En cuanto a las propiedades moleculares de las GRs de guisante, se concluye que hay dos tipos de cDNAs, uno que codifica a la forma citosólica y otro que genera las isoformas resultantes de un procesamiento post-transcripcional a partir de un único gen. De hecho, la GR de guisante fue la primera proteína descrita en plantas con una doble secuencia señal, codificada por un único gen, para su importación a cloroplasto o mitocondrias (Creissen et al., 1995; Stevens et al., 1997; Cleary et al., 2002; Rudhe et al., 2002; 2004; Chew et al., 2003).

1.3.1.5. Otros sistemas antioxidantes enzimáticos

Glutation peroxidasa (GP; EC 1.11.1.9)

Es una peroxidasa no hemínica, que contiene selenio (Stadtman, 1990; Lauchli, 1993), la cual cataliza la reducción de H₂O₂ o hidroperóxidos orgánicos con GSH según la siguiente reacción (Flohé & Günzler, 1985):



Durante la “explosión oxidativa” característica del ataque por patógenos, estas glutatión peroxidases catalizan la reducción o inactivación del H₂O₂, dependiente de GSH, formando GSSG e incrementando la biosíntesis de glutatión por retroalimentación (Marrs, 1996). En animales se han llegado a determinar hasta cuatro grupos de GPs caracterizadas por su estructura, especificidad de sustrato y distribución en el tejido (Eshdat et al., 1997). Esta actividad se ha detectado también en cultivos celulares de espinaca y maíz, así como en plantas de *Lemna* (Drotar et al., 1985) y de Citrus (Beor-Tzahar et al., 1995), en semillas etioladas y hojas de guisante (Edwards, 1996; Mullineaux et al., 1998). Además, se ha caracterizado y clonado una enzima con actividad GST y GP en plantas de *Arabidopsis* (Bartling et al., 1993; Nutricati et al., 2006).

Glutation S-transferasa (GST; EC 2.5.1.18)

Uno de los sistemas de defensa de la planta en respuesta a estrés abiótico son las glutatión S-transferasas (GSTs), las cuales constituyen una familia de enzimas citosólicas de naturaleza diméricas (23-30 KDa por subunidad) que catalizan la adición nucleofílica del grupo -SH del GSH sobre centros electrofílicos de moléculas orgánicas (Moons, 2005). Se generan así compuestos más hidrosolubles iniciándose de este modo la desintoxicación de agentes alquilantes potenciales y de xenobióticos (Habig et al., 1974; Edwards, 1996; Marrs, 1996; Pascal et al., 1998; Frova, 2003), aunque a veces los productos resultantes son mucho más dañinos que el compuesto original (Halliwell & Gutteridge, 2000). Las GSTs se han hallado en la mayoría de los organismos aerobios, incluidas las plantas (Pascal et al., 1998). Se identificaron por vez primera en base a su capacidad para eliminar herbicidas y se han caracterizado las GSTs de calabaza (Fujita & Hossain, 2003), trigo (Cummins et al., 1997; Pascal et al., 1998) y guisante (Edwards, 1996). Además, algunas GSTs actúan como peroxidases, regenerando ascorbato a partir de deshidroascorbato o en el catabolismo de tirosinas (Thom et al., 2001).

Las GSTs se inducen durante procesos de estrés que propician la producción de ROS en plantas, tales como la toxicidad por metales pesados, el ataque por patógenos, heridas, y la producción de etileno y ozono (Marrs, 1996; Pascal et al., 1998; Alfenito et al., 1998). Ésto, junto con la necesidad de GSH para llevar a cabo su actividad, ha hecho que se incluya a esta familia de enzimas en los sistemas antioxidantes de la planta. Por otra parte, las GSTs tienen una función importante en el metabolismo normal de la planta, relacionada con productos secundarios como antocianinas y ácido cinámico, y en

respuesta celular frente a auxinas (Marrs, 1996; Alfenito et al., 1998; Romero-Puertas et al., 2004).

Tiorredoxinas

Las tiorredoxinas son polipéptidos de bajo peso molecular (aprox. 12 kDa) presentes en eucariotas y procariotas, que tienen dos grupos tiol (-SH) adyacentes que se oxidan a disulfuro (-S-S-) en las múltiples reacciones redox que las tiorredoxinas llevan a cabo con diversas proteínas (Halliwell & Gutteridge, 2000). La regeneración de los grupos -SH en la proteína oxidada puede ser efectuada por la tiorredoxin-reductasa, una flavoenzima que utiliza NADPH y tiene similitud con la GR. Las tiorredoxinas juegan un papel clave en el metabolismo animal y vegetal, pues intervienen en múltiples procesos. Estas proteínas pueden reaccionar con H₂O₂, regular las actividades enzimáticas del ciclo de Calvin en el cloroplasto (López-Jaramillo et al., 1998; Pagano et al., 2000), y de enzimas implicadas en la glucólisis (la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), en la síntesis de ATP (el factor de acoplamiento CF1), y en la asimilación del carbono en plantas C₄ (la NADP-malato deshidrogenasa). De igual manera, las tiorredoxinas pueden participar en la exportación de equivalentes de reducción al citosol en plantas C₃, e intervienen en la reparación de los daños a los residuos de metionina de las proteínas (Halliwell & Gutteridge, 2000).

Peroxirredoxinas

Las peroxirredoxinas son proteínas con actividad peroxidasa que tienen una amplia especificidad de sustratos, entre los que se pueden citar el peróxido de hidrógeno, el butilhidroperóxido, y los hidroperóxidos de ácido linoleico y de dilinoleoil-fosfatidilcolina (Dietz, 2003). Las peroxirredoxinas de plantas contienen uno o dos residuos de cisteína que poseen poder catalítico y que se encuentran inmersas en secuencias altamente conservadas (Horling et al., 2002). Durante el proceso catalítico, los residuos cisteínicos son regenerados por diferentes tioles tales como tiorredoxinas, glutarredoxinas y ciclofilinas, entre otros (Dietz, 2003). En plantas se han descrito cuatro grupos de peroxirredoxinas (Rouhier & Jacquot, 2005). El primer grupo, presentado por la peroxirredoxina 1-Cys (1-Cys Prx), se ha localizado en el núcleo y se ha sugerido que posee función protectora de macromoléculas frente a daños oxidativos (Stacy et al., 1996; 1999). El segundo grupo corresponde a la peroxirredoxina 2-Cys (2-Cys-Prx), descrita en cebada. Esta proteína, que se codifica en el núcleo y se localiza en los cloroplastos, protege al aparato fotosintético de daños oxidativos (Baier & Dietz, 1997; 1999). El tercer grupo (tipo II Prx) incluye a una peroxirredoxina con capacidad antioxidante y cuya diana es una tiorredoxina citoplasmática (Verdoucq et al., 1999). Recientemente se ha descrito la presencia en peroxisomas de hojas de guisante de una peroxirredoxina que muestra reactividad cruzada con el anticuerpo de la PRX II (Corpas et al., 2003). Por último, el

cuarto grupo (PRX Q) se detectó en *Sedum linenae* y se identificó como una homóloga de la proteína co-migratoria de la bacterioferritina de *Escherichia coli* (Bcp) (Kong et al., 2000).

1.3.1.6. Defensas secundarias

Deshidrogenasas dependientes de NADP⁺

Por su capacidad de regenerar el poder reductor de la célula en forma de NADPH, necesario para la actuación de algunos antioxidantes primarios, las deshidrogenasas dependientes de NADP⁺ pueden ser consideradas un nuevo grupo de enzimas antioxidantes. Entre ellas podemos incluir las dos deshidrogenasas del tramo oxidativo de la ruta de las pentosas fosfato, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH; EC 1.1.1.49) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH; EC 1.1.1.44). Otras deshidrogenasas serían la NADP-isocitrato deshidrogenasa y el enzima málico. De hecho, diversos estudios han mostrado que la G6PDH tiene un papel relevante en el mecanismo de protección frente a estrés oxidativo en bacterias, levaduras y células de mamíferos (Corpas et al., 1998a). Sin embargo, en plantas existen pocos datos que establezcan la correlación de estas enzimas con algún determinado estrés (Corpas et al., 1999b; León et al., 2002; Valderrama et al., 2006). En plantas, la G6PDH se ha localizado en el citosol, en el estroma cloroplastídico y en peroxisomas (Schnarre et al., 1973; Herbert et al., 1979; Corpas et al., 1998a). La isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato a 2-oxoglutarato con la producción de coenzima NADPH en su forma reducida (Galvez & Gadal, 1995). Esta enzima ha sido localizada en el citosol, cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas de organismos fotosintéticos (Martínez-Rivas & Vega, 1998; Corpas et al., 1999b).

1.3.2. Antioxidantes no enzimáticos

También son conocidos como antioxidantes estequiométricos por su capacidad de neutralizar un único radical libre por molécula, y normalmente actúan a concentraciones altas (Halliwell & Gutteridge, 2000). Entre los sistemas antioxidantes no enzimáticos más importantes destacan la vitamina C (ácido ascórbico), el glutatión, la vitamina E (α -tocoferol), el β -caroteno (provitamina A) y los flavonoides, que a su vez se dividen en liposolubles o hidrosolubles.

1.3.2.1. Liposolubles

El α -tocoferol o vitamina E es un reductor liposoluble que debe ser aportado en la dieta, ya que sólo se conoce su biosíntesis en plantas, donde sólo se ha detectado en membranas de plastidios o tilacoides de todas las plantas y en algunas algas y cianobacterias (Sattler et al., 2004). El α -tocoferol junto a otros antioxidantes juegan un papel muy importante en la reducción de los niveles de ROS (principalmente $^1\text{O}_2$ y $\cdot\text{OH}$) en las membranas fotosintéticas y limita la peroxidación lipídica a dicho nivel (Trebst et al., 2002; Kruk et al.,

2005). Por lo tanto, el α -tocoferol contribuye a preservar el estado redox adecuado en cloroplastos, y a mantener la estructura de la membrana tilacoidal y la función durante el desarrollo de la planta y en la respuesta a estrés en la planta. El α -tocoferol reacciona con los radicales de oxígeno peroxilo (ROO^\cdot) o lipoxilo, formando un radical tocoferilo que, por ser estable, interrumpe la cadena de reacciones en cascada producida por los radicales libres (Liebler, 1998; Smirnoff, 2000; Wang & Quinn, 2000). Se sabe que el ascorbato interviene en el reciclaje del α -tocoferol desde radicales tocoferilos, procedentes a su vez de radicales lípido-peroxilo (Smirnoff, 2000; Munné-Bosch et al., 2005) (ver Fig. 1.9; pág. 30).

Los **carotenoides**, entre los que se encuentra el β -caroteno (provitamina A), son pigmentos colectores de luz azul que pueden transferir su energía de excitación a la clorofila, aunque también tienen un importante papel antioxidante porque secuestran rápidamente el $^1\text{O}_2$ y otras ROS y especies de nitrógeno reactivo (RNS) y ayudan a prevenir su aparición durante la fotosíntesis (Telfer et al., 1994; Halliwell & Gutteridge, 2000). Los carotenoides, constituidos por carotenos y xantofilas, son los pigmentos que proporcionan el color rojo amarillento a las hojas de árboles y plantas durante el otoño, debido a su acumulación en los plastidios de dichas células. Éste parece ser un mecanismo de defensa de la planta que responde a las condiciones fotoinhibidoras de la aclimatación al invierno. Este mecanismo está acompañado de un aumento en la concentración de α -tocoferol y una disminución gradual del contenido de clorofila, así como de una transformación de los plastidios, de cloroplastos a cromoplastos (Hormaetxe et al., 2004). Estos cromoplastos también están presentes en algunos tipos de frutos y pétalos. El consumo de carotenoides evita el riesgo de ciertos tipos de cáncer y ayudan a regular el sistema inmune (Naik et al., 2003). Además, los carotenoides junto al α -tocoferol y el ascorbato, protege a las membranas fotosintéticas frente a condiciones de estrés oxidativo (Hormaetxe et al., 2004).

Por otro lado, los **flavonoides** constituyen un amplio grupo de metabolitos secundarios aromáticos sintetizados por plantas y especialmente por cítricos (Dugo et al., 2005). Estas sustancias se caracterizan por su actividad antioxidante y quelante de iones metálicos impidiendo su participación en reacciones de tipo Fenton generadoras de radicales $^\cdot\text{OH}$, por lo que le confiere una gran importancia frente a enfermedades coronarias del corazón y algunos tipos de cáncer (Yamaguchi et al., 2005). La capacidad antioxidante de estas moléculas depende de la estructura y del número de grupos hidroxilo que tenga dicha molécula.

Otras sustancias consideradas antioxidantes son la bilirrubina y el ácido úrico ya que se unen a metales e impiden reacciones tipo Fenton. El ácido úrico, además, proporciona protección frente al ozono y al NO_2^- . También existen aminoácidos con capacidad para secuestrar iones metálicos y que son susceptibles a oxidarse en presencia de H_2O_2 y concentraciones fisiológicas de bicarbonato (Stadtman & Berlett, 1991). En

tejidos animales, la melatonina atrapa al radical $\cdot\text{OH}$ además de estimular enzimas antioxidantes importantes (SOD, GPX y GR), por lo que se considera actualmente como un importante antioxidante. En dosis farmacológicas es efectiva para reducir el daño ocasionado por agentes tóxicos y paradigmas experimentales que inducen el estrés oxidativo (Reiter et al., 1997).

1.3.2.2. Hidrosolubles

Ascorbato o vitamina C

Aparece en todos los compartimentos celulares, incluido el apoplasto. Funciona como antioxidante ubicuo pues interacciona con los radicales hidroxilo, superóxido y el oxígeno singlete. Además, es el donador electrónico de la ascorbato peroxidasa para eliminar el peróxido de hidrógeno. Interviene en la generación del α -tocoferol y en el ciclo de las xantofilas para regenerar la zeaxantina. Dada su relevancia en el contenido de esta Tesis, se abordará en el siguiente apartado de este capítulo una visión más amplia del metabolismo del ascorbato.

Glutation

La forma reducida del glutatión (GSH) es un tripéptido (γ -Gly-Cys-Gly) que existe de forma intercambiable con su forma oxidada (GSSG). El GSH es el antioxidante que se encuentra en mayores concentraciones intracelulares. En su papel como antioxidante participa junto al ascorbato en el ciclo ascorbato-glutatión que elimina el H_2O_2 intracelular (Creissen et al., 1992; Wingsle & Karpinski, 1996), y además de reaccionar directamente con el $^1\text{O}_2$ y los radicales $\cdot\text{OH}$, protege a los grupos tioles de las proteínas (Lascano et al., 1998; Gechev et al., 2002). Además, el glutatión juega un papel importante en la eliminación de xenobióticos cuando se conjuga con moléculas electrofílicas, por la acción de la enzima glutatión S-transferasa. En tercer lugar, el glutatión como componente de las fitoquelatinas (polímeros de $(\gamma\text{-Glu-Cys})_2\text{Gly}$) interviene en la quelación de metales pesados como el cadmio, facilitando así su secuestro por la vacuola (Steffens et al., 1986; Foyer et al., 2001). El GSH actúa también como cofactor de la glutatión peroxidasa eliminando H_2O_2 ; puede además eliminar radicales libres por vías no enzimáticas, p.e. participa en la desintoxicación de drogas con grupos funcionales que reducen parcialmente al oxígeno molecular (Smirnoff, 2000). El GSH está involucrado en otros procesos metabólicos, como el mantenimiento de la comunicación intercelular, el transporte intracelular de cobre y es cofactor de enzimas en diversas rutas metabólicas. Participa en la regulación del estado redox de los disulfuros en proteínas con otras moléculas como la tiorredoxina y glutarredoxina entre otros compuestos tiólicos. En animales, el GSH está sujeto a un control hormonal y a su vez puede modular la expresión hormonal al regular los receptores hormonales en la membrana que contienen grupos tioles o disulfuros como por ejemplo el receptor NMDA (N-metil D-aspartato) que tiene

grupos sulfidrilos y está sujeto a control redox. (Spector et al., 1991; Taylor et al., 1996; Gamaley & Klyubin, 1999; Dalton et al., 1999; Halliwell & Gutteridge, 2000). Recientemente se le ha atribuido el papel, junto al ascorbato, de modular la respuesta oxidativa, regulando la expresión de genes de respuesta a la patogénesis y de la resistencia sistémica adquirida (Pastori et al., 2003; Kiddle et al., 2003; Barth et al., 2004).

La ruta de síntesis de glutatión es conservada en todos los organismos e implica a dos enzimas dependientes de ATP la gamma-glutamilcisteína sintetasa (γ -ECS) y la glutatión sintetasa (GSH-S). En plantas se piensa que la regulación de la síntesis de GSH se podría llevar a cabo por la distinta compartimentación de las dos enzimas que intervienen en dicho proceso (Foyer & Noctor, 2005). En *Arabidopsis* y mediante estudios bioquímicos de localización subcelular se ha observado que la proteína γ -ECS es abundante en cloroplastos mientras que la GSH-S se encuentra principalmente en el citosol. Por otro lado, parece ser que la disponibilidad de cisteína y la inhibición de la γ -ECS por el propio GSH intervienen en la regulación del pool de GSH (Zhu et al., 1999).

1.3.3. Ascorbato: metabolismo y función

El ascorbato o vitamina C es un antioxidante sintetizado por plantas y en un buen número de células animales, salvo en humanos, otros primates, cobayas, murciélagos y algunas aves. Estas especies han perdido la capacidad para sintetizar la enzima gulonolactona oxidasa (GULO), la cual interviene en la última etapa de síntesis de ascorbato en animales y por ello requieren la presencia de ascorbato en su dieta (Burns, 1957; Chaudhuri & Chatterjee, 1969; Davey et al., 2000). La síntesis de ascorbato en plantas se localiza en la membrana mitocondrial interna desde donde se transportará a otros compartimentos celulares en los que forma parte del ciclo ascorbato-glutatión.

El ascorbato puede encontrarse en distintos estados oxidativos. El primer producto de oxidación del ascorbato es el radical monodeshidroascorbato (MDA), que es relativamente estable. Este MDA en presencia de otra molécula similar son capaces de formar ascorbato y deshidroascorbato, que es el segundo producto de oxidación del ascorbato. Entre los sistemas de regeneración de ascorbato tenemos la reducción directa del MDA por el fotosistema I, la MDAR dependiente de NADPH y la DHAR dependiente de glutatión reducido (GSH). Este GSH es proporcionado por la enzima glutatión reductasa (GR) dependiente de NADPH, la cual reduce GSH a partir de la forma oxidada de éste (GSSG).

Actualmente se sabe que el ascorbato además de ser un importante antioxidante celular interviene en otros muchos procesos importantes dentro y fuera de la célula. Esto hace imprescindible un sistema de transporte de dicha molécula cuya difusión libre a través de la membrana no es lo esperado al estar cargada negativamente a pH fisiológico (Horemans et al., 2000a). Poco se sabe aún sobre el transporte inter- e intracelular del ascorbato en plantas. En cuanto al transporte intercelular en animales se ha observado que

este proceso se lleva a cabo sólo en algunos tipos celulares como las células endoteliales que lo acumulan para la síntesis de colágeno, mientras que es más habitual el transporte del deshidroascorbato. Los sistemas de transporte de ascorbato en animales pertenecen a una familia de transportadores dependientes de sodio (NATs o Na⁺-dependent transporters) (Tsukaguchi et al., 1999), mientras que los transportadores de DHA pertenecen a una familia de transportadores de glucosa tipo GLUT (Vera et al., 1996; Rumsey et al., 1997; Liang et al., 2001) (Ver Fig. 1.10, pag. 31). En plantas, también se han identificado algunos sistemas de transporte de tipo NATs implicados en el transporte de ascorbato desde el citosol al apoplasto (Argyrou et al., 2001). En cuanto al transporte intracelular se sabe que en cloroplastos existe un transportador específico que introduce ascorbato en el cloroplasto y dicho sistema presenta gran homología con los transportadores de glucosa de mamíferos de la familia GLUT y difieren de los transportadores de hexosas de plantas (Szarka et al., 2004). En mitocondrias de plantas el transporte de DHA y glucosa al interior del orgánulo es llevada a cabo por el mismo tipo de transportador. Por otro lado, se ha sugerido que el ascorbato sintetizado en el espacio intermembrana atraviesa la membrana mitocondrial en su forma oxidada, DHA (Szarka et al., 2004).

1.3.3.1. Biosíntesis

En los años cincuenta ya se suponía que la síntesis de ascorbato en plantas difería de la de animales (Loewus, 1963). Pero es a partir de los 1990s, con la obtención de algunos mutantes deficientes en la síntesis de ascorbato, cuando se empieza a estudiar con más detalle las vías de síntesis de este antioxidante en plantas. La síntesis de ácido ascórbico en animales implica la transformación de la D-glucosa (D-Glc) a ácido ascórbico vía D-glucoronato, L-gulonato y L-gulono-1,4-lactona (L-GulL) (Burns et al., 1960), el cual es oxidado a ácido ascórbico mediante la enzima L-gulono-1,4-lactona oxidasa (GulLO; EC 1.1.3.8) (Fig. 1.7). Esta enzima ha sido purificada en rata, cabra y pollo (Nishikimi et al., 1976; Kiuchi et al., 1982). En plantas, la síntesis de ascorbato ocurre por diferentes vías, que describiremos a continuación, y que tienen como precursor común la L-galactono-1,4-lactona (L-GalL), que es oxidada a ácido ascórbico mediante la enzima L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GalLDH; EC 1.3.2.3) (Wheeler et al., 1998; Conklin et al., 2000; Smirnoff et al., 2001; Wolucka et al., 2001; Agius et al., 2003). Por otro lado, en hongos y algas, donde está ausente el ascorbato, se ha observado la presencia de un compuesto análogo al ascorbato, el eritroascorbato, que presenta una ruta de síntesis alternativa en la que interviene una nueva aldono-1,4-lactona oxidasa, la D-arabino-1,4-lactona oxidasa (D-AraLO; EC), la cual es distinta a la GulLO de animales o la GalLDH de plantas (Smirnoff et al., 2001).

En plantas se han descrito varias vías posibles en la síntesis de ascorbato (Fig. 1.8), pero la principal ruta fisiológica es la de Smirnoff-Wheeler (Conklin et al., 1999) que

ocurre vía GDP-manosa (GDP-Man), GDP-L-galactosa (GDP-L-Gal), L-galactosa-1-fosfato, L-galactosa y L-galactono-1,4-lactona (L-Gall) que es oxidada a ascorbato por la L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GalLDH; EC 1.3.2.3) (Wheeler et al., 1998; Ishikawa et al., 2006). Actualmente se han establecido otras rutas de síntesis de ácido ascórbico en plantas, como la que utiliza ácido D-galacturónico (Agius et al., 2003) derivado de pectinas, o aquella ruta de síntesis a partir de mio-inositol en *Arabidopsis* (Lorence et al., 2004). Por otro lado, Loewus (1988) propone una vía alternativa a partir de la cual el ascorbato es sintetizado desde D-glucosa, vía L-sorbose. En judía y espinaca hay indicios de actividad capaz de convertir L-sorbose a ascorbato en una reacción dependiente de NADP⁺ (Saito et al., 1990; Loewus et al., 1990).

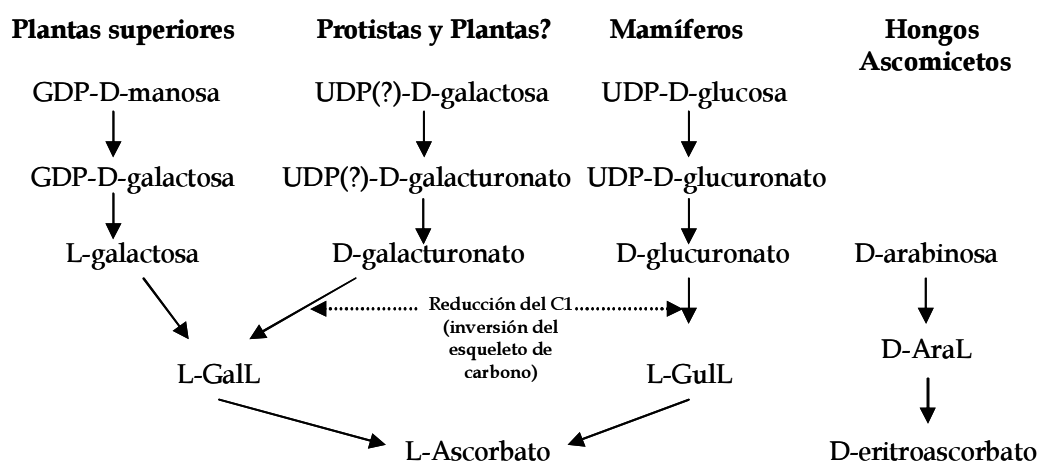


Fig. 1.7. Comparación de la síntesis de ácido ascórbico y eritroascórbico en varios organismos. La ruta de síntesis de ácido ascórbico varía entre los distintos grupos de organismos. En plantas (incluyendo algas clorofíticas) la aldono-lactona precursora de ácido ascórbico es producida desde una aldosa, mientras que en mamíferos y algunos protistas ello ocurre desde el ácido urónico. Hay evidencias de que las plantas también podrían llevar a cabo esta ruta a partir del ácido urónico. Por otro lado, los hongos Ascomycetos, incluyendo las levaduras, producen D-eritroascorbato, un análogo C₅ del ácido ascórbico, por medio de una ruta similar a la de las plantas. Comparaciones entre la secuencia de aminoácidos de las aldono-lactonas deshidrogenasas (plantas)/oxidasas (animales) que producen ascorbato o eritroascorbato (levaduras) muestran un 26 a un 31% de identidad. Este diagrama fue descrito por Smirnov (2001). L-Gall, L-galactono-1,4-lactona; L-Gull, L-gulono-1,4-lactona; D-AraL, D-arabino-1,4-lactona.

Los pasos previos a la L-galactosa-1P en la síntesis de ascorbato por la ruta descrita por Smirnov-Wheeler son comunes para otros procesos celulares como la síntesis de polisacáridos de la pared celular y la glicosilación de proteínas (Smirnov et al., 2001). Esto nos indica que las reacciones exclusivas de la ruta de síntesis de ascorbato son las catalizadas por la GalDH y la GalLDH. Por otro lado, se ha observado que la actividad GalDH es inhibida en presencia de altas concentraciones de ascorbato por mecanismo "feedback" (Tabata et al., 2002) y, además, ciertos estudios indican que la actividad GalLDH es fuertemente regulada por las condiciones de luminosidad en las que se encuentran las plantas (Tabata et al., 2002; Tamaoki et al., 2003; Pateraki et al., 2004).

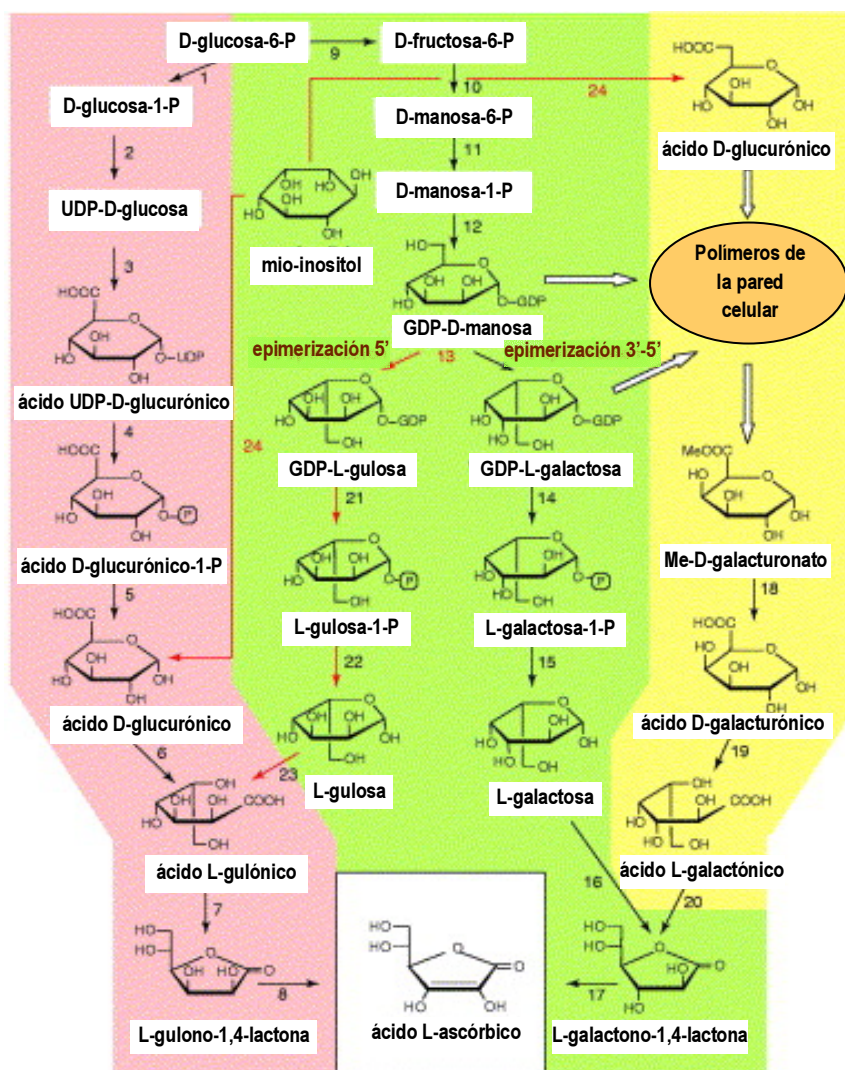


Fig. 1.8. Rutas propuestas para la biosíntesis de ácido ascórbico en animales (reacción 1-8) y plantas (reacciones 9-24). Las flechas rojas indican actividades enzimáticas de nuevas rutas de síntesis de ácido L-ascórbico (Wolucka y Montagu, 2003; Lorence et al., 2004). Las enzimas que catalizan las reacciones numeradas son: 1, fosfoglucomutasa; 2, UDP-glucosa pirofosforilasa; 3, UDP-glucosa deshidrogenasa; 4, glucuronato-1-fosfato uridiltransferasa; 5, glucurono quinasa; 6, glucuronato reductasa; 7, aldonolactonasa; 8, gulono-1,4-lactona deshidrogenasa; 9, glucosa-6-fosfato isomerasa; 10, manosa-6-fosfato isomerasa; 11, fosfomanomutasa; 12, GDP-manosa pirofosforilasa; 13, GDP-manosa-3'-5'-epimerasa; 14, fosfodiesterasa; 15, azúcar fosfatasa; 16, L-galactosa deshidrogenasa; 17, L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa; 18, metilesterasa; 19, D-galacturonato reductasa; 20, aldono-lactonasa; 21, fosfodiesterasa; 22, azúcar fosfatasa; 23, L-gulosa deshidrogenasa; 24, mio-inositol oxigenasa. Modelo propuesto por Valpuesta & Botella, 2004.

1.3.3.2. Función

La función principal del ascorbato es la de actuar como un potente **antioxidante**. Se explica así su importancia en procesos relacionados con la fotosíntesis, entre los que se encuentra su papel eliminador de peróxido de hidrógeno en la reacción catalizada por la APX, eliminación directa de superóxido, radicales hidroxilo y oxígeno singlete, regeneración del α -tocoferol (Padh, 1990), donación de electrones al fotosistema II y actuar como cofactor de la violaxantina depoxigenasa (VDE) (Fig. 1.9), enzima implicada en el

ciclo de las xantofilas en el lumen tilacoidal, concretamente en la disipación del exceso de energía de excitación dependiente de zeaxantina (Smirnoff, 2000). Además interviene en la eliminación de las especies de oxígeno reactivo generadas durante la fotorrespiración, a nivel de la glicolato oxidasa en el peroxisoma. Esta función antioxidante en plantas hace que el ascorbato juegue un papel importante en la defensa frente al estrés oxidativo, sobre todo en los tejidos fotosintéticos (Foyer et al., 1983; Smirnoff, 2000), de manera que en cloroplastos llega a alcanzar concentraciones de 20 a 300 mM en algunas especies alpinas (Foyer et al., 1983; Rautenkranz et al., 1994; Streb et al., 1997; Smirnoff, 2000).

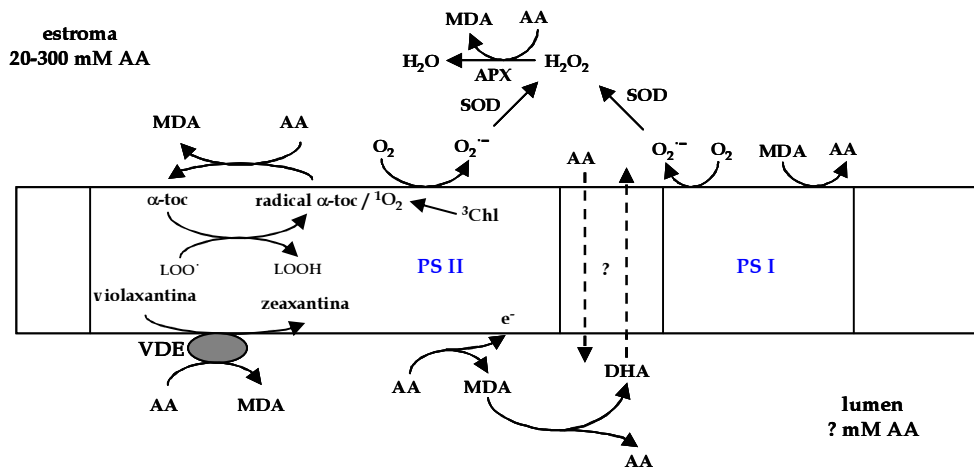


Fig. 1.9. Función del ascorbato en la fotosíntesis. Se indican los sitios donde el ascorbato interviene como donador de electrones y el monodeshidroascorbato como aceptor de electrones, además de su función como cofactor de la violaxantina depoxigenasa (VDE), reciclaje del oxígeno singlete (¹O₂) y regeneración del α-tocoferol a partir de los radicales tocoferilos. Movimiento del ascorbato y deshidroascorbato (DHA) entre el lumen tilacoidal y el estroma (--->). APX, ascorbato peroxidasa; AA, ácido ascórbico/ascorbato; DHA, deshidroascorbato; LOO[·], radical lípido-peroxilo; LOOH, hidroperóxido lipídico; MDA, monodeshidroascorbato; PS, fotosistema (I y II); SOD, superóxido dismutasa; α-toc, tocoferol.

La mayoría del ascorbato (90%) está localizado en el interior de la célula, y a diferencia de otros antioxidantes solubles, una proporción mínima es exportada al apoplasto, donde aparece en concentraciones milimolares. Se cree que este ascorbato apoplástico representa la primera barrera de defensa frente a los oxidantes externos potencialmente dañinos como el ozono, SO₂ y NO₂ (Plochl et al., 2000; Maddison et al., 2002) (Fig. 1.10). Dicho ascorbato apoplástico puede ser oxidado a monodeshidroascorbato por la enzima ascorbato oxidasa, por el ozono u otros oxidantes. El MDA es inestable y rápidamente es desproporcionado a DHA y ascorbato. El DHA suele ser transportado a través de la membrana plasmática al citoplasma celular por un transportador (Horemans et al., 2000a). Gracias a la DHAR citoplasmática este DHA es reciclado nuevamente a ascorbato que puede quedarse en la célula o ser nuevamente transportado al espacio apoplástico (Horemans et al., 2000b). El DHA apoplástico generado parece ser responsable de la elongación y la división celular (Lin & Varner, 1991; González-Reyes et al., 1994; Kerk & Feldman, 1995; Pignocchi & Foyer, 2003). No obstante, el ASC también parece intervenir en la elongación celular en las zonas meristemáticas de

la raíz de plantas de cebolla (González-Reyes et al., 1995; Córdoba-Pedregosa et al., 2003a, 2003b; 2005). El transporte del ascorbato, por tanto, es imprescindible en el mantenimiento del estado redox apoplástico y se ha observado que la actividad de dicho transportador es un proceso regulado por el ciclo celular (Horemans et al., 2003).

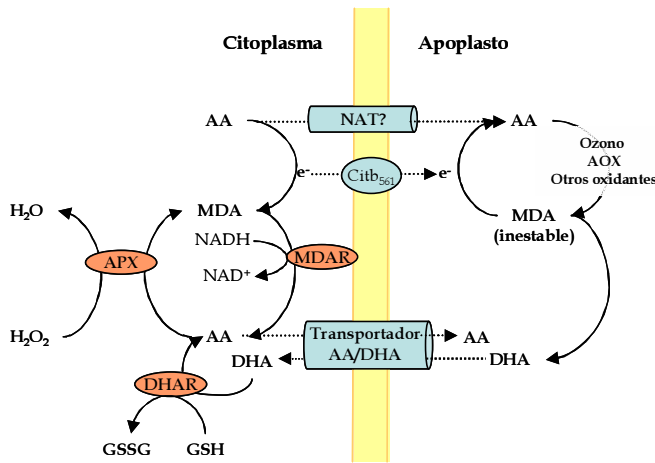


Fig. 1.10. Reacciones de oxidación-reducción del ácido ascórbico en el citoplasma y apoplasto (Conklin & Barth., 2004). Se representan algunos de los mecanismos propuestos para el transporte del ácido ascórbico y el deshidroascorbato (DHA) a través de la membrana plasmática de células de plantas. MDA, radical monodeshidroascorbato; MDAR, monodeshidroascorbato reductasa; AOX, ascorbato oxidasa; DHAR, deshidroascorbato reductasa; NAT, transportador de ácido ascórbico dependiente de Na⁺; APX, ascorbato peroxidasa.

El ácido ascórbico juega también un papel importante en la **señalización celular**. El ascorbato interviene en la resistencia a ataques por patógenos ya que modula el contenido de algunas moléculas señal como ácido salicílico, ácido abscísico, etileno y giberelinas (Conklin & Barth, 2004). Estas moléculas señal desencadenan una serie de procesos de defensa celular por medio de la activación de MAP quinasas. Se ha observado que esta respuesta de resistencia frente a patógenos está ampliamente relacionada con la provocada por exposición a ozono (Conklin & Barth, 2004)(Fig. 1.11).

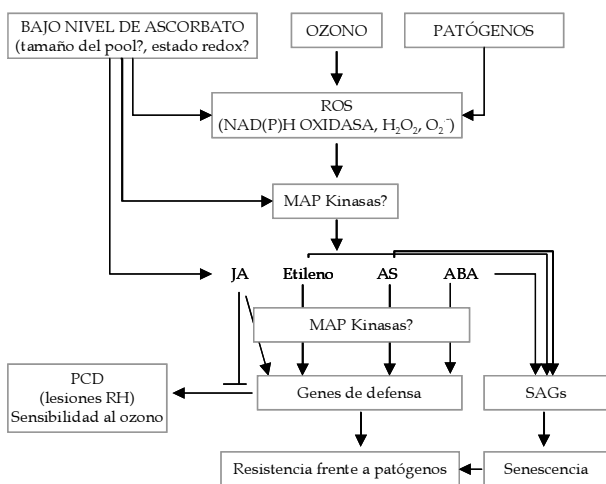


Fig. 1.11. Modelo descrito por Conklin & Barth (2004), donde se ilustra que bajas concentraciones de ascorbato (AA), presencia de ozono y patógenos puede activar rutas similares a las de defensa en plantas. Bajos niveles de AA producen un aumento en los niveles de ROS que a su vez activan a MAP quinasas que desencadenan una respuesta de defensa a través de fitohormonas. A su vez, el estado redox y/o la abundancia de AA puede también inducir la respuesta hormonal de la planta resultando la expresión de genes relacionados con la defensa y con la senescencia (SAGs), lo cual puede contribuir a la resistencia frente a patógenos. Por otro lado, el ácido salicílico (AS), etileno y ácido abscísico (ABA) inician una reacción hipersensible y lesiones que son atenuadas por el ácido jasmónico, resultando una sensibilidad al ozono.

Recientemente se han desarrollado estudios que relacionan la interacción ascorbato-H₂O₂ y el ácido abscísico con la regulación del cierre estomático en plantas (Foyer & Noctor, 2005). Además la abundancia de ascorbato foliar puede modular la

expresión de genes relacionados con la patogénesis y de la respuesta sistémica adquirida (Pastori et al., 2003; Kiddle et al., 2003; Barth et al., 2004). La disminución en los niveles de ascorbato disminuye el umbral de sensibilidad al estrés y desencadena respuestas de muerte celular programada (PCD) y de respuesta sistémica adquirida (Kangasjarvi et al., 2005). De hecho, mutantes *vtc1* y *vtc2* deficientes en la síntesis de ascorbato desarrollan una mayor resistencia frente a patógenos relacionada con la acumulación de ácido abscísico unida a una senescencia más temprana que el tipo silvestre (Barth et al., 2004).

Además de actuar como **cofactor** de la violaxantina depoxidasa, el ascorbato actúa como cofactor de otras enzimas (Davey et al., 2000; Smirnoff, 2000).

1.3.4. Antioxidantes en productos hortícolas

Los estudios epidemiológicos realizados hasta ahora sugieren que el consumo elevado de alimentos ricos en antioxidantes naturales incrementa la capacidad antioxidante de nuestro plasma sanguíneo y reduce el riesgo de algunos tipos de cáncer, enfermedades de corazón, cataratas, Alzheimer, etc. (Mariko et al., 2005). La principal fuente de antioxidantes en nuestra alimentación es de origen vegetal, principalmente por el consumo de fruta y verdura (Fig. 1.12). Esta propiedad antioxidante es atribuida a una gran variedad de constituyentes que incluyen vitaminas y otros compuestos fitoquímicos como flavonoides y carotenoides (Cao et al., 1996; Proteggente et al., 2002). De hecho, algunos de estos antioxidantes deben ser incluidos en nuestra dieta, ya que los humanos hemos perdido la capacidad de sintetizarlos, como es el caso del ascorbato (Davey et al., 2000). En este caso, dichos antioxidantes parecen ser importantes para mantener un buen estado de salud complementando las funciones de las defensas celulares. Entre los antioxidantes más importantes sintetizados por plantas y obtenidos a partir de la dieta en humanos están los carotenoides, los flavonoides, el α -tocoferol o vitamina E y el ácido ascórbico o vitamina C. Algunos antioxidantes tienen funciones paradójicas en tanto que pueden funcionar como prooxidantes, p.e. el ácido ascórbico cuando está en presencia de hierro o cobre (Spector et al., 1991; Stocker et al., 1991). La Tabla 1.5. muestra la capacidad antioxidante total y el contenido en ácido ascórbico o vitamina C de algunos tipos de frutas y verduras.

Por otro lado, las frutas y verduras están constituidas principalmente por agua (80-90% de su peso) y, aunque el contenido de carbohidratos es variable, en la mayoría de los casos éste es menor del 10% de su peso. Además, son pobres en contenido de lípidos y proteínas por lo que, a la gran mayoría, se les consideran alimentos hipocalóricos. En este caso, las verduras apenas superan las 50 calorías por 100 gramos, excepto las alcachofas y las patatas, y las frutas oscilan entre 30-80 calorías por 100 gramos, excepto el aguacate y el coco que pueden alcanzar las 200 calorías por 100 gramos (www.es.wikipedia.org). Ya se comentó la importancia de estos alimentos por su alto contenido en vitaminas esenciales para nuestra salud, y además, aportan minerales como potasio, magnesio,

calcio, hierro y sodio. El 2% de la fruta y el 2-10% de la verdura es fibra, constituida principalmente por pectina y celulosa.



Fig. 1.12. Frutas y verduras, productos con alto contenido en antioxidantes

La importancia que hoy día nos supone las propiedades organolépticas (color, tamaño, calidad, nutrientes, etc.) de los frutos se traduce en el reciente auge que ha supuesto la investigación en la mejora de las propiedades genéticas y bioquímicas en este sentido (White, 2002).

Tabla 1.5. Capacidad antioxidante total y ascorbato total en extractos de frutas y verduras.

Fruta/verdura	Capacidad antioxidante total (mg GAE/100g peso fresco) ^a	Ascorbato total (mg/100g peso fresco)
Fresa	330 ± 4	61
Frambuesa	228 ± 6	26
Ciruela roja	320 ± 12	5
Pimiento rojo	131 ± 12	105
Naranja	126 ± 6	46
Pimiento verde	119 ± 10	92
Brócoli	128 ± 4	45
Cebolla	88 ± 1	6
Uva	80 ± 4	2
Espinaca	72 ± 1	7
Pera	60 ± 3	3
Manzana	48 ± 1	6
Berenjena	45 ± 2	22
Melocotón	38 ± 1	6
Plátano	38 ± 4	10
Guisante	32 ± 1	22
Tomate	30 ± 1	18
Coliflor	30 ± 1	15
Puerro	22 ± 1	16
Lechuga	14 ± 1	<2

^a Datos de capacidad antioxidante total expresados como contenido fenólico en equivalentes de ácido gálico (GAE); valor ± SEM (error estandar de la media) de tres muestras. Los datos han sido recopilados de las siguientes referencias: Mariko et al., 2005; Proteggente et al., 2002. Estos valores están sujetos a variaciones según la variedad y estado de desarrollo de cada fruta o verdura.

1.4. PEROXISOMAS, ROS Y ANTIOXIDANTES

1.4.1. Metabolismo peroxisomal

Los peroxisomas son orgánulos celulares descritos por primera vez en 1954 por Rhodin y caracterizados bioquímicamente a principios de los 60 por De Duve (Luschning & Fink, 1999). Son orgánulos pequeños de entre 0,1 y 2 μm de diámetro constituidos por una membrana simple que rodea a una matriz granular o fibrilar (Tolbert & Essner, 1981). No son orgánulos autónomos, ya que no presentan un sistema genético propio y sus proteínas son codificadas por el núcleo. Se localizan en la mayoría de las células eucariotas (Kindl & Lazarow, 1982) y entre sus componentes básicos se encuentran las enzimas catalasa y flavin oxidasas productoras de H_2O_2 . En plantas, existen varios tipos de peroxisomas que se pueden clasificar según su función metabólica y el tejido en el cual se localizan (Huang et al., 1983; Baker & Graham, 2002):

- a. Glioxisomas, presentes en el tejido de reserva de semillas oleaginosas y en hojas senescentes. Estos orgánulos contienen las enzimas de la β -oxidación de ácidos grasos y del ciclo del glioxilato para convertir los lípidos de reserva en azúcares que son utilizados para la germinación y el crecimiento de la plántula y en las etapas de senescencia en las que deja de funcionar de manera efectiva la fotosíntesis.
- b. Peroxisomas de hojas, que se encuentran en tejidos fotosintéticos y que llevan a cabo la mayoría de las reacciones de la fotorrespiración.
- c. Peroxisomas de nódulos de raíz, presentes en nódulos de algunas leguminosas tropicales, y donde tiene lugar la síntesis de alantoína, el metabolito utilizado en este tipo de plantas para el transporte de nitrógeno.
- d. Peroxisomas no especializados, localizados en muchos tejidos, que contienen las enzimas básicas peroxisomales, pero cuya función fisiológica se desconoce.

Además de catalasa, en los peroxisomas encontramos oxidasas que, salvo en el caso de la urato oxidasa, son flavoproteínas como la D-amino oxidasa, acil-CoA oxidasa, glicolato oxidasa, α -hidroxiácido oxidasa y glutaril-CoA oxidasa, entre otras (Huang et al., 1983; Angermuller et al., 1987).

Una propiedad típica de peroxisomas es su plasticidad metabólica debido a que su contenido enzimático varía dependiendo del organismo, tipo de célula o tejido y de las condiciones ambientales en las que se encuentren (van den Bosch et al., 1992; Mullen & Trelease, 1996). Como ejemplo tenemos la transformación de los glioxisomas en peroxisomas de hojas en presencia de la luz (Huang et al., 1983; Masters & Crane, 1995; Mullen & Trelease, 1996) o la transición inversa de los peroxisomas de hojas en glioxisomas durante la senescencia o en situaciones de estrés provocado por cadmio (De Bellis et al., 1990; Landolt & Matile, 1990; Nishimura et al., 1993, 1996; Vicentini & Matile, 1993; Pastori & del Río, 1997; del Río et al., 1998a; 2002a).

También, se ha descrito la presencia de actividad endoproteasa en peroxisomas de hojas de guisante (Corpas et al., 1993; Distefano et al., 1997). Las endoproteasas peroxisomales parecen estar implicadas en distintos procesos, como en la degradación de proteínas durante la transición metabólica de los peroxisomas, en la degradación del extremo N-amino terminal de proteínas que contienen el péptido señal de localización peroxisomal PTS2, así como en la conversión irreversible de la XDH en XOD (Palma et al., 2002).

1.4.2. Metabolismo oxidativo

En estudios previos se ha demostrado la producción de especies oxígeno reactivas dentro del peroxisoma así como la participación de dicho orgánulo en el metabolismo oxidativo de la célula (del Río et al., 2002a). Además de la producción de H_2O_2 , favorecida por el metabolismo principalmente oxidativo del peroxisoma, se han descrito dos lugares importantes de producción de $O_2^{\cdot-}$ dentro del orgánulo: uno en la matriz, por la acción de la xantina oxidasa (XOD), y otro en la membrana, constituido por una cadena de transporte electrónico dependiente de NAD(P)H (Sandalio & del Río, 1988; del Río et al., 1989; 1998a; López-Huertas et al., 1997). En condiciones metabólicas normales, tanto el $O_2^{\cdot-}$ como el H_2O_2 producidos no son tóxicos para la célula ya que son eliminados por los sistemas de defensa del orgánulo y del resto de la célula. Pero en situaciones de estrés puede aumentar la producción de estas ROS dando lugar a condiciones de estrés oxidativo en las que los peroxisomas tendrían una función importante.

Actualmente se sabe de la presencia de distintos sistemas antioxidantes dentro del peroxisoma. Entre ellos destaca la actividad superóxido dismutasa con distintas formas isoenzimáticas (del Río et al., 1983; 1998a; Sandalio & del Río, 1987; Corpas et al., 1998b). En la mayoría de los casos las isoenzimas que aparecen dentro del peroxisoma son la Mn-SOD y/o la CuZn-SOD (Sandalio & del Río, 1988; Corpas et al., 1998b), aunque también se ha descrito una Fe-SOD en pétalos de clavel (Droillard & Paulin, 1990). También existen estudios que demuestran la existencia de los componentes del ciclo ascorbato-glutation dentro del peroxisoma (Bunkelmann & Trelease, 1996; Jiménez et al., 1997). De hecho, hay estudios que demuestran la localización de la DHAR y la GR en la fracción soluble del peroxisoma, mientras que la MDHAR y la APX se encuentran unidas a la membrana (Bunkelmann & Trelease, 1996; López-Huertas et al., 1999; Jiménez et al., 1997; Leterrier et al., 2005; Lisenbee et al., 2005). Se ha descrito también la presencia en peroxisomas de tres NADP-deshidrogenasas, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la 6-fosfogluconato deshidrogenasa y la isocitrato deshidrogenasa, que proporcionarían el NADPH necesario para el funcionamiento del ciclo ascorbato-glutation (Corpas et al., 1998a; 1999b) y otras funciones del orgánulo (del Río et al., 2006).

La aparición de cierta homología entre un péptido de membrana del peroxisoma (PMP) de 20 kDa de *Candida boidini* con una tiorredoxina dependiente de peroxidasa de *E.*

coli (Verdoucq et al., 1999) nos sugiere la presencia de estas proteínas dentro del peroxisoma. Por otro lado, se tienen evidencias de la presencia de una peroxirredoxina en peroxisomas de hojas de guisantes (Corpas et al., 2003). Por tanto, se ha postulado que estas proteínas intervendrían como un sistema enzimático antioxidante junto a la catalasa y al ciclo ascorbato-glutation manteniendo los niveles de H₂O₂ dentro del peroxisoma (Valderrama et al., 2006).

Se ha observado que la población de peroxisomas aumenta durante la senescencia y bajo distintas condiciones de estrés, como las producidas por xenobióticos, ozono, metales pesados y H₂O₂ (Palma et al., 1991; del Río et al., 1998a; 2002b; Romero-Puertas et al., 1999; López-Huertas et al., 2000). En estas situaciones, las ROS producidas por los peroxisomas podrían actuar como moléculas señal activando distintas rutas de señalización, para contribuir a una mejor comunicación entre los distintos compartimentos celulares ante estas situaciones de estrés (Corpas et al., 2001; del Río et al., 2002b).

1.5. EL ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D). HERBICIDA Y AUXINA SINTÉTICA.

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético ha sido y es ampliamente utilizado como herbicida, aunque a bajas concentraciones se comporte como una fitohormona auxínica (McCarthy, 2004). Los herbicidas son inhibidores enzimáticos que afectan a reacciones metabólicas básicas en la vida de la planta (Boger, 1988). El 2,4-D es un herbicida biclorado de actividad auxínica clasificado dentro de la serie fenoxiacética en el grupo de los ácidos fenoxialquilcarboxílicos (Grossman, 2000b) (Tabla 1.6.).

Tabla 1.6. Clasificación de los herbicidas auxínicos. Propuesta por el "Herbicide Resistance Action Committee" (HRAC).

Clasificación de los herbicidas auxínicos sintéticos		Ejemplos
Ácidos fenoxialquilcarboxílicos	Serie fenoxiacética	2,4-D, 2,4,5-T y MCPA
	Serie fenoxipropiónica	Mecoprop, Diclorprop y Fenoprop
	Serie fenoxibutírica	MCPB, 2,4-DB y 2,4,5-TB
	Serie fenoxibenzóica	TCB (no autorizado en España)
	Serie fenoxietílica	MCPES, Sesone, 2,4,5-TES, 2,4-DEP, 2,4-DEB y Erbon
Ácidos benzoicos		Dicamba, Cloramben y TBA
Ácidos piridín-carboxílicos		Picloram, Clopyralid, Triclopyr y Fluoroxypyrr
Ácidos quinolín-carboxílicos		Quinclorac y Quinmerac
Otros		Benazolin

Desde que en 1935 Zimmerman y Wilcoxon descubrieran la fuerte actividad auxínica de los fenoxiácidos clorados, estos han sido ampliamente usados en agricultura. Las auxinas han sido usadas para prevenir la caída prematura de los frutos, para inducir el enraizamiento de los cortes y la partenocarpia, para asegurar la fructificación, para mantener el pimpollo o las yemas en dormancia y para mejorar el bienestar general de la planta (Kimball, 2002). En investigación científica las auxinas se emplean en medios de cultivo *in vitro* para inducir la embriogénesis somática y para estimular la proliferación celular en callos (Lloyd et al., 1980; Schiavone & Cooke, 1987; Kuijpers et al., 1996; Bronsema et al., 1998; Yang & Davies, 1999; Kitamiya et al., 2000).

El 2,4-D junto a otros fenoxiácidos clorosustituídos como el MCPA y el 2,4,5-T fueron introducidos en el mundo agrícola como herbicidas selectivos por su gran actividad frente a diversas hierbas de hoja ancha y su inocuidad frente a gramíneas (Lotlikar et al., 1968; Loos, 1975; Díaz, 1979; Sen et al., 1983; Golebski et al., 1988; Gollapudi et al., 1999; Charles et al. 2000; Forgacs et al., 2000). Además, fue ampliamente utilizado como Agente Naranja durante la guerra de Vietnam con fines militares, para la defoliación de bosques. En 1969, el gobierno de los EE.UU. dictaminó limitar el uso del 2,4,5-T en cultivos alimenticios debido a sus efectos teratogénicos observados en ratas y ratones de laboratorio (Cherry, 1970; Jackson, 1972; Loos, 1975; Reuber, 1983; Sen et al., 1983). Por su solubilidad en agua, se especula que el 2,4-D es un contaminante medioambiental con capacidad para infiltrarse en acuíferos, y por tanto, no sorprende que se hayan hallado residuos de 2,4-D entre otros herbicidas en muestras de aguas subterráneas de toda Europa y EE.UU. (Fielding et al., 1992; Khizbullin et al., 1997; Zipper et al., 1999; Smejkal et al., 2001).

A pesar de los mecanismos naturales existentes para su inactivación, como fotodegradación (Hay & Timan, 1956a; Sundstrom et al., 1979; Muller et al., 1999), degradación por bacterias aerobias (Lyon et al., 1989; Bhat et al., 1993; Hogan et al., 1997; Travkin et al., 1997; Top et al., 1998; Cosper et al., 1999; Poh et al., 2001; Smejkal et al., 2001) y por hongos del suelo (Vroumsia et al., 1999), los fenoxiherbicidas pueden persistir en las plantas por períodos de tiempo bastante largos, característica esencial para su mecanismo de acción (McCracken et al., 1981). En general, el 2,4-D es el herbicida más ampliamente usado en la actualidad, desde que el 2,4,5-T fuera prohibido en muchos países por su alta toxicidad (Travkin et al., 1997; DeFelice, 1999; Cho et al., 2000). Se utiliza principalmente en campos de golf, praderas, jardines, cultivos de cereales y pastos y como defoliante en bosques y operaciones militares. Sus intermediarios de biodegradación (el 2,4-diclorofenol y el 2,4,5-triclorofenol) son aún usados como biocidas y constituyen un grupo importante de contaminantes medioambientales (Travkin et al., 1997).

Por otro lado, el 2,4-D ha sido utilizado como se dijo antes en sistemas de experimentación *in vitro* por su papel como auxina sintética. Las auxinas y citoquininas son añadidas a cultivos de células vegetales, tanto en suspensión, como de callos o de

órganos, ya que intervienen en el control del crecimiento y multiplicación celular (Bronsema et al., 1998; Gyorgyey et al., 1997; Martín et al., 1999; Yang & Davies, 1999; Marapara et al., 1999). Las auxinas juegan un papel clave en el control de la división y elongación de las células vegetales mediante la alteración del patrón de expresión génica (Ishida et al., 1996). El 2,4-D es comúnmente utilizado en sistemas celulares como sustituto del ácido indolacético (AIA) a concentraciones de hasta 22,6 μM para estimular la mitosis y mantener el crecimiento de las células vegetales no diferenciadas (Bayliss, 1977; Sen et al., 1983; Yang & Davies, 1999). La adición de 2,4-D a células BY2 de tabaco cultivadas en un medio privado de auxina durante 3 días, induce la división celular, mientras que si no se adiciona 2,4-D no ocurre tal estimulación (Ishida et al., 1996). Se ha visto que el 2,4-D produce un incremento de mRNA específico (Gee et al., 1991; Mennes et al., 1992; Takahashi & Nagata, 1992; Ananvoranich et al., 1994; Okamoto et al., 1995; Wu et al., 1996) así como la actividad RNA-polimerasa ligada a cromatina (Loos, 1975; Guilfoyle et al., 1975; Fedtke, 1982; Sen et al., 1983). También se ha observado que el 2,4-D provoca la estimulación de ciertas actividades MAP-quinasas (Dominov et al., 1992). Las auxinas (2,4-D, NAA e AIA) inhiben el acúmulo de alcaloides durante la fase de crecimiento (Arvy et al., 1994) y podrían tener un papel en la absorción y translocación de ciertos alcaloides hasta las vacuolas dentro de las células vegetales (Taguchi et al., 2000). Por último, se ha observado que el 2,4-D incrementa la eficiencia de los procesos relacionados con la desaturación en los compartimentos extra-plastidiales (Engel et al., 1995). Las auxinas afectan a la actividad lipoxigenasa (LOX) de los embriones somáticos. En la Tabla 1.7 se muestran, a modo de resumen, algunos de los estudios en los que se ha empleado el 2,4-D en cultivos *in vitro*.

1.5.1. Mecanismo de acción del 2,4-D y otros herbicidas auxínicos

Los herbicidas auxínicos mimetizan los efectos bifásicos del AIA sobre los tejidos vegetales, de forma que cuando están presentes a baja concentración, también activan el crecimiento por división y elongación celular (Loos, 1975; Fedtke, 1982; Khalatkar & Bhargava, 1982; Grossmann, 2000a). No obstante, existe una importante diferencia entre el ácido indolacético endógeno, que controla el crecimiento de las plantas, y los fenoxiherbicidas, pues mientras que las concentraciones del primero están cuidadosamente controladas y reguladas por reacciones biosintéticas y catabólicas de la planta en los distintos tejidos, las concentraciones de los últimos no lo están (Loos, 1975; Fedtke, 1982; Marrs, 1996; Candelas et al., 1996).

Los síntomas más comunes que aparecen a las 24 horas de la aplicación de estos herbicidas a alta concentración, son curvatura del tallo, epinastia foliar (curvatura hacia abajo de las hojas), inhibición del crecimiento de hojas, raíces y tallos, formación de agallas (sobre todo en tallos), e inducción de la formación de raíces secundarias (Cárdenas et al., 1968; DeFelice, 1999; Grossmann et al., 2001). El floema se considera la ruta primaria

Tabla 1.7. Empleo del 2,4-D en sistemas de experimentación *in vitro* (McCarthy, 2004)

Efecto	Especie	Referencia
Estimulación del crecimiento	<i>Solanum tuberosum</i> <i>Glycine max</i> , <i>Oryza sativa</i>	Faludi et al., 1965 Feung et al., 1974
Elongación celular y mayor actividad PAL	<i>Mentha sp.</i>	Yang et al., 1999
Mitogénico, regulador del tamaño y la forma celular	<i>Daucus carota</i>	Lloyd et al., 1980
Acumulación de mRNA	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	Dominov et al., 1992
Inducción de la división celular	<i>Nicotiana tabacum</i>	Ishida et al., 1996
Inducción de la actividad telomerasa	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tamura et al., 1999
Estimulación del gen PMEK1	<i>Petunia híbrida</i>	Trehin et al., 1998
Estimulación de actividades MAP-quinasas y MAP-quinasas-quinasas	<i>Nicotiana tabacum</i>	Mizoguchi et al., 1994
Inducción de la embriogénesis somática	<i>Medicago sativa</i> <i>Medicago arborea</i>	Dudits et al., 1993 Martín et al., 1999
Desarrollo de callos con potencial embriogénico	<i>Dendrocalamus giganteus</i>	Ramanayake & Wanniarachchi, 2003
Represión de la embriogénesis	<i>Daucus carota</i>	Tisserat & Murashige, 1977 Kitamiya et al., 2000
Represión de la síntesis de alcaloides	<i>Catharantus roseus</i>	Goddijn et al., 1992 Arvy et al., 1994 Limam et al., 1998
Acumulación de escopolina	<i>Nicotiana tabacum</i>	Taguchi et al., 2000
Inducción de la flavonol-3-sulfotransferasa	<i>Flaveria bidentis</i>	Ananvoranich et al., 1994
Estimulación de la actividad fosfolipasa A ₂	<i>Glycine max</i>	Scherer & André, 1989 Scherer & Arnold, 1997
Represión del desarrollo de amiloplastos	<i>Nicotiana tabacum</i>	Miyazawa et al., 1999

de transporte de estos compuestos, lo que explica su actividad más limitada al aplicarse por vía radical (Hay & Timan, 1956b; Rohrbaugh & Rice, 1956; Barrier & Loomis, 1957; Pallas, 1960; Clor et al., 1962; 1963), ya que en ese caso el transporte es efectuado a través del xilema. Estos herbicidas se acumulan en regiones de alta actividad metabólica, tales como los meristemas. Así, la edad de la planta y la tasa de crecimiento vegetal se correlacionan con la susceptibilidad a los herbicidas reguladores del crecimiento (Weaver & Derose, 1946; DeFelice, 1999; Romero-Puertas et al., 2004).

La selectividad de los fenoxiherbicidas hacia las cotiledóneas parece estar determinada sobre todo por características de la estructura de la planta y por la velocidad de translocación del herbicida (Hay & Timan, 1956b; Loos, 1975; Fedtke, 1982). El hecho

de que, en las monocotiledóneas, el floema esté repartido en núcleos, cada uno rodeado de tejido esclerénquima protector, y que en éstos núcleos no exista un cámbium y un periciclo sensible a auxinas (Fites et al., 1969), así como el hecho de que la absorción y translocación de herbicidas aplicados foliarmente es mucho más restringida en las monocotiledóneas que en las dicotiledóneas (Gallup & Gustafson, 1952; Fang & Butts, 1954; Loos, 1975), parecen ser factores potenciales de resistencia.

Desde un punto de vista fisiológico, se ha aceptado que los fenoxiherbicidas causan la muerte de la planta en unas dos semanas por alteración del crecimiento y del metabolismo, provocando anormalidades que resultan letales (Primo Yúfera, 1958; Cárdenas et al., 1968; DeFelice, 1999). La distorsión del crecimiento ocurre en toda la planta, aunque el 2,4-D haya tocado solo algunas hojas. En primer lugar, se inhibe el crecimiento de brotes, las flores no se abren, y los tallos y las hojas se curvan. Las partes subterráneas también se alteran. Las raíces dejan de crecer, se deforman por proliferación de tejido y desarrollan raíces laterales pequeñas, hasta que se desintegran (Wolf et al., 1950; Primo Yúfera, 1958; Fedtke, 1982; DeFelice, 1999; Grossmann, 2000a; 2001). Todo ello va asociado a cambios bioquímicos como son el alto consumo de carbohidratos (Rasmussen, 1947; Mitchell & Brown, 1947) y el aumento de la respiración (Humphreys & Dugger, 1957). Algunas plantas, que exteriormente parecen destruidas, reaparecen a veces en la estación siguiente, brotando de algún resto vivo subterráneo (Primo Yúfera, 1958).

Debido a sus efectos sobre procesos fundamentales, como la biosíntesis de ácidos nucleicos y proteínas, la actividad de muchas enzimas y la división celular, los herbicidas auxínicos afectan a muchos procesos en plantas, por lo que se concluyó que su modo general de acción es mimetizar a la auxina y alterar los procesos de crecimiento controlados por ella (Loos, 1975). Sin embargo, el mecanismo de acción que subyace al mimetismo de los herbicidas auxínicos es aún desconocido, a pesar de que exista información sobre su interferencia en el metabolismo de los ácidos nucleicos y su capacidad para romper o alterar los sistemas de transporte de la planta por proliferación celular masiva (DeFelice, 1999). Desde una perspectiva molecular, se sabe que la percepción y la señalización de las auxinas naturales y sintéticas inducen una serie de eventos, tales como la sobreexpresión de genes de respuesta a auxinas, conducentes a aberraciones en la biosíntesis de RNA (Franco et al., 1990; Gee et al., 1991; Cobb, 2006), fluctuaciones rápidas en la concentración de Ca^{+2} citosólico (Gehring et al., 1990), de inositol bi- y trifosfato, de ácidos grasos y de lisofosfolípidos (Morre et al., 1984; Ettliger & Lehle, 1988; Scherer & Andre, 1989; Scherer & Arnold, 1997), e incrementos en la actividad ATPasa de membrana (Barrierbrygoo et al., 1989; Barr et al., 1993) causantes de un deterioro en el gradiente protónico y de un aumento en la plasticidad de la pared celular (Basra & Basra, 1997; Grossmann, 2000a).

En la Figura 1.13 se muestra un modelo del mecanismo de acción de los herbicidas auxínicos propuesto por Grossmann et al. (2001). Como se indica en este esquema, una menor asimilación del CO₂ fotosintético, debido al cierre estomático propiciado por ABA, conduce a una sobreproducción de ROS, que pueden estar involucrados en la inducción del daño tisular y la muerte celular (Grossmann et al., 2001). Así, junto al etileno y al ABA, las ROS parecen contribuir al modo de acción de los herbicidas auxínicos en dicotiledóneas sensibles. Sin embargo, a pesar de que la inducción de la ACS parece ser el primer paso en la acción herbicida auxínica (Grossmann, 2000a; Hansen & Grossmann, 2000; Grossmann et al., 2001), y a pesar de que hayan sido descritas una variedad de proteínas como candidatas a ser receptores auxínicos, tales como GSTs (Bilang et al., 1993), formaldehído deshidrogenasas dependientes de GSH (Sugaya & Sakai, 1996a), indol-3-acetaldehído reductasas (Sugaya & Sakai, 1996b), disulfuro isomerasas (Sugaya et al., 2000) y proteínas ubicadas en la membrana plasmática (ABP1), la pared celular (Barrierbrygoo et al., 1989; Jones & Herman, 1993; Kimball, 2002), el núcleo (Prasad & Jones, 1991), el retículo endoplásmico, y el tonoplasto (Lamb, 1978), aún no se ha identificado inequívocamente la proteína diana de auxinas que actúa como el receptor específico primario para la percepción auxínica (Sterling & Hall, 1997; Luschning & Fink, 1999), ni se ha dilucidado en todos los detalles la ruta de transducción de señales auxínica (Grossmann, 2000a; Grossmann et al., 2001).

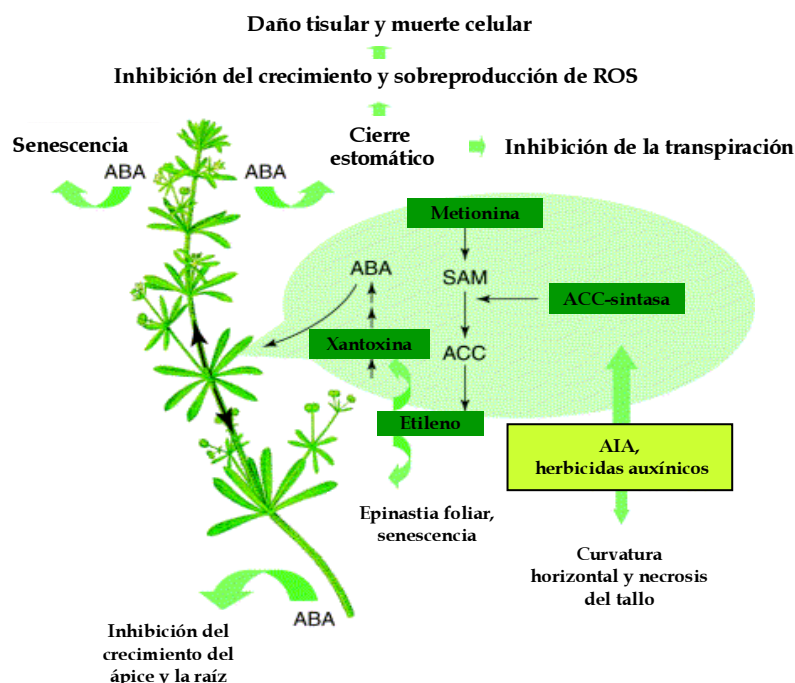


Figura 1.13. Modelo propuesto por Grossmann et al. (2001) para explicar el modo de acción de los herbicidas auxínicos en la inducción del daño tisular y la senescencia en *Galium aparine*. ABA: ácido abscísico; ACC: 1-aminociclopropano 1-carboxílico; AIA: ácido indolacético; ROS: Especies de oxígeno reactivo; SAM: S-adenosilmetionina.

Recientemente, Romero-Puertas et al. (2004) han propuesto un modelo complementario al del grupo de Grossmann y que explicaría los fundamentos moleculares que propiciaron la sobreexpresión de ROS por acción del 2,4-D y otros herbicidas auxínicos (Fig. 1.14). El exceso de radical superóxido y peróxido de hidrógeno generados por las actividades xantina oxidasa (XOD) y superóxido dismutasa (SOD), respectivamente, pueden provocar una sobreproducción de radicales hidroxilo por la reacción de tipo Haber-Weiss en presencia de ciertos metales (Cu^{2+} , Fe^{3+} , etc.). En estas condiciones, se produce epinastia, gravitropismo y estrés oxidativo caracterizado por la inhibición del crecimiento y la fotosíntesis, la peroxidación lipídica, la oxidación de proteínas, la proteólisis y la muerte celular. El ciclo ascorbato-glutation, cuyos niveles enzimáticos aumentan tras el tratamiento con 2,4-D, participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno y en proporcionar glutatión reducido (GSH) para la actividad glutatión S-transferasa (GST), la cual forma complejos de GSH-2,4-D.

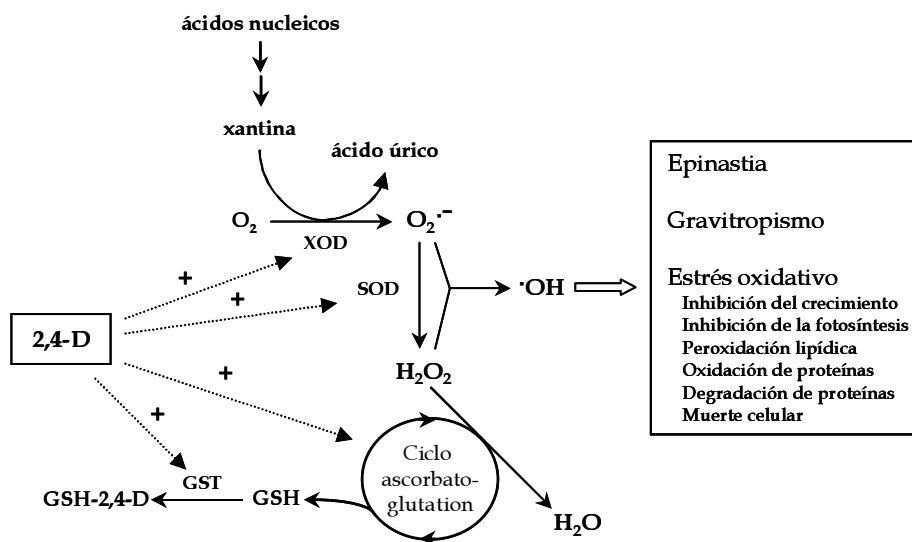


Fig. 1.14. Modelo propuesto por Romero-Puertas et al. (2004) para la acción del 2,4-D sobre el metabolismo oxidativo de hojas de guisante. XOD, xantina oxidasa; SOD, superóxido dismutasa; GST, glutatión S-transferasa; GSH, glutatión reducido

OBJETIVOS

En la actualidad es creciente la demanda de productos naturales que posean propiedades promotoras de un buen estado de salud. De hecho, uno de los aspectos que más interés despiertan hoy en día de los productos naturales es su contenido en antioxidantes. El pimiento (*Capsicum annuum* L.) es un producto hortícola consumido por la mayor parte de la población mundial, si bien este elevado consumo no se corresponde con una disponibilidad de datos moleculares y celulares sobre la capacidad antioxidante de esta especie hortícola. Es, por tanto, fundamental conocer las características nutricionales y beneficiosas que esta materia prima puede aportar a la dieta humana dado que ello tendrá una repercusión directa en nuestra salud.

Con este propósito, nuestro grupo de trabajo de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC) de Granada inició una línea de investigación dirigida al estudio integral de los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos del pimiento, con el fin de definir criterios de diagnóstico de la capacidad antioxidante de distintas variedades, así como analizar su implicación en la maduración de los frutos y en la respuesta frente al estrés abiótico.

Nuestro grupo de investigación comprobó que el pimiento mostraba una respuesta diferencial frente a estrés abiótico generado por altas concentraciones del cadmio dependiendo de la variedad. Sin embargo, en dichos estudios no se pudo determinar si dicho comportamiento dependía del agente generador del estrés o de la variedad. Por tanto, quedaba por dilucidar si una misma variedad es capaz de mostrar una mayor resistencia al estrés abiótico que otras, independientemente del tipo de estrés aplicado.

Es un hecho conocido que la calidad y la producción de los frutos de pimiento depende de las condiciones ambientales que imperan durante la polinización. Las temperaturas extremas (frío y calor) y la alta radiación influyen de manera fundamental en el éxito de la polinización pudiendo ocasionar alteraciones en la maduración del fruto, lo que va acompañado de una disminución en la calidad del mismo y una reducción importante de la cosecha. Si bien, este concepto es una verdad incuestionable entre los mejoradores y los cultivadores de pimiento, aún no se conocen los fundamentos moleculares de este vínculo ni qué papel pueden jugar los antioxidantes del fruto en todo este proceso.

Por otro lado, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio comprobamos que el ascorbato se encontraba presente en una elevada concentración en los frutos de pimiento. De hecho, los valores obtenidos permitían afirmar que unas cantidades normales de pimiento en nuestra dieta serían suficientes para satisfacer las necesidades diarias de vitamina C. Se han postulado diferentes rutas de síntesis del ascorbato en plantas superiores. En fresa, otro de los productos hortofrutícolas de interés para la nutrición humana por su alto contenido en vitamina C, se ha propuesto la actuación de forma simultánea de varias vías de síntesis de ascorbato. Hasta el momento no se dispone de información tanto a nivel génico como enzimático sobre la síntesis de ascorbato en frutos de pimiento. Si consideramos, como ya se ha apuntado, la contribución de esta hortaliza al aporte total de vitamina C en la dieta, sería fundamental realizar el estudio de dicha ruta en los frutos de pimiento.

En base a todo lo dicho anteriormente, nos planteamos los siguientes objetivos para esta Tesis Doctoral:

1.- Estudiar el efecto del 2,4-D en plantas de dos variedades de pimiento, con la finalidad de establecer modelos de respuesta de los antioxidantes de esta especie vegetal frente al estrés abiótico.

2.- Analizar los niveles de antioxidantes enzimáticos en distintas variedades de pimiento y la evolución de los mismos durante la maduración y en distintas condiciones ambientales de luz, radiación y temperatura.

3.- Investigar la síntesis de ascorbato y la implicación del mismo en la maduración de los frutos de pimiento.

Además, estos objetivos permitirán abordar dos aspectos de sumo interés en nuestro entorno: por un lado, contribuir a la selección e identificación de marcadores moleculares de interés nutricional de variedades de pimiento, lo que incidirá en una mejora de la calidad de esta fuente de alimentación; y por otro, sentar las bases moleculares para diseñar futuras estrategias que permitan seleccionar variedades más resistentes a los estreses más frecuentes en el sudeste español, lo que repercutiría en una mayor rentabilidad del sector agroalimentario de dicha zona. Los objetivos que se plantean, aun diseñados para responder a problemas reales de nuestra sociedad y de nuestro entorno agrícola, se acometerán desde un punto de vista estrictamente científico.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se han utilizado hojas y frutos de plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) obtenidas a partir de semillas de la empresa Syngenta Seeds S.A. (El Ejido, Almería).

Las semillas de pimiento fueron desinfectadas por inmersión en etanol al 96% (v/v) durante tres minutos, secándolas posteriormente al aire sobre papel de filtro (Rabie et al., 1980). Estas semillas se germinaron en vermiculita humedecida con CaSO_4 0,5mM, en cámara de cultivo a 25°C durante 30 días. Posteriormente, se trasladaron al invernadero, donde se cultivaron durante 3 meses en el mismo sustrato, en condiciones óptimas para dicha especie vegetal. Una vez obtenido el estadio de crecimiento adecuado, las plántulas se extrajeron cuidadosamente del soporte de vermiculita para no dañar el sistema radicular y se trasplantaron a botes de PVC (2,5 litros de capacidad; 4 plántulas por bote) que se distribuyeron según un diseño de bloques de parcelas al azar hasta la finalización del ensayo. Se utilizó un sistema de cultivo en medios líquidos (Hewitt, 1966) con aireación controlada de la solución nutritiva en cada unidad de cultivo.

Las condiciones de cultivo de las plantas (día / noche) fueron las siguientes: temperatura, $26 \pm 2^\circ\text{C}$ / $18 \pm 1^\circ\text{C}$; humedad relativa, $70 \pm 5\%$ / $80 \pm 5\%$, y un fotoperiodo de 14 h con un PAR (radiación fotosintéticamente activa) mínimo de $420 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Las soluciones nutritivas se prepararon con agua desionizada (resistividad $\geq 4 \text{ M}\Omega$) y reactivos específicos de pureza analítica, reponiéndose cada 24 horas el volumen perdido por transpiración con agua desionizada.

La composición de la solución nutritiva se basó en la de Hewitt (1966) modificada con un pH inicial de $5,5 \pm 0,1$ y una concentración iónica de 30 mg ión l^{-1} , siguiendo la técnica propuesta por Steiner (1961). Las concentraciones de macronutrientes, expresados en mM, fueron: NO_3^- , 12; H_2PO_4^- , 4,0; SO_4^{2-} , 1,5; K^+ , 5,0; Ca^{2+} , 4,5; Mg^{2+} , 1,5; y los siguientes micronutrientes, expresados en μM : Fe, 91,3; B, 46; Cu, 1,1; Zn, 2,3; Mn, 9,3 (del Río et al., 1985). Durante 3 meses las plantas crecieron en estas condiciones nutritivas completas. A lo largo del ensayo, la renovación total de las soluciones nutritivas se realizó semanalmente.

Para el estudio de los antioxidantes enzimáticos de fruto de pimiento en distintos estados de maduración y sometidos a variaciones ambientales se utilizaron frutos procedentes de los invernaderos experimentales que Syngenta Seeds tiene en El Ejido (Almería). Las plantas se cultivaron en un sustrato comercial (lana de roca), enriquecido en los nutrientes necesarios.

3.2. VARIEDADES DE PIMIENTO

Para el análisis de los sistemas antioxidantes de hojas de planta de pimiento frente a una situación de estrés abiótico provocada por el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) se utilizaron 2 variedades de pimiento, una de tipo dulce italiano (Abdera) y otra de tipo lamuyo (Herminio).

En el estudio de los antioxidantes de frutos de pimiento de distintas épocas del año y distinto estado de maduración se han utilizado las variedades Vergasa, Biela, Lodosa y Bierzo, siendo Vergasa, Biela y Lodosa frutos de tipo california y Bierzo de tipo lamuyo (ver Fig. 4.10; pág. 93).

En el estudio de los antioxidantes de fruto de pimiento sometidos a variaciones ambientales se utilizaron las variedades Vergasa, Biela, Galileo y Dulce Italiano (ver Fig. 4.33; pág. 113). Vergasa y Biela son frutos de tipo california, Galileo pertenece al grupo de los lamuyos y Dulce Italiano al grupo del mismo nombre.

En la caracterización, purificación y medida de antioxidantes de los peroxisomas de frutos de pimiento se emplearon frutos verdes y rojos de tipo lamuyo.

3.3. APLICACIÓN DEL ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D)

Tras el crecimiento de las plantas en la solución nutritiva completa, se procedió a la aplicación foliar del herbicida 2,4-D mediante un microatomizador de vidrio de control manual. Debido a su baja solubilidad en agua, el 2,4-D (forma ácida) se disolvió primero en etanol (50%; v/v) y, a continuación, se disolvió en agua con un 1% (v/v) de mojante-adherente (Bayer). Las concentraciones de 2,4-D administradas fueron las siguientes: 0 mM (control) y 22,62 mM (0,5 Kg · ha⁻¹). Se dispusieron 4 recipientes de 2,5 l para las plantas tratadas con 2,4-D que quedaron convenientemente apantallados del resto en el momento de la pulverización, consistiendo ésta en destinar a cada recipiente de cultivo 10 cm³ de solución hidroetanólica de 2,4-D. La aplicación se efectuó en tres pulsos temporales (3,33 ml por pulso) para favorecer la adsorción del producto en las cutículas y evitar el peligro de escurrido o lixiviación, habiéndose previamente eliminado la ventilación en el recinto de cultivo.

El tratamiento foliar con 2,4-D fue de 24 h, 7 días y 14 días, transcurrido el cual se cosecharon todas las hojas de las plantas de pimiento para proceder a su estudio.

3.4. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS PARA ENSAYOS BIOQUÍMICOS

3.4.1. Homogenados de hoja

Concluido el periodo de crecimiento en los tratamientos aplicados, se procedió a la recogida del material separando la hoja del resto de la planta. Las hojas fueron lavadas por inmersiones sucesivas en agua desionizada y posteriormente fueron secadas con papel secante. Las hojas recolectadas fueron pesadas y destinadas a realizar estudios bioquímicos según se describe más adelante.

Las hojas fueron homogenizadas con mortero y pistilo hasta que la rotura del tejido presentaba un aspecto homogéneo. Las hojas se mezclaron con tampón de homogeneización a 4°C en una relación 1:2 (p/v). La composición del tampón de homogeneización fue la siguiente: tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,8, glicerol 10%

(v/v), EDTA 0,1 mM, Tritón X-100 0,1% (v/v), DTT 5 mM. Tras la homogeneización, los extractos se filtraron a través de dos capas de nylon y se centrifugaron a 27.000 g durante 20 min a 4°C, en una centrífuga refrigerada Sorvall. Con el sobrenadante obtenido se realizaron los correspondientes ensayos.

Para la determinación de grupos carbonilo, los homogenados de hojas se prepararon en tampón fosfato-Na 10 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 0.2% (v/v) y PMSF 1mM, con una relación 1:4 (p/v). Los homogenados se filtraron y centrifugaron a 27.000 g durante 20 min y los sobrenadantes se utilizaron para las correspondientes determinaciones.

3.4.2. Homogenados de fruto

En la preparación de homogenados de fruto de pimiento, se empleó una relación 1:2 (p/v). Se tomaron dos tiras longitudinales de los frutos para la homogeneización (Fig. 3.1.) que se dividieron manualmente en trozos de 1 cm² de sección aproximadamente y se homogeneizaron con mortero y pistilo en presencia del tampón de homogeneización que contenía tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 0,1 mM, Tritón X-100 0,1% (v/v), glicerol 10% (v/v), y DTT 2 mM. En la preparación de extractos destinados a la medida de la actividad ascorbato peroxidasa, se incluyó ascorbato 20 mM en el tampón de homogeneización. Tras la homogeneización, los extractos se filtraron a través de dos capas de nylon y se centrifugaron a 27.000 g durante 15 min a 4°C, en una centrífuga refrigerada Sorvall. Con el sobrenadante obtenido se realizaron la mayoría de los ensayos. Los sobrenadantes destinados a la medida de actividad glutatión reductasa, L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa y galactosa deshidrogenasa se pasaron por una columna de Sephadex® G25 (Pharmacia NAP™- 10 Column, de Amersham Bioscience), para eliminar las moléculas de pequeño tamaño que pudieran interferir en la medida.

Para la medida de ascorbato y glutatión, los extractos de fruto de pimiento se obtuvieron pulverizando 0,70-0,75 gr de pericarpo de fruto con mortero y pistilo en presencia de nitrógeno líquido. Posteriormente se añadió 2,5 ml de ácido metafosfórico 5% (p/v). El homogenado se centrifugó a 19.000 g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se usó para la determinación de ascorbato y glutatión.

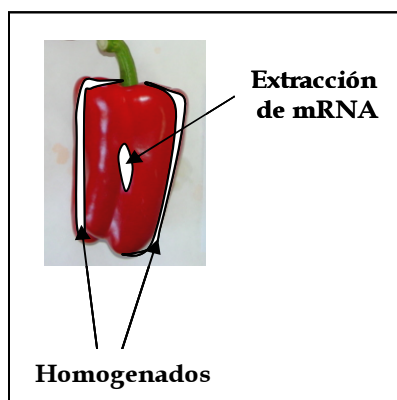


Fig. 3.1. Corte de los frutos en los distintos ensayos. Se cortaron dos tiras longitudinales del fruto de pimiento para los ensayos enzimáticos y una tira de menor tamaño para la extracción de mRNA.

3.5. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PEROXISOMAS DE FRUTO DE PIMIENTO

Todas las operaciones fueron realizadas a 4°C, al objeto de preservar en todo momento la integridad de los orgánulos. El método utilizado es una modificación del descrito por López-Huertas et al. (1995) para peroxisomas de hojas de guisante. El método consiste en varias centrifugaciones diferenciales seguidas de una centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa (Fig. 4.22; pág. 105). Los frutos se lavaron con agua desionizada y se fragmentaron manualmente en trozos de 5-10 cm² de sección, e inmediatamente después se incubaron durante 30 min en baño de hielo. Posteriormente, se le añadió el tampón de homogeneización en una relación 1:2 (p/v) y se homogeneizó en un aparato Sorvall de tipo Omni-Mixer aplicando 3 golpes a velocidad 3 y otros 3 golpes a velocidad 6. La composición del tampón de homogeneización fue la siguiente: Tricina-KOH 170 mM, pH 7,5, KCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 1,2 M, ASB 0,3% (p/v) y DTT 5 mM. El homogenado se filtró a través de dos capas de entretela y se centrifugó a 2.400 g durante 20 minutos para eliminar la mayor parte de los cloroplastos, núcleos y residuos celulares. El sobrenadante se centrifugó de nuevo a 12.000 g durante 15 minutos y el precipitado obtenido se resuspendió en 3 ml de un medio similar al de extracción pero con pH 7,0 y sin DTT. La suspensión de orgánulos se depositó con ayuda de una jeringa, en la parte superior de un gradiente discontinuo de sacarosa compuesto por: 3 ml del 60%, 6 ml del 57%, 9 ml del 51%, 9 ml del 47%, 6 ml del 42% y 3 ml del 35% de sacarosa (p/v). Las soluciones de sacarosa se prepararon a partir de una solución madre de sacarosa al 66% (p/v) preparada en Na₂-EDTA 1 mM, pH 7,5. Los gradientes de sacarosa se prepararon en tubos Quick Seals (Beckman) y se centrifugaron a 80.000 g durante 1 hora y 20 minutos en una ultracentrífuga Beckman usando un rotor vertical VTi50. Finalizada la centrifugación, los peroxisomas se situaban en la parte inferior del gradiente, en la interfase entre las capas de 57 y 51% (p/v) de sacarosa (López-Huertas et al., 1995).

Para la caracterización de los gradientes de sacarosa, éstos se eluyeron por desplazamiento ascendente con un fraccionador Isco mod. 185, registrándose la transmitancia a 280 nm con un detector Isco mod. UA-5. Se recogieron fracciones de 1,5 ml. La identificación de los orgánulos en los gradientes se realizó utilizando los marcadores enzimáticos que se describen en el Apartado 3.6. de esta memoria. Una vez caracterizados los gradientes, la banda correspondiente a la fracción de peroxisomas se extrajo mediante perforación de los tubos con una jeringa. Las matrices peroxisomales (fracción soluble), se separaron de la fracción de membranas mediante choque osmótico, por dilución 1:4 con tampón fosfato-K 100 mM, pH 7,8, Na₂-EDTA 1 mM, con agitación a 4°C durante 1 hora y posterior centrifugación a 120.000 g durante 30 minutos en un rotor Beckman 60Ti. El eluido se concentró por ultrafiltración usando una membrana PM-10[®] de Amicon. En los peroxisomas aislados se analizaron los parámetros bioquímicos inmediatamente, o bien se congelaron a -20°C hasta su uso.

3.6. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

3.6.1. Xantina oxidasa (XOD; EC 1.1.3.22)

La actividad XOD se determinó mediante espectrofotometría, según describe Rajagopalan (1985), midiendo a 293 nm la aparición de ácido úrico dependiente de O_2 , a 25 °C. La muestra se incubó previamente 3 minutos con KCN 1 mM para inhibir la actividad uricasa. La reacción se llevó a cabo en un tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,8 conteniendo xantina 50 μ M y Tritón X-100 0,1% (v/v), siendo el volumen final de reacción de 1 ml. La actividad se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción utilizando un coeficiente de extinción molar para el ácido úrico de $1,22 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Hong & Schopfer, 1981) y se expresó en nmoles de ácido úrico $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína.

3.6.2. Superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1.)

3.6.2.1. Actividad total

Se empleó básicamente el método espectrofotométrico de McCord y Fridovich (1969), basado en la medida de la tasa de inhibición, por la SOD, de la reducción del citocromo *c* por los radicales libres $O_2^{\cdot-}$ generados por el sistema enzimático xantina/XOD. La reacción se desarrolló a 25°C y la medida de la densidad óptica se realizó a 550 nm en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 640.

El ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 1 ml de una mezcla de reacción que contenía citocromo *c* $1,35 \times 10^{-5} \text{ M}$, xantina $9,67 \times 10^{-5} \text{ M}$ en tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM, 4-15 μ l de XOD (Roche: 20 U/ml y dil 1:50), y 25-100 μ l de muestra. En primer lugar, se comprobó el estado de oxidación del citocromo *c* añadiendo un exceso de ditionito sódico a la mezcla de reacción sin XOD y sin muestra, debiendo estar la lectura a 550 nm comprendida entre 0,22 y 0,24 unidades de absorbancia. Después se realizó una reacción control, adicionando XOD (Roche: 20 U/ml y dil 1:50) a la mezcla de reacción hasta obtener una tasa de reducción del citocromo *c* entre 0,024 y 0,026 unidades de absorbancia/min. Finalmente, en la reacción problema se añadió la muestra a la mezcla de reacción, así como el volumen de XOD determinado en la reacción control, midiéndose a 550 nm el cambio de absorbancia durante 2 minutos. En la determinación de actividad SOD en extractos crudos es conveniente incluir $CN^- 10^{-5} \text{ M}$ a fin de evitar posibles interferencias en la reducción del citocromo *c*.

Una unidad de actividad SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para producir una inhibición del 50% en la velocidad inicial de reducción del citocromo *c* en la reacción control a 25°C. La actividad enzimática se calculó según el tanto por ciento de inhibición:

$$\% I = \left[\frac{A_{550} / \text{min (control)} - A_{550} / \text{min (probl)}}{A_{550} / \text{min (control)}} \right] \times 100$$

$$\text{Unidades SOD/ml} = \frac{\% I}{50 \% \times v} \times f$$

donde v es el volumen de muestra utilizado, en ml, y f es el factor de dilución de la muestra.

3.6.2.2. Actividad isoenzimática

Las isoenzimas se separaron por EGPA en condiciones nativas o por electroenfoque, según se indica en los apartados 3.8.1. y 3.8.2., respectivamente. Una vez finalizada la electroforesis, se reveló la actividad SOD en geles según se describe en Beauchamp y Fridovich (1971). Los geles se incubaron durante 20 minutos en oscuridad con una solución de NBT 2,45 mM, preparada en tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8. Después se incubaron con una solución de riboflavina 28 μ M y TEMED 28 mM en el mismo tampón durante 15 minutos, en oscuridad. Finalmente se expusieron los geles a la luz en tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8 durante 10-15 minutos hasta visualizar las bandas acromáticas sobre el fondo azul del gel.

3.6.3. Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6)

Se siguió el método espectrofotométrico descrito por Aebi (1984), basado en la medida de la disminución de la absorbancia a 240 nm debida a la descomposición del H_2O_2 por efecto de la catalasa. En una cubeta de cuarzo se añadieron la muestra, convenientemente diluida, y la mezcla de reacción, protegida de la luz, y formada por tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,0 y H_2O_2 10,6 mM hasta completar un volumen final de 1 ml en la cubeta. La reacción se registró durante 2 minutos a 25°C en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 640, frente a un blanco compuesto por agua destilada. La actividad enzimática, expresada en μ mol de $H_2O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ se calculó a partir de la velocidad inicial de la reacción y de un coeficiente de extinción molar para el H_2O_2 de 39,58 $M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (del Río et al., 1977).

3.6.4. Ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11)

Para llevar a cabo el análisis de esta actividad se utilizaron muestras (homogenados y orgánulos celulares) preparadas en un medio de extracción conteniendo ascorbato 2 mM, para prevenir la inactivación de la APX. La actividad se determinó según describe Jiménez et al. (1997) midiendo a 290 nm la oxidación del ácido ascórbico durante un minuto.

La mezcla de reacción contenía tampón Hepes-NaOH 50 mM, pH 7,6, ascorbato 0,2 mM, H₂O₂ 0,3 mM y la muestra convenientemente diluida (15 µl como máximo). La reacción en 1 ml de volumen final, se llevó a cabo a 25 °C y se inició con la adición del H₂O₂.

La actividad enzimática, expresada en nmoles de ácido ascórbico oxidado · min⁻¹ · mg⁻¹ proteína, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el ácido ascórbico de 2,8 mM⁻¹ · cm⁻¹ (Hossain & Asada, 1984a). Se utilizaron tres controles, uno sin H₂O₂, otro sin ascorbato y otro sin muestra. Como control negativo de la reacción se utilizó un inhibidor de la APX, el *p*-cloromercurifenilsulfónico (pCMS).

3.6.5. Glutation reductasa (GR; EC 1.6.4.2.)

Se empleó el método espectrofotométrico de Edwards et al. (1990), basado en la medida de la tasa de oxidación del NADPH a 340 nm durante 3 minutos, la cual es necesaria para transformar el glutatión oxidado (GSSG) en glutatión reducido (GSH). La reacción se llevó a cabo a 25°C en un volumen final de 1 ml que contenía tampón Hepes-NaOH 0,1M, pH 7,8, EDTA 1 mM, MgCl₂ 3 mM, GSSG 0,5 mM, NADPH 0,2 mM y 100 µl de muestra. Se utilizaron tres controles, uno sin muestra y sin GSSG, otro sin GSSG, y otro sin muestra (Tabla 3.1.).

Tabla.3.1. Contenido de las cubetas, controles y problema, para la medida de la actividad Glutation Reductasa.

Reactivo	Blanco de reactivo	Blanco de muestra	Reacción Problema
Tampón + GSSG	800	-	800
Tampón - GSSG	150	800	-
NADPH	50	50	50
Muestra	-	100	100

La actividad enzimática expresada en nmoles de NADPH oxidado · min⁻¹ · mg⁻¹ proteína, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el NADPH de 6,22 mM⁻¹ · cm⁻¹ (Jiménez et al., 1997).

3.6.6. Guayacol peroxidasa

Se siguió el método descrito por Quessada y Macheix (1984), basado en la detección a 470 nm de guayacol oxidado producido por la acción de las peroxidasas. La mezcla de reacción, en un volumen final de 1,1 ml, contenía tampón fosfato potásico 50 mM, pH 6,1, guayacol-H₂ 6,25 mM, H₂O₂ 0,025 mM y la muestra convenientemente diluida. La reacción se inició por adición de H₂O₂ y la actividad se expresó en nmoles de guayacol · min⁻¹ · mg⁻¹, calculada aplicando un coeficiente de extinción molar (ϵ_{470}) para el guayacol oxidado de 26,6 mM⁻¹ · cm⁻¹.

3.6.7. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH; EC 1.1.1.49)

Se determinó espectrofotométricamente, midiendo la reducción del NADP⁺ a 340 nm según Corpas et al. (1998a). La reacción se llevó a cabo a 25°C en un volumen final de 1 ml que contenía tampón Hepes 50 mM, pH 7,6, con MgCl₂ 1 mM y NADP⁺ 0,8 mM, iniciándose la reacción por adición de glucosa-6-fosfato (G6P) 5mM.

Una miliunidad de actividad se definía como la cantidad de enzima necesaria para reducir un nmol de NADP⁺ · min⁻¹ a 25°C. Esta actividad se corrigió con la actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa. El coeficiente de extinción molar para el NADPH es de 6,22 mM⁻¹ · cm⁻¹.

3.6.8. 6-Fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH; EC 1.1.1.44)

Para determinar esta actividad se utilizó un medio de reacción similar al usado para la actividad G6PDH, sustituyendo el sustrato por el 6-fosfogluconato (6PG) 5mM (Corpas et al., 1998a). Una miliunidad de actividad se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir un nmol de NADP⁺ · min⁻¹ a 25°C. El coeficiente de extinción molar para el NADPH es de 6,22 mM⁻¹ · cm⁻¹.

3.6.9. Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ (NADP-ICDH; EC 1.1.1.42)

Se midió espectrofotométricamente el incremento de absorbancia a 340 nm debido a la reducción del NADP⁺ según describen Goldberg y Ellis (1983). La reacción se llevó a cabo a 25°C en un medio (1 ml) que contenía tampón Hepes 50 mM, pH 7,6, MgCl₂ 1 mM y NADP⁺ 0,8 mM, iniciándose la reacción con la adición de 2R,3S-isocitrato 2 mM.

La actividad enzimática expresada en nmoles de NADPH · min⁻¹ · mg⁻¹ proteína, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el NADPH de 6,22 mM⁻¹ · cm⁻¹ (Vigil, 1983).

3.6.10. Enzima málico (EM; EC 1.1.1.40)

Para determinar esta actividad se utilizó un medio de reacción similar al usado para la actividad G6PDH, sustituyendo el sustrato por el ácido L-málico 5 mM (Corpas et al., 1998a), y se siguió la tasa de reducción del NADP⁺ en presencia de malato.

La actividad enzimática expresada en nmoles de NADPH · min⁻¹ · mg⁻¹ proteína, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el NADPH de 6,22 mM⁻¹ · cm⁻¹ (Vigil, 1983).

3.6.11. L-Galactono-γ-lactona deshidrogenasa (GalLDH; EC. 1.3.2.3.)

La GalLDH es la enzima que cataliza la etapa final de síntesis de ácido L-ascórbico en plantas, concretamente lleva a cabo la oxidación de la L-galactono-γ-lactona a ácido ascórbico. Dicha actividad se midió espectrofotométricamente mediante el método

descrito por Ôba et al. (1994) siguiendo la reducción del citocromo *c* dependiente de L-galactono- γ -lactona (L-GL) a 550 nm, 22°C y durante 5 minutos. La mezcla de reacción contenía tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,4, 50 μ l de muestra, KCN 0,1 mM, citocromo *c* 85 μ M y L-galactono- γ -lactona 4,2 mM en un volumen final de 1 ml. Para ajustar el blanco del aparato se usó un control que en lugar de llevar L-GL llevaba tampón y se midió junto a la cubeta problema. La actividad enzimática, expresada en nmoles de citocromo *c* reducido \cdot min⁻¹ \cdot mg⁻¹ proteína, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción de la cubeta problema menos la del blanco sin L-GL y de un coeficiente de extinción molar para el citocromo *c* de 17,3 mM⁻¹ \cdot cm⁻¹ (Imai et al., 1998).

3.6.12. L-Galactosa deshidrogenasa (GalDH; 1.1.1.48)

Esta enzima interviene en una de las etapas previas a la síntesis de ácido L-ascórbico en plantas, concretamente lleva a cabo la oxidación de la L-galactosa a L-galactono- γ -lactona. Dicha actividad se midió en el espectrofotómetro mediante el método descrito por Gatzek et al. (2002) siguiendo la reducción del NAD⁺ dependiente de L-galactosa a 340 nm y 37°C, durante 3 minutos. La mezcla de reacción contenía tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 20-100 μ l de muestra, NAD⁺ 0,1 mM y L-galactosa 1 mM. Para ajustar el blanco se usó un control que llevaba tampón sin L-Gal y se midió junto a la cubeta problema.

La actividad enzimática, expresada en nmoles de NAD⁺ reducido \cdot min⁻¹ \cdot mg⁻¹ proteína, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el NAD⁺ de 6,22 mM⁻¹ \cdot cm⁻¹.

3.6.13. Nucleósido difosfato quinasa (NDPK; EC2.7.4.6)

La actividad nucleósido difosfato kinasa (NDPK) cataliza la reacción de fosforilación de un nucleósido difosfato a partir de otro trifosfato, ATP normalmente. Para su análisis se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En primer lugar, se preparó la mezcla de reacción compuesta por Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 5 mM, KCl 75 mM, GDP 1 mM, ATP 1mM y el volumen de muestra correspondiente. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 5 minutos y después se incubó a 100°C durante 3 minutos para detener la reacción. Tras enfriar en hielo durante 5 minutos, se centrifugó a 10.000 rpm durante 3 minutos en una microfuga. Finalmente, se inyectó 25 μ l del sobrenadante en la columna analítica Hypersil-NH₂ (APS-2; 5 μ m, 150 x 4,6 mm). Se construyó una curva patrón (concentración/área) para cada uno de los nucleótidos analizados (ATP, ADP, GDP y GTP). Los distintos tiempos de retención para cada nucleótido fueron detectados a 260 nm y la actividad fue determinada a partir de la concentración de GTP formada tras 5 minutos de reacción.

3.6.14. Hidroxipiruvato reductasa (HPR; EC 1.1.1.29)

Se utilizó el método descrito por Schwitzguébel y Siegenthaler (1984). Para ello se midió la oxidación a 340 nm del NADH acoplada a la reducción del hidroxipiruvato a glicerato. El medio de reacción contenía tampón fosfato-K 50 mM, pH 6.2, KCN 1 mM, NADH 0.2 mM e hidroxipiruvato 2 mM, en un volumen final de reacción de 1,1 ml.

La actividad enzimática se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción, utilizando un coeficiente de extinción molar para el NADH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Vigil, 1983), y se expresó en nmoles de NADH $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína.

3.6.15. Glicolato oxidasa (GOX; EC 1.1.3.1)

Se midió espectrofotométricamente según el método descrito en Archer y Ting (1996), siguiendo la formación a 324 nm de glioxilato de fenilhidrazona, resultado de la reacción del glioxilato, generado por la oxidación del glicolato, con la fenilhidrazina. El medio de reacción contenía fosfato-K 45 mM, pH 8,0, EDTA 3 mM, cloruro de fenilhidrazina 10 mM y glicolato sódico 5 mM, en un volumen final de reacción de 1 ml.

La actividad enzimática se calculó a partir de la velocidad inicial de la reacción utilizando un coeficiente de extinción molar para el glioxilato de fenilhidrazona de $17,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y se expresó en nmoles de glioxilato de fenilhidrazona $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína.

3.6.16. Acil-CoA oxidasa (ACOX; EC 1.3.3.6)

Esta actividad se determinó mediante espectrofotometría, según describe Gerhardt (1983), midiendo la formación de la forma oxidada de la antipirina a 500 nm durante 5 minutos y a 25 °C. La mezcla de reacción de 1 ml de volumen final contenía tampón Tris-HCl 175 mM, pH 8,5, FAD 47 μM , p-hidroximercuribenzoato 12 mM, 4-aminoantipirina 0,9 mM, N_3Na 0,9 mM, peroxidasa de rábano tipo II (Sigma) 5,28 U/ml, 100 μl de matrices peroxisomales, y palmitoil-CoA 47 mM que dispara la reacción.

La actividad enzimática se calculó a partir de la velocidad inicial de la reacción utilizando un coeficiente de extinción molar para la forma oxidada de la antipirina de $6,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y se expresó en mmoles de antipirina oxidada $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína.

3.6.17. Tiolasa (TIO; EC 2.3.1.9)

Se utilizó el método descrito por Gerhardt (1983), que determina la formación de NADH, proporcional a la actividad tiolasa presente en la muestra, producido por la malato deshidrogenasa en una secuencia de reacciones acopladas en las que interviene la citrato sintasa y la tiolasa y que se muestra en la Figura 3.2.

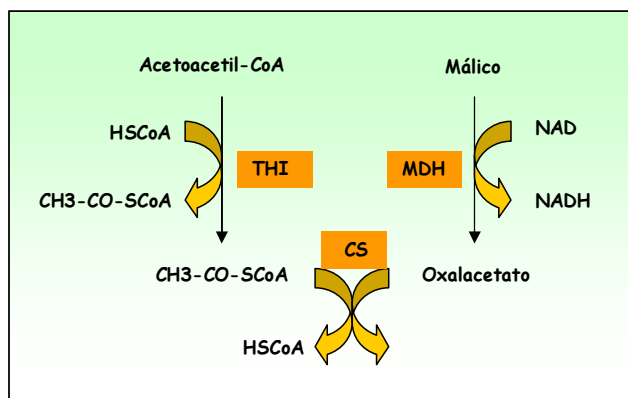


Fig. 3.2. Reacciones enzimáticas implicadas en la medida de la actividad tiosolasa

Para ello se preparó una mezcla de reacción que contenía fosfato potásico 100 mM, pH 7,5, MgCl₂ 250 μM, L-malato 3 mM, Tritón X-100 0,05% (v/v), DTT 2 mM, acetoacetil-CoA 40 μM, CoA 2 mM, KCN 2 mM, acetilpiridina-NAD 140 μM, 20 μg de citrato sintasa, 10 μg de malato deshidrogenasa y 100 μl de matrices peroxisomales. La medida se realizó a 25 °C durante 5 minutos, a 340 nm y en un volumen final de 2,20 ml.

La actividad enzimática se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción, utilizando un coeficiente de extinción molar para el NADH de 6,22 mM⁻¹ · cm⁻¹ y se expresó en nmoles de NADH · min⁻¹ · mg⁻¹ proteína.

3.6.18. Isocitrato liasa (ICL; EC 4.1.3.1)

Se empleó como marcador enzimático de los peroxisomas de fruto de pimiento rojo, ya que la catalasa en estos frutos no era muy abundante. Para ello se siguió el método de Archer & Ting (1996), basado en la cuantificación del complejo glioxilato de fenilhidrazona que se genera a partir del glioxilato proveniente de la ruptura enzimática del isocitrato y del clorhidrato de fenilhidrazina. La actividad se registró durante 3 minutos a 324 nm. El ensayo se realizó a 25°C, en un volumen de reacción de 1 ml con la composición siguiente: tampón fosfato-K 100 mM, pH 7,5, con MgCl₂ 10 mM; clorhidrato de fenilhidrazina 12 mM, DTT 5 mM; muestra (30 μl); y DL- isocitrato 13 mM. La actividad enzimática, expresada en nmoles de complejo · min⁻¹ · mg⁻¹ proteína, se calculó aplicando un coeficiente de extinción molar (ϵ_{324}) para el glioxilato de fenilhidrazona de 1,7 · 10⁴ M⁻¹ · cm⁻¹.

3.6.19. Malato sintasa (MS; EC 4.1.3.2)

Se determinó según una modificación del método descrito por Hock y Beevers (1966), que mide la producción del coenzima A libre (CoA-SH), utilizando el reactivo DTNB, el cual forma un mercáptido con el grupo sulfidriilo del CoA-SH que absorbe a 412 nm.

La mezcla de reacción, en un volumen de 2,8 ml, contenía tampón Tris-HCl 0,08 M, pH 8,0, MgCl₂ 3 mM, acetil-CoA 0,11 mM, DTNB 0,11 mM, glioxilato sódico 0,5 mM y 25-100 μl de muestra. La reacción se llevó a cabo a 30 °C y se inició añadiendo acetil-CoA. El

registro se efectuó a 412 nm durante 30 segundos frente a un blanco con todos los componentes de la reacción a excepción del acetil-CoA. La actividad enzimática, en nmoles de producto $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción utilizando un coeficiente de extinción molar de $13,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.6.20. Fumarasa (EC 4.2.1.2.)

Se utilizó el método descrito por Walk y Hock (1977) basado en la medida a 240 nm de la conversión del malato en fumarato. El ensayo se realizó a 25 °C en un volumen de reacción de 1 ml que contenía L-malato 4.3 mM, Tritón X-100 al 0.02 % (v/v), tampón tricina 0.1 M, pH 7.5 y 50 μl de muestra convenientemente diluida. La reacción se inició por la adición de L- malato, y se registró la formación de fumarato a 240 nm, frente a un blanco compuesto por el tampón de reacción. La actividad enzimática, en mmoles de fumarato $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el ácido fumárico de $2.44 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Hill & Bradshaw, 1969). Esta actividad se usó como marcador enzimático de mitocondrias en la caracterización de los gradientes de sacarosa.

3.6.21. NADPH-citocromo *c* reductasa (EC 1.6.2.4)

Se determinó mediante espectrofotometría mediante el método de Lord (1973), basado en la medida de la tasa de reducción del citocromo *c*, dependiente de NADPH, a 550 nm durante 3 minutos. La medida se llevó a cabo en un volumen final de 1 ml de una mezcla de reacción que contenía tampón fosfato potásico 20 mM, pH 7,2, NADPH 0,2 mM, citocromo *c* 0,02 mM, KCN 10 mM, antimicina A 1 μM (preparada en etanol) y la muestra. Este marcador nos indicó las fracciones de los gradientes de sacarosa correspondientes al retículo endoplasmático.

La actividad enzimática se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción, utilizando un coeficiente de extinción molar para la reducción del citocromo *c* de $21 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, y se expresó en mmoles de citocromo *c* reducido $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína.

3.6.22. Fructosa 1,6-bifosfatasa (EC 3.1.3.11)

Esta enzima se empleó como marcador de cloroplastos. Se midió en el espectrofotómetro a 28°C y durante 3 minutos mediante el método de Lázaro et al. (1974), basado en la reducción del NADP⁺ a 340 nm acoplada a la secuencia de reacciones que se muestran en la Fig. 3.3.

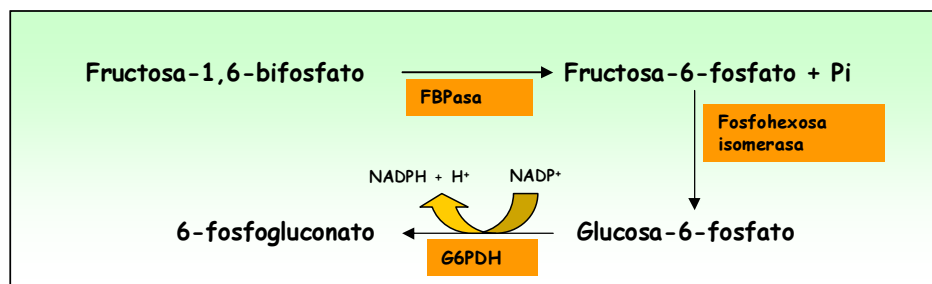


Fig. 3.3. Reacciones enzimáticas implicadas en la medida de la actividad fructosa 1,6-bifosfatasa (FBPasa).

Se preparó una mezcla de reacción de 1 ml de volumen final que contenía tampón Tris-HCl 100 mM, pH 8,8, EDTA-Na₂ 0,5 mM, MgCl₂ 10 mM, FBP 0,6 mM, NADP⁺ 0,3 mM, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (0,14 U), fosfohexosa isomerasa (1,4 U) y 50 µl de muestra. El blanco se ajustó con toda la mezcla de reacción salvo la FBP.

La actividad enzimática se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción, utilizando un coeficiente de extinción molar para la reducción del NADP⁺ de 6,22 mM⁻¹ · cm⁻¹, y se expresó en mmoles de NADPH · min⁻¹ · mg⁻¹ proteína.

3.6.23. Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (EC 1.2.1.13)

El método utilizado es el descrito por Holtum y Winter (1982) y está basado en la medida del descenso de absorbancia a 340 nm debido a la oxidación del NADPH a 25°C. La mezcla de reacción, en un volumen final de 1 ml, contenía un tampón Hepes-NaOH 25 mM pH 9,0, Bicina 25 mM, MgCl₂ 2 mM, DTT 2 mM, NADPH 0,08 mM, 3 U de fosfoglicerato quinasa (PGK), muestra convenientemente diluida y ácido 3-fosfoglicérico 3 mM. La reacción se dispara con ATP 1 mM y se sigue el descenso de absorbancia durante 4 minutos. Esta medida fue utilizada como marcador de cromoplastos en los gradientes de sacarosa que se emplearon para la separación de orgánulos de frutos de pimiento rojo.

La actividad enzimática, expresada en nmol NADPH oxidado · min⁻¹ · mg⁻¹ proteína, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción, utilizando un coeficiente de extinción molar para el NADPH de 6,22 mM⁻¹ · cm⁻¹.

3.6.24. Glutation S-transferasa (GST; EC 2.5.1.18)

La reacción catalizada por la glutacion-S-transferasa se siguió espectrofotométricamente midiendo a 30°C el aumento de absorbancia a 340 nm, correspondiente a la formación de un complejo entre el glutacion reducido (GSH) y el cloro-2,4-dinitrobenzenceno (CDNB) según Habig et al. (1974). La reacción se llevó a cabo en tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 7,5, conteniendo GSH 1 mM, CDNB 1mM y muestra (5-50 µl de extracto), durante un minuto. Como controles se utilizaron un blanco de reactivos (sin muestra) y un blanco sin CDNB para cada muestra.

La actividad enzimática expresada en $\text{nmoles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el producto conjugado de $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Habig et al., 1974).

3.6.25. Actividad endopeptidasa

3.6.25.1. Actividad total

La actividad endopeptidasa se determinó espectrofotométricamente utilizando como sustrato azocaseína, según describe Distefano et al. (1997). La hidrólisis de la azocaseína se llevó a cabo a 37°C durante 20 h en una mezcla de reacción (de volumen final 1 ml) que contenía tampón Tris-HCl 100 mM, pH 8,5, azocaseína al 0,5% (p/v) y 0,1 ml de muestra. La reacción se paró con 2 ml de ácido tricloroacético al 12% (p/v). La actividad endopeptidasa se expresó en unidades $\cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, considerando una unidad la cantidad de enzima que causa un incremento de absorbancia de 0,01 en 2h a 340 nm.

3.6.25.2. Actividad isoenzimática

Se utilizó un equipo Mini-Protean II, de Bio Rad, donde se prepararon geles de $7,5 \times 8 \text{ cm}$ y 1,5 mm de grosor. Los geles se prepararon con una concentración de poliacrilamida del 6% (p/v) conteniendo gelatina al 0,05% (p/v) tal y como se describe en Distefano et al. (1997). Las muestras frescas fueron diluidas en un tampón de carga 4x que contenía tampón Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5, glicerol al 40% (p/v), SDS al 5% (p/v) y azul de bromofenol al 0,005% (p/v). Tras la electroforesis los geles se transfirieron a una solución acuosa conteniendo Tritón X-100 al 2,5% (v/v) durante 1 hora a temperatura ambiente, para eliminar el SDS y renaturalizar las endopeptidasas. Posteriormente, se incubaron a 37°C durante 4 horas en tampón Tris-HCl 250 mM, pH 7,5. Después de la incubación, se tiñó el gel durante 1 hora con "Coomassie Brilliant Blue" R-250 al 0,1% (p/v) preparado en metanol al 50% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v), tras lo cual se destiñó con metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v), hasta visualizar la actividad endoproteasa como bandas acromáticas sobre el fondo azul del gel.

3.7. OTRAS DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

3.7.1. Peroxidación lipídica

Este parámetro se determinó midiendo la tasa de formación de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), empleando el malondialdehído (MDA) como compuesto de referencia (Buege & Aust, 1978). Todos los reactivos de este ensayo se prepararon en agua Milli-Q. Para el ensayo se añadieron 200 μl de muestra, convenientemente diluida, a 1 ml de la siguiente mezcla de reacción: ácido tricloroacético al 15% (p/v), ácido tiobarbitúrico al 0,375% (p/v) y butilhidroxitolueno al 0,01% (p/v) preparado en HCl 0,25 N. Posteriormente, la mezcla se calentó durante 15 minutos a 95°C con agitación, se dejó enfriar y se centrifugó a 2.000 g durante 5 minutos. En el

sobrenadante se efectuó la lectura de la densidad óptica a 535 nm. Los valores obtenidos se enfrentaron a una recta de calibración con distintas concentraciones de MDA dimetil acetal (0,1-10 μM), para determinar la tasa de peroxidación lipídica de las muestras.

3.7.2. Oxidación de proteínas

Se determinaron los grupos carbonilo en extractos crudos de hojas de pimiento como índice de las proteínas modificadas oxidativamente. Como control positivo, se utilizaron homogenados incubados, durante 2 h, con concentraciones crecientes de H_2O_2 (0-20 mM).

3.7.2.1. Medida en solución

La cuantificación de grupos carbonilo se efectuó según el método de Levine et al. (1991) basado en la reacción de los grupos $\text{C}=\text{O}$ con la 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) con formación de 2,4-dinitrofenilhidrazona que absorbe a 370 nm, según la reacción que se indica en la Figura 3.5.

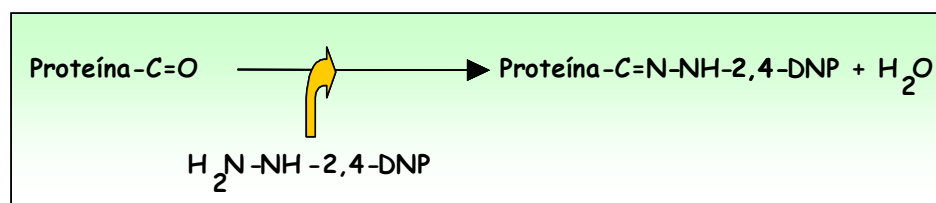


Fig. 3.4. Reacciones enzimáticas implicadas en la medida de grupos carbonilos de proteínas

Para cada tratamiento se usaron tres muestras con dos réplicas cada una y su correspondiente blanco. Una de las réplicas se destinó a la medida de los productos de oxidación de las proteínas y la otra a la determinación del contenido en proteínas de las muestras. Los extractos, conteniendo 0.5 mg de proteína se incubaron con sulfato de estreptomicina al 1% (p/v) durante 20 min para eliminar ácidos nucleicos y se centrifugaron a 2.000 g durante 10 min. Posteriormente, los homogenados se incubaron durante 1 h con DNPH 10 mM preparada en HCl 2 M. Los blancos se incubaron con HCl sin DNPH. Las proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v) y el exceso de DNPH se eliminó por lavados con etanol/acetato de etilo (1:1). Finalmente, el precipitado se resuspendió en guanidina 6 M preparada en KH_2PO_4 20 mM a pH 2,3 (ajustado con ácido trifluoroacético) y se midió la absorbancia a 370 nm. Como control del contenido de proteínas, al final del ensayo se midió la absorbancia de las réplicas a 280 nm utilizando una curva patrón de ASB preparada en guanidina 6 M. El contenido de carbonilos se calculó usando un coeficiente de extinción molar para las hidrazonas alifáticas de $22.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Levine et al., 1990).

Para la cuantificación de grupos carbonilo en peroxisomas purificados, éstos se sometieron a choque osmótico por dilución (5 veces) con tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,8, EDTA 1mM, y se mantuvieron en agitación durante 1-2 horas a 4°C.

Posteriormente, las muestras se incubaron con TCA 10% (p/v) durante 15 minutos y las proteínas se recuperaron por centrifugación a 27.000 g durante 1 hora. El precipitado obtenido se resuspendió en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7,4, y se incubó con DNPH continuando con el protocolo anteriormente indicado.

3.7.2.2. Detección inmunoquímica

Se llevó a cabo según el método de Yan et al. (1998). Los homogenados y las fracciones peroxisomales se incubaron con DNPH 10 mM preparada en HCl 2 M durante 1 hora. Como controles se utilizaron blancos incubados en HCl sin DNPH. Posteriormente, se precipitaron las proteínas con TCA al 10% (p/v) y se lavaron con etanol/acetato de etilo (1:1) tres veces como se indicó anteriormente. Finalmente, las proteínas se resuspendieron en tampón fosfato-Na 10 mM, pH 7,4, y se cargaron 10 µg de proteínas en dos geles de poliacrilamida-SDS. Uno de los geles se empleó para la inmunodetección, mediante la transferencia a una membrana de PVDF, y el segundo para tinción de proteínas como control. Las membranas de PVDF se incubaron con anticuerpos comerciales frente a la DNPH de Sigma (dilución 1:40.000) y las proteínas oxidadas se detectaron mediante quimioluminiscencia (Corpas et al., 1998a) o mediante el método de la fosfatasa alcalina, usando como sustrato el BCIP-NBT.

3.7.3. Medida del contenido de ascorbato

Se empleó el método del dipiridil descrito por Okamura (1980), con algunas modificaciones. Para la determinación de ascórbico total (ascorbato más deshidroascorbato; ASC + DHA) se preparó una mezcla de reacción que contenía 125 µl de homogenados de frutos preparados como se indica el apartado 3.4.2, 25 µl de trietanolamina 1,5 M, 150 µl de tampón fosfato sódico 150 mM, pH 7,4 y 75 µl de DTT 10 mM. Para reducir todo el ácido deshidroascórbico se mezcló bien y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para eliminar el DTT se añadió 75 µl de N-etilmaleimida 0,5% (p/v) y se incubó de nuevo a temperatura ambiente durante al menos 30 segundos. Posteriormente se añadió 300 µl de ácido tricloroacético 10% (p/v), 300 µl ácido fosfórico 44% (v/v), 300 µl de 2,2'-dipiridyl 4% (p/v) diluido en etanol 70% (v/v) y FeCl₃ al 3% (p/v). Esta mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C y se midió la absorbancia a 525 nm. Para la determinación de ácido ascórbico reducido se añadió lo mismo que para la determinación de ascorbato total salvo el DTT y la NEM.

Para determinar la concentración de ascórbico total (ASC + DHA) y de ascorbato reducido se preparó una curva patrón de ácido ascórbico comercial (10-60 µM) disuelto en ácido metafosfórico 5% (p/v) y se le dio el mismo tratamiento que a las muestras. Para determinar la concentración de deshidroascórbico se le resta a la medida de ascórbico total la de ascorbato reducido. Para la determinación del contenido de ascorbato en

matrices peroxisomales el procedimiento es el mismo que en extractos crudos salvo que no se añadió trietanolamina a la mezcla de reacción.

3.7.4. Contenido de glutatión

Esta medida se basa en el ensayo de reciclado de Anderson, el cual es un proceso enzimático sensible y específico. Como se indica en la reacción de la Fig 3.5., el GSH es oxidado por el DTNB dando GSSG con la formación estequiométrica de TNB. El GSSG es reducido a GSH por la glutatión reductasa y el NADPH. La formación de TNB es medida a 412 nm y es proporcional a la suma de GSH y GSSG. El ensayo puede ser también medido a 340 nm (desaparición del NADPH).

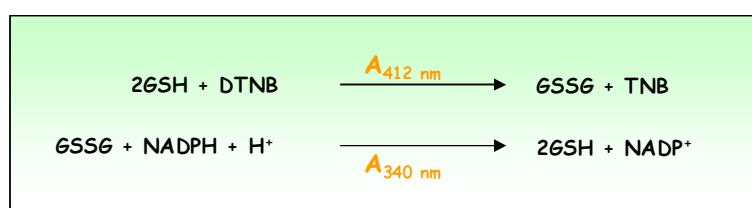


Fig. 3.5. Reacciones enzimáticas implicadas en la medida de glutatión

Para la determinación de GSH y GSSG se prepararon los homogenados como indica el punto 3.4.2. Se preparó una curva patrón para el GSH y otra para el GSSG, en el rango de 0,5-5 μM , partiendo de soluciones madre con una concentración de 50 mM disueltas en ácido metafosfórico 5% (p/v) y que llevan el mismo tratamiento que las muestras.

La medida de GSSG requiere una previa derivatización de las muestras lo cual consiste en añadir 2 μl de 2-vinilpiridina en su forma monomérica (Fluka) y 6 μl de trietanolamina 1,5 M a 100 μl de muestra y posterior incubación durante una hora a temperatura ambiente. El mismo tratamiento se le da al blanco de muestra que en lugar de muestra lleva ácido metafosfórico 5% (p/v).

El siguiente tratamiento era común en las muestras destinadas a la medida de glutatión total y glutatión oxidado (derivatizadas). Para ello, se preparó una mezcla de reacción que contenía tampón fosfato sódico 143 mM, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 6,3 mM, pH 7,5, NADPH (0,248 mg/ml); a ello se añadió DTNB 6 mM y glutatión reductasa (266 U/ml), ambos diluidos en el tampón anterior; finalmente se incorporó la muestra, que en el caso del glutatión total se diluyó 1/5.

3.7.5. Determinación de las proteínas

Se empleó el método de Bradford (1976), que permite determinar espectrofotométricamente el contenido de proteínas mediante la medida del complejo que éstas forman con el azul Coomassie. Se empleó el reactivo comercial de Bio-Rad "Protein Assay Dye Reagent", y albúmina de suero bovino (ASB), fracción V, como proteína

estándar para preparar la curva patrón de proteínas (0, 3, 6, 12, 18 y 24 μg ASB). Se adicionaron 200 μl de reactivo Bio-Rad a 800 μl de un volumen compuesto por la muestra o ASB, convenientemente diluidas, y agua destilada, y se midió la absorbancia a 595 nm, de 5 minutos a 1 hora tras la adición del reactivo (período de estabilidad del complejo). Conocidos los valores de absorbancia, se elaboró una recta de regresión lineal con los datos de la curva patrón de albúmina y se calculó la concentración de proteínas interpolando los valores de absorbancia de las muestras.

3.7.6. Determinación de la densidad

La determinación de la densidad de las fracciones de los gradientes de sacarosa se efectuó con un refractómetro Atago mod. 500 con capacidad para medir concentraciones en el intervalo 0-90% de sacarosa (p/p). Los porcentajes obtenidos por refractometría se transformaron en densidad ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$) utilizando las "International Critical Tables" (Griffith, 1983).

3.8. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (EGPA)

3.8.1. EGPA en condiciones nativas

Se utilizó un equipo Mini-Protean III, de Bio Rad, donde se prepararon geles de 7,5 x 8 cm y 1,5 mm de grosor. Los geles se prepararon con una concentración de poliacrilamida del 10% (p/v) en tampón Tris-HCl 377 mM, pH 8,9. Estos geles se destinaron a la separación de las distintas isoformas de SODs. Los homogenados, preparados en glicerol al 10% (v/v), se cargaron directamente en el gel, añadiendo azul de bromofenol al 0,006% (p/v) a cada muestra. Se utilizó una intensidad de 10 mA por gel durante 30 min, y después de 20 mA hasta que el azul de bromofenol alcanzó prácticamente el final del gel. El tampón de electrodos utilizado fue glicina 38 mM, ajustado a pH 8,2 con el tampón de geles.

3.8.2. Isoelectroenfoque

Se siguió básicamente el método descrito por Palma et al. (1997). Las muestras se prepararon en una solución que contenía sacarosa al 15% (p/v) y 2,3% (p/v) de anfolitos de pH 3,5-7 para las SODs (Pharmacia Biotech). Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida al 6% de 1,5 mm de grosor, conteniendo un 10% (v/v) de glicerol y un 2,3% (p/v) de anfolitos del rango de pH indicado anteriormente. Para impedir inactivaciones por la solución del cátodo, sobre las muestras se colocó una solución de sacarosa 7,5% (p/v) y anfolitos con los pHs correspondientes (2,3%; p/v). Las soluciones anódica y catódica fueron ácido fosfórico 0,06% (p/v) y NaOH 0,1M, respectivamente. La electroforesis se realizó a 4°C, con un voltaje de 150 V durante 30 min seguido de 200 V durante otros 30 min y, finalmente, se fijó a 250 V durante 1,5-2 h, en un equipo Mini-Protean II de Bio-Rad. Para determinar los puntos isoeléctricos de las distintas isoenzimas

de SOD, se emplearon marcadores de IEF de pI 2,80 - 6,55 (Pharmacia LKB Biotechnology) que se cargaron en los geles junto a las muestras. Tras el proceso electroforético, se separó la parte del gel correspondiente a los indicadores de pI, y se incubó con TCA al 20% (p/v) durante 2 h. Posteriormente se revelaron las proteínas en los geles como se indica en el apartado 3.6.2.2.

3.8.3. EGPA en condiciones desnaturalizantes (EGPA-SDS)

El método seguido fue el descrito por Laemmli (1970), utilizando un equipo Mini-Protean III de Bio-Rad. Se prepararon geles de poliacrilamida a distintas concentraciones (10-15%; p/v), con un gel concentrador de poliacrilamida al 4% (p/v). Las muestras para electroforesis se prepararon en un tampón de carga Tris-HCl 63 mM, pH 6,8, SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0,006% (p/v) y DTT 10 mM y se calentaron a 95°C durante 10 minutos para desnaturalizar las muestras. Después se cargaron en los geles, a los cuales se les aplicó un voltaje de 100 V durante 15-20 minutos, y después un voltaje de 200 V durante unos 45 minutos. El tampón de electrodos usado para el cátodo fue Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3, glicina 0,192 M y SDS 0,1% (p/v), y el tampón del ánodo de igual composición pero sin SDS.

3.8.4. Tinción de geles con azul Coomassie

Los geles se tiñeron con "Coomassie Brilliant Blue" R-250 al 0,1% (p/v), preparado en metanol al 50% (v/v) y ácido acético al 10% durante 30 minutos. Después se destiñeron con metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v), hasta que quedaron bandas azules sobre un fondo transparente.

3.8.5. Tinción con plata

Se utilizó la técnica descrita por Heukeshoven y Dernick (1985). Después de la electroforesis, los geles se incubaron con etanol al 30% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) durante 3 horas para fijar las proteínas. A continuación, los geles se lavaron con agua desionizada 3 veces durante 5 minutos cada vez, y se incubaron con una solución reductora de ferricianuro potásico 1% (p/v) y tiosulfato de sodio al 1,6% (p/v) durante 15 minutos. Posteriormente, los geles se lavaron abundantemente hasta que desapareciese el color amarillento de los mismos y se incubaron en una solución de nitrato de plata 0,1% (p/v), en oscuridad, durante 30 minutos. El revelado se efectuó en una solución de carbonato sódico 0,3 M y formaldehído 0,02% (v/v), hasta que aparecieron las bandas de proteínas. La reacción se detuvo añadiendo ácido acético al 3% (v/v).

3.9. TRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS (TÉCNICA DE WESTERN)

3.9.1. Transferencia de proteínas

Las proteínas separadas tanto por EGPA nativa como por EGPA-SDS se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF) de Millipore de 0,45 μm , utilizando un sistema de transferencia semiseco Trans-Blot SD de Bio-Rad. El tampón utilizado en la transferencia fue CAPS 10 mM, pH 11,0, con metanol al 10% (v/v). La transferencia se llevó a cabo utilizando una intensidad de 1,5 mA por cm^2 del gel durante 2 horas, según Corpas et al., 1998a.

3.9.2. Inmunodetección por quimioluminiscencia

Para la detección de las proteínas transferidas a la membrana de PVDF se utilizó un método de quimioluminiscencia (Bunkelmann & Trelease, 1996), que se basa en la oxidación del luminol por el complejo peroxidasa de rábano-anti-IgG en presencia de H_2O_2 , dando lugar a un compuesto intermediario que se estabiliza por la emisión de luz (Thorpe et al., 1985). La emisión de luz se potencia con 4-yodofenol, que actúa como transmisor de radicales de oxígeno al luminol.

Una vez concluida la transferencia de las proteínas, las membranas se lavaron con agua destilada. Para bloquear los sitios inespecíficos de unión de las inmunoglobulinas, las membranas se incubaron con leche en polvo desnatada al 1,5% (p/v), preparada en tampón TBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7,8, NaCl 0,18 M) durante 1,5-2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar las membranas, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente, en una dilución óptima, durante toda la noche a 4°C, o bien durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron con TBS durante 40 minutos, cambiando el tampón cada 10 minutos, tras lo cual se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario, anti-IgG unida a peroxidasa de rábano. Las membranas se lavaron finalmente con TBS y se procedió a la detección de las proteínas por quimioluminiscencia. Para el revelado, las membranas se incubaron durante 2-4 minutos en oscuridad en 20 ml de un tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,6, NaCl 150 mM al que se le adicionaron 8 mg de luminol, 200 μl de 4-yodofenol al 0,01% (solución de 10 mg/ml en DMSO) y 3,2 μl de H_2O_2 30% (v/v). Las membranas se expusieron a una película autorradiográfica "Hyperfilm", de Amersham Biosciences, en un accesorio para autorradiografía (Kodak). El tiempo de exposición variaba desde unos segundos hasta 20 minutos, según la intensidad luminosa obtenida en cada caso.

3.10. OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ANTISUERO DE LA Fe-SOD

La síntesis del péptido y obtención del antisuero se realizó mediante los protocolos al efecto de la casa comercial Sigma-Genosys (UK). El péptido sintetizado correspondió a los 14 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la Fe-SOD de tabaco (*Nicotiana glauca*) (P22302), correspondientes a los residuos Ser¹⁸⁹-Ala²⁰²: N-SWEAVSSRLKAATA-C. Este péptido, una vez sintetizado, se conjugó por su extremo amino y mediante el agente MBS (éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) a una proteína transportadora KLH (*keyhole limpet hemocyanin*) para así conferirle mayor poder antigénico. Una vez obtenido el péptido conjugado se procedió a la inmunización de dos conejos machos de la raza Nueva Zelanda, mediante distintas inyecciones subcutáneas. La primera inyección se realizó mezclando el inmunógeno con adyuvante de Freund completo (CFA), y las restantes se realizaron con el adyuvante de Freund incompleto (IFA). El adyuvante mejora la respuesta inmune, de manera que se necesita menor cantidad de péptido para producir más anticuerpo, y además libera lentamente el antígeno, lo que permite la estimulación continua del conejo. El protocolo completo de inmunización seguido se describe en la Tabla 3.2.

Día 0	Suero preinmune, Inyección (CFA)
14	Inyección (IFA)
28	Inyección (IFA)
35	Primer sangrado
42	Inyección (IFA)
49	Segundo sangrado
56	Inyección (IFA)
63	Tercer sangrado
70	Inyección (IFA)
77	Cuarto sangrado (final)

Se obtuvieron 3 ml de cada uno de los tres primeros sangrados, así como del suero preinmune, y 45 ml del sangrado final. A todos se les añadió azida sódica al 0,02% (p/v), y se guardaron a -80°C hasta su posterior utilización.

Tabla 3.2. Protocolo de inmunización llevado a cabo en conejos para la obtención del antisuero frente a la Fe-SOD de tabaco. Adjuvante Completo de Freund (Complete Freund's Adjuvant); IFA: Adjuvante Incompleto de Freund (Incomplete Freund's Adjuvant).

Determinación del título de los antisueros

Los cuatro sangrados de los dos conejos fueron analizados para determinar su título mediante ensayos de transferencia de western usando extractos de diferentes órganos de plantas de pimiento, que se prepararon según se indicó anteriormente en el apartado correspondiente. Los órganos empleados fueron hoja, flor, tallo y frutos de pimiento de distintas variedades.

3.11. EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DEL RNA

3.11.1. Extracción RNA total

El aislamiento de RNA total de las muestras se llevó a cabo utilizando el reactivo comercial Trizol[®] (GIBCOBRL, Life Technologies), compuesto de una solución monofásica de fenol y de isotiocianato de guanidina (Chomczynski & Sacchi, 1987). Los frutos, hojas, flores y tallos de pimiento se homogeneizaron en un mortero con nitrógeno líquido, pesándose el polvo obtenido y añadiendo inmediatamente el Trizol (1 ml por cada 100 mg de tejido). Después de incubarse durante 5 minutos a temperatura ambiente, se le añadió cloroformo (0,2 ml por ml de Trizol utilizado) y se agitó vigorosamente durante 15 segundos, volviéndose a incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 11.000 g durante 15 minutos a 4°C y se obtuvieron dos fases, una inferior, de fenol-cloroformo, y otra acuosa, superior, donde quedó el RNA. Esta fase acuosa se recuperó y se le añadió isopropanol puro (0,5 ml por cada ml de Trizol), incubándose durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se obtuvo el precipitado de RNA centrifugando a 11.000 g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol 75% (v/v), y se centrifugó a 7.500 g durante 5 minutos. Finalmente, se dejó secar el precipitado durante unos minutos a temperatura ambiente, y se resuspendió en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0,1% (v/v).

3.11.2. Cuantificación de RNA y DNA

La cuantificación del RNA y/o DNA obtenidos se realizó espectrofotométricamente, midiendo la absorbancia a 260 nm. Para ello, el RNA/DNA se diluyó en agua (1/40) tratada con DEPC, y se realizó un barrido de absorbancia entre 200 y 300 nm para determinar, asimismo, la posible contaminación de proteínas, que absorben a 280 nm. En estas condiciones, la relación entre las absorbancias A_{260}/A_{280} debe estar comprendida entre 1,8 y 2, para el RNA, o entre 1,7 y 1,9, para el DNA. Para la cuantificación, se asumió que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 µg/ml de RNA o a 50 µg/ml de DNA.

3.11.3. Electroforesis en geles de agarosa

Para comprobar el estado del RNA y los productos de PCR, se realizaron de forma rutinaria electroforesis en geles de agarosa. En el primer caso se prepararon geles de agarosa (Serva) al 0,8% (p/v) en tampón TBE (Tris-HCl 45 mM, ác. bórico 45 mM y EDTA 1 mM, pH 8.0). La agarosa se disolvió en tampón TBE con ayuda de un microondas y se dejó polimerizar, durante 30-45 min, antes de aplicar las muestras. Alícuotas de 1 µg de RNA de cada muestra se mezclaron con 2 µl de tampón de carga (glicerol 25% (v/v), EDTA-Na₂ 1 mM, pH 8, xileno-cianol 0,25% (p/v) y azul de bromofenol 0,25% (p/v)). El volumen final se ajustó a 10 µl con agua Mili-Q tratada con DEPC. Las muestras se

cargaron en el gel y se desarrolló la electroforesis en tampón TBE, a 100 V durante 30 min. Posteriormente y para el marcaje de las muestras en el gel, se incubó éste en un baño con bromuro de etidio ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de agua) durante aproximadamente 15 minutos.

Para evitar la contaminación por RNAasas, todo el material necesario para la electroforesis (peine, soporte del gel y cubeta) se trató previamente con NaOH 50 mM durante 2h y, posteriormente, se lavó con abundante agua Mili-Q tratada con DEPC.

El análisis de los productos de PCR se realizó en geles de agarosa del 0,8-2% (p/v) en tampón TBE. Un volumen de $15 \mu\text{l}$ de cada muestra se mezcló con $3 \mu\text{l}$ de tampón de carga y se cargó en el gel. El desarrollo electroforético se efectuó en tampón TBE, a 100 V durante 30-120 min dependiendo de los casos. Como marcador de tamaño molecular, se empleó el “EZ Load™ 100bp PCR Molecular Ruler”, de BioRad. Como se explicó anteriormente, el gel fue incubado tras la electroforesis en un baño con bromuro de etidio ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de agua) durante aproximadamente 15 minutos.

3.12. SÍNTESIS DE cDNA, TRANSFORMACIÓN Y AISLAMIENTO DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

3.12.1. Obtención de cDNA por transcripción inversa (RT)

La obtención del cDNA se realizó a partir del RNA total de fruto de pimiento obtenido según se explica en el apartado 3.11.1. Se partió de $2 \mu\text{g}$ de RNA total, a los que se les añadió $1,6 \mu\text{g}$ de oligo-dT (de 23 pb). Se incubó a 70°C durante 10 minutos, y posteriormente se adicionaron los siguientes reactivos: dNTPs 1,5 mM, 0,03 U/ μl de RNasin™ (inhibidor de Rnasas, Finnzymes), tampón de la enzima (Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, MgCl_2 5 mM, KCl 50 mM y DTT 2 mM) y 0,65 U/ μl de transcriptasa inversa (AMV Reverse Transcriptase, Finnzymes), en un volumen final de $30 \mu\text{l}$. La reacción se llevó a cabo incubando sucesivamente durante 40 minutos a 42°C , 5 minutos a 98°C , y otros 10 minutos a 4°C . La cuantificación de los cDNAs se realizó espectrofotométricamente como se indica en el apartado 3.11.2.

Para el estudio de la expresión del gen de la *GallDH* mediante PCR cuantitativa a tiempo real se obtuvieron cDNAs de fruto, hoja, flor y tallo de plantas de pimiento. Para ello se usó la transcriptasa inversa de Invitrogen (SuperScript™ II Reverse Transcriptase). En este caso se partió de $1 \mu\text{g}$ de RNA, al que se le añadió, por cada $20 \mu\text{l}$ de reacción final, $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ de oligo-dT y 0,5 mM de dNTPs (cada uno), completando hasta $12 \mu\text{l}$ con agua tratada con DEPC. Posteriormente, se incubó durante 5 minutos a 65°C , colocando después los tubos en hielo durante 1 minuto. Después de concentrar la muestra en el fondo del tubo dándole un pulso de centrifugación máxima de 10 s, se le añadió el tampón de la enzima (50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl_2), 10 mM de DTT y 2 U/ μl de RnaseOUT™ (Inhibidor de Rnasas, Invitrogen). Después de resuspender suavemente se incubó dicha reacción a 42°C durante 2 minutos. Pasado este tiempo se añadió la transcriptasa inversa (10 U/ μl), volviendo a resuspender para incubar

sucesivamente a 25°C durante 10 minutos, 42°C durante 50 minutos y 70°C durante 15 minutos para inhibir a la enzima.

3.12.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador PCR Express, de Hybaid. Se realizó a partir de los cDNAs obtenidos por transcripción inversa, así como de los plásmidos para confirmar la clonación de los distintos fragmentos. La mezcla de reacción fue la siguiente: 25-50 ng de cDNA o de plásmido, dNTPs 0,25 mM, tampón de la enzima, a la concentración indicada por el fabricante, con MgCl₂ 1,5 mM, 0,125 U/μl de enzima DNA polimerasa (Ampli Taq Gold®, Roche), y 0,25-0,5 μM de cada cebador, en un volumen final de 20 μl.

3.12.3. Diseño y síntesis de oligonucleótidos para la obtención del cDNA total de la GalLDH y de cDNA parciales

En el transcurso de esta Tesis se ha abordado la clonación de distintos cDNAs parciales de pimiento entre los que se incluyen *actina*, *catalasa*, *APX*, *Mn-SOD*, *Fe-SOD*, *CuZn-SOD*, *MDAR*, *GR*, *ICDH*, *G6PDH*, *6PGDH*, *GalDH* y el cDNA total de la *GalLDH*. Para el aislamiento de cada cDNA en pimiento se identificaron secuencias de plantas con cierto grado de identidad utilizando el programa BLAST del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Posteriormente se realizó un alineamiento entre dichas secuencias, utilizando el programa OMIGA 2 (Oxford Molecular), para localizar zonas conservadas interespecíficas, y diseñar oligonucleótidos degenerados a partir de esas zonas. Las secuencias alineadas fueron

generalmente las de tomate, tabaco y arroz. De las zonas conservadas encontradas se diseñaron los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 3.3.

Cebadores	Secuencias
F-GRI	5'-GGTGTGT(G/T)CC(C/T)AAAAAGAT-3'
R-GRI	5'-ATTTC(G/T)TCATCAAAACCTCT-3'
F-MDAR1	5'-AACGTGTGGTTGTTGGAGG-3'
R-MDAR1	5'-ACGGGAATAGAAGTATGGAAGG-3'
F-G6PDH1	5'-ACCATTA(C/T)TGGGAAAGGA-3'
R-G6PDH1	5'-TGTCCAAGAACAAC(A/C)TCTTC-3'
F-6PGDH1	5'- TGTAGTTATGCTCA(A/G)GGGATG-3'
R-6PGDH1	5'- CTCTCATATGT(A/G)TGAGC(C/T)CC-3'
F-ICDH1	5'-TGCCCTGATGGGAAGACTATTG-3'
R-ICDH1	5'-ATGCCCATACATAACCTCCTT-3'
F-GIDH1	5'-GG(C/T)ATCAACTTCTT(C/T)GACAC-3'
R-GIDH1	5'-GGAGAAGCA(C/T)T(G/T)ATCAC(A/T)CC-3'

Tabla 3.3. Oligonucleótidos diseñados para la obtención de cDNA parciales en pimiento.

En el caso de la *catalasa*, *APX*, *Mn-SOD*, *Fe-SOD* y *CuZn-SOD* se diseñaron oligonucleótidos específicos directamente ya que la secuencia de estos genes de pimiento estaba ya disponible en dicha base de datos.

Una vez realizadas las amplificaciones específicas de los fragmentos, el análisis por electroforesis de cada uno de los productos de la PCR mostró una única banda a partir del cDNA de fruto rojo de pimiento, la cual se purificó de los geles de agarosa, se clonó y se secuenció. Se obtuvieron las secuencias indicadas en el Anexo I, que en la mayoría de los casos compartían una alta homología con las correspondientes de algunas Solanaceas como *Nicotiana tabacum* y *Lycopersicum esculentum*. A partir de estas secuencias, se diseñaron parejas de cebadores específicos para pimiento, que fueron los indicados en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Cebadores específicos utilizados en la PCR semicuantitativa

Cebadores	Secuencias
F-CAT	5'-GATTTCCTCTCTTCCTCC-3'
R-CAT	5'-CGATGTTCTTATTCAATACC-3'
F-APX	5'-TGTGCTCCTCTTATGCTCC-3'
R-APX	5'-CTCAAAACCAGAACGCTCC-3'
F-MnSOD	5'-CATGCAGCTTCATCACCAGA-3'
R-MnSOD	5'-ATAACAAGGCGCTTCAGCTC-3'
F-FeSOD	5'-CATCACAGGACCTATGTCC-3'
R-FeSOD	5'-GGTGTTTTCACAACACTACAAGC-3'
F-CuZnSOD	5'-TGTTAGTGGCACCATCCTCT-3'
R-CuZnSOD	5'-GGCCGATAATACCACAAGCA-3'
F-GR2	5'-TTTGTTTATGGAGCTGCC-3'
R-GR2	5'-CAGTGGGAGTTGCTTTCTG-3'
F-MDAR2	5'-ATGGAGAGGGTGAAGTCCG-3'
R-MDAR2	5'-GCCTTGACAGCCTGCTCAG-3'
F-G6PDH2	5'-ATTTGTTGGTGTGCGTT-3'
R-G6PDH2	5'-CATTGATTGAAGGACCT-3'
F-6PGDH2	5'-TGTAGTTATGCTCAGGGGATG-3'
R-6PGDH2	5'-CTTCATATGTGTGAGCCCC-3'
F-ICDH2	5'-TTGTGCCAGAAGGATCAGAC-3'
R-ICDH2	5'-CAGATTCCAGCCTCCTCGTA-3'
F-ACT	5'-ACTCTTAATCAATCCCTCC-3'
R-ACT	5'-GCACTGTATGACTGACACC-3'

Con cada uno de estos cebadores se obtuvo una única banda a partir de cDNA de fruto rojo de pimiento, que también se purificó del gel de agarosa, se clonó y secuenció para su comprobación. Estos cebadores específicos fueron los utilizados para los posteriores análisis de expresión mediante PCR semicuantitativa.

Para el aislamiento del cDNA completo de la GalLDH de fruto de pimiento se diseñaron cebadores degenerados a partir del alineamiento de la secuencia de cDNA en *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum* y *Arabidopsis thaliana* (Fig. 3.6). Mediante PCR se amplificaron, clonaron y secuenciaron los distintos fragmentos. Los fragmentos obtenidos se superponían entre sí dando lugar a la secuencia incompleta (sin el extremo 5') de la GalLDH de pimiento. Para el estudio del extremo 5' se empleó la técnica RACE descrita en el apartado 3.13.

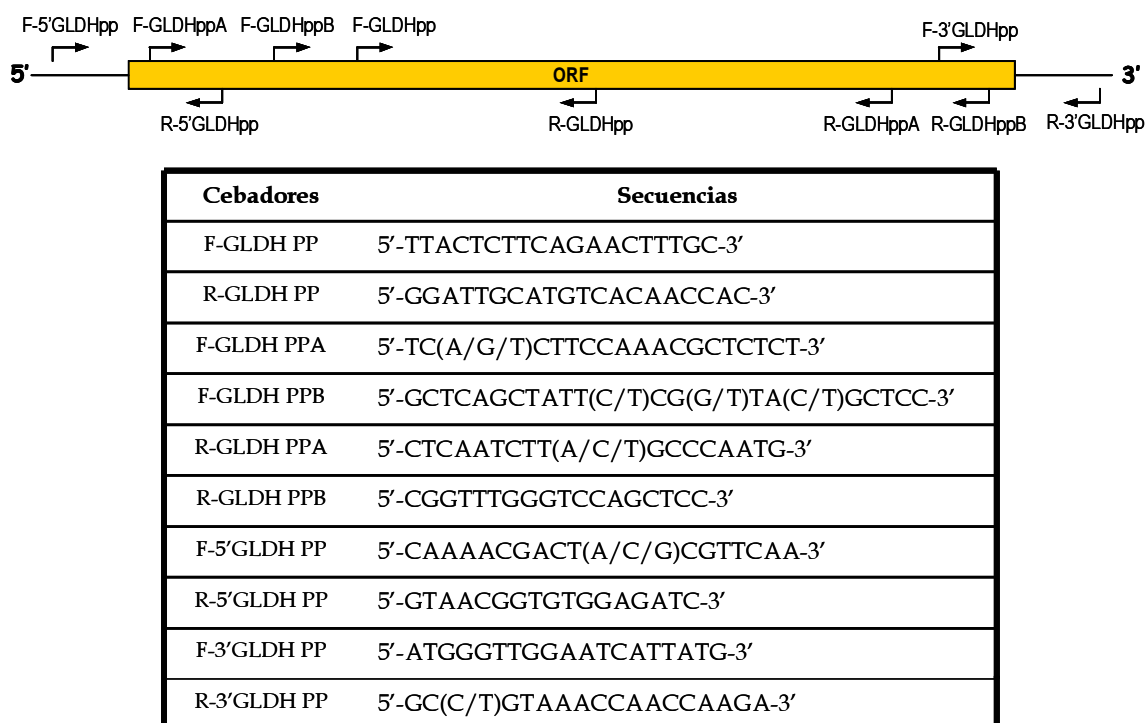


Fig. 3.6. Cebadores diseñados para el aislamiento del cDNA de GalLDH a partir del alineamiento entre las secuencias de cDNA de *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum* y *Arabidopsis thaliana*. ORF, Open Reading Fragment

3.12.4. Purificación de fragmentos de cDNA y ligación en vectores de clonación

Los fragmentos de cDNA se purificaron a partir de geles de agarosa. Para recuperar los fragmentos de cDNA de los geles se utilizó el método comercial "GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" de Amersham Biosciences, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las bandas del gel extraídas se solubilizaron a 60°C durante 10 minutos con un agente caotrópico que desnaturaliza las proteínas, disuelve la agarosa y provoca la unión del DNA a una matriz de fibra de vidrio. Esta mezcla se cargó en una columna

proporcionada por el kit y, tras una breve centrifugación se añadió una solución de lavado que contenía tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 1mM y etanol 80% (v/v) para arrastrar las proteínas y las sales contaminantes mediante otra breve centrifugación. El proceso se completaba con un último paso de elución del correspondiente DNA con agua.

Después de la purificación de los fragmentos de DNA, éstos se clonaron en el vector pGEM[®]-T Easy, de Promega, usando el siguiente protocolo: 50 ng del plásmido, 3 U de la enzima T4 DNA ligasa y la cantidad que indica el protocolo de la enzima, en un volumen final de 10 µl de mezcla de reacción, e incubándose a temperatura ambiente durante 1 h. La cantidad de fragmento de DNA usado para la ligación se determinó según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{ng de vector} \cdot \text{tamaño del inserto (Kb)}}{\text{tamaño del vector (Kb)}} \times \text{razón molar inserto : vector} = \text{ng inserto}$$

utilizando una proporción molar inserto:vector comprendida entre 3:1 y 1:3.

3.12.5. Preparación de células competentes de *Escherichia coli*

El método utilizado fue el descrito por Hanahan (1983). Se cultivaron bacterias *E. coli* DH5α en 5 ml de medio LB [Luria-Bernati: Triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v), pH 7,0] a 37°C durante 12-15 h. Se adicionaron 4 ml de este cultivo a 100 ml de medio LB suplementado con MgSO₄ 10 mM. Se incubó a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 0,4-0,6 (fase logarítmica), y entonces se detuvo el crecimiento del cultivo colocándolo en hielo durante 15 min. Las bacterias se recuperaron por centrifugación a 4.300 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en 32 ml de una solución compuesta por RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, CaCl₂ 10,2 mM, acetato potásico 30 mM y glicerol 12% (v/v), pH 5,8, preenfriada a 4°C, incubándose en hielo durante 15 min. Se volvió a centrifugar a 4.300 g durante 10 min a 4°C, y el precipitado se resuspendió en otra solución compuesta por CAPS 100 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM y glicerol 12% (v/v), pH 6,8, preenfriada también a 4°C. Se hicieron alícuotas de las bacterias y se guardaron a -80°C.

3.12.6. Transformación de bacterias competentes

Se usó el método descrito por Lucotte & Baneyx (1993). Las bacterias *E. coli* DH5α, mantenidas a -80°C, se descongelaron en hielo, tras lo cual se añadieron 50-100 ng de los plásmidos de interés, y se mantuvieron durante 30 min en hielo. Posteriormente, se calentaron a 42°C durante 90 s, colocándose de nuevo en hielo durante 5 min. A esta mezcla se le adicionaron 1 ml de medio LB (dil. 1:5) y se incubó a 37°C durante 1 h, con agitación. La suspensión de bacterias se sembró en placas de Petri conteniendo un medio comercial (S-GAL[™]/LB Agar Blend, Sigma) compuesto por LB (dil. 1:5), agar 1,2% (p/v),

S-GalTM (3,4-ciclohexenoesculetina- β -D-galactopiranosido) 0,03% (p/v), citrato de amonio férrico 0,05% (p/v) e IPTG (1-isopropil- β -D-1-tiogalctopiranosido) 0,003% (p/v), suplementando con 50 μ g/ml de ampicilina, y se incubaron durante toda la noche a 37°C.

3.12.7. Aislamiento de plásmidos recombinantes

Se seleccionaron las colonias individuales crecidas en las placas a partir de las cuales se iniciaron cultivos en 3 ml de LB (dil. 1:5) con ampicilina (100 μ g/ml), que se incubaron a 37°C en un agitador orbital a 190 rpm. Cuando los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ de 0,6 (12-16 h), se centrifugaron a 10.000 g durante 5 min para precipitar las bacterias, y se procedió a la extracción del DNA plasmídico utilizando el método comercial “Wizard Plus SV Miniprep” de Promega (Fig. 3.7).

Todas las operaciones fueron realizadas a temperatura ambiente. Las bacterias se resuspendieron en 250 μ l de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM, Rnasa A 100 μ g/ml. Después, se les añadió 250 μ l de solución de lisis [NaOH 0,2 M y SDS 1% (p/v)] y se incubaron durante 1-5 min. Seguidamente, se le añadió 10 μ l de una solución de proteasas, incubándose durante 5 min, tras los cuales, se le añadió 350 μ l de solución de neutralización (acetato potásico 0,759 M, guanidina-HCl 4,09 M y ácido acético glacial 2,12 M, pH 4,2). Esta mezcla se centrifugó a 14.000 g durante 10 min, y el sobrenadante se pasó por la columna especificada en el método comercial, de forma que el DNA quedó fijado a la resina de la misma. Se centrifugó a 14.000 g durante 1 min, y posteriormente se le añadieron 750 μ l de una solución de lavado [acetato potásico 60 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, etanol 60% (v/v)], volviéndose de nuevo a centrifugar a 14.000 g durante 1 min. Se volvió a lavar de nuevo la columna con 250 μ l de solución de lavado, y se centrifugó durante 2 min en las mismas condiciones anteriores. Finalmente, el DNA se eluyó de la columna añadiendo 100 μ l de agua a la misma y centrifugando a 14.000 g durante 1 min.

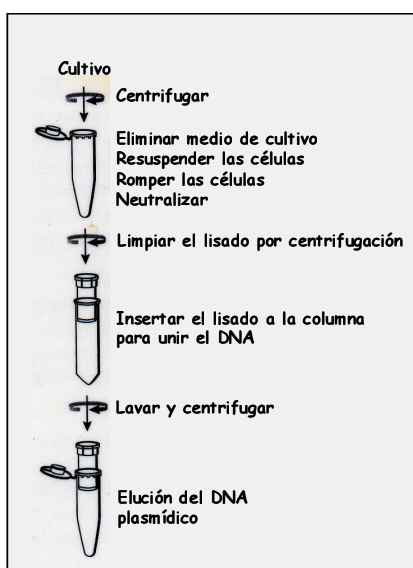


Fig. 3.7. Aislamiento de DNA plasmídico a partir de cultivos bacterianos (“Wizard Plus SV Miniprep” de Promega)

3.13. OBTENCIÓN DEL EXTREMO 5' DE LA *GalLDH* MEDIANTE RACE (*Rapid Amplification C End*)

Para abordar el estudio del extremo 5' del gen de la *GalLDH* de fruto de pimiento se ha utilizado el kit "BD SMART™ RACE cDNA Amplification" de BD Bioscience. Este protocolo se centra en la utilización combinada del oligonucleótido BD SMART II™ A y la transcriptasa inversa (RT) PowerScript™, la cual presenta una actividad transferasa terminal que añade de 3-5 residuos de dC al extremo 3' de la primera copia de cDNA (Fig. 3.8). A su vez la zona terminal del Oligo BD SMART contiene residuos de dG que se alinean específicamente con los de dC de la primera hebra de cDNA copiada por la RT a partir de un oligo-dT, dando lugar así a una doble hebra de cDNA, copia del RNA original que además contiene una secuencia BD SMART adicional. Esta secuencia BD SMART adicional es complementaria al oligonucleótido UPM (Universal Primer A Mix) que también es proporcionado por dicho kit.

Se aisló el RNA de fruto rojo de la variedad Vergasa mediante el método descrito en el apartado 3.11.1. Primero se realizó la RT-RACE (Fig. 3.8) para obtener el cDNA con el fragmento 5' BD SMART, descrito anteriormente. Siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial, y para un volumen final de reacción de 10 µl, se añadieron 0,7 µg de RNA, 1,2 µM del cebador 5'-CDS (poliT modificado), 1,2 µM del oligonucleótido BD SMART II™A, y se completó con agua tratada con DEPC. Tras resuspender adecuadamente, incubamos la mezcla a 70°C durante 2 minutos. Posteriormente, se incubó a 4°C durante 2 min y se completó la mezcla de reacción (10 µl) con tampón "First Strand", DTT 2mM, dNTPs 1mM (cada uno) y 1 µl de "BD PowerScript™ Reverse Transcriptase". La mezcla se incubó durante 90 min a 42°C en un termociclador PCR Express, de Hybaid. Finalmente, se le añadió 100 µl de tampón Tricina-EDTA al producto de RT-RACE y se incubó a 72°C durante 7 min.

Para la posterior clonación de la copia de cDNA del extremo 5' del gen de la *GalLDH* se llevó a cabo la PCR-RACE en un volumen final de reacción de 50 µl que contenía: tampón para PCR "BD Advantage 2" y "BD Advantage 2 Polymerase Mix" a la concentración indicada por el fabricante, dNTP 0,2 mM (cada uno), 2,5 µl del producto de RT-RACE convenientemente diluido, el oligonucleótido UPM y 0,4 µM del cebador específico del gen (GSP1) diseñado en forma de antisentido (Q-R-GLDHpp1). Después el producto de dicha PCR se sometió a electroforesis en agarosa, dando lugar a una única banda que se purificó del gel, se clonó y secuenció.

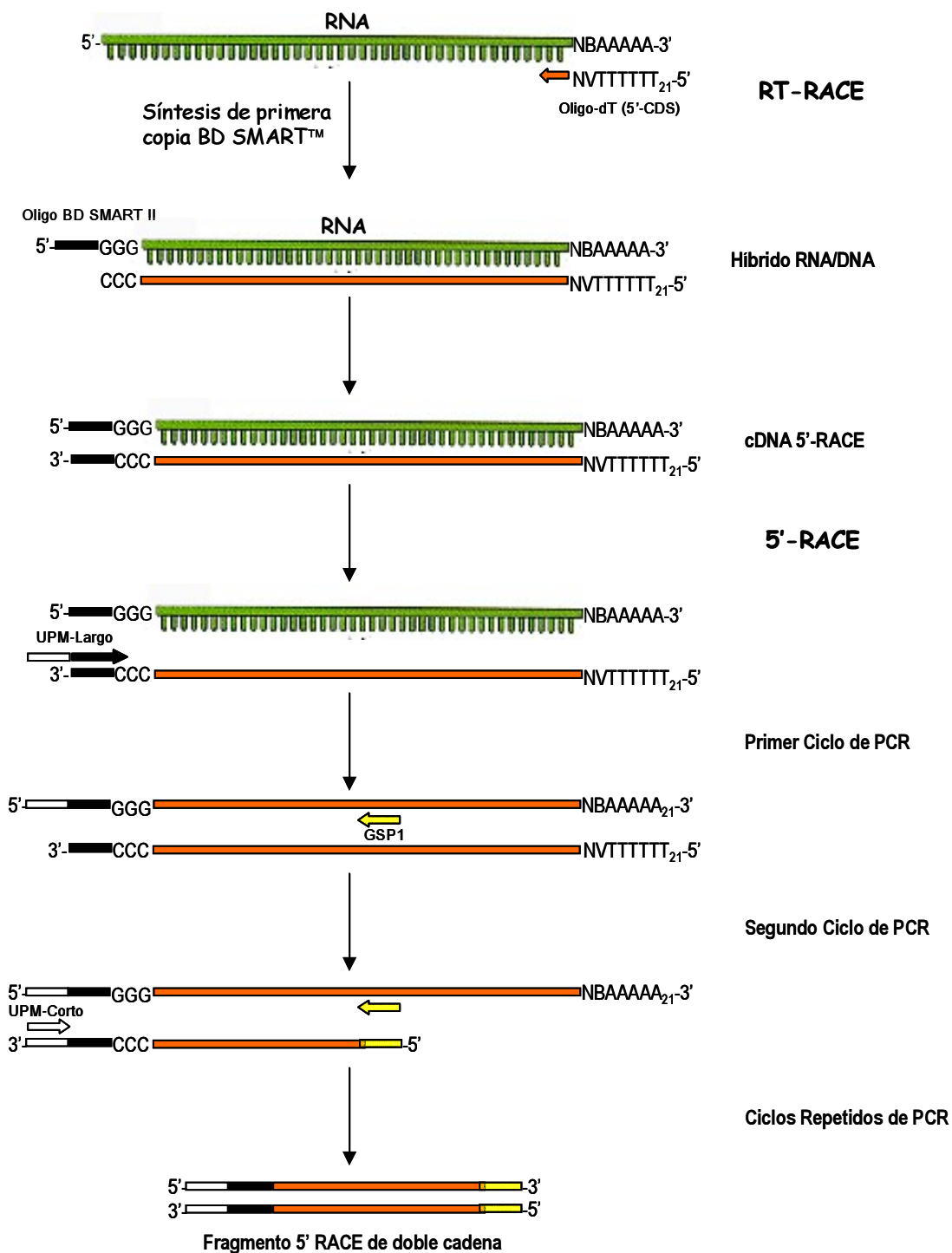


Fig. 3.8. RT-PCR para la obtención de copias de cDNA del extremo 5' de la GalLDH a partir del Kit "BD SMART™ RACE cDNA Amplification" de BD Biosciences.

3.14. PCR SEMICUANTITATIVA

Para el estudio de la expresión de los genes de las enzimas *catalasa*, *APX*, *GR*, *MDAR*, *G6PDH*, *6PGDH*, *NADP-ICDH*, *Fe-SOD*, *Mn-SOD*, *CuZn-SOD* y *GalLDH* de frutos de distintas variedades de pimiento, se utilizó la técnica de PCR semicuantitativa (Marone et al., 2001). Esta técnica permite comparar la cantidad de un mRNA determinado entre muestras distintas, ya que si la reacción de PCR se detiene en aquella zona en la que la cantidad de DNA amplificado aún se encuentra en zona exponencial, la intensidad de las bandas amplificadas es proporcional a la cantidad inicial del cDNA en la muestra. Además es imprescindible el uso de un gen control (en nuestro caso hemos utilizado la actina), cuya expresión sea constitutiva y, por tanto, no varíe entre las distintas situaciones. Ésto permite normalizar la intensidad de las bandas con respecto a este control interno, y minimizar de esta forma el error experimental.

Una vez obtenidos los cDNA de los distintos frutos, se midió su concentración y se hicieron diluciones de los mismos de forma que en todos ellos se dispusiera de la misma concentración inicial de cDNA total. Se puso a punto el número de ciclos en los cuales la cantidad de DNA amplificado por la polimerasa se encontrase en fase exponencial, que fueron los que se indican en la Fig. 1 del Anexo II. Para asegurarnos que todos los tubos de reacción contenían la misma cantidad de reactivos, y así partir de las mismas condiciones en cada uno de ellos, el procedimiento experimental fue el siguiente: a) se realizó una mezcla que contenía todos los reactivos menos los cDNA y los cebadores. De esta forma nos aseguramos de que en todos los tubos se partía de la misma cantidad de enzima; b) seguidamente, esta mezcla se repartió en los volúmenes necesarios para dos reacciones de PCR, y a cada tubo se le añadieron 60 ng del correspondiente cDNA, distribuyéndose este volumen, a su vez, en otros dos tubos. Así se aseguraba que en cada tubo tuviésemos la misma cantidad de cDNA; y c) una vez repartidos, a cada tubo se le añadieron sus cebadores correspondientes, bien los del gen control (actina) o bien los del gen problema.

Las reacciones se llevaron a cabo de la siguiente forma: 30 ng de cDNA, dNTPs 0,25 mM, tampón de la enzima con MgCl₂ 2,5 mM, 0,5 U de enzima polimerasa (HotMaster Taq™ DNA Polymerase, Eppendorf) y de 0,5 μM de cada cebador, en un volumen final de reacción de 20 μl. El programa de PCR utilizado se detalla en la Tabla 3.5. Los tubos sometidos a un número menor de ciclos se retiraron durante la etapa número tres del programa de PCR. En aquellos casos donde el número de ciclos era idéntico en ambas reacciones se omitió la etapa 3 de dicho programa y se sacaron todos los tubos al mismo tiempo, al finalizar la reacción. Los fragmentos obtenidos de cada PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0,8-1% (p/v) en tampón TBE.

Los cebadores usados en este caso son los mismos que se indican en la Tabla 3.4.

1)	95°C, 10 min	} x 28
2)	95°C, 30 seg	
	55°C, 30 seg	
	72°C, 45 seg	
3)	4°C, 2 min	} x 4
4)	94°C, 20 seg	
	55°C, 20 seg	
	72°C, 45 seg	
5)	72°C, 10 min	

Tabla.3.5. Programa utilizado en el análisis por PCR semicuantitativa de la expresión de algunos genes de enzimas de frutos de pimiento de distintas variedades y estados de maduración. El número de ciclos y la temperatura de hibridación es variable según la pareja de cebadores utilizados, tal y como se indica en la Fig. 1 del Anexo II.

3.15. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

La transcripción inversa, combinada con la técnica de PCR es el método más sensible para la detección de un mRNA específico (Wang y Brown, 1999). La técnica de “PCR cuantitativa a tiempo real” (QRT-PCR) es un poderoso avance dentro de la metodología básica de PCR. Con ella, mediante la utilización de estrategias apropiadas para la detección de fluorescencia, es posible cuantificar la cantidad inicial de ácidos nucleicos en una muestra. Esta cuantificación se consigue a partir del valor del incremento de fluorescencia durante la fase exponencial de la PCR, obtenido de medidas realizadas en cada ciclo de amplificación.

La cuantificación basada en medidas a tiempo final son inexactas debido a que los valores, a dicho tiempo, pueden verse fuertemente influenciados por la limitación de los reactivos, pequeñas diferencias en los componentes de la reacción o por las condiciones de los ciclos. En cambio, el número de copias inicial de ácidos nucleicos puede ser cuantificado durante la PCR a tiempo real basándose en el ciclo umbral (*threshold cycle*, Ct), que se define como el número de ciclos al cual la fluorescencia se incrementa de forma estadísticamente significativa sobre el ruido de fondo. Este valor de Ct es inversamente significativo sobre el ruido de fondo, y es inversamente proporcional al logaritmo del número de copias iniciales. Por tanto, a menor valor de Ct, mayor es la cantidad de moléculas iniciales. Las medidas de fluorescencia se realizan a lo largo de la fase exponencial de la amplificación, cuando la eficiencia de la PCR no se ha visto afectada aún por la limitación de los reactivos.

En nuestro caso, el análisis de los niveles de expresión del gen que codifica para la enzima GalLDH se realizó mediante la técnica de PCR a tiempo real.

Se aisló el RNA de frutos maduros (rojos o amarillos) e inmaduros (verdes), hojas, flores y tallos de plantas de pimiento de las variedades Vergasa y Biela. El RNA fue

convertido en cDNA mediante transcripción inversa como se indica en el apartado 3.12.1. y cuantificado mediante PCR a tiempo real, utilizando cebadores específicos para el gen de control interno *actina* y para el gen problema *GaLLDH*.

3.15.1. Cebadores usados

Se diseñaron parejas de cebadores para amplificar secuencias específicas (de 100-200 pb) de los genes de pimiento que codifican para las enzimas GaLLDH y actina, siendo este último el patrón interno (constitutivo) de cara a cuantificar la expresión de los genes investigados (Tabla 3.6.).

Tabla 3.6. Cebadores utilizados en la PCR cuantitativa a tiempo real

Cebadores	Secuencias
Q-F-GLDH1P	5'-GTTACTGTACAAGCTGGGATTCGGGTTC-3'
Q-R-GLDH1P	5'-GGTAACCAGTTTCATGCTTATGACTTGCTC-3'
Q-F-Act1PP	5'-CAAACAGGTTTTAAAAGATGGCAGATGAAG-3'
Q-R-Act1PP	5'-TCCTTTTGACCCATCCCTACCATAACAC-3'

3.15.2. Optimización de la PCR a tiempo real

El protocolo de la PCR fue optimizado para que todas las parejas de cebadores pudieran ser ensayadas en paralelo a la misma temperatura de hibridación. De este modo se pretendía evaluar al mismo tiempo la abundancia relativa de cada transcrito en las diferentes muestras. Tras realizar distintas pruebas, con diferentes temperaturas de hibridación (48-68°C) y realizando la PCR en tres pasos (hibridación y polimerización a distintas temperaturas), se encontró que el protocolo óptimo para realizar la PCR consistía en una temperatura de hibridación de 67,2°C y una de polimerización de 72°C.

A la temperatura seleccionada (67,2°C), se determinó empíricamente la eficiencia de la amplificación (E), para cada pareja de cebadores, de acuerdo con la ecuación que se indica en la Fig. 3.9. (Liu y Saint, 2002), donde $R_{n,A}$ y $R_{n,B}$ corresponden a la unidad de fluorescencia relativa (RFU) a dos umbrales A y B arbitrarios, fijados en la parte exponencial de una curva de amplificación determinada, y Ct_A y Ct_B corresponden a los ciclos umbrales arbitrarios A y B, respectivamente.

$$E = \left(\frac{R_{n,A}}{R_{n,B}} \right)^{-1} - 1 \quad [1]$$

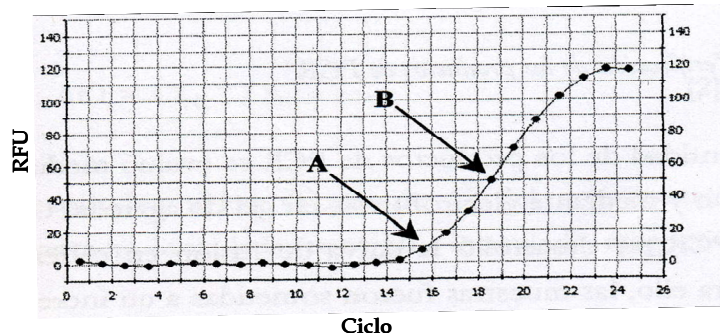


Fig. 3.9. Cálculo de la eficiencia de la amplificación (E) para la curva de PCR. La unidad de fluorescencia relativa (RFU) es determinada a dos umbrales arbitrarios (A y B) dentro de la fase exponencial de la curva de amplificación. E se calculó de acuerdo con la ecuación [1].

3.15.3. Protocolo

La PCR a tiempo real se realizó en placas de 96 pocillos en un termociclador iCycler (Bio-Rad). La mezcla de reacción, en un volumen final de 25 μ l, consistió en tampón de reacción [Tris-HCl 20 mM, pH 8,4 y KCl 50 mM], $MgCl_2$ 1,5 mM, cebadores 200 nM (cada uno), 1U de DNA polimerasa (Platinum® Taq DNA Polimerase, Invitrogen), dNTPs (1:1:1:1) 0,2 mM (cada uno), 2,5 μ l de SYBR Green I (Molecular Probes), diluido 10.000 veces (18 μ l de DMSO, 1 μ l de fluoresceína, 1 μ l de SyBrGreen en 10 ml de agua), y 1 μ l de cDNA. La mezcla de reacción se homogeneizó convenientemente, y se transfirieron alícuotas de 23 μ l a cada pocillo de la placa. Para cada muestra individual, y para cada pareja de cebadores, se prepararon 6 repeticiones de la reacción de la PCR. Todo el proceso se llevó a cabo a 4°C. También se incluyó un control negativo de la PCR (sin cDNA). El programa de PCR consistió en 1 ciclo de 3 minutos a 95°C y de 40 ciclos de 30 s de desnaturalización a 95°C y 30 s de hibridación a 67,2°C, y 40 s de extensión a 72°C, siendo esta última etapa de 72°C en la que se midió la fluorescencia. Además, para estudiar la curva de Melt, se añadió un ciclo de 1 min a 95°C, otro de 1 min a 70°C y 60 ciclos de 10 s a 70°C,.

3.15.4. Análisis de los datos

Los valores de Ct para los distintos genes se obtuvieron utilizando el programa iCycler IQ versión 3.0a (Bio-Rad).

a) Análisis de la expresión de los genes constitutivos mediante el método $2^{-\Delta Ct}$

Con el objeto de determinar el efecto del tratamiento experimental en la expresión del gen control interno seleccionado (actina), los valores de Ct, fueron analizados mediante el método de $2^{-\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Dicho método se puede aplicar para verificar que la expresión del gen constitutivo no se ve afectada por el tratamiento experimental, siempre que la eficiencia de la reacción de amplificación (E) esté próxima a 1. En este caso,

$$\Delta Ct = Ct_{PI} - Ct_{PM}$$

donde Ct_{PI} y Ct_{PM} corresponden a los valores de Ct del gen control interno en las muestras de pimiento verde (inmaduro) y pimiento rojo o amarillo (maduro), respectivamente.

b) Análisis de la expresión génica relativa mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$

El análisis de la expresión relativa del gen problema *GalLDH* se realizó mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Los datos fueron representados como el cambio producido en la expresión génica en los frutos maduros (rojos o amarillos), normalizado frente a un gen control interno (constitutivo) y relativo a los de frutos verdes. Los valores de expresión relativa fueron calculados de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen constitutivo})_{PI} - (Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen constitutivo})_{PM}$$

Esta fórmula se puede aplicar siempre que las eficiencias de la amplificación del gen problema y del gen constitutivo sean aproximadamente iguales entre sí y próximas a 1.

3.16. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

3.16.1. Ultraestructura de frutos de pimiento

Se realizaron cortes de frutos de pimiento de aproximadamente 1 mm³, que se fijaron en una solución de glutaraldehído al 3% (v/v) y *p*-formaldehído al 4% (p/v) preparados en tampón fosfato potásico 100 mM, pH 7,2, durante 3 h a temperatura ambiente y en agitación. Los cortes se lavaron 3 veces en el tampón fosfato potásico. A continuación los cortes se deshidrataron por incubaciones sucesivas con etanol (30, 50, 70, y 100%; v/v), en intervalos de 20 min. Las muestras se mantuvieron a -20°C a partir de la etapa del 70% de etanol. Después de la deshidratación, los cortes se infiltraron gradualmente en

resina LR White (LRW) preparada en series de etanol (25-100%; v/v) en intervalos de 4 h e infiltración final de 12 h. La polimerización se realizó a -20°C con luz ultravioleta. Previo a la deshidratación con etanol las muestras se incubaron con ferricianuro al 1% (p/v) y OsO₄ al 1% (p/v) durante 2,5 h lavándose posteriormente 3 veces con agua.

3.16.2. Peroxisomas purificados

Para comprobar el grado de pureza de la fracción de peroxisomas purificada mediante centrifugación en gradientes de sacarosa se llevó a cabo una observación al microscopio electrónico de los orgánulos purificados.

Se utilizó básicamente el método de Sautter et al. (1981). Los orgánulos se extrajeron del gradiente mediante punción y succión suave con una jeringa, tal como se indicó en el apartado 3.5. La fijación de las fracciones del gradiente que contenían los orgánulos se realizó en un baño de hielo durante 30 min con una solución (relación 1:1) compuesta de formaldehído al 2% (v/v), glutaraldehído al 2,5% (v/v) y sacarosa al 54,7% (p/v), en tampón fosfato potásico 50mM, pH 7,6.

Tras la fijación, la concentración de sacarosa se redujo a la mitad por dilución (1:1) de la mezcla anterior en el mismo medio sin sacarosa y se centrifugó a 12.000 g en un rotor SS-34 (Sorvall) durante 15 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 1 ml de tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,6 con glutaraldehído al 2,5% (v/v) y se incubó de nuevo en baño con hielo durante 30 min. Dicha suspensión se centrifugó a 20.000 g en un rotor SS-34 durante 12 min, y el precipitado se lavó de nuevo con el mismo tampón, volviéndose a centrifugar en las mismas condiciones. El precipitado final se incluyó en agar al 2% (p/v) y, una vez fraccionado, se lavó con tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,6, durante 30 min (3 x 10 min), seguido de una posfijación en OsO₄ al 1% (p/v) en cacodilato-Na 0,15 M, pH 7,3 durante 1 hora a 0-4°C.

Después de 2 horas de lavado (4 x 30 min), las muestras se deshidrataron en series sucesivas de etanol (30- 100%, v/v; 20 min en cada etapa), y se incluyeron en resina. La inclusión se realizó en Epon, en cápsulas de gelatina, y la polimerización se efectuó en estufa a 60°C durante 24 h. Las secciones se cortaron con un ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut E y se tiñeron con citrato de plomo y acetato de uranilo para su posterior observación en un microscopio electrónico Zeiss EM 10C.

RESULTADOS

4.1. EFECTO DEL 2,4-D EN EL METABOLISMO OXIDATIVO DE HOJAS DE PIMIENTO

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en conexión con otro previo en el que se emplearon concentraciones altas de cadmio (León et al., 2002), con el fin de investigar el metabolismo de especies de oxígeno reactivo (ROS) en condiciones de estrés abiótico en plantas de pimiento. Ambos trabajos formaban parte del mismo proyecto de investigación.

Se estudió el efecto del 2,4-D sobre enzimas relacionadas con el metabolismo oxidativo en hojas de dos variedades de pimiento. Las plantas de pimiento de las variedades Abdera y Herminio se cultivaron en ausencia (control) y en presencia de 2,4-D y las hojas se analizaron a los 1, 7 y 14 días. Dichas plantas fueron cultivadas en medios hidropónicos y su tratamiento se llevó a cabo por vía foliar con una concentración 22,6 mM de 2,4-D. Estas condiciones se establecieron en base a estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio en los que se trataron plantas de guisante con distintas concentraciones de 2,4-D y distintos periodos de incubación tras el tratamiento.

4.1.1. Crecimiento y concentración de proteínas

Las plantas de pimiento de ambas variedades sometidas a tratamiento con 2,4-D por vía foliar presentaban un desarrollo vegetativo menor que las plantas control y el número de hojas se redujo drásticamente después de dos semanas de tratamiento (14 días). Además las hojas mostraban irregularidades en su estructura como pequeños abombamientos en el limbo y rizamientos en el borde de las hojas. Éstas presentaban clorosis difusa y aparecían frecuentemente enrolladas sobre sí mismas. El aspecto general de los tallos de las plantas tratadas fue de tallos retorcidos, huecos y quebradizos (Fig. 4.1). No se apreciaron grandes diferencias visuales entre las dos variedades como consecuencia del tratamiento.



Fig. 4.1. Efecto del 2,4-D en dos variedades de pimiento cultivadas en invernadero. Las plantas de las variedades Abdera y Herminio se cultivaron en ausencia (control) y en presencia de 2,4-D 22,6 mM.

Se llevó a cabo el análisis de la concentración de proteínas en los extractos crudos de hojas de plantas de pimiento controles y tratadas con 2,4-D después de 1, 7 y 14 días del tratamiento, de las variedades Abdera y Herminio (Fig. 4.2A). En la variedad Abdera se observó que la concentración proteica disminuía significativamente ($p < 0,005$) en plantas tratadas respecto a plantas controles después de los 14 días del tratamiento. La concentración de proteínas no variaba significativamente entre las plantas controles de 1, 7 y 14 días. Por el contrario, en las plantas tratadas de dicha variedad el contenido proteico disminuía significativamente ($p < 0,005$) el día 14 del tratamiento respecto a los días 1 y 7. En la variedad Herminio, la concentración de proteínas era significativamente mayor ($p < 0,01$) en las plantas control que en las plantas tratadas durante 7 días. Por otro lado, las plantas tratadas experimentaban una disminución ($p < 0,0025$) del contenido proteico a partir del séptimo día del tratamiento.

También se analizó el perfil cualitativo de proteínas de dichas muestras mediante la técnica de electroforesis en geles de poliácridamida en condiciones desnaturalizantes (EGPA-SDS) y tinción con plata (Fig. 4.2B). En la variedad Abdera, se incrementó la intensidad de un péptido de unos 130 kDa en plantas tratadas después de 14 días respecto a las plantas controles. En la variedad Herminio, se detectó un aumento en la concentración de dos péptidos de 44 y 60 kDa tras el tratamiento con 2,4-D.

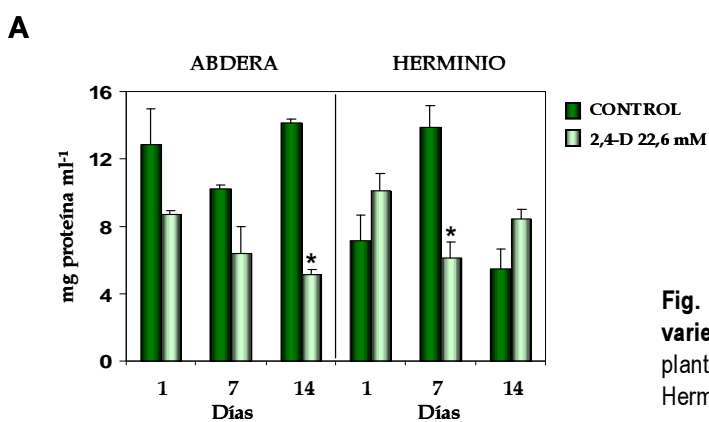
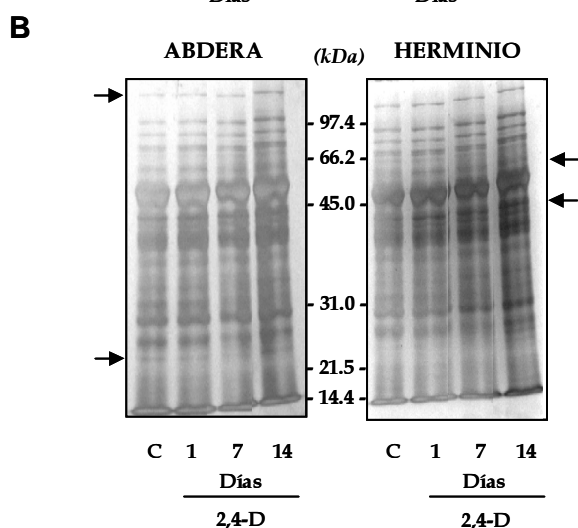


Fig. 4.2. Contenido proteico en hojas de dos variedades de pimiento tratadas con 2,4-D.

Las plantas de pimiento de las variedades Abdera y Herminio se cultivaron en ausencia (control, C) y en presencia de 2,4-D 22,6 mM durante 1, 7 y 14 días. A, concentración de proteínas. Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estándar de la media (ESM). El asterisco indica los tratamientos que son significativamente diferentes con respecto a las plantas control para el día de tratamiento indicado. B, patrón de polipéptidos obtenido por EGPA-SDS en geles al 12% de acrilamida. En el análisis de polipéptidos (30 μ g/pocillo) se comparó el efecto del 2,4-D a los tres tiempos establecidos frente al patrón de plantas control (C) al inicio del experimento. En esta figura se indican igualmente los marcadores de masa molecular (kDa). Las flechas señalan las bandas proteicas con variaciones en la intensidad en las muestras analizadas.



4.1.2. Enzimas de la fotorrespiración

Con el fin de estudiar el posible efecto del 2,4-D sobre el metabolismo peroxisomal de las hojas, se llevó a cabo el estudio de la actividad de las enzimas glicolato oxidasa (GOX) e hidroxipiruvato reductasa (HPR) (Fig. 4.3). En la variedad Abdera, la actividad GOX era significativamente mayor ($p < 0,05$) en plantas tratadas de 1 y 14 días de tratamiento respecto a las controles. En general, ni las plantas controles ni las tratadas presentaban variaciones significativas entre sí en la actividad GOX a lo largo del tiempo. En la variedad Herminio, la actividad GOX descendió significativamente ($p < 0,05$) en las plantas tratadas con 2,4-D a partir del séptimo día del tratamiento.

En la variedad Abdera, la actividad HPR era superior ($p < 0,025$) en plantas tratadas con 2,4-D que en plantas controles al primer día de tratamiento. A su vez, la actividad HPR no experimentó variaciones significativas en las plantas controles y tratadas con 2,4-D a lo largo del tiempo de tratamiento. En la variedad Herminio, la actividad HPR era mayor ($p < 0,05$) en plantas controles respecto a las tratadas sobre todo tras el tratamiento.

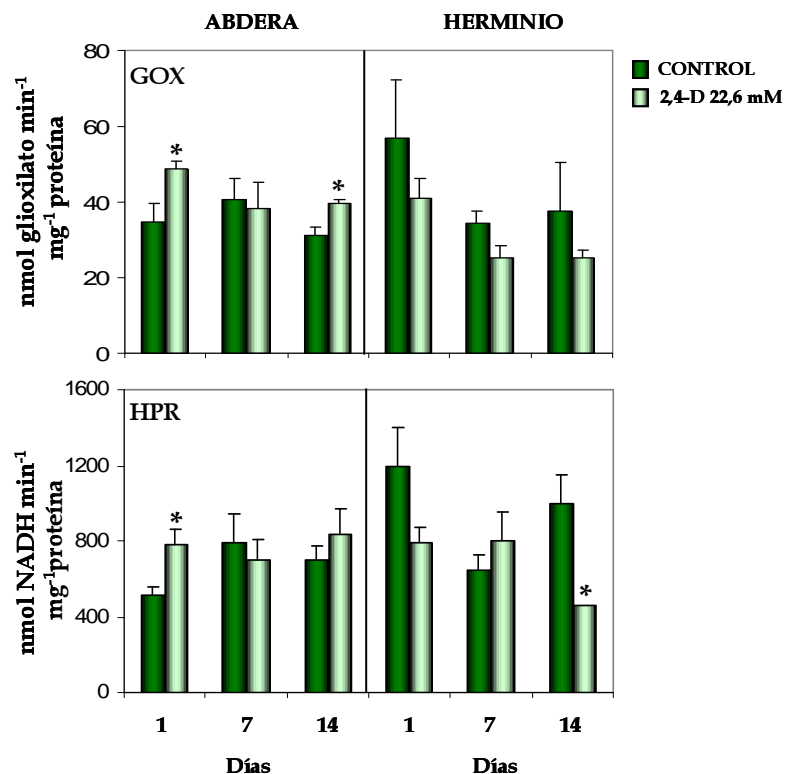


Fig. 4.3. Efecto del 2,4-D sobre la actividad glicolato oxidasa (GOX) e hidroxipiruvato reductasa (HPR) de hojas de dos variedades de pimiento. Las plantas de pimiento de las variedades Abdera y Herminio se cultivaron en ausencia (control) y en presencia de 2,4-D 22,6 mM durante 1, 7 y 14 días. Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estándar de la media (ESM). El asterisco indica los tratamientos que son significativamente diferentes con respecto a las plantas control para el día de tratamiento indicado.

4.1.3. Enzimas relacionadas con el metabolismo oxidativo

Para estudiar el metabolismo oxidativo en condiciones de estrés abiótico provocado por 2,4-D en plantas de pimiento, se llevó a cabo el análisis de la actividad de las enzimas: catalasa, guayacol peroxidasa, xantina oxidasa, superóxido dismutasa, glutatión reductasa y glutatión S-transferasa. Para ello se utilizaron extractos crudos de hojas de las dos variedades de pimiento. Las plantas de pimiento de las variedades Abdera y Herminio se cultivaron en ausencia (control) y en presencia de 2,4-D 22,6 mM durante 1, 7 y 14 días.

4.1.3.1. Catalasa (CAT)

En la variedad Abdera, la actividad catalasa (CAT) (Fig. 4.4) no experimentó cambios significativos por el tratamiento con 2,4-D tras los 14 días del experimento, aunque sí se observó una disminución de dicha actividad en ambos tipos de plantas después de la primera semana de cultivo. En la variedad Herminio, no se observaron cambios significativos de actividad CAT entre las plantas de pimiento control y tratadas con 2,4-D, en ninguno de los tiempos analizados.

4.1.3.2. Guayacol peroxidasa (GPX)

Se midió la actividad guayacol peroxidasa (GPX) (Fig. 4.4) en las mismas muestras y se observó que en la variedad Abdera dicha actividad era mayor ($p < 0,005$) en plantas tratadas con 2,4-D que en las plantas controles de 1 y 14 días de tratamiento. Además, en las plantas tratadas con 2,4-D de la variedad Abdera se detectó un aumento ($p < 0,025$) de la actividad GPX en el día 14 del tratamiento respecto a los días 1 y 7. En la variedad Herminio, la actividad GPX se incrementaba significativamente ($p < 0,05$) en las plantas controles a partir del día 14 del tratamiento con 2,4-D respecto a las de los días 1 y 7. Por otro lado, las plantas de la variedad Herminio tratadas con 2,4-D experimentaron un aumento ($p < 0,05$) de la actividad GPX durante los días 7 y 14 del tratamiento respecto a las plantas de 1 día. La comparación entre plantas control y tratadas arrojaba comportamientos dispares: el 2,4-D provocaba una mayor actividad GPX a la primera semana mientras que a los 14 días el comportamiento era opuesto, con actividades menores que en plantas control.

4.1.3.3. Xantina oxidasa (XOD)

En Abdera, la actividad xantina oxidasa (XOD) (Fig. 4.4) no mostró variaciones significativas entre las plantas controles y tratadas con 2,4-D. En la variedad Herminio, la actividad XOD fue menor ($p < 0,05$) en las plantas de pimiento tratadas con 2,4-D que en las controles tras 1 día de tratamiento y fue mayor ($p < 0,025$) en las plantas tratadas respecto a las controles en el séptimo día del tratamiento con dicho herbicida. Entre las plantas controles de la variedad Herminio, se observó un descenso de la actividad XOD a partir del séptimo día.

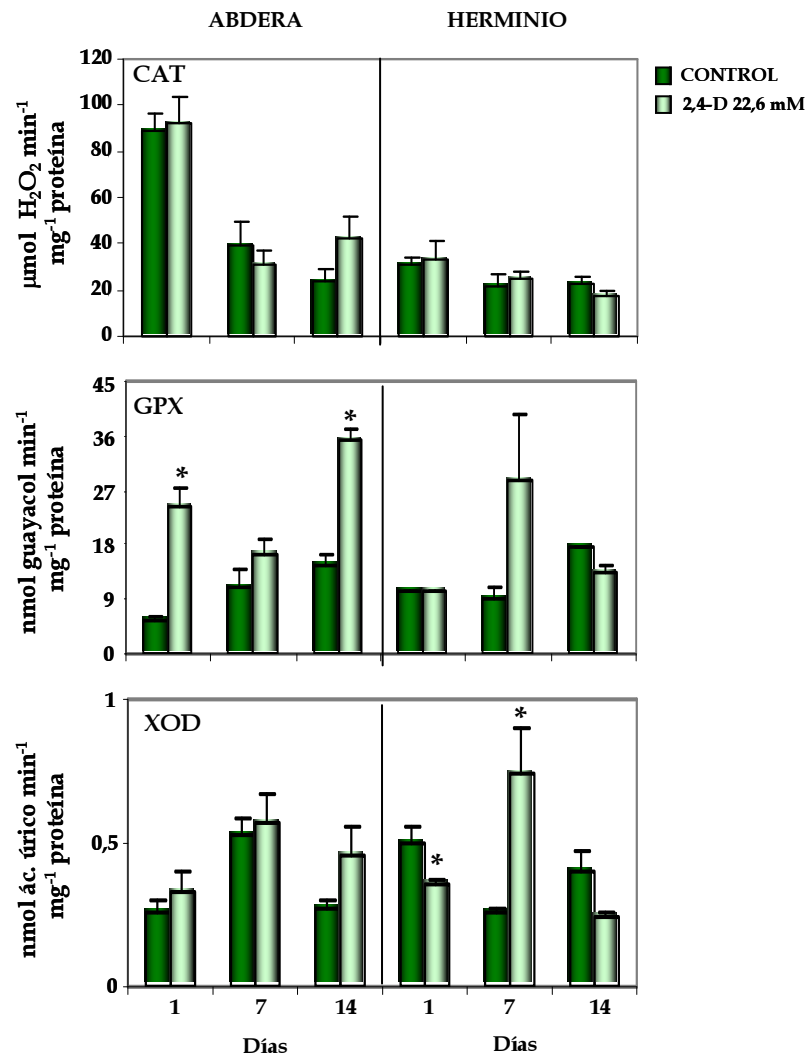


Fig. 4.4. Efecto del tratamiento con 2,4-D sobre la actividad catalasa (CAT), guayacol peroxidasa (GPX) y xantina oxidasa (XOD) de hojas de dos variedades de pimiento. Las plantas de pimiento de las variedades Abdera y Herminio se cultivaron en ausencia (control) y en presencia de 2,4-D 22,6 mM durante 1, 7 y 14 días. Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estándar de la media (ESM). El asterisco indica los tratamientos que son significativamente diferentes con respecto a las plantas control para el día de tratamiento indicado.

4.1.3.4. Superóxido dismutasa (SOD)

Mediante el análisis espectrofotométrico, se observó que la actividad SOD total (Fig. 4.5A) en la variedad Abdera, aumentó significativamente ($p < 0,05$) en plantas tratadas con 2,4-D respecto a las plantas controles durante los 1, 7 y 14 días del experimento; dicho comportamiento fue especialmente notorio tras las dos semanas, puesto que las plantas tratadas mostraban el doble de actividad que las control. En la variedad Herminio, la actividad SOD total experimentó una subida ($p < 0,05$) en las plantas tratadas con 2,4-D respecto a las controles, durante el séptimo día de tratamiento. Entre las plantas controles de la variedad Herminio se observó un aumento ($p < 0,05$) de la actividad SOD tras 14 días de cultivo respecto a las plantas de 1 y 7 días. El estudio de la actividad SOD isoenzimática se llevó a cabo mediante la técnica de EGPA-nativa (Fig. 4.5B). Se identificaron 4 isoformas que por su sensibilidad a inhibidores específicos se

correspondían con una Mn-SOD, una Fe-SOD y dos CuZn-SODs, designadas I y II según su creciente movilidad en el gel. Por otro lado, se observó un aumento en la actividad Mn-SOD y Fe-SOD de las plantas de pimiento tratadas con 2,4-D respecto a las plantas controles, en las dos variedades estudiadas. También, se detectó un aumento en la actividad de las CuZn-SODs I y II de las plantas de las variedades Abdera y Herminio tratadas con 2,4-D de 1 día respecto a las plantas controles y las tratadas de 7 y 14 días. Se analizó la expresión proteica de las CuZn-SODs y la Mn-SOD mediante la técnica de inmunotransferencia (Fig. 4.5C) con anticuerpos específicos frente a la CuZn-SOD de cotiledones de sandía y la Mn-SOD de hojas de guisante. Así, se observó que en la variedad Abdera el contenido de CuZn-SOD aumentaba en plantas de pimiento tratadas de 1 día respecto a las controles y tratadas de 14 días, de manera similar a lo observado mediante EGPA-nativa y tinción específica de actividad. Mediante esta técnica no se observaron variaciones significativas en el contenido proteico de Mn-SOD de las muestras analizadas.

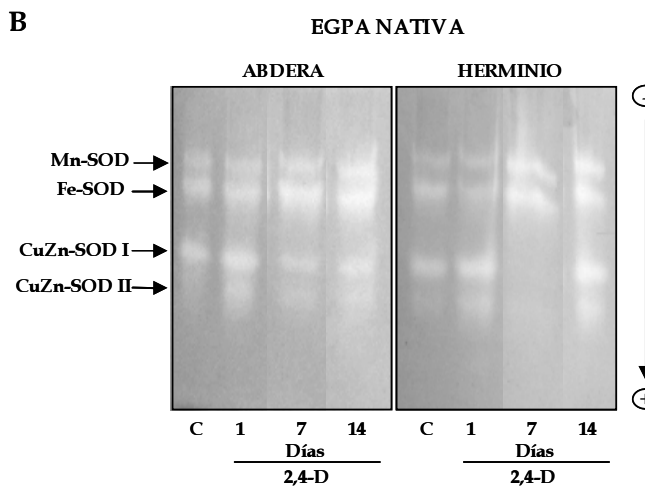
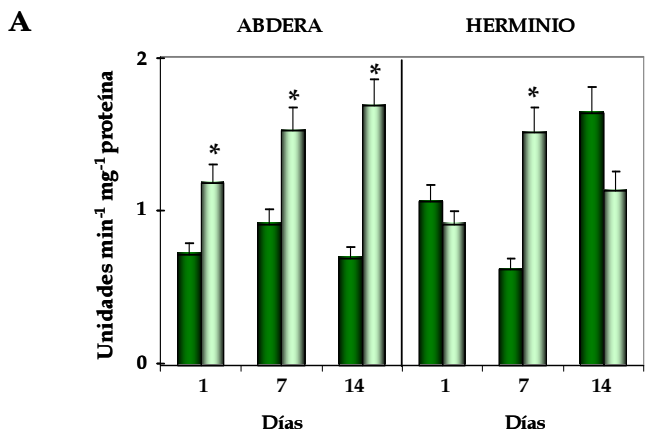


Fig. 4.5. Superóxido dismutasa (SOD) de hojas de dos variedades de pimiento tratadas con 2,4-D durante 1, 7 y 14 días. A, actividad SOD total analizada por el método de reducción del citocromo c. Las plantas de pimiento de las variedades Abdera y Herminio se cultivaron en ausencia (control) y en presencia de 2,4-D 22,6 mM durante 1, 7 y 14 días. Los valores indicados representan la media de 3 experimentos \pm el error estandar de la media (ESM). El asterisco indica los tratamientos que son significativamente diferentes con respecto a las plantas control para el día de tratamiento indicado. B, análisis de la actividad de las distintas isoformas de la SOD mediante EGPA nativa y tinción específica de los geles. En la figura se indican las distintas isoenzimas caracterizadas en base a su sensibilidad a los inhibidores KCN y H₂O₂. Se cargaron 100 μ g/pocillo. Se comparó el efecto del 2,4-D a los tres tiempos establecidos frente al patrón de plantas control (C) al inicio del experimento. C, transferencia de western de extractos de hojas (100 μ g/pocillo) de dos variedades de pimiento. Se comparó el efecto del 2,4-D a los 1 y 14 días frente al patrón de plantas control (C) al inicio del experimento. En esta técnica se emplearon anticuerpos frente a CuZn-SOD peroxisomal de cotiledones de sandía (dil. 1:1000) y frente a la Mn-SOD de hojas de guisante (dil. 1:1000).

4.1.3.5. Glutation reductasa (GR)

Se midió la actividad glutatión reductasa (GR) en plantas de pimiento de dos variedades, Abdera y Herminio, control y tratadas con 2,4-D de 1, 7 y 14 días (Fig. 4.6). En la variedad Abdera, la actividad GR fue siempre mayor ($p < 0,005$) en las plantas tratadas con 2,4-D que en las controles, durante 1, 7 y 14 días de tratamiento. A su vez, la actividad GR de las plantas controles de 1, 7 y 14 días no sufrieron variaciones significativas entre sí, al igual que ocurrió entre las plantas tratadas. En la variedad Herminio se produjo una disminución ($p < 0,05$) de la actividad GR en plantas tratadas respecto a plantas controles de 14 días de tratamiento, mientras que en las de 1 y 7 días las variaciones no fueron significativas. En las plantas controles de 7 días de dicha variedad, se observó una menor actividad GR ($p < 0,05$) respecto a las plantas de 1 y 14 días. En las plantas tratadas con 2,4-D de la variedad Herminio se detectó una disminución ($p < 0,05$) de la actividad GR tras la primera semana.

4.1.3.6. Glutation S-transferasa (GST)

También se estudió la actividad glutatión S-transferasa (GST), enzima implicada en la eliminación de xenobióticos, en las plantas descritas anteriormente (Fig. 4.6). En la variedad Abdera, la actividad GST aumentó ($p < 0,005$) en las plantas de pimiento tratadas con 2,4-D respecto a las controles de 7 y 14 días, siendo estas diferencias más notables a medida que transcurrían los días desde el tratamiento con el herbicida. En la variedad Herminio, la actividad GST no experimentó variaciones significativas en plantas tratadas con 2,4-D respecto a plantas controles a lo largo del experimento. A su vez, en las plantas controles de esta misma variedad, se observó un descenso ($p < 0,005$) de la actividad GST

en las plantas de 7 días respecto a las de 1 y 14 días de tratamiento. Entre las plantas tratadas con 2,4-D se detectó un aumento de la actividad GST, que era sobre todo más acentuado a partir del día 14 después del tratamiento, al igual que ocurría en la variedad Abdera.

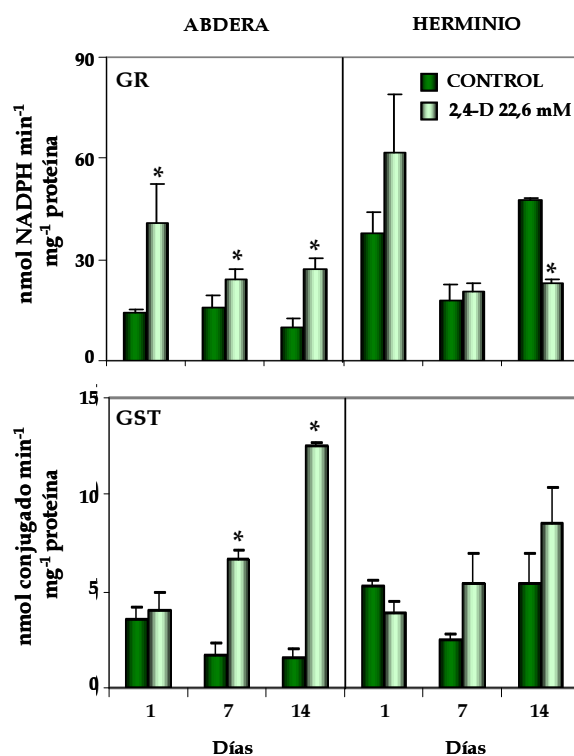


Fig. 4.6. Efecto del 2,4-D sobre la actividad glutatión reductasa (GR) y glutatión S-transferasa (GST) de hojas de dos variedades de pimiento. Las plantas de pimiento de las variedades Abdera y Herminio se cultivaron en ausencia (control) y en presencia de 2,4-D 22,6 mM durante 1, 7 y 14 días. Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estándar de la media (ESM). El asterisco indica los tratamientos que son significativamente diferentes con respecto a las plantas control para el día de tratamiento indicado

4.1.4. Deshidrogenasas productoras de NADPH. NADPH total

Se analizaron las actividades enzimáticas de las deshidrogenasas productoras de NADPH glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), isocitrato deshidrogenasa (ICDH) y enzima málico (EM) en hojas de dos variedades de pimiento. Las plantas de pimiento de las variedades Abdera y Herminio se cultivaron en ausencia (control) y en presencia de 2,4-D 22,6 mM durante 1, 7 y 14 días (Fig. 4.7A).

4.1.4.1. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)

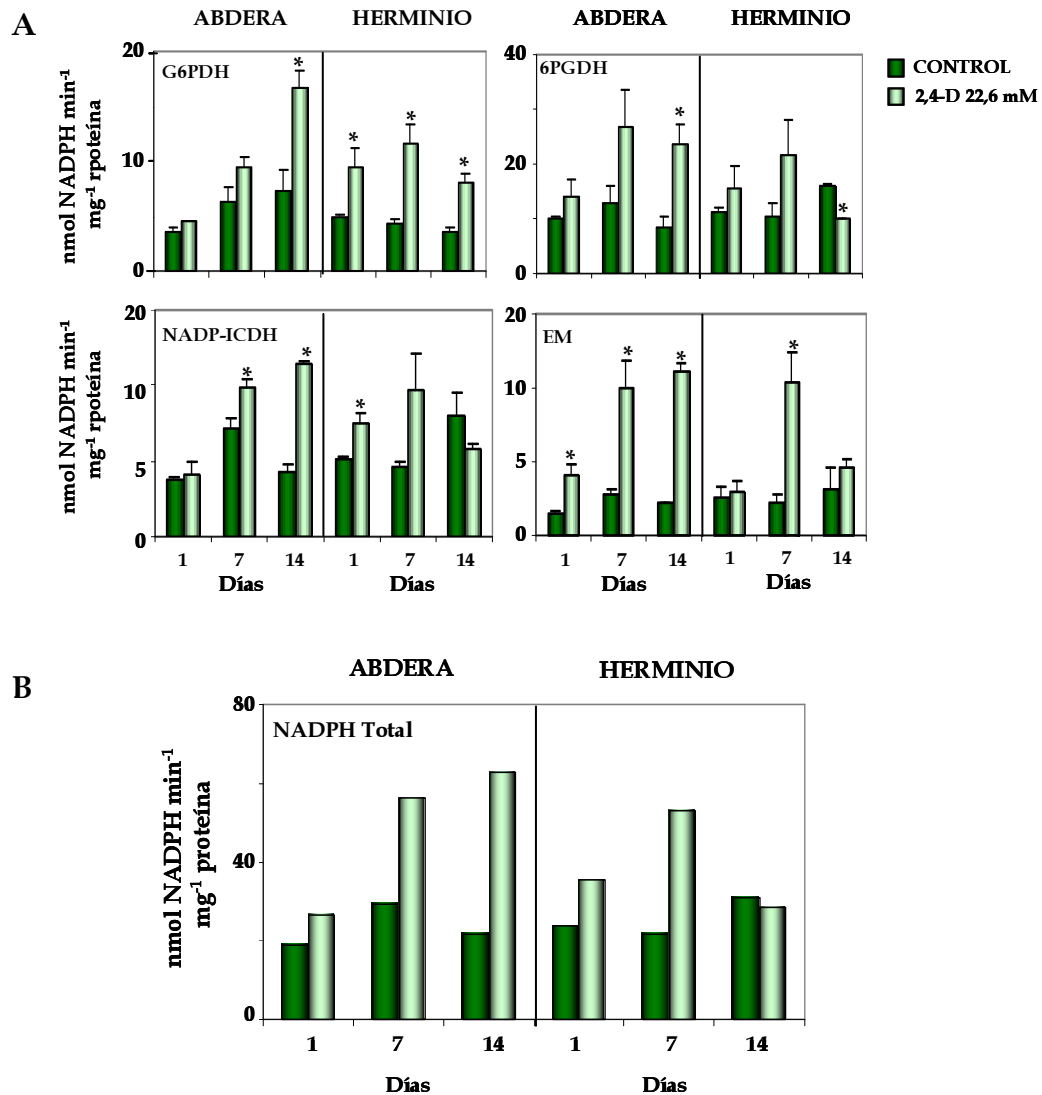
En la variedad Abdera, la actividad G6PDH se incrementó significativamente ($p < 0,025$) en plantas tratadas con 2,4-D respecto a plantas controles de 14 días. La actividad G6PDH no experimentó variaciones significativas entre las plantas controles a lo largo del tiempo, mientras que entre las plantas tratadas se detectó un incremento en dicha actividad a partir del séptimo día de tratamiento. En la variedad Herminio, las plantas de 1, 7 y 14 días tratadas con 2,4-D presentaron una actividad G6PDH significativamente mayor ($p < 0,005$) que las plantas controles. A su vez, las plantas controles de 1, 7 y 14 días no mostraron cambios significativos en la actividad G6PDH y lo mismo ocurrió entre las plantas tratadas con 2,4-D de 1, 7 y 14 días.

4.1.4.2. 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH)

En la variedad Abdera, la actividad 6PGDH fue mayor en plantas tratadas con 2,4-D que en plantas controles, sobre todo a los 14 días. En las plantas tratadas con 2,4-D de esta misma variedad, la actividad 6PGDH aumentó a partir del séptimo día de tratamiento. En la variedad Herminio, la actividad 6PGDH fue menor ($p < 0,005$) en las plantas tratadas con 2,4-D respecto a las plantas controles de 14 días. Entre plantas controles, la actividad 6PGDH aumentó ($p < 0,005$) en las plantas de 14 días respecto a las de 1 y 7 días. No se observaron diferencias significativas entre la actividad 6PGDH de las plantas tratadas con 2,4-D de 1, 7 y 14 días.

4.1.4.3. NADP-isocitrato deshidrogenasa (NADP-ICDH)

El análisis de la actividad NADP-ICDH en las plantas anteriormente descritas, mostraron un aumento ($p < 0,025$) de dicha actividad en plantas de la variedad Abdera tratadas con 2,4-D respecto a plantas controles, a los 7 y 14 días de tratamiento. Además, en las plantas tratadas con 2,4-D de la variedad Abdera, la actividad NADP-ICDH se incrementó ($p < 0,005$) después de la primera semana de tratamiento. En la variedad Herminio, la actividad NADP-ICDH aumentó ($p < 0,05$) en las plantas tratadas con 2,4-D respecto a las plantas controles de 1 y 7 días. No se apreciaron diferencias significativas en la actividad NADP-ICDH de plantas controles de 1, 7 y 14 días.



4.1.4.4. Enzima málico (EM)

También se midió la actividad de la enzima málico (EM), otra de las enzimas implicadas en la generación de poder reductor. En la variedad Abdera, la actividad de la EM aumentó considerablemente ($p < 0,005$) en todas las plantas tratadas con 2,4-D respecto a las plantas controles. A su vez, las plantas tratadas con 2,4-D presentaron una mayor ($p < 0,025$) actividad EM a partir del séptimo día del tratamiento. En la variedad Herminio, la actividad EM fue también mayor ($p < 0,005$) en las plantas tratadas con 2,4-D que en las controles al séptimo día del tratamiento con dicho herbicida.

4.1.4.5. NADPH total

Por otro lado y de modo orientativo, se estudió la contribución teórica de cada una de estas NADP-deshidrogenasas al NADPH total que se generaría en la célula, utilizando para ello la suma de la actividad total de estas enzimas en cada muestra analizada (Fig. 4.7B). Según esto, observamos que en la variedad Abdera la producción de NADPH total aumentó progresivamente en plantas tratadas con 2,4-D respecto a plantas controles de 1, 7 y 14 días desde el tratamiento. En la variedad Herminio, se apreció este mismo efecto en las plantas de 1 y 7 días, mientras que en las de 14 días las plantas controles y tratadas con 2,4-D presentaron producciones similares de NADPH.

4.1.5. Parámetros de estrés oxidativo

Para determinar el posible daño producido a nivel lipídico y proteico tras el tratamiento de las plantas de pimiento con 2,4-D se han analizado parámetros como la peroxidación lipídica, grupos carbonilo y actividad endopeptidasa en hojas de dos variedades de pimiento. Las plantas de pimiento de las variedades Abdera y Herminio se cultivaron en ausencia (control) y en presencia de 2,4-D 22,6 mM durante 1, 7 y 14 días.

4.1.5.1. Peroxidación lipídica y oxidación de proteínas

La peroxidación lipídica aumentó significativamente ($p < 0,005$) desde el primer día de tratamiento con 2,4-D en las plantas tratadas respecto a las plantas controles de ambas variedades (Fig. 4.8A).

Por otro lado, se analizaron los niveles de proteínas modificadas oxidativamente, midiendo para ello el contenido de grupos carbonilos de proteínas en solución y mediante reacción inmunoquímica para lo que se utilizaron anticuerpos comerciales frente a la DNPH de Sigma (Fig. 4.8B). Mediante el estudio espectrofotométrico se observó que no existían diferencias notorias en los niveles de grupos carbonilos de plantas tratadas respecto a plantas controles, en ambas variedades. Mientras que en la variedad Abdera los grupos carbonilos aumentaban ($p < 0,005$) con el tiempo de tratamiento en las plantas controles y tratadas con 2,4-D, en la variedad Herminio los niveles de grupos carbonilos disminuían ($p < 0,005$) a lo largo del tiempo en plantas controles y tratadas con el herbicida. Por transferencia de western, se observaron, al menos, cuatro polipéptidos inmunoreactivos de unos 130, 98, 66 y 45 kDa que eran mayoritarios. Entre ellos, en la variedad Abdera, la intensidad del polipéptido inmunoreactivo de 45 kDa disminuyó en las plantas tratadas con 2,4-D de 14 días respecto a las controles. En la variedad Herminio, la intensidad de todos estos polipéptidos experimentaron una reducción a los 14 días de tratamiento con 2,4-D respecto a las plantas controles.

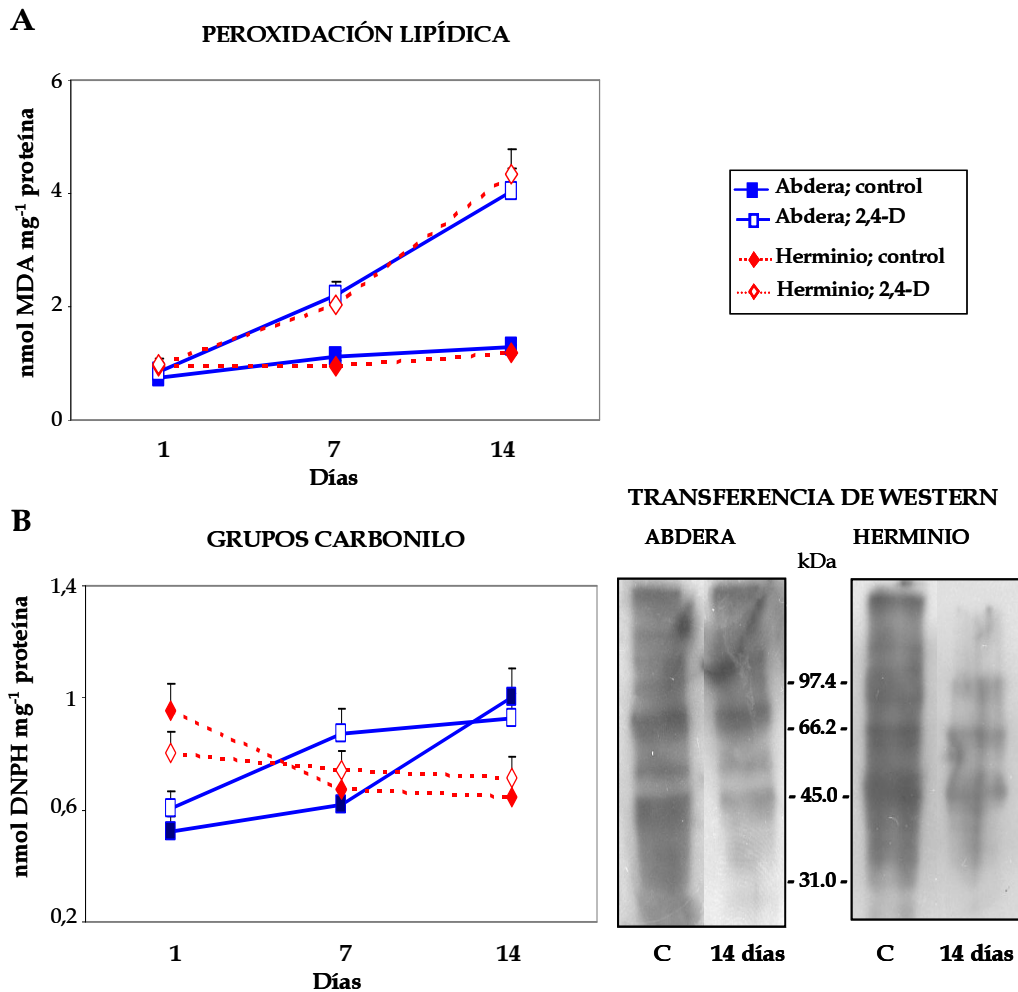


Fig. 4.8. Peroxidación lipídica y oxidación de proteínas de hojas de dos variedades de pimiento tratadas con 2,4-D. Las plantas de pimiento de las variedades Abdera y Herminio se cultivaron en ausencia (control; C) y en presencia de 2,4-D 22,6 mM durante 1, 7 y 14 días. Los valores indicados representan la media de 3 experimentos \pm ESM. A, análisis espectrofotométrico de la peroxidación lipídica en extractos crudos de hojas de dos variedades de pimiento. B, modificación oxidativa de proteínas en extractos crudos de hojas de dos variedades de pimiento. A la izquierda, contenido en grupos carbonilo medido por el método espectrofotométrico. A la derecha, detección inmunoquímica de los grupos carbonilo con un anticuerpo frente a la DNPH (dil. 1:40.000). Se añadieron 10 μ g proteínas/pocillo. En esta figura se indican igualmente los marcadores de masa molecular (kDa).

4.1.5.2. Actividad proteolítica

Se analizó la actividad endopeptidasa en extractos crudos de hojas de pimiento controles y tratadas con 2,4-D a los 1, 7 y 14 días de tratamiento por espectrofotometría (Fig. 4.9A) y por EGPA en presencia de SDS/gelatina (Fig. 4.9B). La variedad Abdera sólo experimentó un ligero incremento en plantas tratadas con 2,4-D, a las dos semanas de tratamiento. En la variedad Herminio, la actividad endopeptidasa descendió a las dos semanas del tratamiento con 2,4-D respecto a las plantas controles ($p < 0,005$) y a las plantas tratadas de 1 y 7 días ($p < 0,005$). Mediante EGPA en presencia de SDS y gelatina, se detectaron en hojas de plantas de pimiento, dos isoformas de endopeptidasas (EP1 y EP2), de diferente movilidad electroforética, con tamaños de 97 y 65 kDa,

respectivamente. Según la intensidad de las bandas, en la variedad Abdera, apenas se observaron cambios significativos en las isoenzimas como consecuencia del tratamiento. En la variedad Herminio la EP1 presentaba una mayor actividad en plantas tratadas de 1 día que en las controles y tratadas de 7 y 14 días. En cuanto a la EP2 en dicha variedad, ésta experimentó un ligero ascenso en su actividad en las muestras tratadas con 2,4-D de 7 días respecto a las controles y tratadas de 1 y 14 días.

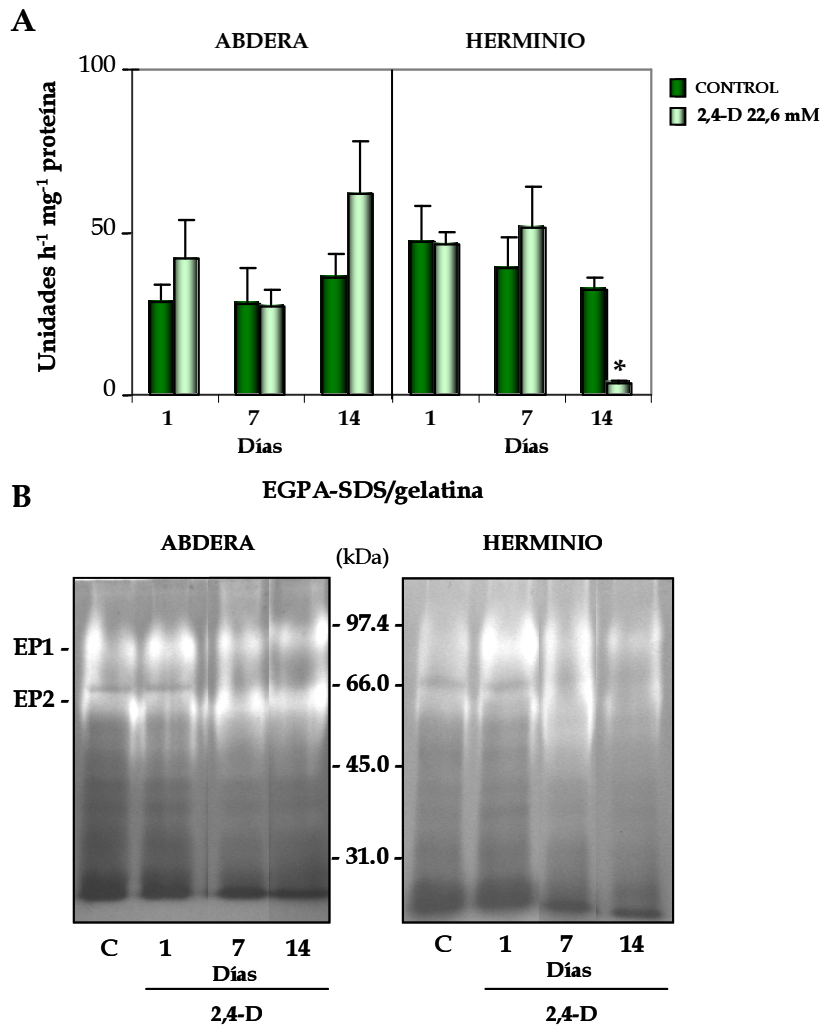


Fig. 4.9. Estudio de la actividad endopeptidasa en hojas de dos variedades de pimiento tratadas con 2,4-D. Las plantas de pimiento de las variedades Abdera y Herminio se cultivaron en ausencia (control) y en presencia de 2,4-D 22,6 mM durante 1, 7 y 14 días. Los valores indicados representan la media de 3 experimentos \pm ESM. A, actividad endoproteolítica total determinada mediante el método de la azocaseína. B, detección de isoenzimas con actividad endopeptidasa por EGPA en presencia de SDS/gelatina y tinción específica de los geles. Se indican las isoformas de endopeptidasas a la izquierda y los marcadores de masa molecular (kDa).

4.2. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS DE FRUTOS DE PIMIENTO. EFECTO DE LA MADURACIÓN.

4.2.1. Selección de las variedades y diseño experimental

En este trabajo se llevó a cabo el estudio de los sistemas antioxidantes de frutos de pimiento de distintas variedades en distintas épocas del año (otoño-invierno) y en distintos estados de maduración (verde y rojo o amarillo). Para ello se han utilizado frutos de las variedades Vergasa, Biela, Lodosa y Bierzo, siendo Vergasa, Biela y Lodosa pimientos de tipo california y Bierzo de tipo lamuyo. Mientras que la variedad Biela cambia de color a amarillo durante la maduración, las otras variedades viran a rojo (Fig. 4.10), considerándose en todos los casos que los frutos verdes pertenecen a un estado de desarrollo de inmadurez que es anterior al de los frutos rojos o amarillos. Se recolectaron 5 frutos verdes y 5 frutos rojos o amarillos, según la variedad, en cada una de las épocas del año estudiadas: en octubre de 2003 (OCT03), diciembre de 2003 (DIC03), enero de 2004 (ENE04) y febrero de 2004 (FEB04). La variedad Vergasa es más sensible a las bajas temperaturas por lo que su cosecha concluía en diciembre o enero, lo que nos impidió tomar muestras en enero y febrero del 2004 (ENE04 y FEB04).





Tipo	Variedad	Fenotipo
California	Vergasa	
	Biela	
	Lodosa	
Lamuyo	Bierzo	

Fig. 4.10. Variedades de pimiento empleadas para el estudio del efecto de la maduración en las enzimas antioxidantes del fruto. En cada caso, se indican los tipos de fruto a los que corresponde cada variedad, así como el fenotipo de los frutos en su estado maduro.

Para analizar el efecto de la maduración de los frutos de pimiento sobre el metabolismo oxidativo de éstos se analizó la actividad de las enzimas catalasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, NADP-isocitrato deshidrogenasa y enzima málico. Asimismo, se analizó la actividad de la L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa, enzima productora de ascorbato.

4.2.2. Catalasa

Se llevó a cabo el estudio de la actividad catalasa (CAT) en frutos de pimiento de las variedades y en las condiciones indicadas anteriormente (Fig. 4.11). En Vergasa, la actividad CAT no experimentó diferencias significativas ($p > 0,05$) entre frutos verdes y maduros de cada recogida, ni entre frutos verdes de OCT03 y DIC03 y entre frutos maduros de OCT03 y DIC03. En Biela, en las recogidas de OCT03, DIC03 y ENE04, la actividad CAT fue menor ($p < 0,01$) en frutos maduros respecto a frutos verdes. En esta misma variedad, los frutos verdes mostraron una mayor actividad en DIC03 respecto a las otras épocas estudiadas, y el mismo patrón se observó en los frutos maduros. En Lodosa, la actividad CAT fue mucho más alta ($p < 0,005$) en los frutos maduros de OCT03 respecto a los verdes de esa misma fecha, sufriendo un descenso considerable en la cosecha de DIC03. En frutos verdes de la variedad Lodosa se produjo un incremento ($p < 0,05$) de la actividad CAT a partir de diciembre, al igual que ocurría en la variedad Biela. Del mismo modo que en Biela, en Bierzo, la actividad CAT descendió en frutos maduros respecto a frutos verdes en DIC03 y ENE04. En frutos verdes de dicha variedad, la actividad CAT fue mayor ($p < 0,05$) en OCT03 y ENE04.

4.2.3. Superóxido dismutasa

Se llevó a cabo el estudio de la actividad superóxido dismutasa total (SOD) en frutos de pimiento de las variedades Vergasa, Biela, Lodosa y Bierzo, en las distintas recogidas de OCT03, DIC03, ENE04 y FEB04 y distintos estadios de maduración (verdes y maduros) (Fig. 4.12). Se comprobó que la actividad SOD en la variedad Vergasa aumentó significativamente ($p < 0,005$) en frutos maduros respecto a frutos verdes, sobre todo en la recogida de DIC03, y que dicha actividad disminuía con el tiempo en los frutos inmaduros. En Biela, igualmente, la actividad SOD fue siempre más alta ($p < 0,005$) en los frutos maduros que en los verdes en todas las épocas del año estudiadas. A su vez, en los frutos maduros de esta variedad, la actividad SOD fue mayor ($p < 0,05$) en los meses de invierno (ENE04 y FEB04). En Lodosa, de nuevo observamos mayor ($p < 0,05$) actividad SOD en frutos maduros que en verdes en las cosechas de DIC03 y ENE04. Sin embargo, en la cosecha de FEB04, la actividad SOD fue superior ($p < 0,05$) en los frutos verdes que en los maduros. Entre frutos maduros de esta variedad, observamos que la actividad SOD se incrementó ($p < 0,05$) a lo largo del tiempo hasta ENE04. Sin embargo, en los frutos inmaduros los niveles más altos de actividad SOD se encontraron en FEB04. Al igual que en las variedades anteriormente descritas la actividad SOD fue más alta ($p < 0,05$) en frutos maduros que en verdes de la variedad Bierzo. Además, la actividad SOD aumentó entre los frutos maduros de esta variedad ($p < 0,05$) a lo largo del tiempo, mientras que en los frutos verdes esta actividad apenas mostraba cambios importantes.

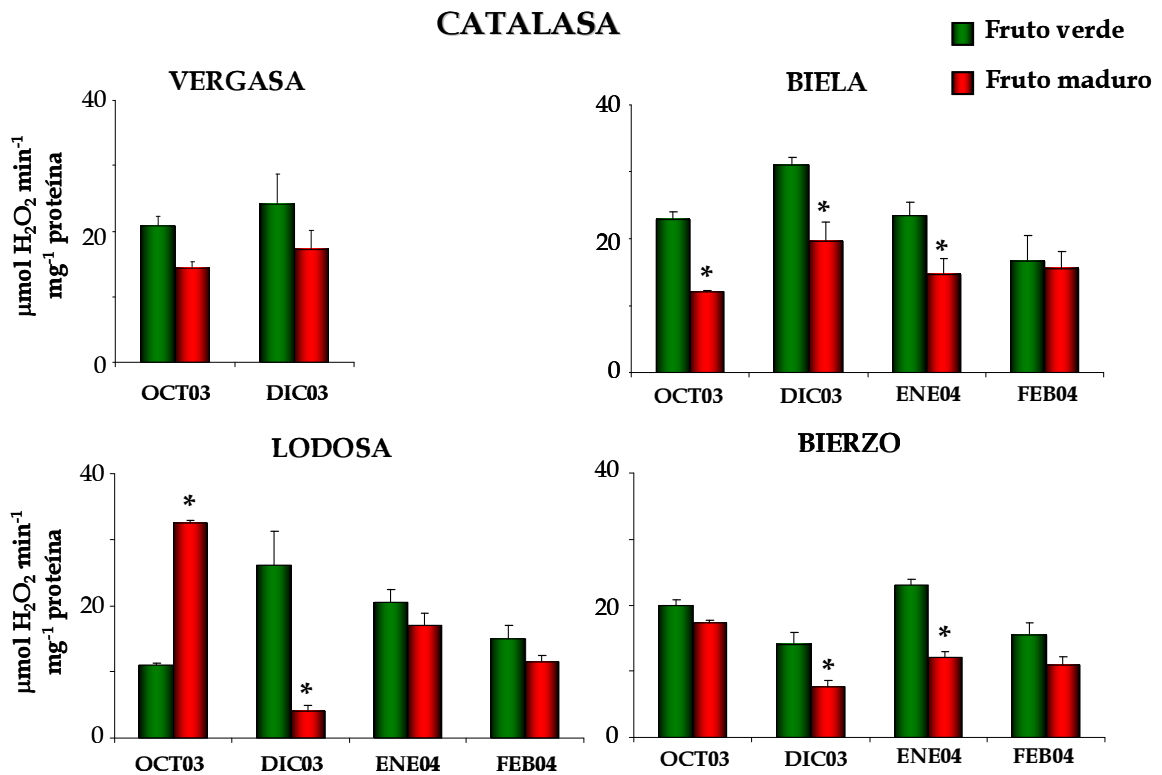


Fig. 4.11. Actividad catalasa en frutos de cuatro variedades de pimiento. Los frutos en estado inmaduro verde y maduro de cada variedad se recolectaron en octubre y diciembre de 2003 (OCT03 y DIC03, respectivamente) y en enero y febrero de 2004 (ENE04 y FEB04, respectivamente). El asterisco indica los frutos maduros con diferencias significativas con respecto a los frutos verdes de cada una de las cosechas y variedades analizadas. Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estándar de la media (ESM).

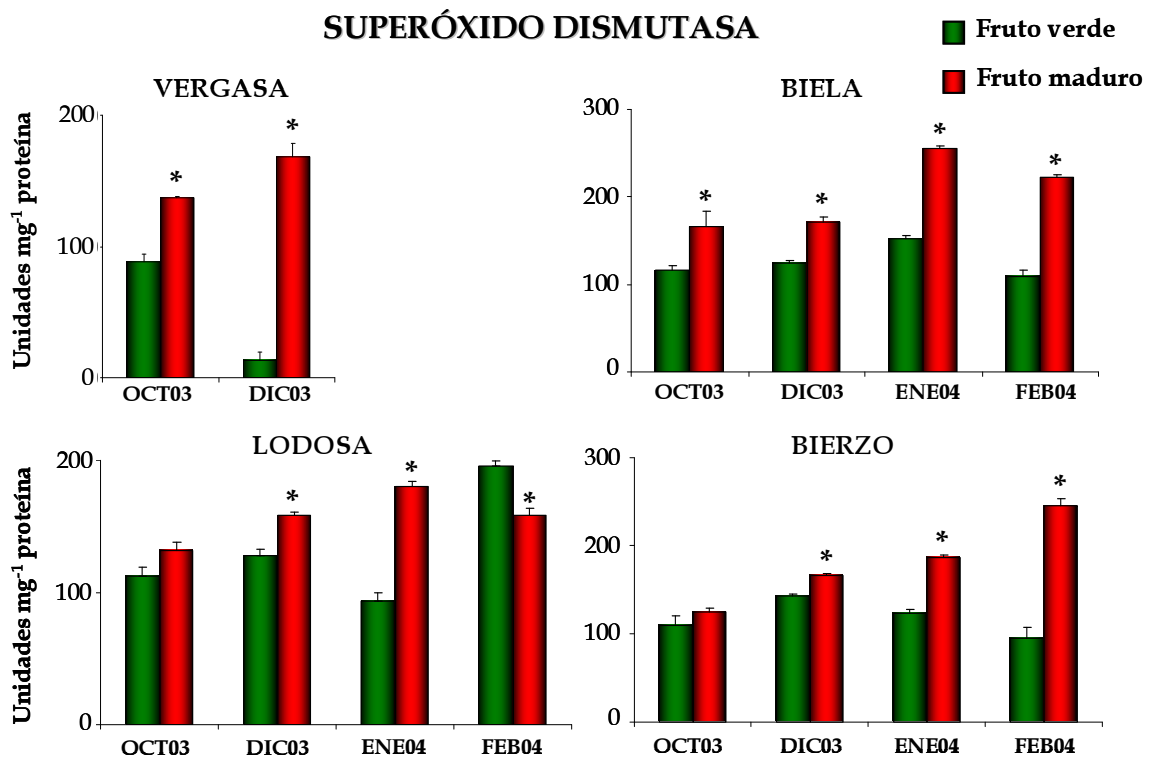


Fig. 4.12. Actividad superóxido dismutasa en frutos de cuatro variedades de pimiento. Los frutos en estado inmaduro verde y maduro de cada variedad se recolectaron en octubre y diciembre de 2003 (OCT03 y DIC03, respectivamente) y en enero y febrero de 2004 (ENE04 y FEB04, respectivamente). El asterisco indica los frutos maduros con diferencias significativas con respecto a los frutos verdes de cada una de las cosechas y variedades analizadas. Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estándar de la media (ESM).

4.2.4. Ascorbato peroxidasa

En los frutos y condiciones indicadas se llevó a cabo el estudio de algunas enzimas del ciclo ascorbato-glutation. En la variedad Vergasa, la actividad ascorbato peroxidasa (APX) fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en los frutos maduros que en los verdes de DIC03 (Fig. 4.13). Entre los frutos verdes la actividad APX se mantuvo sin modificaciones significativas ($p > 0,05$) y entre los maduros la actividad ascendió ($p < 0,05$) en DIC03 respecto a OCT03. En Biela, la actividad APX disminuyó ($p < 0,005$) en frutos maduros respecto a verdes de OCT03 y ENE04. Por el contrario, esta actividad se incrementó en frutos maduros respecto a verdes de DIC03. En frutos verdes de esta misma variedad, se detectó un descenso significativo ($p < 0,005$) de la actividad APX en FEB04 respecto a las otras épocas analizadas. En Lodosa, la actividad APX fue menor ($p < 0,05$) en frutos maduros a partir de enero de 2004. Dicha actividad enzimática disminuyó ($p < 0,005$) tanto en frutos maduros como en verdes en la recogida de FEB04 respecto a las anteriores épocas del año analizadas. En Bierzo, sólo se detectó una disminución ($p < 0,025$) de la actividad APX en frutos maduros respecto a verdes de FEB04. Los frutos verdes y maduros de dicha variedad experimentaron una disminución ($p < 0,05$) de la actividad APX en los meses de invierno respecto a los de otoño.

4.2.5. Glutation reductasa

En la Figura 4.14 se representan los resultados obtenidos de la actividad glutacion reductasa (GR) en las distintas variedades y condiciones. En la variedad Vergasa la actividad GR ascendió significativamente ($p < 0,005$) en frutos maduros respecto a verdes de OCT03 y DIC03. En frutos verdes y maduros de la misma variedad, la actividad GR fue menor ($p < 0,05$) en DIC03 con respecto a OCT03. En Biela, también se determinó una mayor ($p < 0,05$) actividad GR en frutos maduros que en verdes en todas las épocas analizadas, siendo esta diferencia mayor en OCT03 ($p < 0,005$). Los niveles más altos de actividad GR tanto en frutos verdes como maduros se detectaron en OCT03, mientras que en diciembre se determinaron los niveles más bajos en ambos tipos de frutos. En Lodosa, la actividad GR fue mayor ($p < 0,05$) en frutos maduros que en verdes en las recogidas OCT03 y FEB04. Por el contrario, la actividad GR fue significativamente ($p < 0,005$) menor en frutos maduros que verdes de ENE04. En los frutos verdes de esta variedad, la actividad GR se incrementó a partir de enero. En Bierzo, la actividad GR fue mayor en frutos maduros que en verdes de OCT03, ENE04 y FEB04. Del mismo modo que en Biela, la GR de Bierzo presentó la menor actividad en diciembre, tanto en los frutos verdes como en los maduros.

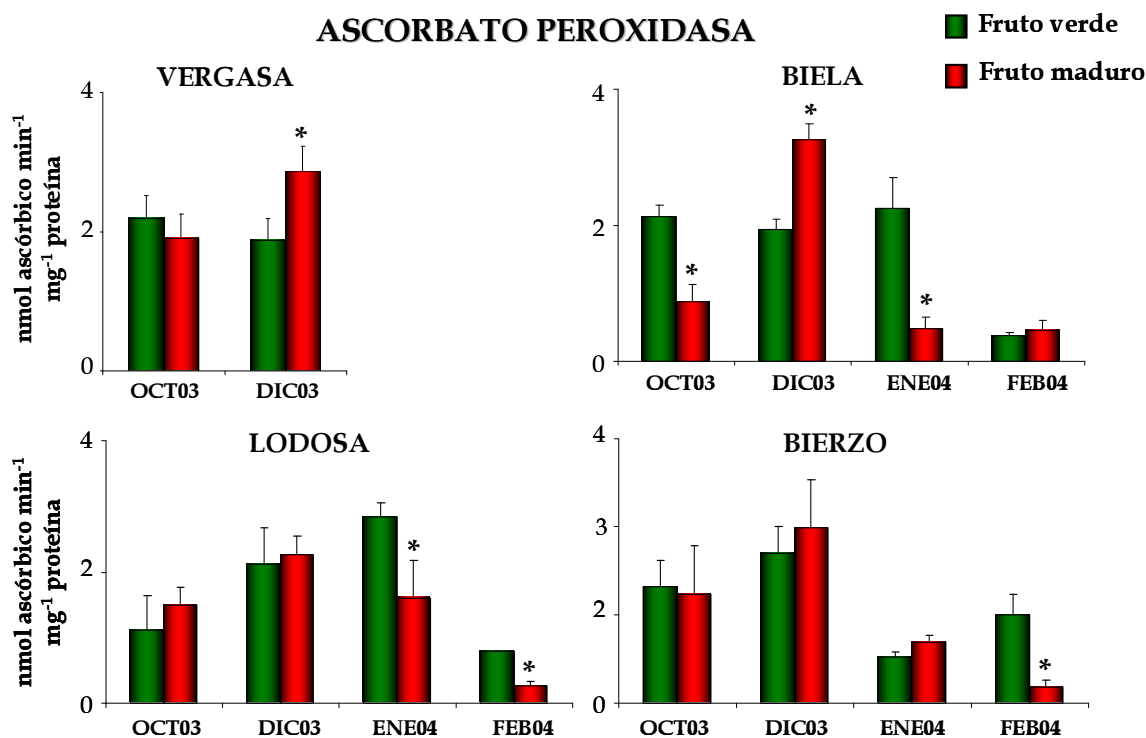


Fig. 4.13. Actividad ascorbato peroxidasa en frutos de cuatro variedades de pimiento. Los frutos en estado inmaduro verde y maduro de cada variedad se recolectaron en octubre y diciembre de 2003 (OCT03 y DIC03, respectivamente) y en enero y febrero de 2004 (ENE04 y FEB04, respectivamente). El asterisco indica los frutos maduros con diferencias significativas con respecto a los frutos verdes de cada una de las cosechas y variedades analizadas. Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estandar de la media (ESM).

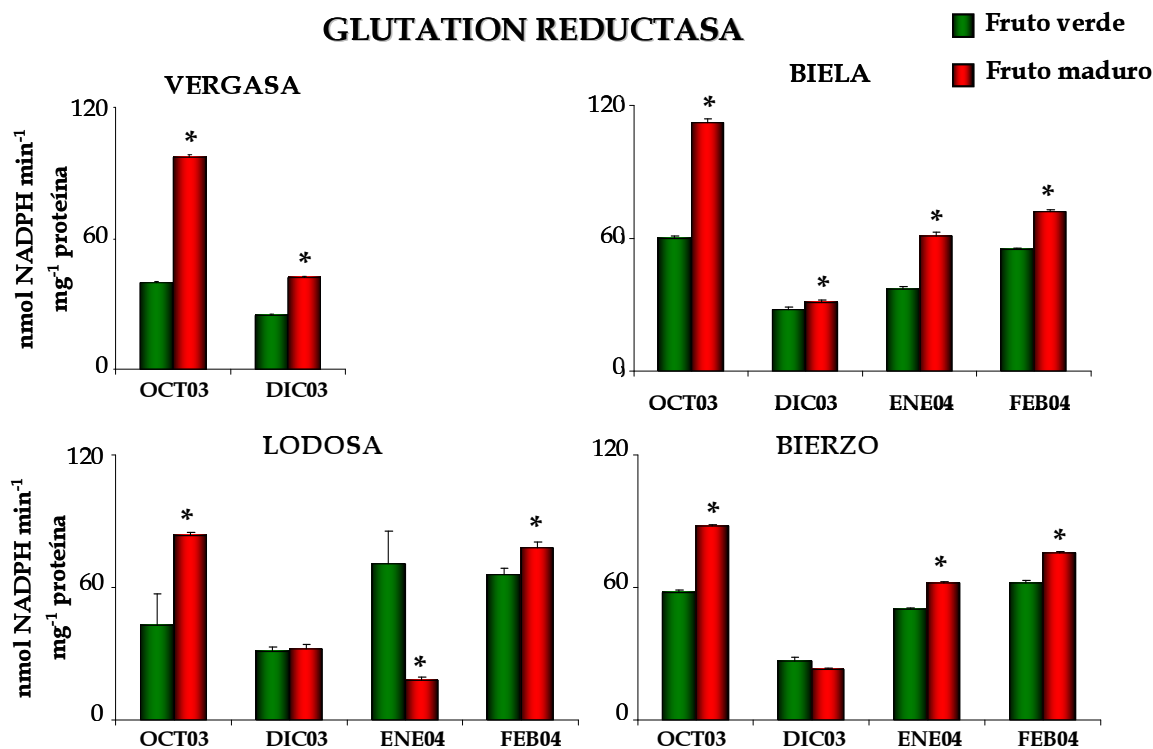


Fig. 4.14. Actividad glutation reductasa en frutos de cuatro variedades de pimiento. Los frutos en estado inmaduro verde y maduro de cada variedad se recolectaron en octubre y diciembre de 2003 (OCT03 y DIC03, respectivamente) y en enero y febrero de 2004 (ENE04 y FEB04, respectivamente). El asterisco indica los frutos maduros con diferencias significativas con respecto a los frutos verdes de cada una de las cosechas y variedades analizadas. Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estandar de la media (ESM).

4.2.6. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

Se estudió la actividad glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en frutos de pimiento de las variedades Vergasa, Biela, Lodosa y Bierzo, en las distintas épocas del año y diferentes estados de maduración del fruto (fruto verde y maduro) (Fig. 4.15). En Vergasa, la actividad G6PDH disminuyó ligeramente ($p < 0,05$) en frutos maduros respecto a verdes de DIC03. En los frutos maduros de dicha variedad se produjo una disminución ($p < 0,05$) de la actividad G6PDH desde OCT03 a DIC03. En Biela, la actividad G6PDH no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) entre frutos verdes y maduros de las épocas del año analizadas. Sin embargo, la actividad G6PDH descendió ($p < 0,05$) progresivamente desde OCT03 a ENE04 tanto en los frutos verdes como en los frutos maduros. En Lodosa, la actividad G6PDH fue mayor ($p < 0,025$) en frutos maduros respecto a verdes en ENE04. En dicha variedad la actividad G6PDH disminuyó ($p < 0,05$) progresivamente desde OCT03 a FEB04 tanto en los frutos verdes como en los frutos maduros. En Bierzo, la actividad G6PDH descendió ($p < 0,05$) en frutos maduros respecto a verdes en los meses de invierno. A su vez, la actividad G6PDH fue menor ($p < 0,005$) en los frutos verdes de invierno que en los de otoño y lo mismo ocurría con los frutos maduros.

4.2.7. 6-Fosfogluconato deshidrogenasa

Con respecto a la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), en la variedad Vergasa, esta actividad se incrementó significativamente ($p < 0,005$) en frutos maduros respecto a verdes de DIC03 (Fig. 4.16). Además, en frutos verdes disminuyó la actividad 6PGDH a partir de diciembre. En la variedad Biela, la actividad 6PGDH fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en los frutos maduros respecto a los verdes de DIC03 y ENE04. En los frutos maduros de dicha variedad, la actividad 6PGDH descendió a partir de diciembre. En Lodosa, la actividad 6PGDH fue más baja en frutos maduros que en verdes de FEB04. Esta cosecha fue la que mostró menor actividad en ambos tipos de frutos. En Bierzo, la actividad 6PGDH se incrementó en frutos maduros respecto a verdes durante el mes de OCT04 mientras que dicha actividad descendió en frutos maduros respecto a verdes en los meses de invierno analizados. Entre los frutos maduros de Bierzo, la actividad 6PGDH disminuyó ($p < 0,005$) progresivamente con el tiempo.

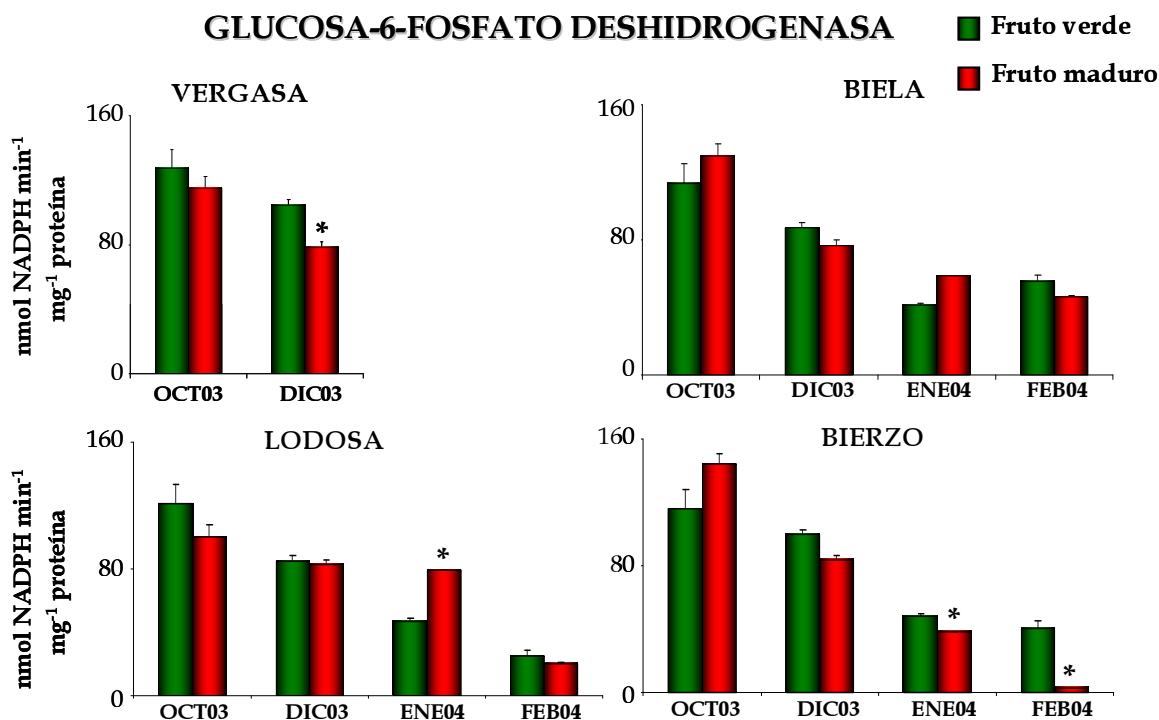


Fig. 4.15. Actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en frutos de cuatro variedades de pimiento. Los frutos en estado inmaduro verde y maduro de cada variedad se recolectaron en octubre y diciembre de 2003 (OCT03 y DIC03, respectivamente) y en enero y febrero de 2004 (ENE04 y FEB04, respectivamente). El asterisco indica los frutos maduros con diferencias significativas con respecto a los frutos verdes de cada una de las cosechas y variedades analizadas. Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estandar de la media (ESM).

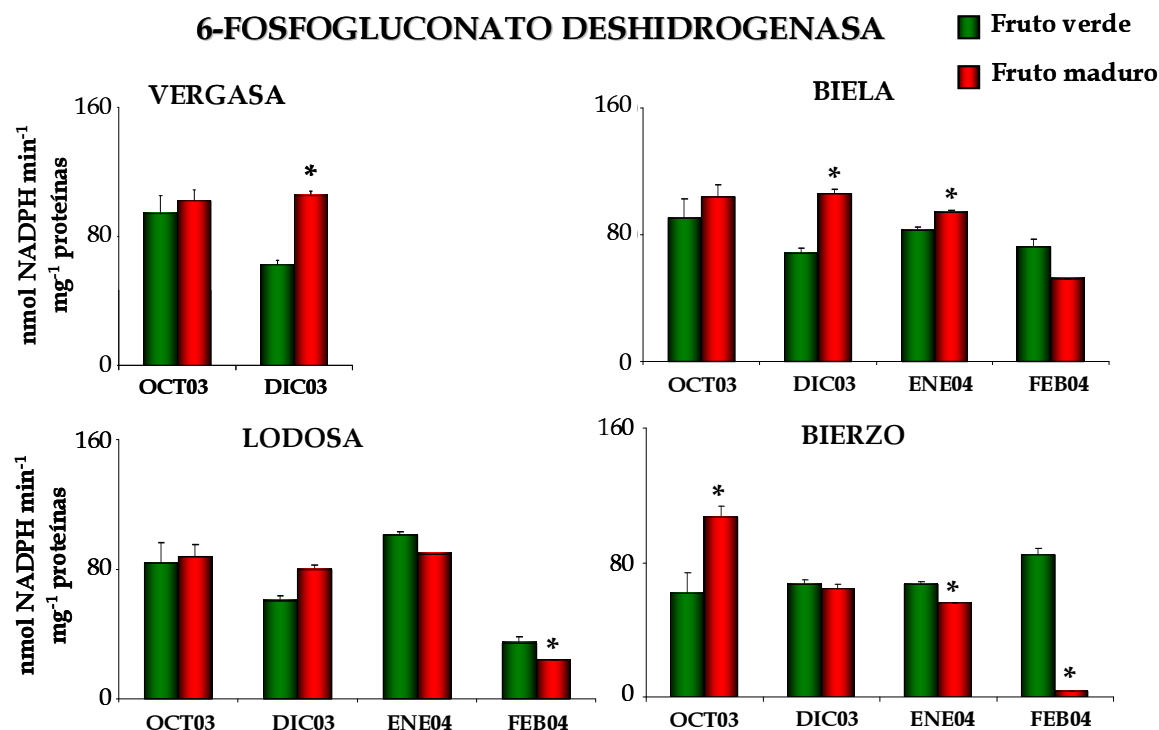


Fig. 4.16. Actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa en frutos de cuatro variedades de pimiento. Los frutos en estado inmaduro verde y maduro de cada variedad se recolectaron en octubre y diciembre de 2003 (OCT03 y DIC03, respectivamente) y en enero y febrero de 2004 (ENE04 y FEB04, respectivamente). El asterisco indica los frutos maduros con diferencias significativas con respecto a los frutos verdes de cada una de las cosechas y variedades analizadas. Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estandar de la media (ESM).

4.2.8. NADP-isocitrato deshidrogenasa

Se analizó asimismo la actividad isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ (NADP-ICDH), en las variedades, épocas del año y estados de maduración descritos anteriormente (Fig. 4.17). En Vergasa, la actividad NADP-ICDH aumentó ($p < 0,025$) en frutos maduros respecto a verdes en ambas cosechas. En Biela, la actividad NADP-ICDH fue siempre mayor ($p < 0,025$) en los frutos maduros que en los verdes aunque más significativamente desde DIC03 a FEB04. Por otro lado, los frutos verdes y los maduros presentaron un mínimo de actividad NADP-ICDH en FEB04. En Lodosa, la actividad NADP-ICDH fue igualmente mayor ($p > 0,025$) en los frutos maduros respecto a los verdes desde OCT03 a ENE04, siendo en FEB04 la actividad NADP-ICDH más alta ($p < 0,05$) en los frutos verdes. Entre frutos maduros, la actividad NADP-ICDH descendió ($p < 0,05$) a lo largo del tiempo. A diferencia de las otras variedades, Bierzo mostró menor ($p < 0,05$) actividad NADP-ICDH en frutos maduros que en verdes de DIC03 a FEB04. En esta variedad la mayor actividad tanto en los frutos verdes como en los maduros se detectó en la primera cosecha de otoño.

4.2.9. Enzima málico

Se midió la actividad del enzima málico (EM) en los frutos de pimiento y las condiciones ya establecidas (Fig. 4.18). En las cuatro variedades la actividad EM fue por lo general mayor ($p < 0,005$) en los frutos maduros que en los verdes durante todas las épocas analizadas. En Vergasa, Biela y Bierzo, la actividad EM se mantuvo prácticamente invariable ($p > 0,05$) en los frutos maduros desde OCT03 a FEB04, mientras que en Lodosa ascendió ($p < 0,05$) significativamente desde DIC03 a FEB04. En los frutos verdes, la actividad EM tendía a aumentar con el tiempo en las variedades estudiadas.

4.2.10. NADPH total

Con carácter orientativo, se calculó la contribución teórica de estas NADP-deshidrogenasas a la síntesis del NADPH total de la célula, utilizando para ello la suma de la actividad total de estas enzimas en cada muestra analizada. Por tanto, la figura 4.19 representaba la estimación del NADPH total generado en los frutos de pimiento de las variedades, épocas del año y estadios de maduración que se analizaron. Según esto, en Vergasa y Biela, la producción de NADPH fue mayor en frutos maduros que en verdes, en todas las épocas del año analizadas. Este mismo efecto tuvo lugar en la variedad Lodosa desde OCT03 a ENE04, siendo en FEB04 la generación de NADPH mayor en frutos verdes que maduros. En Bierzo, la generación de NADPH fue mayor en frutos maduros que en verdes en OCT03. En esta variedad, la generación de NADPH total comenzó siendo mayor en frutos maduros que en verdes pero en las cosechas sucesivas dicho parámetro se equilibró entre los frutos verdes y maduros e incluso descendió en los frutos maduros respecto a los verdes en FEB04.

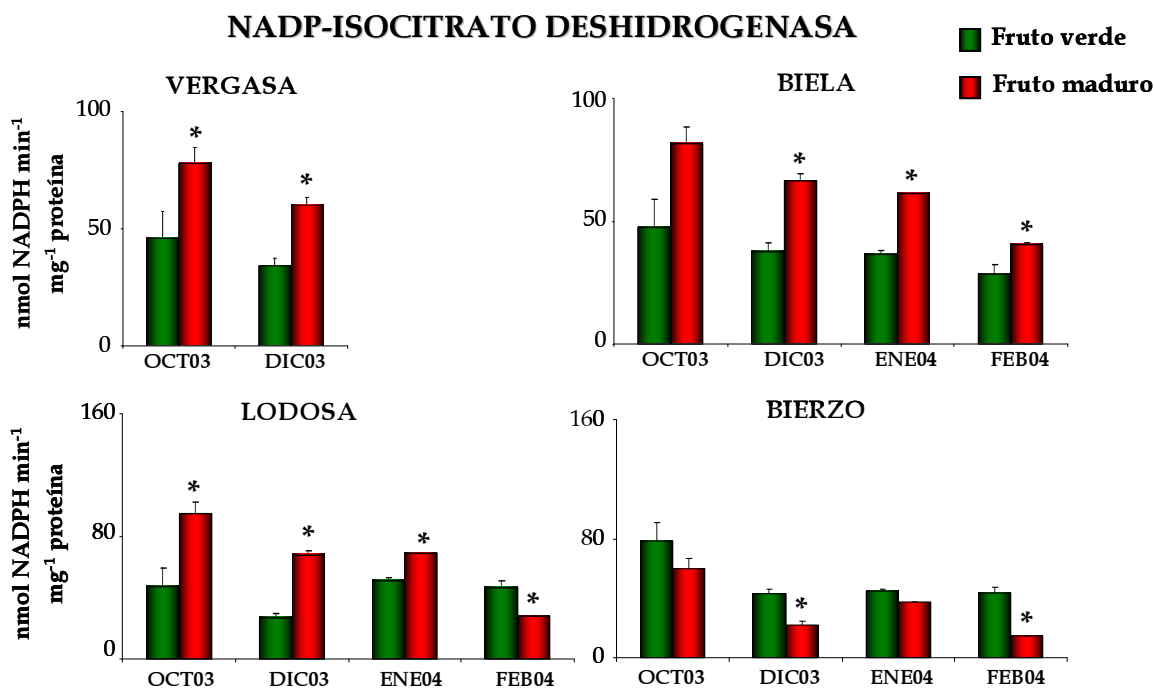


Fig. 4.17. Actividad NADP-isocitrato deshidrogenasa en frutos de cuatro variedades de pimiento. Los frutos en estado inmaduro verde y maduro de cada variedad se recolectaron en octubre y diciembre de 2003 (OCT03 y DIC03, respectivamente) y en enero y febrero de 2004 (ENE04 y FEB04, respectivamente). El asterisco indica los frutos maduros con diferencias significativas con respecto a los frutos verdes de cada una de las cosechas y variedades analizadas. Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estándar de la media (ESM).

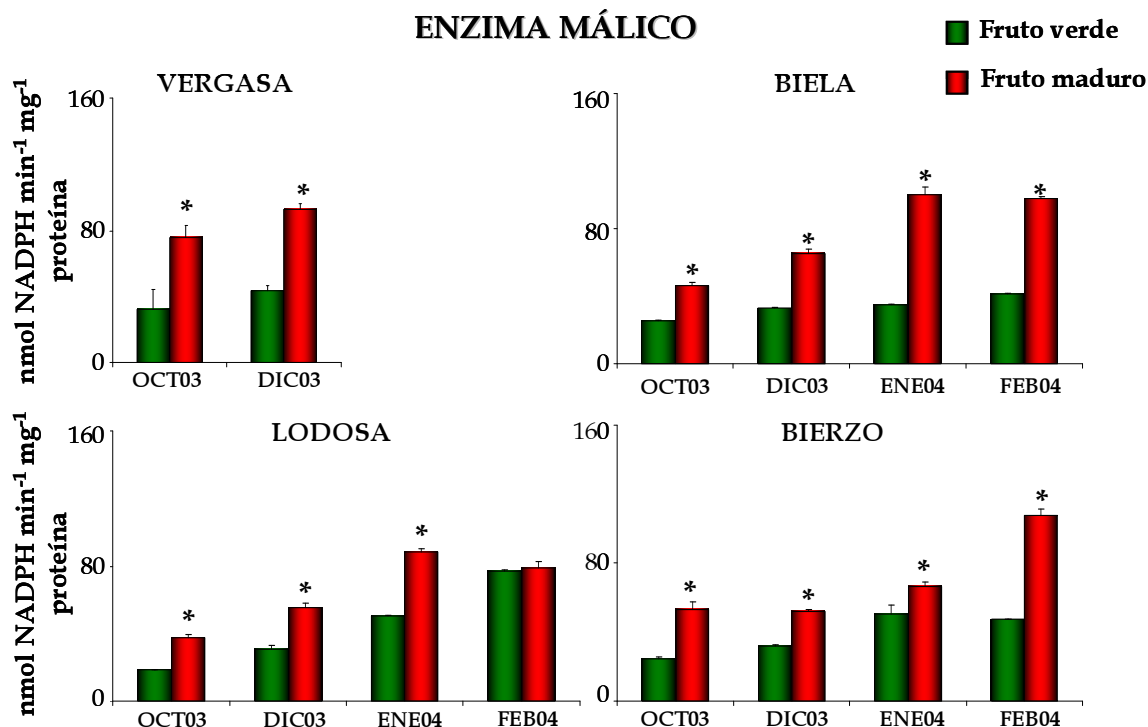


Fig. 4.18. Actividad de la enzima málico de en frutos de cuatro variedades de pimiento. Los frutos en estado inmaduro verde y maduro de cada variedad se recolectaron en octubre y diciembre de 2003 (OCT03 y DIC03, respectivamente) y en enero y febrero de 2004 (ENE04 y FEB04, respectivamente). El asterisco indica los frutos maduros con diferencias significativas con respecto a los frutos verdes de cada una de las cosechas y variedades analizadas. Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estándar de la media (ESM).

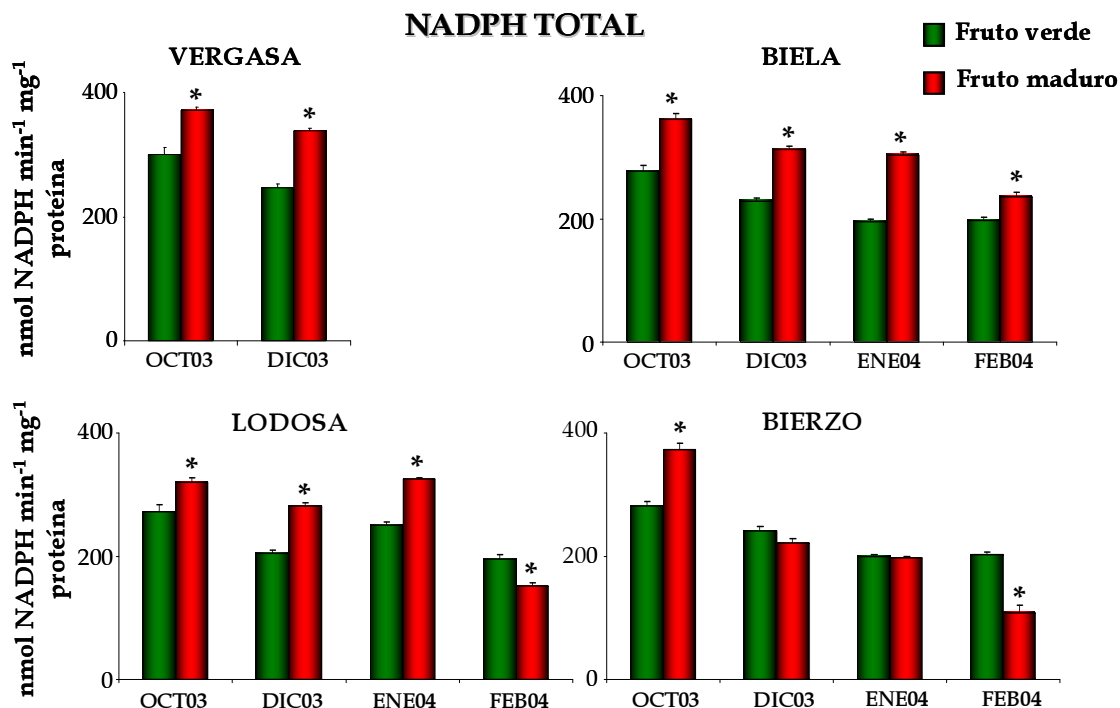


Fig. 4.19. NADPH total en frutos de cuatro variedades de pimiento. Este valor representa el NADPH que teóricamente generarían las NADP-deshidrogenasas analizadas, y se obtiene sumando la actividad de las enzimas generadoras de NADPH estudiadas anteriormente. Los frutos en estado inmaduro verde y maduro de cada variedad se recolectaron en octubre y diciembre de 2003 (OCT03 y DIC03, respectivamente) y en enero y febrero de 2004 (ENE04 y FEB04, respectivamente). El asterisco indica los frutos maduros con diferencias significativas con respecto a los frutos verdes de cada una de las cosechas y variedades analizadas. Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estándar de la media (ESM).

4.2.11. L-Galactono- γ -lactona deshidrogenasa

La actividad de la L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa (GalLDH), una de las principales enzimas implicadas en la síntesis de ascorbato, fue también analizada en frutos de pimiento de distintas variedades (Vergasa, Biela, Lodosa y Bierzo), distintas épocas del año (OCT03, DIC03, ENE04 y FEB04) y estados de maduración (frutos verdes y rojos o amarillos) (Fig. 4.20). La actividad GalLDH se incrementó ($p < 0,005$) en frutos maduros respecto a frutos verdes en las variedades Vergasa y Biela en todas las épocas del año analizadas aunque dicha actividad disminuía con el tiempo en ambos tipos de frutos. Este mismo comportamiento se observó en Bierzo con la excepción de la cosecha DIC03, y en Lodosa en las cosechas OCT03 y DIC03. En esta variedad la actividad GalLDH fue menor en los frutos maduros de FEB04. En los frutos maduros de todas las variedades analizadas, la máxima actividad GalLDH se observó en OCT03.

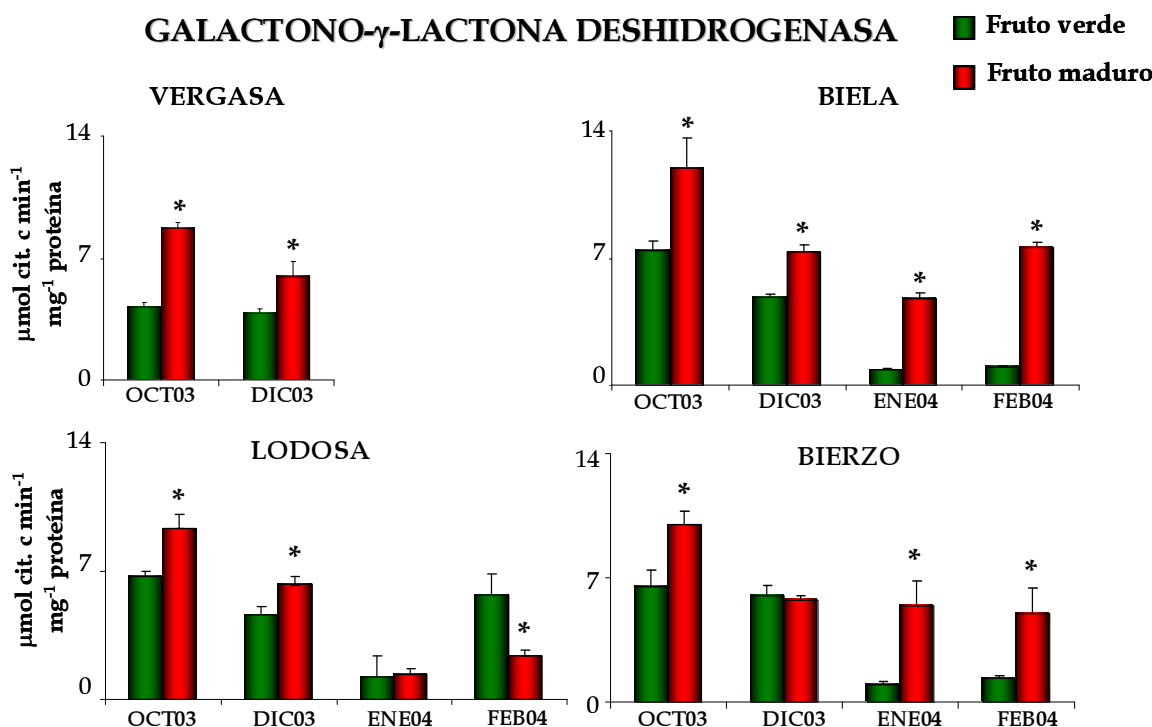


Fig. 4.20. Actividad galactono- γ -lactona deshidrogenasa en frutos de cuatro variedades de pimiento. Los frutos en estado inmaduro verde y maduro de cada variedad se recolectaron en octubre y diciembre de 2003 (OCT03 y DIC03, respectivamente) y en enero y febrero de 2004 (ENE04 y FEB04, respectivamente). El asterisco indica los frutos maduros con diferencias significativas con respecto a los frutos verdes de cada una de las cosechas y variedades analizadas. Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estándar de la media (ESM).

4.3. PEROXISOMAS Y MADURACIÓN DE FRUTOS DE PIMIENTO

La conocida plasticidad metabólica que presentan los peroxisomas frente a diversas situaciones ambientales, de estrés o de desarrollo nos han llevado a estudiar la posible relación existente entre el funcionamiento de algunos sistemas metabólicos presentes en los peroxisomas de frutos de pimiento con los fenómenos de maduración de éstos. Para ello se aislaron y purificaron peroxisomas de frutos de pimiento verdes y rojos, y se estudió su morfología y ultraestructura.

4.3.1. Morfología de los peroxisomas

Para analizar el efecto de la maduración del fruto sobre la población de peroxisomas de frutos verdes y rojos, se procedió al análisis de su ultraestructura mediante microscopía electrónica. No se observaron cambios en la ultraestructura ni en el número de peroxisomas de pimiento rojo con respecto a los de pimiento verde, ni en la membrana ni en la matriz. Habría que destacar la notable presencia de peroxisomas con cuerpos cristalinos de formas y tamaños variables en ambos tipos de frutos (Fig. 4.21).

Por otro lado, estos estudios nos permitieron observar una marcada diferencia entre los plastidios de ambos tipos de frutos. En frutos verdes se detectaron cloroplastos de grandes tilacoides (Fig. 4.21A), mientras que en frutos rojos se observaron cromoplastos con un contenido de gránulos densos a los electrones (Fig. 4.21E).

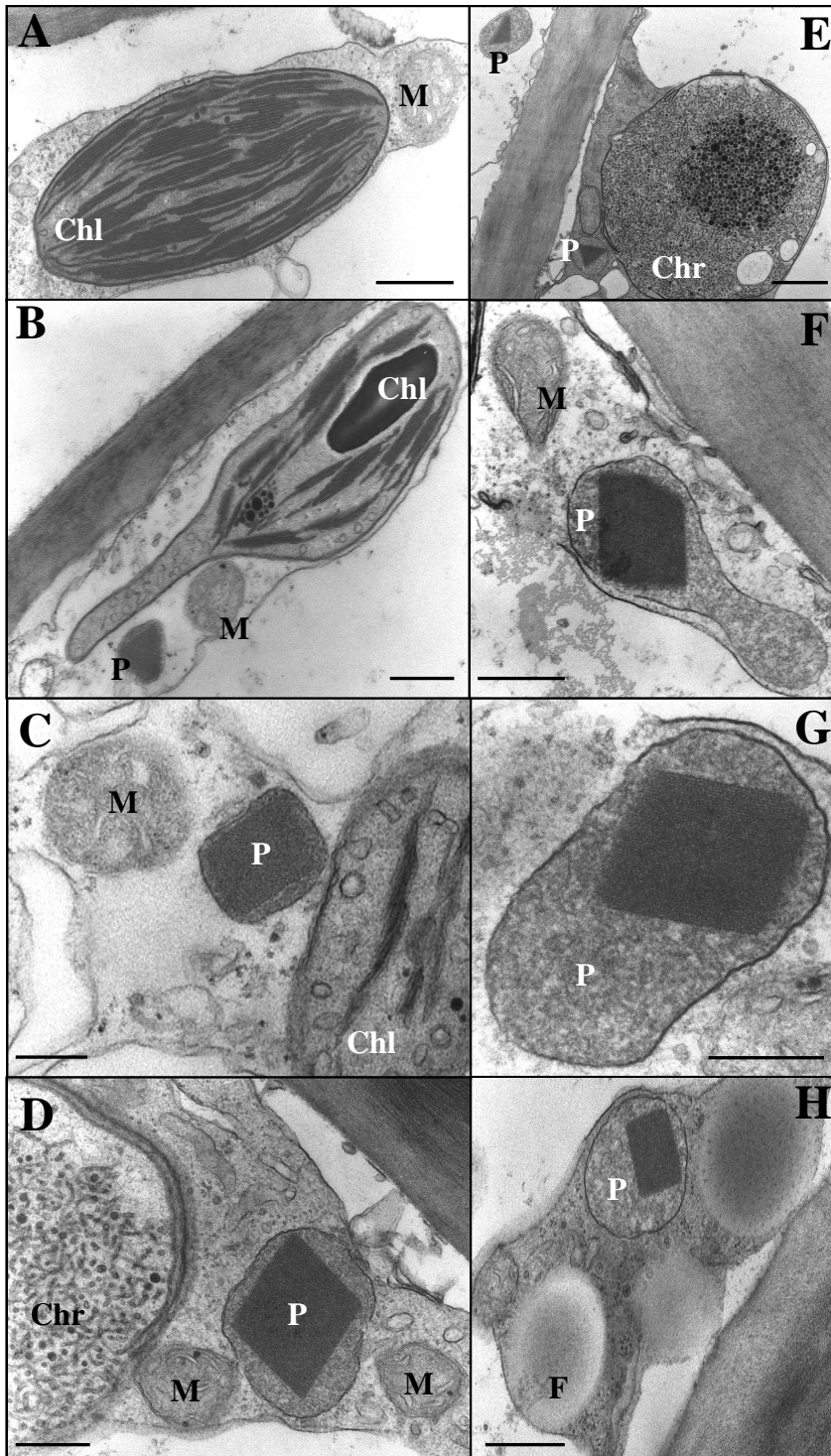


Fig. 4.21. Microscopía electrónica de frutos de pimiento verde (A-C) y rojo (D-H). Chl, cloroplastos; M, mitocondria; P, peroxisomas; Chr, cromoplastos; F, cuerpos grasos. Las barras representan 0.5 μm , excepto en C y G en las que son de 0.25 μm .

4.3.2. Purificación de los peroxisomas de frutos de pimiento

Los peroxisomas se purificaron a partir de frutos de pimientos verdes y rojos, mediante centrifugaciones diferenciales y en gradientes de densidad de sacarosa (Fig. 4.22).

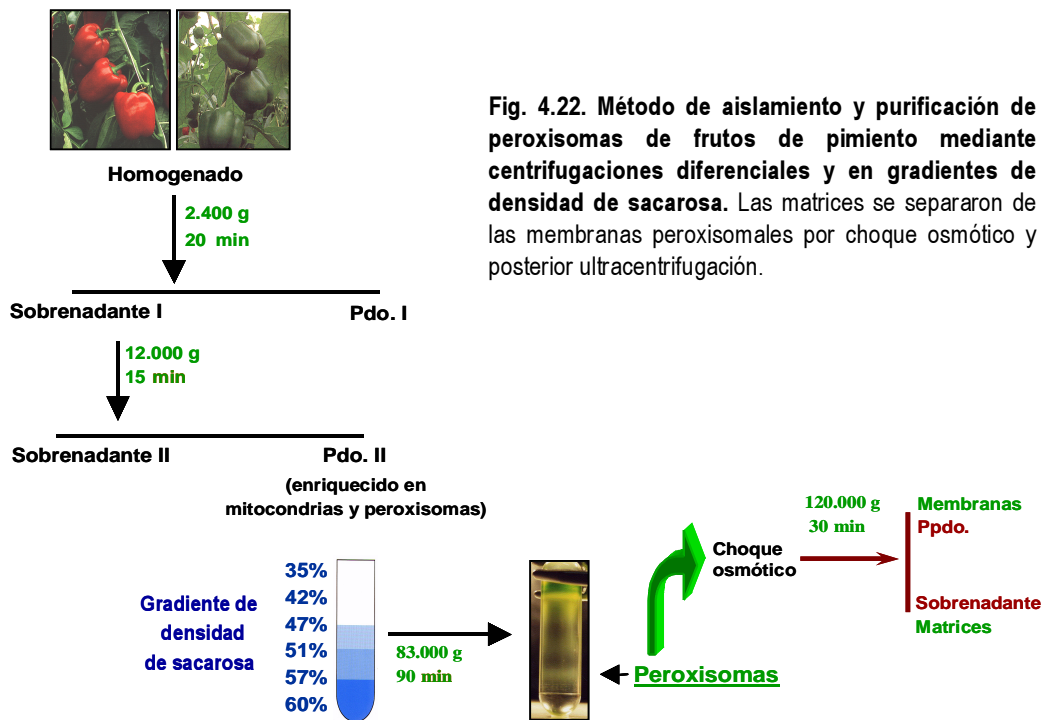


Fig. 4.22. Método de aislamiento y purificación de peroxisomas de frutos de pimiento mediante centrifugaciones diferenciales y en gradientes de densidad de sacarosa. Las matrices se separaron de las membranas peroxisomales por choque osmótico y posterior ultracentrifugación.

Dado que es la primera vez que se acomete la purificación de los peroxisomas de un fruto, se llevó a cabo la caracterización de los gradientes de densidad de sacarosa para poder determinar la zona de migración de los peroxisomas en los mismos y evaluar la contaminación cruzada por otros orgánulos celulares. Para ello se dividió el gradiente de sacarosa de ambos frutos en fracciones de 1,5 ml, por el método descrito en el apartado 3.5. De este modo, se obtuvieron 27 fracciones por cada gradiente, en las que se llevaron a cabo los correspondientes análisis de densidad y contenido proteico, así como la medida de la actividad enzimática de las enzimas marcadoras de orgánulos celulares. Se determinaron catalasa e isocitrato liasa en pimiento verde y rojo, respectivamente, como enzimas marcadoras de peroxisomas, fumarasa para determinar la presencia de mitocondrias, NADPH citocromo *c* reductasa como marcador de retículo endoplasmático, fructosa 1,6-bisfosfatasa para cloroplastos y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa para la localización de cromoplastos. La representación de estos marcadores en las fracciones de los gradientes mostró que la actividad catalasa en pimientos verdes e isocitrato liasa en pimientos rojos se concentraban fundamentalmente en las fracciones 19-22 y se correspondían con sendas bandas que se ubican en el tercio inferior de los gradientes (Fig. 4.23). Como se aprecia en la misma figura, dicha zona de los gradientes apenas mostraba contaminación cruzada con otros orgánulos. Los picos de catalasa e isocitrato liasa se correspondían con un máximo de proteínas y se localizaban en los gradientes a una densidad de equilibrio de 1,24 g cm³ (Fig. 4.24)

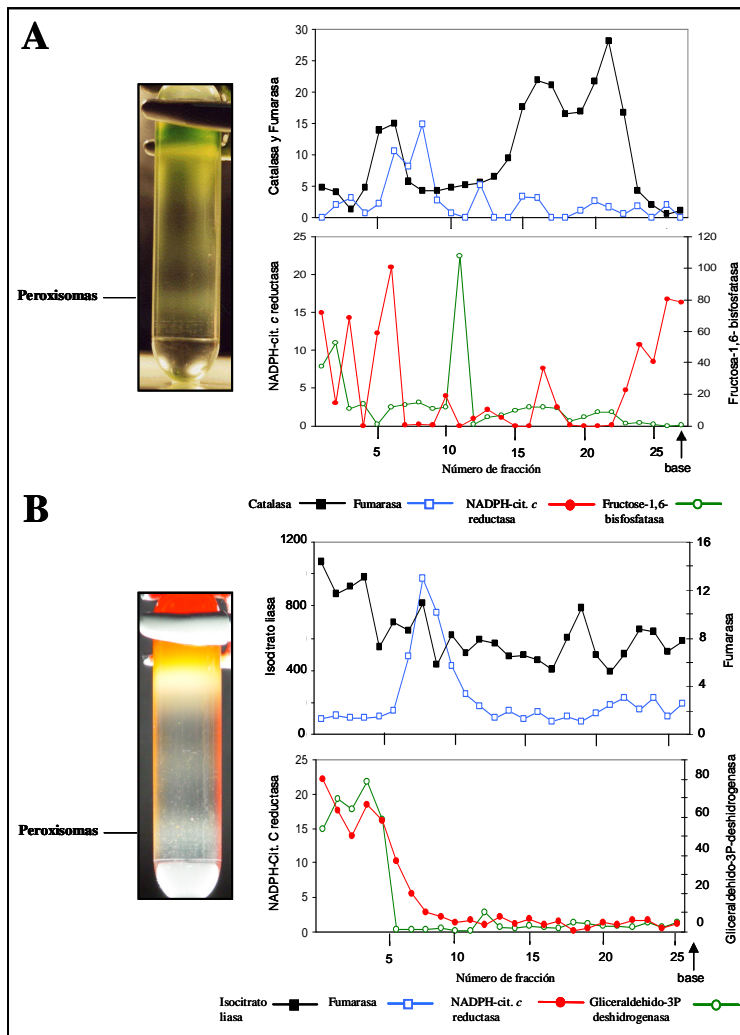


Fig. 4.23. Purificación de peroxisomas de frutos de pimentero verde (A) y rojo (B) en gradientes de densidad de sacarosa. Las bandas de peroxisomas aparecen indicadas por flechas en las fotos. La caracterización de los orgánulos celulares en los gradientes fue realizada usando marcadores enzimáticos específicos de los distintos orgánulos celulares. Catalasa ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$) e isocitrato liasa ($\text{nmol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$) se usaron como marcadores de peroxisomas en frutos verdes y rojos, respectivamente. Se empleó la actividad fumarasa ($\text{mmol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$) como marcador de mitocondrias, la NADPH-cyt c reductasa ($\text{mmol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$) de retículo endoplasmático, la fructosa-1,6-bisfosfatasa ($\text{mmol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$) de cloroplastos y la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa ($\text{nmol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$) de cromoplastos.

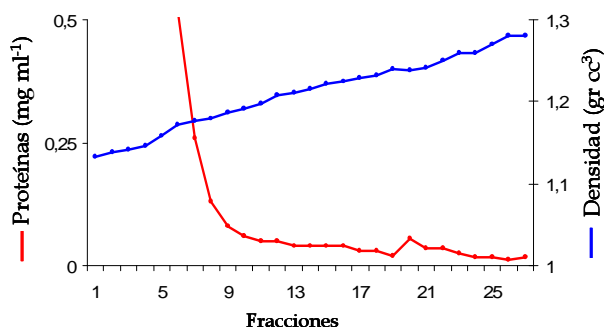


Fig. 4.24. Concentración de proteínas y densidad en los gradientes de densidad de sacarosa.

Una vez localizada la banda de peroxisomas, se extrajo dicha fracción mediante perforación y succión con una jeringa. Posteriormente, se sometieron los peroxisomas a choque osmótico y se centrifugaron para quedarnos con la fracción soluble de dichos orgánulos. En dicha fracción se analizaron las actividades enzimáticas que se describen más adelante.

4.3.3. Morfología de los peroxisomas purificados de frutos de pimiento

Para confirmar la presencia, integridad y grado de pureza de los peroxisomas purificados en los gradientes de densidad, se procedió a su análisis mediante microscopía electrónica. Las imágenes obtenidas mostraron gran cantidad de peroxisomas con cuerpos cristalinos densos a los electrones (Fig. 4.25 A-C) y poca o ninguna contaminación por plastidios o mitocondrias. Además observamos unas estructuras nuevas, con un contenido amorfo envuelto por una membrana sencilla, que podrían derivar de peroxisomas rotos a causa del proceso experimental. De ahí que las llamemos partículas derivadas de peroxisomas (Fig. 4.25. F-G). También se hallaron cuerpos cristalinos libres y/o envueltos por la membrana del peroxisoma (Fig. 4.60 D y E, respectivamente).

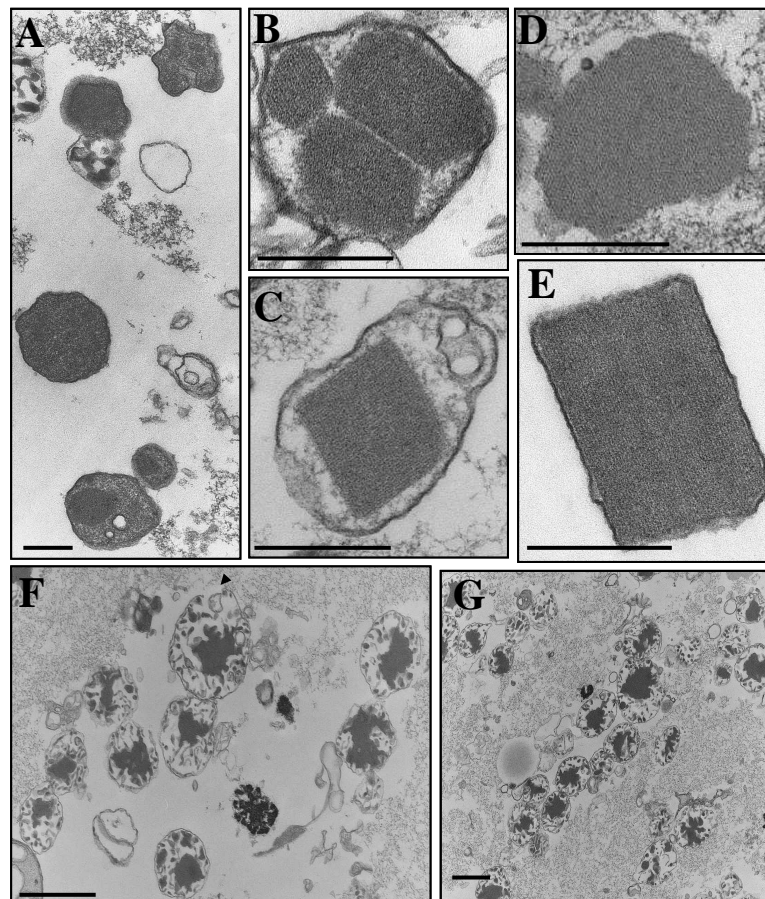


Fig. 4.25. Microscopía electrónica de peroxisomas de frutos de pimiento purificados en los gradientes de densidad de sacarosa. A-C, Peroxisomas que contienen cuerpos cristalinos. D, cuerpo cristalino libre; E, cuerpo cristalino envuelto por una envoltura peroxisomal. F-G, partículas derivadas de peroxisomas rodeadas por una membrana sencilla. La punta de flecha indica la zona de rotura de la membrana. Las barras representan 0.5 μm en los paneles A-E, y 1 μm en los paneles F-G.

4.3.4. Enzimas de la fotorrespiración: GOX y HRP

Con el fin de determinar el tipo de metabolismo presente en los peroxisomas de frutos verdes y rojos, se analizó la actividad de dos enzimas claves en la fotorrespiración, la GOX, enzima generadora de H_2O_2 y la HRP. Tanto la actividad GOX como HRP no fue detectada en peroxisomas de frutos rojos, mientras que sí pudieron ser detectadas en los peroxisomas de frutos verdes (Fig. 4.26).

4.3.5. Enzimas de la β -oxidación: ACOX y TIO

En cuanto a las enzimas de la β -oxidación, se midieron la actividad acil-CoA oxidasa (ACOX), que interviene al comienzo de dicho proceso, y la actividad TIO, que cataliza la última etapa del mismo en los peroxisomas. Los resultados obtenidos indican que la actividad de la enzima TIO no mostraba cambios significativos entre ambos tipos de frutos, mientras que la actividad ACOX era unas 20 veces mayor en peroxisomas de frutos verdes que en los peroxisomas de frutos rojos (Fig. 4.27). Se analizó también el contenido de la enzima TIO mediante transferencia de western usando anticuerpos frente a cotiledones de calabaza, obteniéndose una banda de 45 kDa que era de igual intensidad en ambos tipos de frutos.

4.3.6. Enzimas del ciclo del glioxilato: MS e ICL

En peroxisomas de frutos, la actividad de las enzimas del ciclo del glioxilato, malato sintasa (MS) e isocitrato liasa (ICL), experimentaron un descenso considerable en frutos rojos, del orden de 1,5 y 2 veces, con relación a los peroxisomas de frutos verdes (Fig. 4.28).

4.3.7. Enzimas del metabolismo de ROS: CAT, XOD, GR y SOD

Para estudiar el funcionamiento del metabolismo oxidativo de los peroxisomas de frutos de pimiento durante la maduración, se analizaron las enzimas, catalasa (CAT), xantina oxidasa (XOD), glutathion reductasa (GR) y superóxido dismutasa (SOD). En cuanto a la enzima que intervienen en la eliminación directa del H_2O_2 , catalasa y glutathion reductasa de forma indirecta, se observó una actividad mayor en frutos verdes, del orden de cuatro y cinco veces, con relación a los frutos rojos (Fig. 4.29). Además, se analizó el contenido proteico de la catalasa, mediante la técnica de transferencia de western utilizando un anticuerpo frente a catalasa de cotiledones de calabaza. Los resultados revelaron también un descenso del contenido proteico de CAT en frutos rojos respecto a verdes. La actividad XOD, responsable de la producción del radical $O_2^{\cdot-}$ en la matriz peroxisomal, apenas experimentó cambios durante la maduración de los frutos (Fig. 4.29).

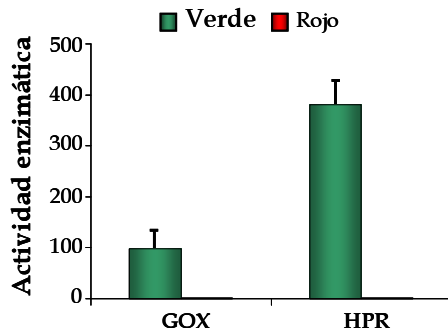


Fig. 4.26. Enzimas de la fotorrespiración en peroxisomas de frutos verdes y rojos de pimiento. La actividad enzimática está expresada en $\text{nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$. GOX, glicolato oxidasa; HPR, hidroxipiruvato reductasa. Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estandar de la media (ESM).

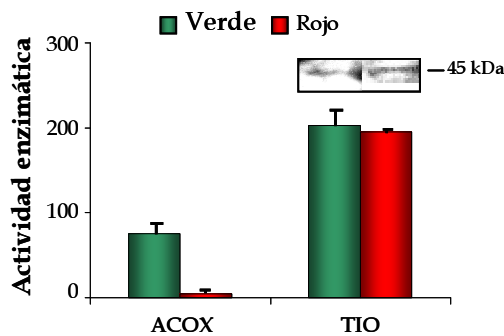


Fig. 4.27. Enzimas de la β -oxidación de ácidos grasos en peroxisomas de frutos verdes y rojos de pimiento. ACOX, acil-CoA oxidasa ($\text{mmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$); TIO, tiolasa ($\text{nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$). La transferencia de western de tiolasa (sobre el gráfico) fue realizada usando un anticuerpo (dilución 1:500) frente a la enzima de cotiledones de calabaza (Kato et al. 1996). Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estandar de la media (ESM).

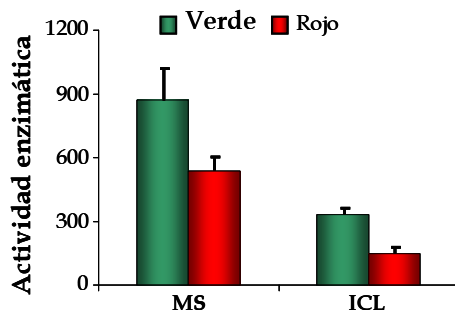


Fig. 4.28. Enzimas del ciclo del glioxilato en peroxisomas de frutos verdes y rojos de pimiento. La actividad enzimática está expresada en $\text{nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$. MS, malato sintasa; ICL, isocitrato liasa. Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estandar de la media (ESM).

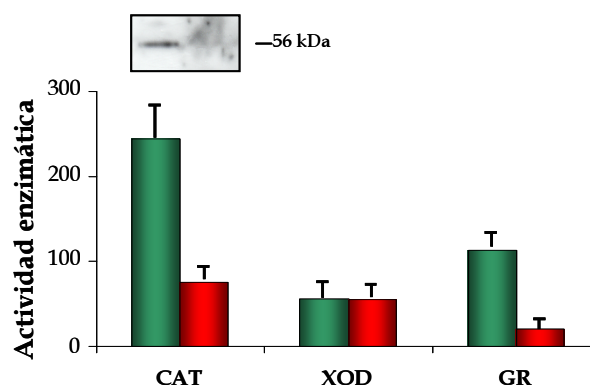


Fig. 4.29. Enzimas del metabolismo de ROS en peroxisomas de frutos verdes y rojos de pimiento. CAT, catalasa ($\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$); XOD, xantina oxidasa ($\text{nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$); GR, glutation reductasa ($\text{nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$). Transferencia de western de catalasa (sobre la gráfica) fue realizada usando un anticuerpo (dilución 1:500) frente a la enzima de cotiledones de calabaza (Yamaguchi et al., 1984). Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estandar de la media (ESM).

Se demostró la presencia de actividad SOD en los peroxisomas de frutos verdes y rojos de pimiento. Se observó que la actividad de esta enzima encargada de eliminar los radicales $O_2^{\cdot-}$ dentro del peroxisoma era mayor en peroxisomas de frutos verdes que en rojos (Fig. 4.30A). El estudio de la actividad SOD mediante EGPA nativa, utilizando inhibidores específicos, mostró que la isoenzima presente en los peroxisomas de ambos frutos era la Mn-SOD y que ésta presentaba un patrón de actividad similar al observado en la actividad total (Fig. 4.30B). La mayor actividad Mn-SOD detectada en los frutos verdes se correspondía con una mayor cantidad proteica de esta isoenzima, en estos frutos, como lo reveló la transferencia de western en la que se usó un anticuerpo frente a la Mn-SOD de hojas de guisante (Fig. 4.30B). En ambos tipos de frutos el tamaño de la subunidad de la Mn-SOD resultó ser de 27 kDa.

4.3.8. NADP-deshidrogenasas: G6PDG, 6PGDH e ICDH

En los peroxisomas de frutos también se estudiaron las enzimas implicadas en la ruta de las pentosas fosfato encargadas de regenerar el NADPH necesario para el funcionamiento del ciclo ascorbato-glutation y para la síntesis de lípidos (del Río et al., 2006). Se observó que la actividad de la G6PDH y la 6PGDH de la matriz peroxisomal de frutos verdes era dos veces superior aproximadamente, con relación a la de frutos rojos. Por otro lado, la actividad de la enzima NADP-ICDH, otra fuente de NADPH, presentaba una actividad elevada en frutos verdes, mientras que no era detectada en frutos rojos (Fig. 4.31).

4.3.9. Contenido en ascorbato y glutacion

Por último, se analizó el contenido de los antioxidantes no enzimáticos ascorbato y glutacion en la matriz peroxisomal y se comparó con la concentración de estos compuestos en los extractos crudos de frutos de pimiento verdes y rojos. El contenido de ascorbato total en extractos crudos de frutos verdes y rojos era similar, siendo del orden de 204 y 221 mg de ascorbato por 100 gr de frutos verdes y rojos, respectivamente. Sin embargo, a nivel peroxisomal, los pimientos rojos presentaban un mayor contenido en ascorbato que los frutos verdes (Tabla 4.1).

Además, se observó que la concentración de glutacion total era 2 veces mayor en extractos crudos de frutos verdes que en rojos, mientras que a nivel peroxisomal ambos tipos de frutos mostraban la misma concentración. Los valores de glutacion de extractos crudos mostrados en la tabla 4.1. corresponden a 5,7 mg de GSH por 100 g de peso fresco de frutos verdes y 3,1 mg de GSH por 100 g de frutos rojos.

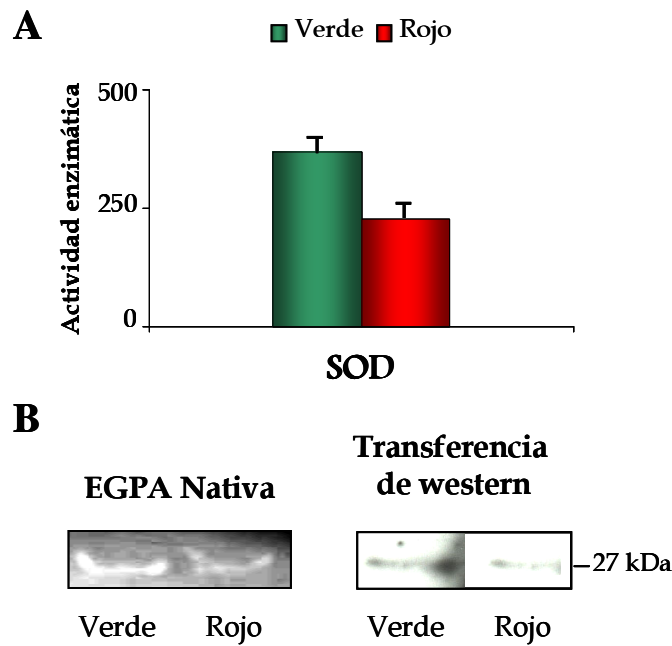


Fig. 4.30. Superóxido dismutasa en peroxisomas de frutos verdes y rojos de pimiento. A, actividad total, expresada como unidades mg^{-1} . Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estandar de la media (ESM). B, EGPA nativa y transferencia de western. Usando distintos inhibidores se demostró que la banda de actividad en geles correspondía a la Mn-SOD. En los ensayos por western blot, se usó un anticuerpo (dilución 1:500) frente a una Mn-SOD de hojas de guisante (Romero-Puertas et al. 1999).

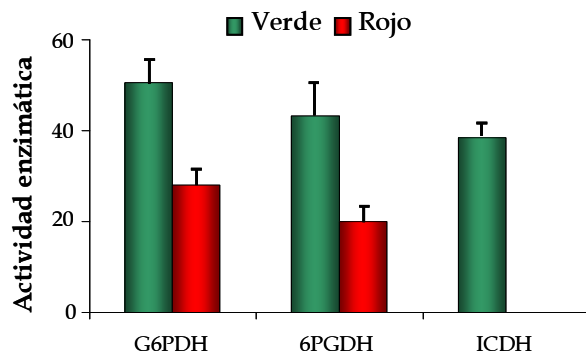


Fig. 4.31. NADP-deshidrogenasas en peroxisomas de frutos de pimientos verdes y rojos. La actividad enzimática está expresada en $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. G6PDH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; 6PGDH, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; ICDH, isocitrato deshidrogenasa. Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estandar de la media (ESM).

Tabla 4.1. Contenido de ascorbato y glutatión total en extractos crudos y peroxisomas de frutos de pimientos rojos y verdes.

	ASC + DHA ($\mu\text{mol/L}$)	GSH+GSSG ($\mu\text{mol/L}$)
Extractos crudos		
Pimiento verde	2406 \pm 505	43,1 \pm 0,9
Pimiento rojo	2612 \pm 108	23,5 \pm 0,2
Peroxisomas		
Pimiento verde	2,9 \pm 0,2	2,3 \pm 0,1
Pimiento rojo	8,8 \pm 0,2	2,1 \pm 0,1

Los resultados proceden de 3 experimentos distintos \pm ESM. ASC, ascorbato reducido; DHA, deshidroascorbato; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado.

4.4. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS DE FRUTOS DE PIMIENTO. EFECTO DE LAS VARIACIONES AMBIENTALES

4.4.1. Condiciones meteorológicas

Se ha llevado a cabo el estudio de los antioxidantes enzimáticos de frutos maduros de diversas variedades de pimiento sometidos a distintas condiciones de temperatura y radiación luminosa a partir de la polinización. Los frutos analizados fueron recolectados en dos periodos distintos de la cosecha: 13 de enero de 2003 (E03) y 13 de febrero de 2003 (F03). Teniendo en cuenta que la polinización ocurre aproximadamente 90 días antes de la recogida en la época invernal, los frutos recogidos el 13 de enero de 2003 corresponden a polinizaciones ocurridas a mediados de octubre, mientras que los recogidos el 13 de febrero de 2003 se gestaron a mediados de noviembre. En la figura 4.32 se representan los valores de temperatura máxima (°C) y radiación solar ($\text{MJ}/\text{m}^2 \cdot \text{día}$) recogidos durante los meses de octubre de 2002 a febrero de 2003 por la Estación Meteorológica de la Mojonera (Almería), próxima al Ejido, donde fueron cosechados los frutos.

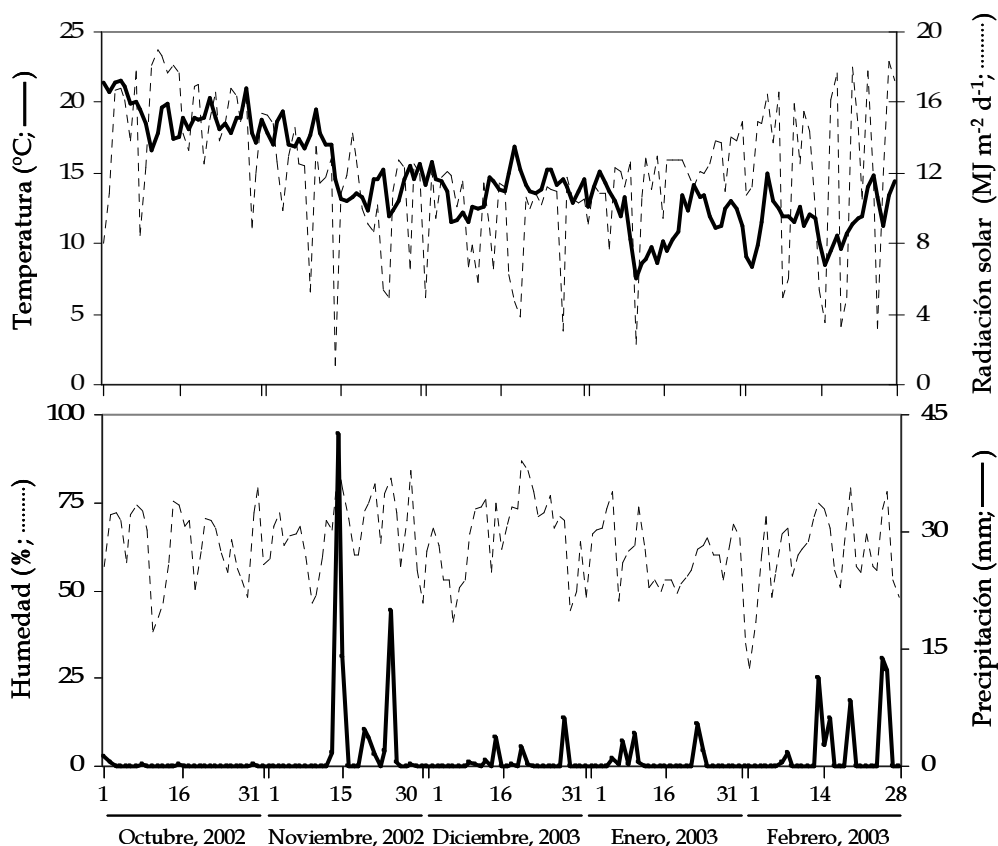


Fig. 4.32. Datos meteorológicos, correspondientes al periodo de octubre de 2002 a febrero de 2003. Las medidas de temperatura media, radiación solar, humedad relativa media y precipitación se registraron en la Estación Meteorológica de La Mojonera (Almería)

4.4.2. Selección de las variedades y diseño experimental

En este estudio se han utilizado frutos de pimiento de 4 variedades distintas: Vergasa, Biela, Galileo y Dulce Italiano. Entre ellos, Vergasa y Biela son frutos de tipo californiana, siendo ambos verdes en su primer estadio de desarrollo que viran a rojo y amarillo, respectivamente, con la maduración. Galileo es un fruto de tipo lamuyo que es verde al principio de su desarrollo y rojo en su estado maduro. La variedad Dulce Italiano pertenece al grupo del mismo nombre y su consumo es preferentemente cuando son verdes (Fig. 4.33).





Tipo	Variedad	Fenotipo
California	Vergasa	
	Biela	
Lamuyo	Galileo	
Dulce italiano	Dulce italiano	

Fig. 4.33. Variedades de pimiento empleadas para el estudio de la influencia de las variaciones ambientales en los antioxidantes del fruto. En cada caso, se indican los tipos de fruto a los que corresponde cada variedad, así como el fenotipo de los frutos en su estado maduro.

Para cada variedad y cosecha estudiada se recolectaron 5 frutos, de los cuales se prepararon distintos extractos que posteriormente fueron analizados. Los resultados obtenidos para los distintos parámetros analizados corresponden a una media de las 5 muestras recogidas.

Para estudiar el efecto ejercido por las variaciones ambientales sobre las enzimas implicadas en el metabolismo oxidativo de la célula se analizaron a nivel bioquímico y molecular las enzimas catalasa, superóxido dismutasa, las del ciclo ascorbato-glutation (ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa y monodeshidroascorbato reductasa) y las deshidrogenasas dependientes de NADP⁺, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa y enzima málico. Igualmente se analizó en las mismas condiciones la galactono- γ -lactona deshidrogenasa.

Para los estudios de expresión de las distintas enzimas antioxidantes, se seleccionó el gen de la *actina* como patrón interno para la técnica de PCR semicuantitativa y PCR cuantitativa a tiempo real tras comprobar que dicho gen se expresaba constitutivamente en las muestras de pimiento con las que íbamos a trabajar (Fig. 4.34). Debido a que la secuencia de cDNA de la *actina* de pimiento no se conocía aún, se diseñaron cebadores para dicho gen mediante el alineamiento de distintas secuencias nucleotídicas de *actina* depositadas en las bases de datos. Se seleccionó una pareja de cebadores (F-ACT y R-ACT) en base a las zonas interespecíficas conservadas (tabla 3.4). Con estos cebadores, se

obtuvo un fragmento de 573 pares de bases, que se clonó en el vector pGEM-T Easy y se secuenció. La secuencia obtenida se depositó en la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov; número de acceso AY572427). Esta secuencia compartía una identidad del 93% con la secuencia conocida de cDNA de *actina* de *Nicotiana tabacum* y un 95% con la de *Solanum tuberosum* (Anexo I, Fig. 1).

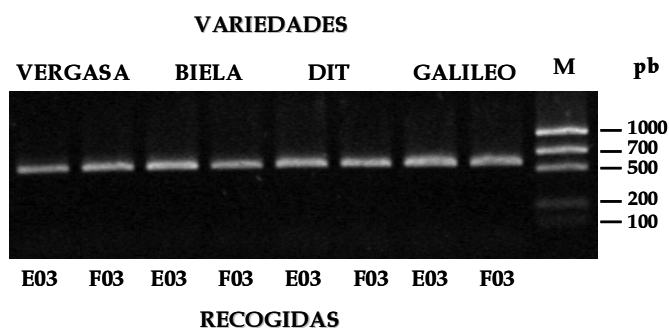


Fig. 4.34. Expresión del mRNA del gen de la *actina* de frutos de cuatro variedades de pimiento analizados por PCR. Los ensayos de expresión se llevaron a cabo en las variedades Vergasa, Biela, Dulce italiano (DIT) y Galileo en frutos cosechados a mediados de enero y de febrero de 2003 (E03 y F03, respectivamente). M, marcadores de tamaño molecular.

En la Fig. 1 del Anexo II se muestran las condiciones establecidas para los estudios de expresión mediante PCR semicuantitativa, como el número de ciclos utilizados para cada pareja de cebadores utilizados en cada caso, así como el tamaño de banda esperado y el número de acceso de la secuencia de cDNA parcial.

4.4.3. Catalasa

4.4.3.1. Actividad total

Se analizó la actividad catalasa (CAT) en frutos de pimiento de las variedades Vergasa, Biela, Galileo y Dulce Italiano sometidos a variaciones ambientales (E03 y F03) (Fig. 4.35). La actividad CAT no experimentó variación ($p > 0,05$) entre los frutos E03 y F03 en las variedades Dulce Italiano y Galileo, mientras que en Vergasa la actividad CAT aumentó significativamente ($p < 0,005$) en los frutos F03 respecto a los E03. En Biela la actividad CAT disminuyó ($p < 0,01$) en los frutos F03 respecto a los E03. Entre variedades y teniendo en cuenta sólo a los frutos E03, pudimos observar que la actividad catalasa en las variedades Biela y Dulce Italiano era superior ($p < 0,05$) a la que mostraban los frutos de Vergasa y Galileo. En la cosecha F03 los frutos de la variedad Galileo presentaron menos actividad CAT que los de las otras variedades estudiadas.

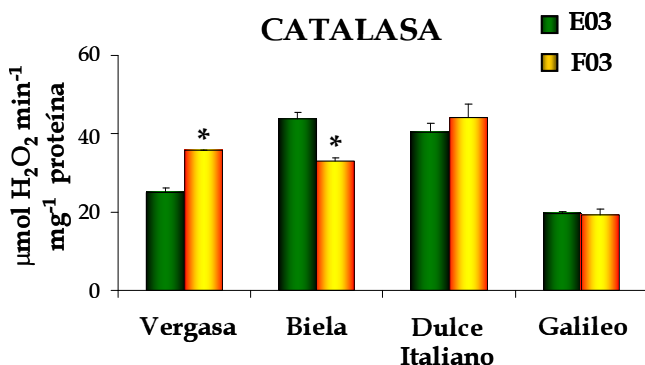


Fig. 4.35. Actividad catalasa en frutos de distintas variedades de pimiento. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en las variedades Vergasa, Biela, Dulce italiano y Galileo en frutos cosechados a mediados de enero y de febrero de 2003 (E03 y F03, respectivamente). El asterisco indica los cambios estacionales significativos con respecto a los frutos E03 en cada variedad analizada. Los valores indicados son la media de 5 experimentos \pm el error estandar de la media (ESM).

4.4.3.2. Expresión de mRNA

Mediante RT-PCR semicuantitativa, se analizaron los niveles de mRNA de la CAT de frutos de pimiento de las variedades y condiciones descritas anteriormente. En principio, se diseñaron cebadores específicos para la *catalasa* (F-CAT y R-CAT), a partir de la secuencia conocida de cDNA de *catalasa* de pimiento depositada en la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov; número de acceso AF227952). En la tabla 3.4 se mostraron los cebadores específicos utilizados en los estudios de expresión mediante PCR semicuantitativa.

Para comprobar la fiabilidad de estos cebadores, se subclonó y secuenció la zona amplificada de 418 pares de bases (Anexo II, Fig. 2A). La secuencia obtenida compartía una identidad del 100% con la secuencia del cDNA de la *catalasa* de *Capsicum annuum* L. depositada en la base de datos.

Se establecieron las condiciones más apropiadas para los análisis de RT-PCR semicuantitativa, empleando como control interno la *actina*. En este diseño ha de considerarse que la cantidad de DNA amplificado se encuentre en fase exponencial, tanto para la CAT como para la *actina*. En nuestro caso, el número de ciclos para la CAT fue de 24, y de 28 para la *actina* y una temperatura de hibridación de 55°C en ambos casos (Anexo II, Fig. 2B).

La Figura 4.36 representa los resultados de expresión de la CAT de pimiento obtenidos mediante PCR semicuantitativa en las distintas variedades de pimiento y variaciones ambientales estudiadas. La Figura 4.36A nos permite analizar la expresión de la CAT de pimiento entre los frutos E03 y F03 (las calibraciones, en cada una de las variedades, se hicieron en base a los frutos E03 a los que se asignaron valor 1) y la Figura 4.36B nos permite comparar la expresión de CAT entre variedades (todos los valores se refirieron al fruto E03 de Galileo al que se asignó como valor 1). La expresión de CAT en la variedad Galileo experimentó una disminución del 80% en el fruto F03 respecto al E03 (Fig. 4.36A). Entre variedades (Fig. 4.36B), se observó que la expresión de CAT fue significativamente inferior ($p < 0,05$) en frutos de pimiento de la variedad Galileo que en las otras variedades estudiadas. Esta diferencia fue mayor ($p < 0,005$) en F03 que en E03.

4.4.4. Superóxido dismutasa

4.4.4.1. Actividad total

Se estudió la actividad superóxido dismutasa (SOD) total en frutos de pimiento de las variedades Vergasa, Biela, Galileo y Dulce Italiano sometidos a cambios estacionales (E03 y F03) mediante el método espectrofotométrico de reducción del citocromo *c*. La actividad SOD descendió significativamente ($p < 0,01$) en los frutos F03 respecto a los E03 de la variedad Dulce Italiano, mientras que en la variedad Vergasa dicha actividad aumentó ($p < 0,01$) en los frutos F03 respecto a los E03. Por otro lado, la actividad SOD fue

significativamente mayor ($p < 0,005$) en frutos de la variedad Biela en ambas recogidas que en las otras variedades analizadas (Fig. 4.37).

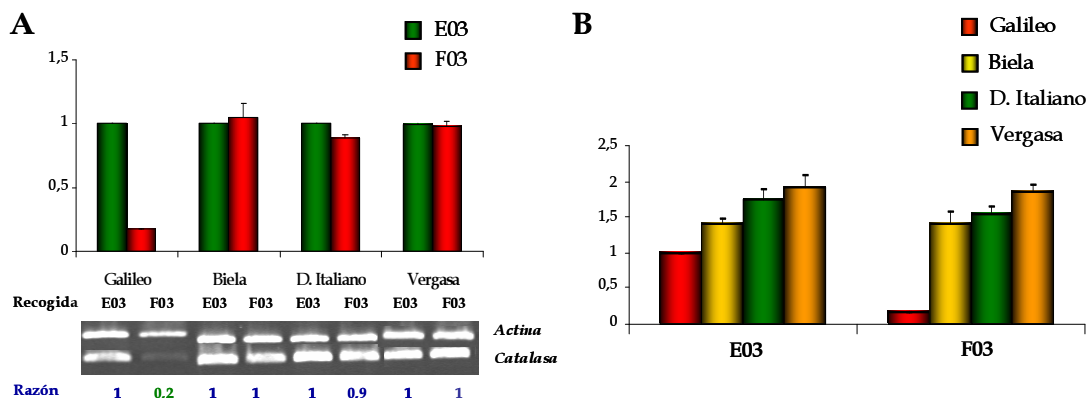


Fig. 4.36. Expresión diferencial de *catalasa* de frutos de las variedades Galileo, Biela, Dulce italiano y Vergasa sometidos a cambios ambientales. Los frutos de las variedades se recogieron a mediados de enero y febrero de 2003 (E03 y F03, respectivamente). El análisis se realizó por RT-PCR semicuantitativa a partir del RNA total aislado de los frutos de pimiento de las variedades y condiciones mencionadas. Los productos de amplificación fueron visualizados con bromuro de etidio y luz ultravioleta en gels de agarosa. A, efecto de la cosecha en la expresión de *catalasa*. La razón indica los niveles relativos del producto de amplificación de la *catalasa* sobre la *actina* usada como control interno después de su normalización, y se expresa en el número de veces respecto al control, al que se asignó el valor de 1 en cada variedad. Los datos son media de al menos tres experimentos diferentes. Valores inferiores a 0,8 y superiores a 1,2 se consideran que muestran diferencias significativas en la expresión. B, efecto de la variedad en la expresión de *catalasa*. Los valores representados se obtuvieron por referencia a los datos de Galileo E03, al que se asignó el valor 1.

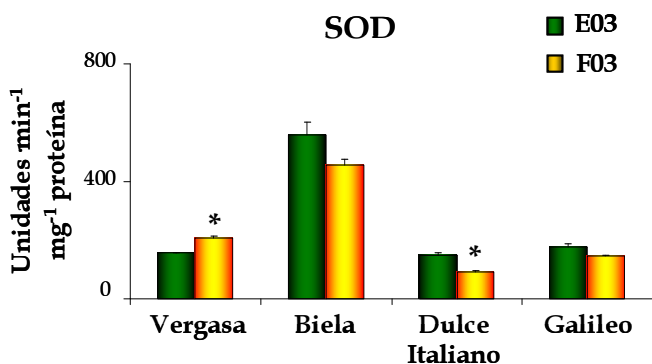


Fig. 4.37. Actividad superóxido dismutasa (SOD) en frutos de distintas variedades de pimiento. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en las variedades Vergasa, Biela, Dulce italiano y Galileo en frutos cosechados a mediados de enero y de febrero de 2003 (E03 y F03, respectivamente). El asterisco indica los cambios estacionales significativos con respecto a los frutos E03 en cada variedad analizada. Los valores indicados son la media de 5 experimentos \pm el error estándar de la media (ESM).

4.4.4.2. Isoenzimas

El ensayo de la actividad isoenzimática se llevó a cabo mediante la técnica de EGPA-nativa (Fig. 4.38A). Se identificaron 4 isoformas de movilidad creciente que por su sensibilidad a inhibidores se correspondían con una Mn-SOD, una Fe-SOD y dos CuZn-SODs designadas I y II en base a su creciente movilidad en el gel. Según este estudio observamos que la actividad Fe-SOD fue ligeramente menor en los frutos F03 que en los frutos E03 de las variedades analizadas. Además, se detectaron ligeras diferencias entre las movilidades de las bandas de la CuZn-SOD II en la cosecha F03 de Biela y Dulce Italiano con respecto a los frutos E03. Para una mejor resolución y separación de las CuZn-

SODs se utilizó la técnica de isoelectroenfoque (Fig. 4.38B). En las muestras de la cosecha E03 de Biela y Dulce Italiano se detectaron tres isoenzimas con actividad CuZn-SOD, mientras que en la cosecha F03 de Biela sólo se detectó una CuZn-SOD que se correspondía con la banda intermedia de E03. Hasta ahora no se ha podido establecer una correspondencia entre las CuZn-SODs detectadas por EGPA-nativa y por isoelectroenfoque en frutos de pimienta.

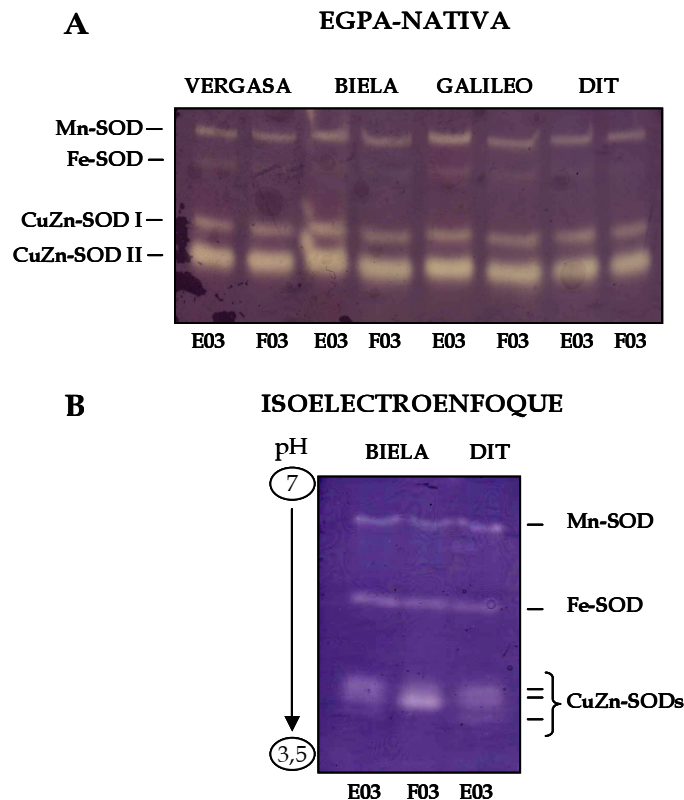


Fig. 4.38. Actividad isoenzimática superóxido dismutasa (SOD) en frutos de pimienta de distintas variedades sometidas a variaciones ambientales. Los frutos de las variedades Vergasa, Biela, Galileo y Dulce italiano (DIT) se recogieron a mediados de enero y febrero de 2003 (E03 y F03, respectivamente). A, EGPA-nativa de extractos crudos de pimienta (100 µg/pocillo). B, isoelectroenfoque de extractos crudos de frutos de pimienta (100 µg/pocillo). Se indican el rango de pH empleado. En ambos casos se muestran las isoenzimas detectadas caracterizadas en base al empleo de los inhibidores KCN y H₂O₂.

4.4.4.3. Expresión de mRNA

Se utilizó la técnica de PCR semicuantitativa para el estudio de la expresión de las distintas isoformas de SOD en frutos de pimienta de distintas variedades sometidas a variaciones ambientales (E03 y F03). Para ello se diseñaron cebadores específicos (Tabla 3.4), a partir de la secuencia de cDNA de *Mn-SOD* (número de acceso: AF036936), *Fe-SOD* (número de acceso: AY173123) y *CuZn-SOD* (número de acceso: AF009734) de frutos de *Capsicum annuum* L. depositadas en la base de datos del NCBI. Con estos cebadores y mediante RT-PCR se obtuvieron 3 fragmentos de 314, 352 y 459 pares de bases, respectivamente (Anexo II, Fig. 3A), que se clonaron en el vector pGEM-T Easy y se

secuenciaron. Estas secuencias compartían una homología del 100%, con las secuencias conocidas de *Mn-SOD*, *Fe-SOD* y *CuZn-SOD* de fruto de *Capsicum annuum L.*

Para el análisis por RT-PCR semicuantitativa se utilizó como patrón interno la *actina*. Considerando que la cantidad de DNA amplificada debía estar dentro de la fase exponencial de amplificación se realizó la prueba de ciclos para las *SODs* y para la *actina*. En este caso, el número de ciclos fue de 28 para la *actina* y de 28, 28 y 24 para la *Mn-SOD*, *Fe-SOD* y *CuZn-SOD*, respectivamente (Anexo II, Fig. 3B). Tras establecer las condiciones apropiadas, se analizó la expresión de las *SODs* de los frutos de pimiento. Las figuras 4.39A, 4.40A y 4.41A nos permiten analizar la expresión de las distintas *SODs* de pimiento entre los frutos E03 y F03 (las calibraciones, en cada una de las variedades, se hicieron en base a los frutos E03; valor 1) y las Figuras 4.39B, 4.40B y 4.41B nos permite comparar la expresión de las *SODs* entre variedades (todos los valores se refieren al fruto E03 de Galileo; valor 1). La expresión de la *Mn-SOD* (Fig. 4.39) fue menor en frutos F03 que en frutos E03 de la variedad Vergasa. La expresión de la *Mn-SOD* en las otras variedades estudiadas no presentaron diferencias significativas entre los frutos E03 y F03. Tampoco se observaron diferencias significativas en la expresión de la *Mn-SOD* entre variedades (Fig. 4.39B). La expresión de la *Fe-SOD* (Fig. 4.40) sólo mostraba diferencias significativas en los frutos de la variedad Dulce Italiano, donde dicha enzima se expresaba menos en frutos F03 que en los E03. En cuanto a la *CuZn-SOD* (Fig. 4.41), se detectó un aumento de su expresión en frutos de la variedad Vergasa respecto a las otras variedades en ambas cosechas E03 y F03.

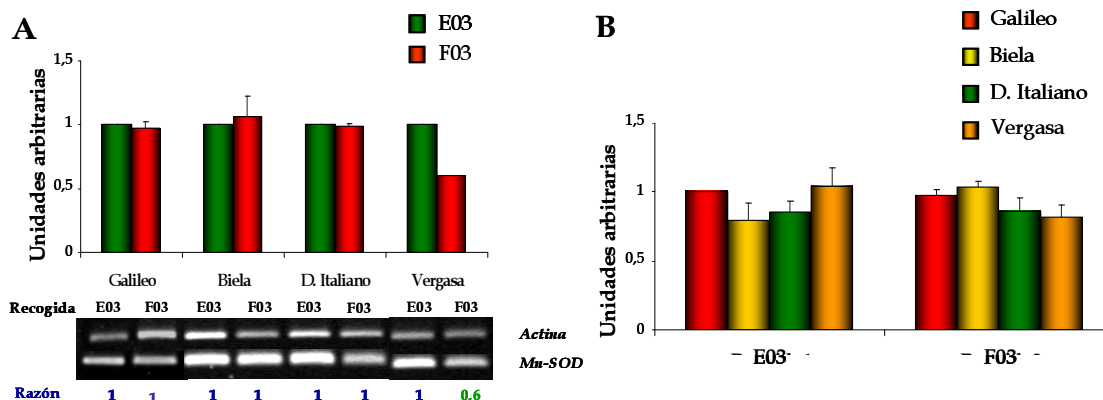


Fig. 4.39. Expresión diferencial de *Mn-SOD* de frutos de las variedades Galileo, Biela, Dulce italiano y Vergasa sometidos a cambios ambientales. Los frutos de las variedades se recogieron a mediados de enero y febrero de 2003 (E03 y F03, respectivamente). El análisis se realizó por RT-PCR semicuantitativa a partir del RNA total aislado de los frutos de pimiento de las variedades y condiciones mencionadas. Los productos de amplificación fueron visualizados con bromuro de etidio y luz ultravioleta en geles de agarosa. A, efecto de la cosecha en la expresión de *Mn-SOD*. La razón indica los niveles relativos del producto de amplificación de la *Mn-SOD* sobre la *actina* usada como control interno después de su normalización, y se expresa en el número de veces respecto al control, al que se asignó el valor de 1 en cada variedad. Los datos son media de al menos tres experimentos diferentes. Valores inferiores a 0,8 y superiores a 1,2 se consideran que muestran diferencias significativas en la expresión. B, efecto de la variedad en la expresión de *Mn-SOD*. Los valores representados se obtuvieron por referencia a los datos de Galileo E03, al que se asignó el valor 1.

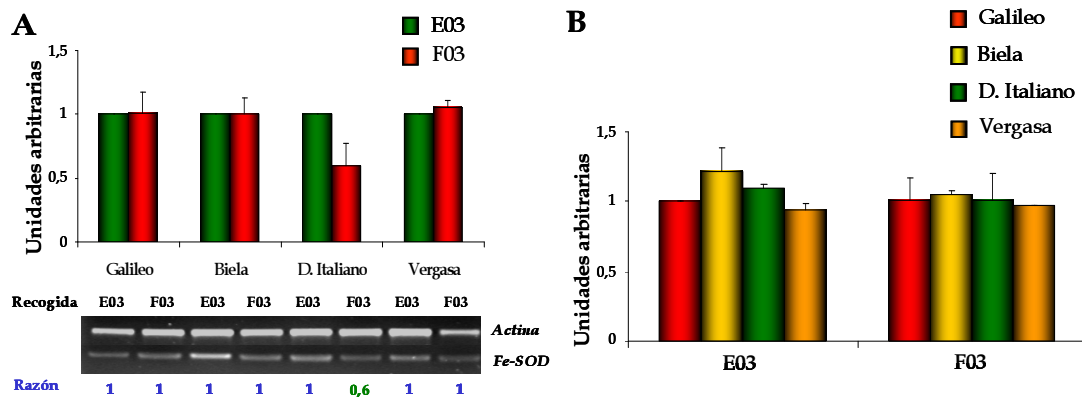


Fig. 4.40. Expresión diferencial de *Fe-SOD* de frutos de las variedades Galileo, Biela, Dulce italiano y Vergasa sometidos a cambios ambientales. Los frutos de las variedades se recogieron a mediados de enero y febrero de 2003 (E03 y F03, respectivamente). El análisis se realizó por RT-PCR semicuantitativa a partir del RNA total aislado de los frutos de pimienta de las variedades y condiciones mencionadas. Los productos de amplificación fueron visualizados con bromuro de etidio y luz ultravioleta en geles de agarosa. A, efecto de la cosecha en la expresión de *Fe-SOD*. La razón indica los niveles relativos del producto de amplificación de la *Fe-SOD* sobre la *actina* usada como control interno después de su normalización, y se expresa en el número de veces respecto al control, al que se asignó el valor de 1 en cada variedad. Los datos son media de al menos tres experimentos diferentes. Valores inferiores a 0,8 y superiores a 1,2 se consideran que muestran diferencias significativas en la expresión. B, efecto de la variedad en la expresión de *Fe-SOD*. Los valores representados se obtuvieron por referencia a los datos de Galileo E03, al que se asignó el valor 1.

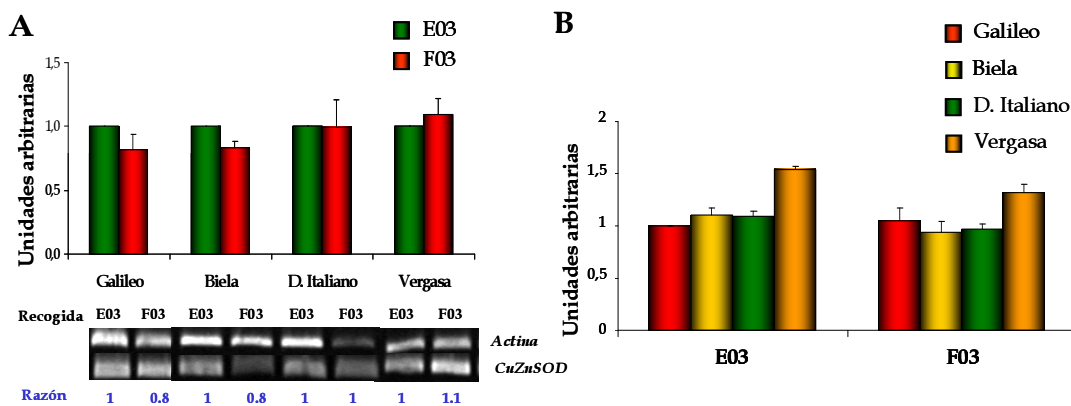


Fig. 4.41. Expresión diferencial de *CuZn-SOD* de frutos de las variedades Galileo, Biela, Dulce italiano y Vergasa sometidos a cambios ambientales. Los frutos de las variedades se recogieron a mediados de enero y febrero de 2003 (E03 y F03, respectivamente). El análisis se realizó por RT-PCR semicuantitativa a partir del RNA total aislado de los frutos de pimienta de las variedades y condiciones mencionadas. Los productos de amplificación fueron visualizados con bromuro de etidio y luz ultravioleta en geles de agarosa. A, efecto de la cosecha en la expresión de *CuZn-SOD*. La razón indica los niveles relativos del producto de amplificación de la *CuZn-SOD* sobre la *actina* usada como control interno después de su normalización, y se expresa en el número de veces respecto al control, al que se asignó el valor de 1 en cada variedad. Los datos son media de al menos tres experimentos diferentes. Valores inferiores a 0,8 y superiores a 1,2 se consideran que muestran diferencias significativas en la expresión. B, efecto de la variedad en la expresión de *CuZn-SOD*. Los valores representados se obtuvieron por referencia a los datos de Galileo E03, al que se asignó el valor 1.

4.4.5. Ascorbato peroxidasa

4.4.5.1. Actividad total

El estudio de la actividad ascorbato peroxidasa (APX) en frutos de pimiento de distintas variedades sometidos a variaciones ambientales (E03 y F03), muestra que dicha actividad era superior en las variedades Vergasa, Biela y Galileo que en la variedad Dulce Italiano. A su vez, dicha actividad se incrementaba en los frutos E03 respecto a los F03 en las variedades Vergasa y Biela. Este fenómeno se invirtió en la variedad Galileo, donde la APX disminuyó durante F03 (Fig. 4.42).

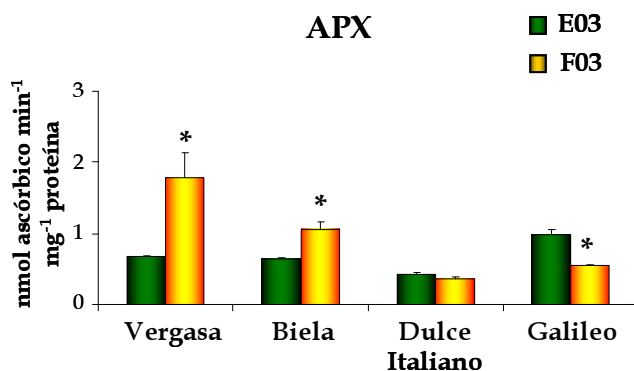


Fig. 4.42. Actividad ascorbato peroxidasa (APX) en frutos de distintas variedades de pimiento. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en las variedades Vergasa, Biela, Dulce italiano y Galileo en frutos cosechados a mediados de enero y de febrero de 2003 (E03 y F03, respectivamente). El asterisco indica los cambios estacionales significativos con respecto a los frutos E03 en cada variedad analizada. Los valores indicados son la media de 5 experimentos \pm el error estándar de la media (ESM).

4.4.5.2. Expresión de mRNA

Se analizó la expresión del gen de la APX mediante la técnica de PCR semicuantitativa. Para ello se diseñó una pareja de cebadores específicos para la APX de fruto de pimiento (*Capsicum annuum* L.) a partir de la secuencia depositada en la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov; número de acceso X81376). Con el fin de comprobar la fiabilidad de los cebadores, la banda obtenida, de 485 pb, se amplificó por la técnica de PCR (Anexo II, Fig. 4), se ligó al vector pGEM-T Easy y se secuenció obteniendo así una secuencia con un 100% de identidad con la secuencia de APX de *Capsicum annuum* L. depositada en la base de datos.

Posteriormente se analizó el número de ciclos de la PCR necesarios para alcanzar la fase exponencial de amplificación para cada pareja de cebadores (Anexo II, Fig. 4). Para la *actina* se utilizaron 28 ciclos y para la APX 24. La temperatura de hibridación utilizada fue de 55°C. Con estas condiciones se llevó a cabo el estudio de la expresión de la APX en los frutos de pimiento indicados anteriormente (Fig. 4.43). La figura 4.43A nos permite analizar la expresión de la APX entre los frutos E03 y F03 de cada variedad (las calibraciones, en cada una de las variedades, se hicieron en base a los frutos E03; valor 1) y la Figura 4.43B nos permite comparar la expresión de la APX entre variedades (todos los valores se refieren al fruto E03 de Galileo; valor 1). Tan sólo se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de la APX de frutos de la variedad Biela, donde la expresión de dicha enzima aumentó en F03 respecto a E03. Este aumento de expresión

coincidió con el aumento de actividad APX en dicha muestra (Fig. 4.42). Entre variedades, la expresión de la APX no experimentó diferencias significativas.

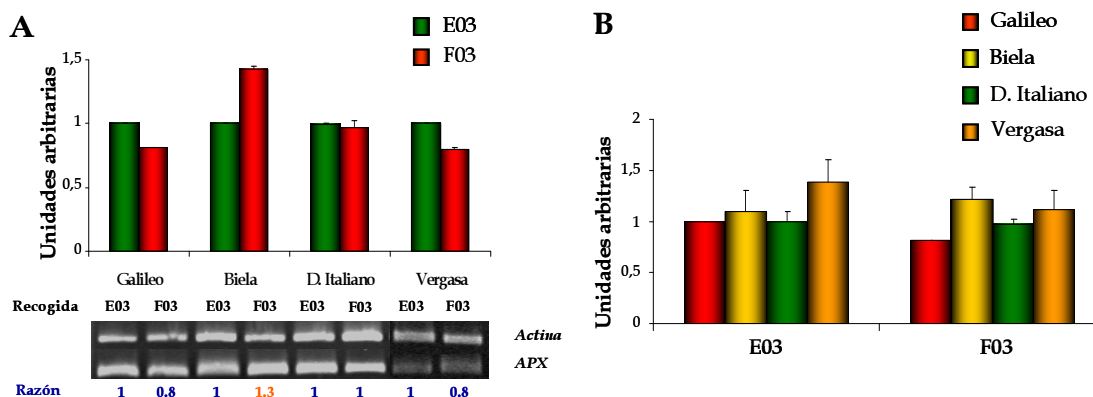


Fig. 4.43. Expresión diferencial de ascorbato peroxidasa (APX) de frutos de las variedades Galileo, Biela, Dulce italiano y Vergasa sometidos a cambios ambientales. Los frutos de las variedades se recogieron a mediados de enero y febrero de 2003 (E03 y F03, respectivamente). El análisis se realizó por RT-PCR semicuantitativa a partir del RNA total aislado de los frutos de pimienta de las variedades y condiciones mencionadas. Los productos de amplificación fueron visualizados con bromuro de etidio y luz ultravioleta en geles de agarosa. A, efecto de la cosecha en la expresión de APX. La razón indica los niveles relativos del producto de amplificación de la APX sobre la *actina* usada como control interno después de su normalización, y se expresa en el número de veces respecto al control, al que se asignó el valor de 1 en cada variedad. Los datos son media de al menos tres experimentos diferentes. Valores inferiores a 0,8 y superiores a 1,2 se consideran que muestran diferencias significativas en la expresión. B, efecto de la variedad en la expresión de APX. Los valores representados se obtuvieron por referencia a los datos de Galileo E03, al que se asignó el valor 1.

4.4.6. Glutathion reductasa (GR)

4.4.6.1. Actividad total

Se llevó a cabo el análisis de la actividad glutathion reductasa (GR) en las distintas variedades de pimienta y variaciones ambientales descritas con anterioridad (Fig. 4.44). La actividad GR descendió significativamente ($p < 0,005$) en frutos de pimienta de la cosecha F03 respecto a la de E03 en todas las variedades estudiadas. La actividad GR fue mayor ($p < 0,005$) en frutos de la variedad Biela que en las otras variedades estudiadas, tanto en las condiciones E03 como en las F03. A su vez, es destacable, la presencia de menor actividad glutathion reductasa en los frutos de la variedad Dulce Italiano respecto a las demás variedades, al igual que ocurría con la actividad ascorbato peroxidasa.

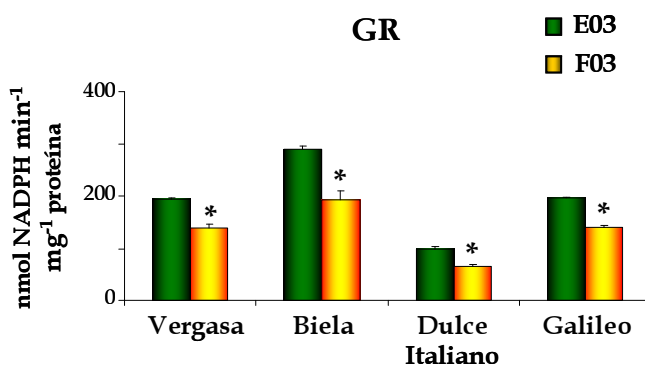


Fig. 4.44. Actividad glutathion reductasa (GR) en frutos de distintas variedades de pimienta. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en las variedades Vergasa, Biela, Dulce italiano y Galileo en frutos cosechados a mediados de enero y de febrero de 2003 (E03 y F03, respectivamente). El asterisco indica los cambios estacionales significativos con respecto a los frutos E03 en cada variedad analizada. Los valores indicados son la media de 5 experimentos \pm el error estándar de la media (ESM).

4.4.6.2. Aislamiento del cDNA parcial

Para obtener la secuencia del clon parcial de la GR de frutos de pimiento se llevó a cabo el diseño de una pareja de cebadores degenerados para dicho gen. El diseño de dichos cebadores se realizó mediante el alineamiento de secuencias conocidas de *glutathione reductase* de otras especies como *Nicotiana tabacum* y *Lycopersicum esculentum*, utilizando para ello el programa OMIGA 2 (Oxford Molecular). Con este par de cebadores, F-GR1 y R-GR1 (Tabla 3.3), y mediante RT-PCR se obtuvo una banda de 509 pb (Anexo II, Fig. 5A) que se ligó al vector pGEM T easy, se clonó y se secuenció. La secuencia obtenida fue depositada en las bases de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov; número de acceso AY547351) y presentaba un 84% y 82% de identidad con la secuencia de la *glutathione reductase* citosólica de *Pisum sativum* y *Arabidopsis thaliana*, respectivamente (Anexo I, Fig. 2). A partir de la secuencia de GR de pimiento obtenida, se diseñaron unos cebadores específicos, F-GR2 y R-GR2 (Tabla 3.4) que fueron utilizados a continuación en los estudios de expresión de dicho gen en los frutos de pimiento.

4.4.6.3. Expresión de mRNA

Los estudios de expresión del gen de la GR se llevaron a cabo mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativa. Para dicho análisis se utilizaron los cebadores específicos para la GR obtenidos anteriormente y los de la *actina* como patrón interno (Tabla 3.4). Mediante RT-PCR se analizaron los números de ciclos y temperatura de hibridación que determinaban la fase exponencial de amplificación. En el caso de la *actina*, se utilizaron 28 ciclos, al igual que para la *glutathione reductase* (Anexo II, Fig. 5B) y la temperatura de hibridación utilizada fue de 55°C en ambos casos. La Figura 4.45A muestra la expresión de la GR entre los frutos E03 y F03 (las calibraciones, en cada una de las variedades, se hicieron en base a los frutos E03; valor 1) y la Figura 4.45B representa la expresión de la GR entre variedades (todos los valores están referidos al fruto E03 de Galileo; valor 1). Estos resultados nos indican que la expresión de dicha enzima no variaba significativamente entre E03 y F03, salvo en la variedad Galileo donde la expresión de la GR era menor en F03 que en E03. La expresión de la GR no mostró diferencias entre variedades en las dos cosechas analizadas (Fig. 4.45B).

4.4.7. Monodeshidroascorbato reductasa

4.4.7.1. Aislamiento del cDNA parcial

Para la obtención del clon parcial del gen de la *monodeshidroascorbato reductasa* (MDAR) se utilizó la pareja de cebadores F-MDAR1 y R-MDAR1 (Fig. 3.3). Estos cebadores se diseñaron mediante el alineamiento con el programa OMIGA 2 de secuencias de MDAR de *Lycopersicum esculentum* y *Pisum sativum*. Mediante RT-PCR se obtuvo una sola banda de 279 pb (Anexo II, Fig. 6A) que se ligó al vector pGEM-T Easy, se clonó y secuenció. La secuencia del clon parcial de la monodeshidroascorbato reductasa de *Capsicum annuum* L.

presentaba una identidad del 88% y del 80% con la secuencia de la *MDAR* de *Arabidopsis thaliana* y *Pisum sativum*, respectivamente (Anexo I, Fig. 3). Esta secuencia fue depositada en las bases de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov; AY652702). A partir de esta secuencia se diseñaron cebadores específicos (F-MDAR2 y R-MDAR2) que fueron utilizados posteriormente en los estudios de expresión mediante PCR semicuantitativa.

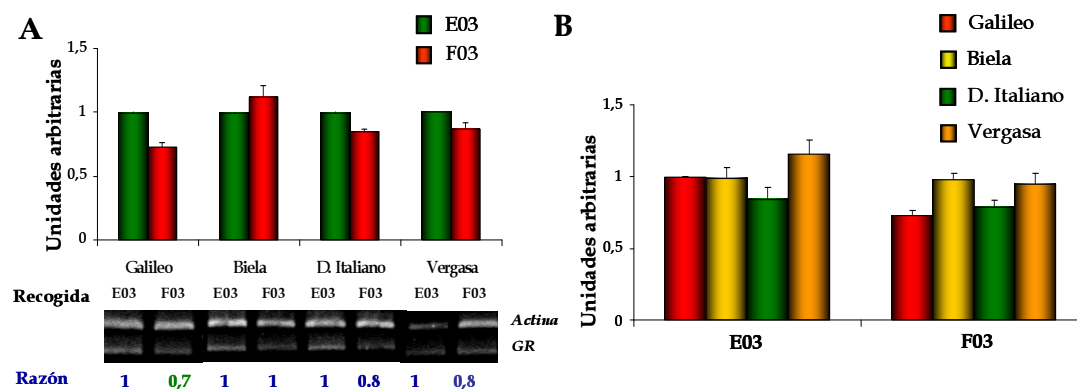


Fig. 4.45. Expresión diferencial de glutation reductasa (GR) de frutos de las variedades Galileo, Biela, Dulce italiano y Vergasa sometidos a cambios ambientales. Los frutos de las variedades se recogieron a mediados de enero y febrero de 2003 (E03 y F03, respectivamente). El análisis se realizó por RT-PCR semicuantitativa a partir del RNA total aislado de los frutos de pimiento de las variedades y condiciones mencionadas. Los productos de amplificación fueron visualizados con bromuro de etidio y luz ultravioleta en gels de agarosa. A, efecto de la cosecha en la expresión de GR. La razón indica los niveles relativos del producto de amplificación de la GR sobre la *actina* usada como control interno después de su normalización, y se expresa en el número de veces respecto al control, al que se asignó el valor de 1 en cada variedad. Los datos son media de al menos tres experimentos diferentes. Valores inferiores a 0,8 y superiores a 1,2 se consideran que muestran diferencias significativas en la expresión. B, efecto de la variedad en la expresión de GR. Los valores representados se obtuvieron por referencia a los datos de Galileo E03, al que se asignó el valor 1.

4.4.7.2. Expresión de mRNA

Los estudios de expresión de la *MDAR* de fruto de pimiento se llevaron a cabo mediante la técnica de PCR semicuantitativa. Para ello primero se analizaron los números de ciclos y temperaturas de hibridación necesarias para alcanzar la fase exponencial de amplificación en el patrón interno o *actina* y el gen diana o *MDAR*. Los números de ciclos establecidos fueron de 28 y 24 para la *actina* y la *MDAR*, respectivamente (Anexo II, Fig. 6B). La temperatura de hibridación utilizada fue de 55°C para ambos casos.

Una vez establecidas las condiciones para la PCR semicuantitativa, se llevó a cabo el estudio de expresión del gen de la *MDAR* en las distintas variedades y condiciones ambientales (E03 y F03) estudiadas. La expresión de la *MDAR* no presentaba diferencias significativas entre los frutos de pimiento E03 y F03, salvo en la variedad Dulce Italiano donde hubo una disminución de la expresión de *MDAR* en F03 respecto a E03 (Fig. 4.46A). Entre variedades, la expresión de *MDAR* fue significativamente mayor en frutos F03 de la variedad Biela y Vergasa que en Galileo y Dulce Italiano. La variedad con menor expresión de la *MDAR* fue Dulce Italiano (Fig. 4.46B), especialmente en F03. Esto último

se corresponde con los resultados obtenidos para la actividad GR y APX pertenecientes a la misma ruta metabólica.

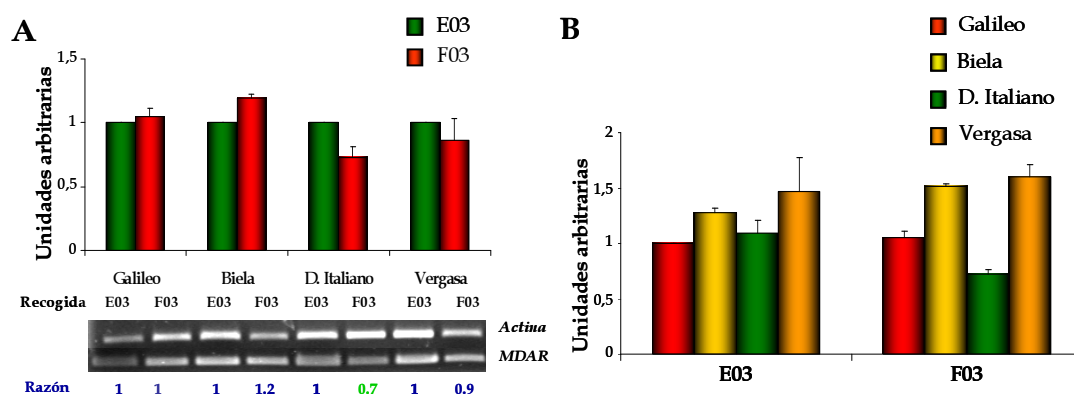


Fig. 4.46. Expresión diferencial de monodeshidroascorbato reductasa (MDAR) de frutos de las variedades Galileo, Biela, Dulce italiano y Vergasa sometidos a cambios ambientales. Los frutos de las variedades se recogieron a mediados de enero y febrero de 2003 (E03 y F03, respectivamente). El análisis se realizó por RT-PCR semicuantitativa a partir del RNA total aislado de los frutos de pimienta de las variedades y condiciones mencionadas. Los productos de amplificación fueron visualizados con bromuro de etidio y luz ultravioleta en geles de agarosa. A, efecto de la cosecha en la expresión de MDAR. La razón indica los niveles relativos del producto de amplificación de la MDAR sobre la *actina* usada como control interno después de su normalización, y se expresa en el número de veces respecto al control, al que se asignó el valor de 1 en cada variedad. Los datos son media de al menos tres experimentos diferentes. Valores inferiores a 0,8 y superiores a 1,2 se consideran que muestran diferencias significativas en la expresión. B, efecto de la variedad en la expresión de MDAR. Los valores representados se obtuvieron por referencia a los datos de Galileo E03, al que se asignó el valor 1.

4.4.8. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

4.4.8.1. Actividad total

Se analizó la actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en las distintas variedades de frutos de pimienta y recogidas ya descritas (Fig. 4.47). En nuestras condiciones, se produjo un descenso ($p < 0,05$) de la actividad G6PDH en los frutos F03 respecto a los E03 de las variedades Biela y Dulce Italiano. En Vergasa y Galileo las diferencias no fueron significativas.

Por otro lado, se analizó el contenido proteico de la G6PDH en dichas muestras mediante transferencia de western empleando anticuerpos frente a la G6PDH de levadura. La banda obtenida correspondía con un peso molecular de 56 kDa. En dicho análisis se identificó un descenso en el contenido proteico de G6PDH en frutos F03 respecto a E03 en todas las variedades analizadas. La variedad de fruto de pimienta con mayor contenido proteico de G6PDH fue Galileo, tanto en E03 como F03 (Fig. 4.47).

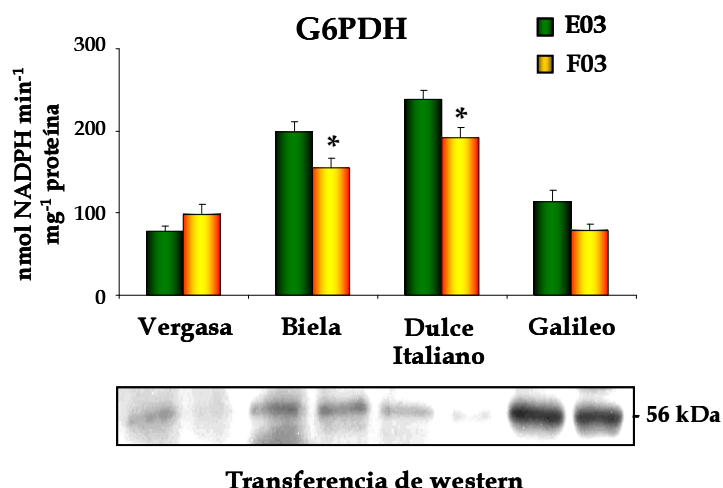


Fig. 4.47. Actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en frutos de distintas variedades de pimiento. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en las variedades Vergasa, Biela, Dulce italiano y Galileo en frutos cosechados a mediados de enero y de febrero de 2003 (E03 y F03, respectivamente). El asterisco indica los cambios estacionales significativos con respecto a los frutos E03 en cada variedad analizada. Los valores indicados son la media de 5 experimentos \pm el error estandar de la media (ESM). En los ensayos de transferencia de western se emplearon anticuerpos frente a la G6PDH de *Saccharomyces cerevisiae* (dil. 1:1000) y se cargaron 30 μ g proteína/pocillo.

4.4.8.2. Aislamiento del cDNA parcial

Para la obtención del clon parcial de la *G6PDH* se utilizó una pareja de cebadores degenerados (F-G6PDH1 y R-G6PDH1) (Tabla 3.3). Estos cebadores se diseñaron mediante el alineamiento con el programa OMIGA 2 de secuencias de *G6PDH* de *Solanum tuberosum* y de *Lycopersicon esculentum*. Mediante RT-PCR se obtuvo una sola banda de 255 pb (Anexo II, Fig. 7A) que se ligó al vector pGEM-T Easy, se clonó y secuenció. La secuencia del clon parcial de la *G6PDH* de *Capsicum annuum* L. presentaba una identidad del 98% y 94% con la *G6PDH* de *Solanum tuberosum* y de *Pisum sativum*, respectivamente (Anexo I, Fig. 4). Esta secuencia fue depositada en las bases de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov; AY652703). A partir de esta secuencia se diseñaron cebadores específicos (F-G6PDH2 y R-G6PDH2) que fueron utilizados posteriormente en los estudios de expresión.

4.4.8.3. Expresión de mRNA

Utilizando los cebadores específicos de *G6PDH* diseñados en el apartado anterior, se procedió al estudio de la expresión de dicho gen mediante RT-PCR semicuantitativa. Para ello se establecieron las condiciones adecuadas de números de ciclos y temperatura de hibridación para las dos parejas de cebadores utilizadas, las del gen diana o *G6PDH* (28 ciclos) y la del patrón interno o *actina* (28 ciclos) (Anexo II, Fig. 7B).

La Figura 4.48A muestra la expresión de la *G6PDH* entre los frutos E03 y F03 (las calibraciones, en cada una de las variedades, se hicieron en base a los frutos E03; valor 1) y la Figura 4.48B representa la expresión de la *G6PDH* entre variedades (todos los valores

están referidos al fruto E03 de Galileo; valor 1). La expresión de la *G6PDH* disminuía únicamente en los frutos F03 de la variedad Dulce Italiano respecto a los E03. En cuanto a la expresión de la *G6PDH* entre variedades, observamos que entre los frutos E03 la mayor expresión de la *G6PDH* se producía en la variedad Dulce Italiano y entre los frutos F03 en la variedad Vergasa (Fig. 4.48B).

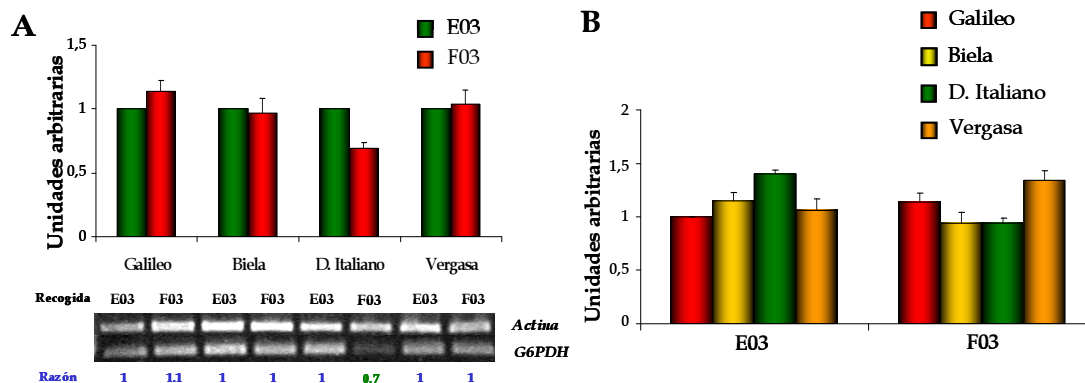


Fig. 4.48. Expresión diferencial de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*G6PDH*) de frutos de las variedades Galileo, Biela, Dulce italiano y Vergasa sometidos a cambios ambientales. Los frutos de las variedades se recogieron a mediados de enero y febrero de 2003 (E03 y F03, respectivamente). El análisis se realizó por RT-PCR semicuantitativa a partir del RNA total aislado de los frutos de pimiento de las variedades y condiciones mencionadas. Los productos de amplificación fueron visualizados con bromuro de etidio y luz ultravioleta en geles de agarosa. A, efecto de la cosecha en la expresión de *G6PDH*. La razón indica los niveles relativos del producto de amplificación de la *G6PDH* sobre la *actina* usada como control interno después de su normalización, y se expresa en el número de veces respecto al control, al que se asignó el valor de 1 en cada variedad. Los datos son media de al menos tres experimentos diferentes. Valores inferiores a 0,8 y superiores a 1,2 se consideran que muestran diferencias significativas en la expresión. B, efecto de la variedad en la expresión de *G6PDH*. Los valores representados se obtuvieron por referencia a los datos de Galileo E03, al que se asignó el valor 1.

4.4.9. 6-Fosfogluconato deshidrogenasa

4.4.9.1. Actividad total

Asimismo, se analizó la actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) en las distintas variedades y condiciones ya indicadas (Fig. 4.49). Según esto, la actividad 6PGDH descendió ($p < 0,01$) en los frutos F03 respecto a los E03 de las variedades Biela, Dulce Italiano y Galileo. En Vergasa las diferencias no fueron significativas.

Mediante la técnica de inmunotransferencia y con los anticuerpos policlonales producidos en huevo de pollo frente a la 6PGDH de espinaca se detectó una banda de 50 kDa. El estudio comparativo entre las muestras analizadas, nos reveló un mayor contenido de la 6PGDH en frutos E03 que en F03 de las variedades Dulce Italiano y Galileo. En las variedades Vergasa y Biela, no se detectó ninguna banda de 6PGDH.

4.4.9.2. Aislamiento del cDNA parcial

Al igual que en el caso de la *G6PDH*, la secuencia del gen de la *6PGDH* era desconocida para frutos de pimiento. Por ello y como en otras ocasiones, se realizó el alineamiento de distintas secuencias conocidas de *6PGDH* de especies como *Nicotiana tabacum* y

Lycopersicon esculentum. Para dicho alineamiento se utilizó el programa OMIGA 2. A partir de dicho alineamiento se buscaron las zonas más conservadas, a partir de las cuales se diseñaron los cebadores degenerados indicados en la Tabla 3.3 (F-6PGDH1 y R-6PGDH1). Mediante RT-PCR (Anexo II, Fig. 8A), clonación en un vector pGEM T Easy y secuenciación se obtuvo la secuencia parcial del gen de la 6PGDH de fruto de pimiento. Dicha secuencia fue depositada en las bases de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov; AY532646). La secuencia del clon parcial de la 6PGDH de *Capsicum annuum* L. presentaba una identidad del 87% con la 6PGDH de *Arabidopsis thaliana* y *Spinacia oleracea* (Anexo I, Fig. 5). A partir de dicha secuencia se diseñaron los cebadores específicos que se utilizarán en el estudio de expresión mediante PCR semicuantitativa (F-6PGDH2 y R-6PGDH2).

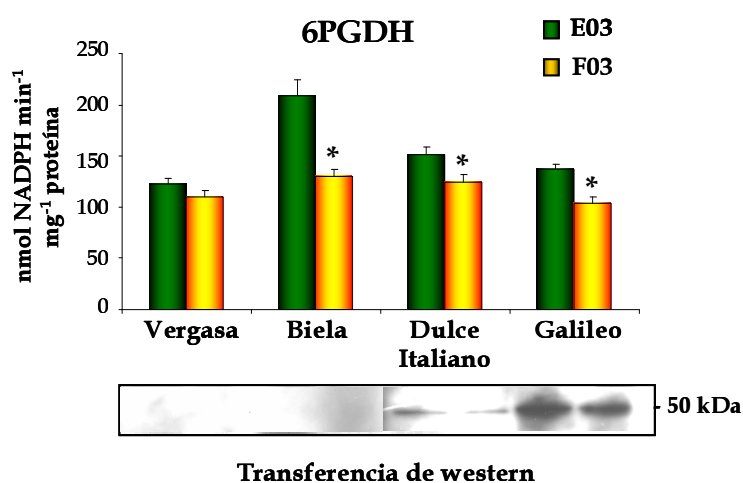


Fig. 4.49. Actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) en frutos de distintas variedades de pimiento. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en las variedades Vergasa, Biela, Dulce italiano y Galileo en frutos cosechados a mediados de enero y de febrero de 2003 (E03 y F03, respectivamente). El asterisco indica los cambios estacionales significativos con respecto a los frutos E03 en cada variedad analizada. Los valores indicados son la media de 5 experimentos \pm el error estándar de la media (ESM). En los ensayos de transferencia de western se emplearon anticuerpos frente a 6PGDH espinaca (dil. 1:1000) y se cargaron 30 μ g proteína/pocillo.

4.4.9.3. Expresión de mRNA

Como en los casos anteriores, se utilizó como patrón interno el gen de la *actina*, cuya expresión era constitutiva en frutos de pimiento. En primer lugar, se establecieron las condiciones de número de ciclos y temperatura de hibridación para ambas parejas de cebadores, siendo de 36 ciclos para la pareja de cebadores de la 6PGDH y de 28 ciclos para la *actina* (Anexo II, Fig. 8B). La temperatura de hibridación utilizada fue de 55°C en ambos casos. La expresión de la 6PGDH no presentaba diferencias significativas entre los frutos E03 y F03 de las variedades estudiadas (Fig. 4.50A). Se detectó un incremento en la expresión de la 6PGDH de Dulce Italiano respecto a las demás variedades en los frutos E03 (Fig. 4.50B). Por otro lado, los frutos E03 y F03 de la variedad Vergasa eran los que expresaban los niveles más bajos de 6PGDH.

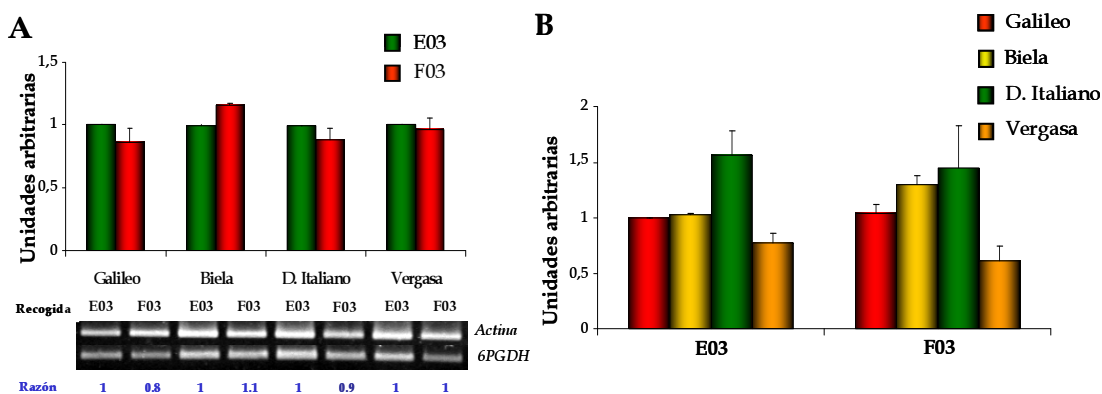


Fig. 4.50. Expresión diferencial de 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) de frutos de las variedades Galileo, Biela, Dulce italiano y Vergasa sometidos a cambios ambientales. Los frutos de las variedades se recogieron a mediados de enero y febrero de 2003 (E03 y F03, respectivamente). El análisis se realizó por RT-PCR semicuantitativa a partir del RNA total aislado de los frutos de pimiento de las variedades y condiciones mencionadas. Los productos de amplificación fueron visualizados con bromuro de etidio y luz ultravioleta en geles de agarosa. A, efecto de la cosecha en la expresión de 6PGDH. La razón indica los niveles relativos del producto de amplificación de la 6PGDH sobre la *actina* usada como control interno después de su normalización, y se expresa en el número de veces respecto al control, al que se asignó el valor de 1 en cada variedad. Los datos son media de al menos tres experimentos diferentes. Valores inferiores a 0,8 y superiores a 1,2 se consideran que muestran diferencias significativas en la expresión. B, efecto de la variedad en la expresión de 6PGDH. Los valores representados se obtuvieron por referencia a los datos de Galileo E03, al que se asignó el valor 1.

4.4.10. NADP-isocitrato deshidrogenasa (NADP-ICDH)

4.4.10.1. Actividad total

La actividad isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ (NADP-ICDH) descendió significativamente ($p < 0,01$) en los frutos de pimiento F03 respecto a los E03 de todas las variedades analizadas (Fig. 4.51). La mayor actividad de la NADP-ICDH se detectó en la variedad Biela, especialmente en E03, mientras que Vergasa fue la variedad con menor actividad NADP-ICDH tanto en E03 como F03.

Mediante inmunotransferencia en la que se empleó un anticuerpo frente al péptido de la ICDH de guisante se identificó una sola banda de 45 kDa, correspondiente a la NADP-ICDH de fruto de pimiento (Fig. 4.51). En cuanto a la intensidad de las distintas bandas, detectamos una disminución del contenido de la NADP-ICDH en frutos F03 en comparación con los E03, en todas las variedades analizadas. Por otro lado, la variedad con mayor contenido proteico de NADP-ICDH fue Dulce Italiano.

4.4.10.2. Aislamiento del cDNA parcial

Se alinearon las secuencias del gen de la ICDH de *Nicotiana tabacum* y *Solanum tuberosum* con el fin de determinar las zonas más conservadas para el diseño de cebadores. Ello se llevó a cabo con el programa OMIGA 2 y los cebadores obtenidos se indican en la Tabla 3.3 (F-ICDH1 y R-ICDH1). Mediante RT-PCR (Anexo II, Fig. 9A), ligación al pGEM-T Easy y secuenciación se obtuvo la secuencia del clon parcial de la ICDH de *Capsicum annuum* L. Dicha secuencia se depositó en la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov;

AY572426). La secuencia del clon parcial de la *ICDH* de pimiento presentaba una identidad del 94% con la *ICDH* de *Nicotiana tabacum* y *Solanum tuberosum* (Anexo I, Fig. 6). A partir de dicha secuencia se diseñaron los cebadores específicos que utilizamos en la PCR semicuantitativa (F-*ICDH*2 y R-*ICDH*2).

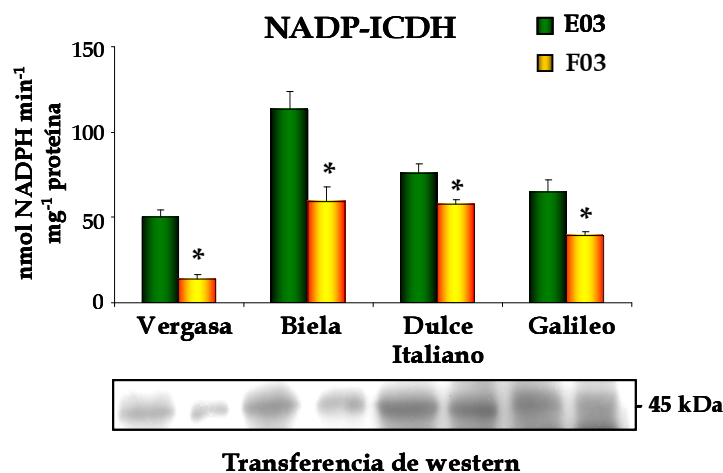


Fig. 4.51. Actividad NADP-isocitrato deshidrogenasa (NADP-ICDH) en frutos de distintas variedades de pimiento. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en las variedades Vergasa, Biela, Dulce italiano y Galileo en frutos cosechados a mediados de enero y de febrero de 2003 (E03 y F03, respectivamente). El asterisco indica los cambios estacionales significativos con respecto a los frutos E03 en cada variedad analizada. Los valores indicados son la media de 5 experimentos \pm el error estandard de la media (ESM). En los ensayos de transferencia de western se emplearon anticuerpos frente a *ICDH* de guisante (dil. 1:1000) y se cargaron 30 μ g proteína/pocillo.

4.4.10.3. Expresión de mRNA

Se llevó a cabo el estudio de la expresión del gen de la *ICDH* en los frutos de pimiento y las variaciones ambientales establecidas. Para ello se utilizó la pareja de cebadores diseñada en el apartado anterior. En primer lugar, se analizó el número de ciclos y temperatura de hibridación que determinan una amplificación exponencial en la PCR para las parejas de cebadores utilizadas, la del gen diana o *ICDH* y la del patrón interno o *actina*, siendo de 28 ciclos en los dos casos (Anexo II, Fig. 9B). La temperatura de hibridación utilizada fue de 55°C para las dos parejas de cebadores. Mediante la técnica de PCR semicuantitativa y utilizando un gel de agarosa al 0,8% se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 4.52. La expresión de la *ICDH* era mayor en frutos F03 de la variedad Biela que en los frutos E03 (Fig. 4.52A). Por otro lado, en la variedad Vergasa la expresión de la *ICDH* disminuyó en F03 respecto a E03. En Dulce Italiano y Galileo la expresión de la *ICDH* no presentaba diferencias significativas entre frutos E03 y F03. Nuestros resultados indicaron que la expresión de la *ICDH* no presentaba diferencias significativas entre variedades (Fig. 4.52B).

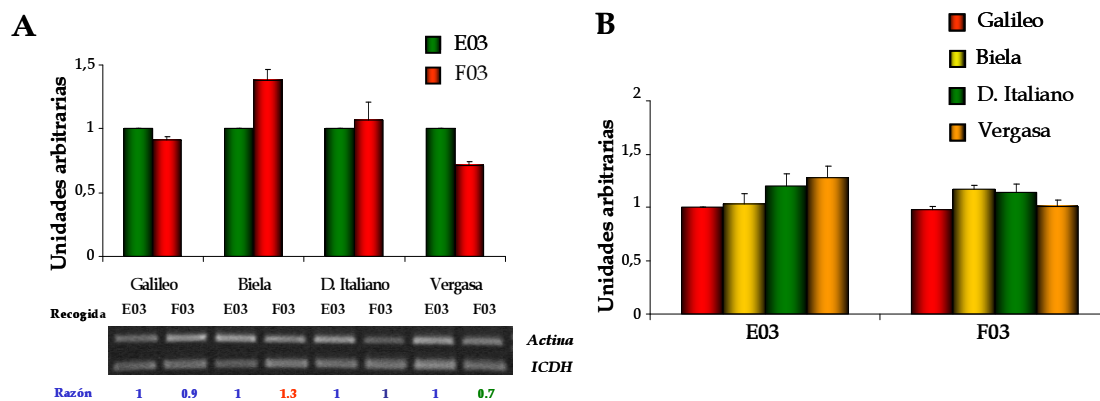


Fig. 4.52. Expresión diferencial de *NADP-icocitrato deshidrogenasa* (*NADP-ICDH*) de frutos de las variedades Galileo, Biela, Dulce italiano y Vergasa sometidos a cambios ambientales. Los frutos de las variedades se recogieron a mediados de enero y febrero de 2003 (E03 y F03, respectivamente). El análisis se realizó por RT-PCR semicuantitativa a partir del RNA total aislado de los frutos de pimienta de las variedades y condiciones mencionadas. Los productos de amplificación fueron visualizados con bromuro de etidio y luz ultravioleta en geles de agarosa. A, efecto de la cosecha en la expresión de *NADP-ICDH*. La razón indica los niveles relativos del producto de amplificación de la *NADP-ICDH* sobre la *actina* usada como control interno después de su normalización, y se expresa en el número de veces respecto al control, al que se asignó el valor de 1 en cada variedad. Los datos son media de al menos tres experimentos diferentes. Valores inferiores a 0,8 y superiores a 1,2 se consideran que muestran diferencias significativas en la expresión. B, efecto de la variedad en la expresión de *NADP-ICDH*. Los valores representados se obtuvieron por referencia a los datos de Galileo E03, al que se asignó el valor 1.

4.4.11. Enzima málico (EM)

Se determinó la actividad del enzima málico (EM) en los frutos de pimienta de las variedades y condiciones ambientales ya establecidas. La actividad EM disminuyó considerablemente ($p < 0,05$) en frutos F03 en comparación a los E03 en todas las variedades analizadas. La variedad Biela presentaba los niveles más altos de actividad EM en ambas cosechas, mientras que Dulce Italiano era la variedad con menor actividad (Fig. 4.53).

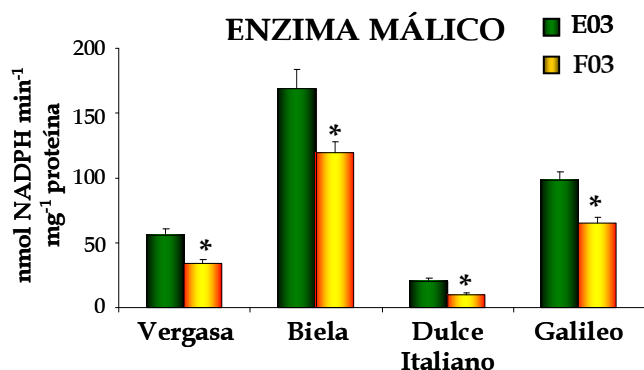


Fig. 4.53. Actividad de la enzima málico en frutos de distintas variedades de pimienta. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en las variedades Vergasa, Biela, Dulce italiano y Galileo en frutos cosechados a mediados de enero y de febrero de 2003 (E03 y F03, respectivamente). El asterisco indica los cambios estacionales significativos con respecto a los frutos E03 en cada variedad analizada. Los valores indicados son la media de 5 experimentos \pm el error estándar de la media (ESM).

4.4.12. NADPH total

Se hizo una estimación teórica del NADPH generado que aportarían las deshidrogenasas descritas anteriormente en nuestro material vegetal. Como se indica en la Fig. 4.54 en todas las variedades se obtuvo una disminución de NADPH en la cosecha F03.

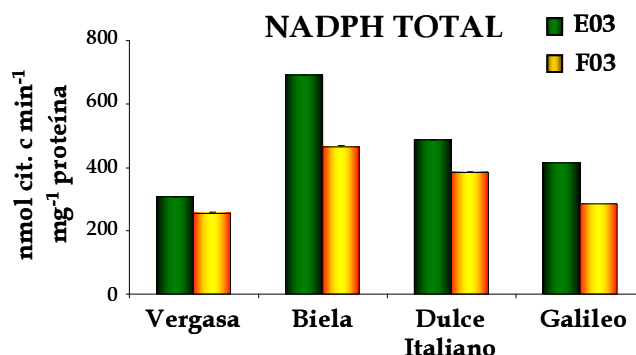


Fig. 4.54. NADPH total en frutos de cuatro variedades de pimiento. Este valor representa el NADPH que teóricamente generarían las NADP-deshidrogenasas analizadas y se obtiene sumando la actividad de las enzimas generadoras de NADPH anteriormente estudiadas. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en las variedades Vergasa, Biela, Dulce italiano y Galileo en frutos cosechados a mediados de enero y de febrero de 2003 (E03 y F03, respectivamente).

4.4.13. L-Galactono- γ -lactona deshidrogenasa

La enzima L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa (GalLDH) es la que cataliza la última reacción en la síntesis de ascorbato en plantas. Estudios recientes atribuyen a esta enzima una importante función reguladora de dicho proceso. En base a esto y a que los frutos de pimiento son ricos en vitamina C, se ha llevado a cabo el estudio de la actividad y expresión de la GalLDH en frutos de pimiento de distintas variedades sometidas a variaciones ambientales (E03 y F03).

4.4.13.1. Actividad total

La Figura 4.55 representa los valores de actividad GalLDH en los frutos de pimiento seleccionados. Como se puede observar, la actividad GalLDH era más alta ($p < 0,05$) en los frutos de la recogida E03 que en los F03 de las variedades Vergasa, Biela y Dulce Italiano. Entre todas las variedades de pimiento estudiadas, Biela era la que presentaba mayor actividad GalLDH. Entre variedades, los frutos sometidos a las condiciones F03 no presentan diferencias significativas en la actividad GalLDH.

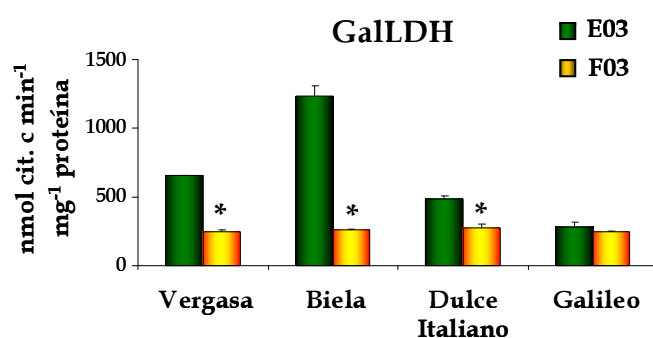


Fig. 4.55. Actividad L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa (GalLDH) en frutos de distintas variedades de pimiento. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en las variedades Vergasa, Biela, Dulce italiano y Galileo en frutos cosechados a mediados de enero y de febrero de 2003 (E03 y F03, respectivamente). El asterisco indica los cambios estacionales significativos con respecto a los frutos E03 en cada variedad analizada. Los valores indicados son la media de 5 experimentos \pm el error estándar de la media (ESM).

4.4.13.2. Expresión de mRNA

Se llevó a cabo el estudio de expresión de la *GalLDH*, mediante PCR semicuantitativa. Los cebadores específicos utilizados en este caso son los descritos en la Figura 3.6 (F-GLDH PP y R-GLDH PP), diseñados para la obtención de la secuencia completa del gen de la *GalLDH* de pimiento que describiremos más adelante en este apartado de Resultados. Estos cebadores amplificaron un fragmento de 388 pb de la *GalLDH* de pimiento (Anexo II, Fig. 10A). Por otro lado, se analizó el número de ciclos y temperatura de hibridación necesarios para alcanzar la fase exponencial de amplificación con los cebadores del patrón interno o *actina* (28 ciclos) y con los de la *GalLDH* (34 ciclos) (Anexo II, Fig. 10B). La temperatura de hibridación utilizada fue de 55°C para las dos parejas de cebadores. La expresión de la *GalLDH* descendió en frutos F03 respecto a los E03 en las variedades Dulce Italiano y Galileo (Fig. 4.56A). En Vergasa, por el contrario, la expresión de la *GalLDH* fue mayor en frutos F03 que en frutos E03. En Biela las diferencias de expresión de la *GalLDH* entre frutos E03 y F03 no fueron significativas. Entre variedades, observamos que Biela y Vergasa presentaban menor expresión de la *GalLDH* que Dulce Italiano y Galileo en la cosecha E03, mientras que en recogida F03 estos resultados se invertían, siendo Biela y Vergasa las que presentaban mayor expresión de la *GalLDH*.

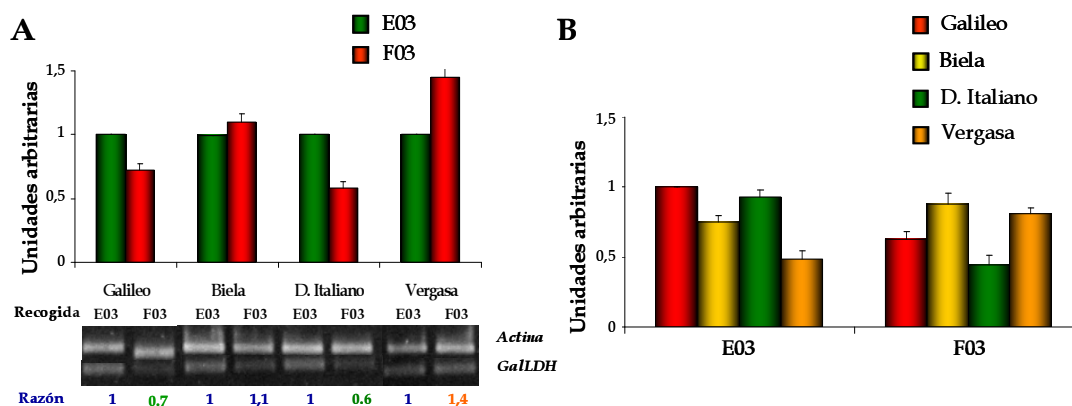


Fig. 4.56. Expresión diferencial de *L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa (GalLDH)* de frutos de las variedades Galileo, Biela, Dulce italiano y Vergasa sometidos a cambios ambientales. Los frutos de las variedades se recogieron a mediados de enero y febrero de 2003 (E03 y F03, respectivamente). El análisis se realizó por RT-PCR semicuantitativa a partir del RNA total aislado de los frutos de pimiento de las variedades y condiciones mencionadas. Los productos de amplificación fueron visualizados con bromuro de etidio y luz ultravioleta en geles de agarosa. A, efecto de la cosecha en la expresión de *GalLDH*. La razón indica los niveles relativos del producto de amplificación de la *GalLDH* sobre la *actina* usada como control interno después de su normalización, y se expresa en el número de veces respecto al control, al que se asignó el valor de 1 en cada variedad. Los datos son media de al menos tres experimentos diferentes. Valores inferiores a 0,8 y superiores a 1,2 se consideran que muestran diferencias significativas en la expresión. B, efecto de la variedad en la expresión de *GalLDH*. Los valores representados se obtuvieron por referencia a los datos de Galileo E03, al que se asignó el valor 1.

4.5. SÍNTESIS DE ASCORBATO EN PLANTAS DE PIMIENTO

Los resultados obtenidos hasta ahora nos muestran que el ascorbato podría jugar un papel importante en la maduración del fruto de pimiento y por ello nos centramos en el estudio de algunas de las enzimas implicadas en la síntesis de este antioxidante. Se analizó la actividad y expresión de la L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa (GalLDH) y la actividad de la L-galactosa deshidrogenasa (GalDH) en distintos órganos de la planta de pimiento (hoja, flor, tallo, fruto verde y fruto rojo). Por otro lado, se estudió la actividad nucleosido difosfato quinasa (NDPK) en frutos verdes, rojos y amarillos.

4.5.1. L-Galactosa deshidrogenasa en plantas de pimiento

4.5.1.1. Actividad total

Se analizó la actividad L-galactosa deshidrogenasa (GalDH) en hojas, flores, tallos y frutos verdes y maduros (rojos o amarillos) de pimiento de dos variedades distintas, Vergasa y Biela. En Vergasa, los niveles más altos de actividad GalDH se detectaron en frutos maduros (rojos) y apenas se detectó actividad en las flores completas (Fig. 4.57). En la variedad Biela, también la maduración del fruto iba acompañada de un ascenso en la actividad GalDH (Fig. 4.58). Por tanto, en ambas variedades era en el fruto maduro donde se detectaron los mayores niveles de actividad GalDH.

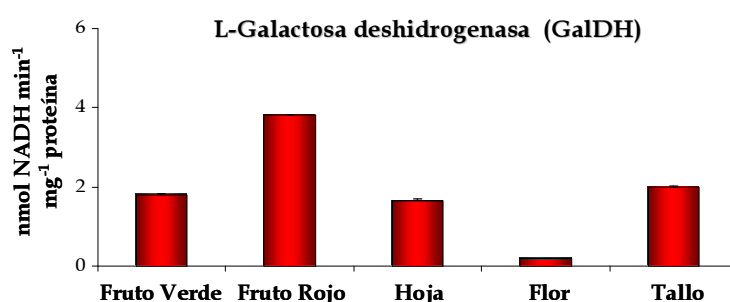


Fig. 4.57. Actividad L-galactosa deshidrogenasa (GalDH) en distintos órganos de plantas de pimiento de la variedad Vergasa. Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estándar de la media (ESM).

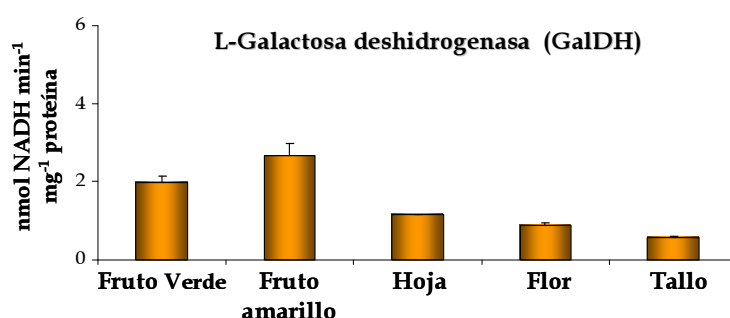


Fig. 4.58. Actividad L-galactosa deshidrogenasa (GalDH) en distintos órganos de plantas de pimiento de la variedad Biela. Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estándar de la media (ESM).

4.5.1.2. Aislamiento del cDNA parcial

Para el estudio de la secuencia del clon parcial de la *galactosa deshidrogenasa* (GalDH) de fruto de pimiento se diseñaron cebadores degenerados a partir del alineamiento de las secuencias de GalDH de *Arabidopsis thaliana* y *Spinacia oleracea*. Para ello, como en otros

casos, se utilizó el programa OMIGA 2. Mediante la correspondiente RT-PCR, clonación en un vector pGEM-T Easy y secuenciación se obtuvo la secuencia parcial del gen de la *GalDH* de fruto de pimiento. La secuencia obtenida fue depositada en la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov; AY995156). Esta secuencia presenta una homología del 89% y 83% con la secuencia de *GalDH* de *Arabidopsis thaliana* (AJ417563) y *Spinacia oleracea* (AB160990), respectivamente (Anexo I, Fig. 7).

4.5.2. L-Galactono- γ -lactona deshidrogenasa en plantas de pimiento

4.5.2.1. Actividad total

Se estudió la actividad L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa (GalLDH) en frutos verdes, maduros (rojos y amarillos), hojas, flores y tallos de las variedades Vergasa y Biela. En la variedad Vergasa la actividad GalLDH fue más alta ($p < 0,005$) en los frutos verdes que en los maduros, detectándose los mayores niveles de actividad en los tallos (Fig. 4.59). Por otro lado, era de destacar la muy baja actividad observada en las flores. En Biela, la actividad GalLDH aumentó ($p < 0,005$) significativamente en frutos maduros (amarillos) respecto a los frutos verdes siendo además el órgano donde mayor actividad se detectó (Fig. 4.60). Al igual que en la variedad Vergasa, las flores presentaban la menor actividad.

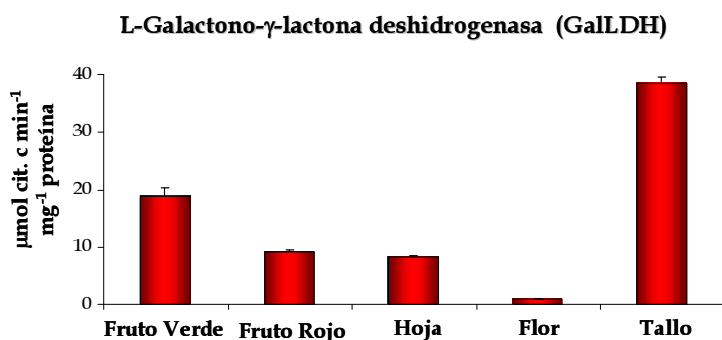


Fig. 4.59. Actividad L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa (GalLDH) en distintos órganos de plantas de pimiento de la variedad Vergasa. Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estándar de la media (ESM).

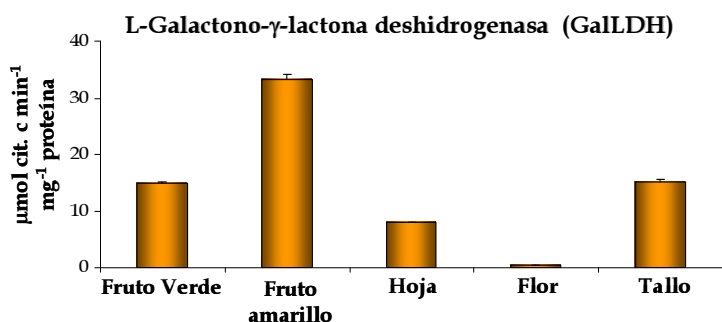


Fig. 4.60. Actividad L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa (GalLDH) en distintos órganos de plantas de pimiento de la variedad Biela. Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estándar de la media (ESM).

4.5.2.2. Expresión de la *GalLDH* en plantas de pimiento mediante PCR cuantitativa

Se ha analizado la expresión del gen de la *GalLDH* mediante PCR cuantitativa a tiempo real en distintos órganos de la planta de pimiento en las variedades, Vergasa y Biela. Para ello se utilizó el RNA de hojas, tallos, flores y frutos verdes y maduros (rojos o amarillos) de la planta de pimiento. Por otro lado, se diseñaron cebadores específicos para el gen de

la *GaLLDH* y como patrón interno se empleó la *actina* (Tabla 3.6). En Vergasa, la mayor expresión de la *GaLLDH* ($p < 0,005$) tuvo lugar en flores y hojas, mientras que en frutos y tallos los niveles de expresión de la *GaLLDH* eran muy similares (Fig. 4.61). En Biela, los niveles más altos de expresión de la *GaLLDH* se obtuvieron en flores y en el resto de órganos analizados la expresión de la *GaLLDH* no mostró diferencias significativas (Fig. 4.62).

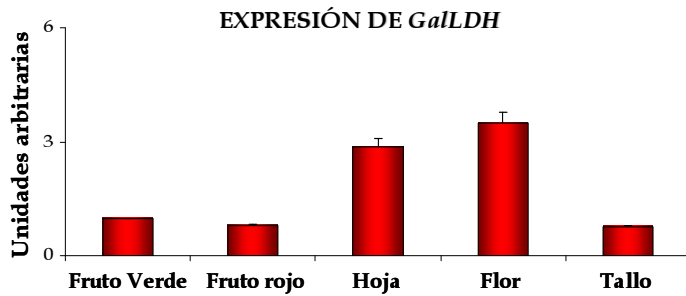


Fig. 4.61. Expresión del mRNA de la *galactono- γ -lactona deshidrogenasa (GaLLDH)* en distintos órganos de plantas de pimiento de la variedad Vergasa. El análisis se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real en los órganos indicados. Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estandar de la media (ESM).

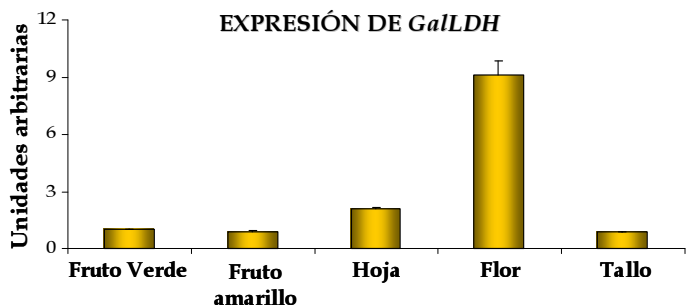


Fig. 4.62. Expresión del mRNA de la *galactono- γ -lactona deshidrogenasa (GaLLDH)* en distintos órganos de plantas de pimiento de la variedad Biela. El análisis se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real en los órganos indicados. Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estandar de la media (ESM).

4.5.3. Nucleosido difosfato quinasa (NDPK)

Por último y fruto de una estancia en el laboratorio del Profesor Nicholas Smirnoff de la Universidad de Exeter (Reino Unido) se llevó a cabo el estudio de la nucleósido difosfato quinasa (NDPK). Dicha enzima interviene en la generación de nucleótidos trifosfato como el GTP, necesario en la ruta de síntesis de ascorbato. Para estudiar la posible implicación de dicha enzima en la síntesis de ascorbato en nuestro material se analizó la actividad NDPK en frutos de pimiento verdes, rojos y amarillos. Como se aprecia en la Figura 4.63, la actividad NDPK era superior en los frutos verdes que en los frutos rojos o amarillos, siendo en éstos últimos donde se observó la menor actividad NDPK.

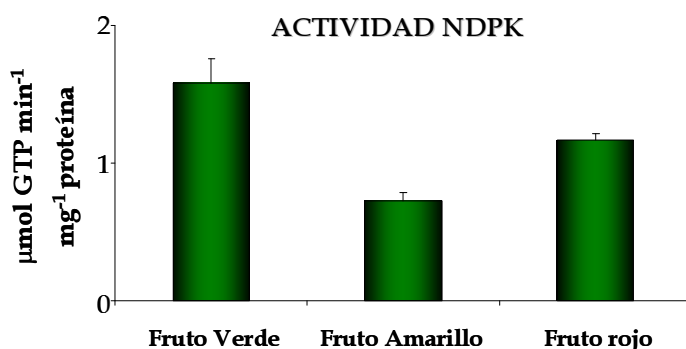


Fig. 4.63. Estudios de la actividad nucleósido difosfato quinasa (NDPK), en frutos de pimiento verde, rojo y amarillo. Los valores indicados son la media de 3 experimentos \pm el error estandar de la media (ESM).

4.6. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA L-GALACTONO- γ -LACTONA DESHIDROGENASA DE FRUTOS DE PIMIENTO

En los últimos años se han descrito distintas vías de síntesis de ascorbato en plantas, entre ellas la descrita por Smirnof-Wheeler donde la L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa (GalLDH) cataliza la última reacción en la ruta de síntesis del ascorbato. Existen estudios que muestran la alta susceptibilidad de esta enzima a variaciones medioambientales, como la transición de luz a oscuridad, que desembocan en un efecto directo sobre la concentración de ascorbato (Smirnof & Pallanca, 1996).

4.6.1. Aislamiento del cDNA

Para la determinación de las propiedades moleculares de la GalLDH de frutos de pimiento y para el diseño de anticuerpos específicos para dicha enzima, se procedió al aislamiento del gen completo de la GalLDH de *Capsicum annuum* L. En principio, se diseñaron distintas parejas de cebadores degenerados (Fig. 3.6) a lo largo del gen, utilizando para ello el alineamiento de las secuencias de GalLDH de *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana* y *Lycopersicum esculentum* (Fig. 3.5). Con dichas parejas de cebadores y mediante sucesivas RT-PCRs se obtuvo un cDNA parcial de la GalLDH de *Capsicum annuum* L. Finalmente, mediante la técnica 5'-RACE se obtuvo el extremo 5' de dicho gen, consiguiendo de este modo la secuencia completa de la GalLDH de fruto de pimiento. Dicha secuencia fue depositada en la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov; AY547352). La secuencia del gen de la GalLDH de pimiento presentaba una identidad del 88% con la GalLDH de *Nicotiana tabacum* y de *Lycopersicum esculentum* (Fig. 4.64).

4.6.2. Propiedades moleculares de la GalLDH

El análisis de la predicción molecular basada en la secuencia de aminoácidos deducida del gen de la GalLDH de frutos de pimiento descrita anteriormente proporcionó los resultados indicados en la Tabla 4.2. Dicho análisis se llevó a cabo mediante las herramientas bioinformáticas disponibles en www.expasy.org. Según estos datos, la proteína madura consta de 586 aminoácidos, siendo el tamaño teórico de la subunidad de 62,2 kDa y su punto isoeléctrico (PI) de 6,4. Como ya se ha descrito anteriormente en otras especies vegetales, la GalLDH de frutos de pimiento presenta un péptido señal característico de mitocondrias que en nuestro caso se corresponde con los 37 aminoácidos del extremo amino. Además, se trata de una enzima inestable, ya que su índice de estabilidad es de 43,24 y su coeficiente de extinción molar es de 74,175 M⁻¹ · cm⁻¹. Por otro lado, la GalLDH de pimiento presentaba dominios de unión al FAD, dominios de unión de FAD/FMN a deshidrogenasas y dominios de unión al UDP-N-acetilmuramato de ciertas deshidrogenasas (Fig. 4.65).



Fig. 4.64. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la GalLDH de pimiento y la de la *Nicotiana tabacum* (BAB13368 , 587 aminoácidos) y *Lycopersicon esculentum* (BAC11758; 588 aminoácidos).

Tabla 4.2. Propiedades moleculares de la L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa de frutos de pimiento basadas en la predicción a partir de la secuencia de aminoácidos.

Masa molecular de la subunidad	62.234 Da
Punto isoeléctrico (pI)	6,40
Péptido señal (mitocondrial)	37 aminoácidos (N-terminal) (MLRSFISKRSLSQFLRYHHHH HHRRAHRPFSTTPGPP)
Hidrofobicidad	0,481
Coefficiente extinción molar (ϵ_{280})	74.175 M ⁻¹ cm ⁻¹
Índice de estabilidad	43,24 (Inestable)

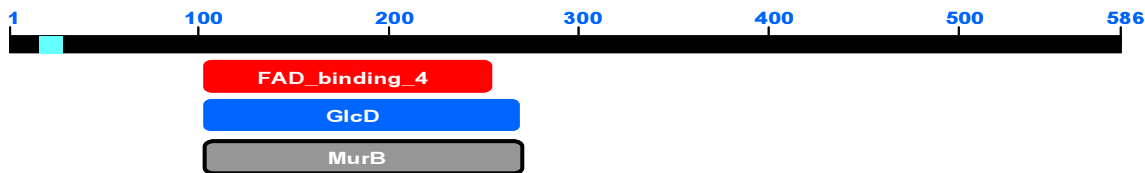


Fig. 4.65. Dominios de unión de la L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa de fruto de pimiento. FAD binding 4, dominio de unión al FAD; GlcD, dominios de unión de FAD/FMN a deshidrogenasas; MurB, dominios de unión al UDP-N-acetilmuramato de ciertas deshidrogenasas.

Por otro lado, se analizaron las posibles regiones transmembranas de la GalLDH de frutos de pimiento. Dicha aproximación se llevó a cabo mediante diversos métodos disponibles en www.expasy.org. El método TMHMM (CBS, Denmark) (Fig. 4.66A) predecía un dominio transmembrana localizado entre el aminoácido 9 y el 28. Según este mismo estudio los aminoácidos 1 al 8 estarían expuestos a la cara externa de la membrana y el resto del péptido estaría en su mayoría expuesto a la cara interna de la membrana. En este último fragmento expuesto a la cara interna de la membrana se observaron cuatro pequeños fragmentos que podrían pertenecer a regiones transmembrana con una probabilidad inferior al 5%. Por el método DAS de la Universidad de Estocolmo (Fig. 4.66B) se identificó de nuevo un dominio transmembrana principal (entre los aminoácidos 9 y 28) y otros dos dominios transmembrana secundarios. Estos dos nuevos dominios transmembrana coincidían con dos de las regiones transmembranas hipotéticas descritas en el método anterior.

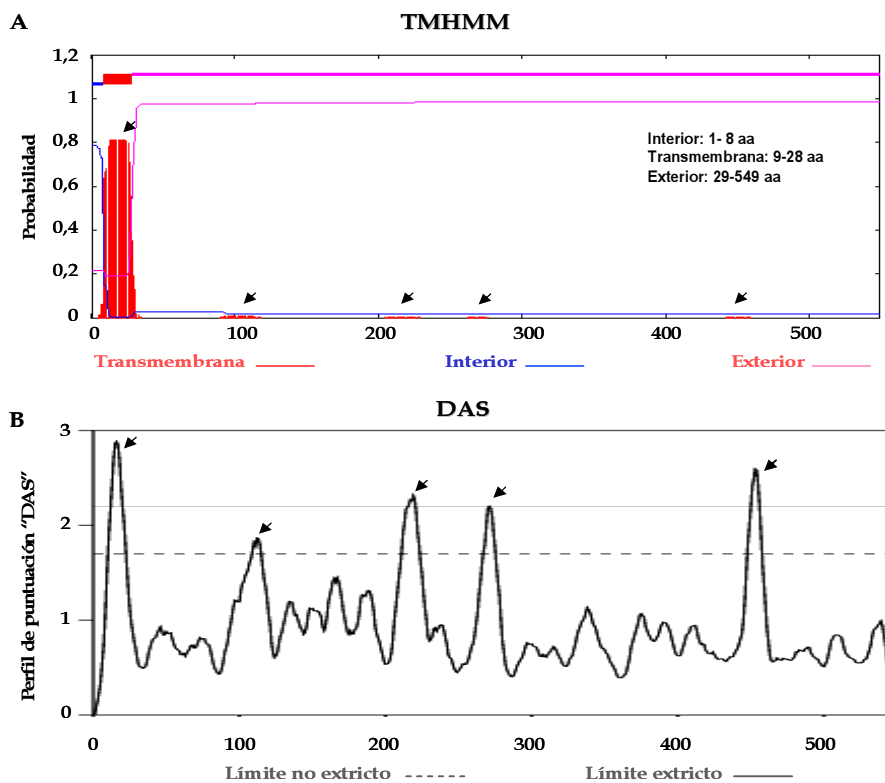


Fig. 4.66. Dominios transmembrana de la L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa de fruto de pimiento. Este estudio se ha llevado a cabo por el método TMHMM (CBS, Denmark) (A) y por el método DAS (Stockholm University) (B). TMHMM, Hélices transmembrana basado en el Modelo Oculto de Markov (Transmembrane Helices based on the Hidden Markov Model). DAS, Método de alineamiento de superficies densas (Dense Alignment Surface).

DISCUSIÓN

El pimiento (*Capsicum annuum* L.) es un producto hortícola de gran importancia agronómica ya que es consumido por la mayor parte de la población mundial. Por otro lado, el pimiento es una especie de alto interés económico en el sur de Europa, y, sobre todo, en España. En la última década los esfuerzos con respecto a este producto hortícola se han centrado en dos aspectos fundamentalmente: producción y comercialización. En el sector de la producción se ha avanzado mucho con nuevas técnicas, como la elección de variedades de rendimientos comerciales cada vez superiores y de resistencias múltiples. Esto ha dado lugar a variedades de pimientos de una mayor calidad.

Como es sabido, los alimentos vegetales proporcionan casi la totalidad de las vitaminas y minerales esenciales, así como numerosos compuestos promotores de un buen estado de salud, tema por el que el consumidor se muestra cada vez más preocupado. Por tanto, aparte de las características visuales de los productos naturales como color, forma, tamaño, estado de maduración, etc. (Howard et al., 2000; Gruda, 2005), se demanda también el contenido en sustancias beneficiosas para la salud e incluso si los alimentos poseen capacidad anticancerígena, antimutagénica y antiinflamatoria (Peterson & Dwyer, 1998).

Esto nos ha servido de plataforma para abarcar un tema de interés general como es el estudio del contenido en antioxidantes de frutos de pimiento así como de sistemas enzimáticos que no siendo propiamente antioxidantes están implicados en procesos metabólicos relacionados con la eliminación o producción de especies de oxígeno reactivo. Dicho estudio se ha llevado a cabo en frutos de pimiento de distintas variedades sujetas a variaciones ambientales durante la polinización y desarrollo del fruto y en frutos de pimiento con distinto grado de maduración. Para esta investigación se han desarrollado aproximaciones bioquímicas y de biología celular y molecular. Este enfoque múltiple da a nuestro estudio de los antioxidantes enzimáticos un carácter pionero en la biología del pimiento que puede ser trasladado a otras especies vegetales incluidas en la alimentación humana, con la finalidad de establecer estrategias de selección y mejora de variedades con alto interés nutricional. Como etapa previa a estos estudios, y en conexión con una investigación que se había desarrollado en nuestro laboratorio, hemos analizado la participación de los sistemas antioxidantes enzimáticos de hojas de pimiento en la respuesta frente al estrés provocado por el 2,4-D.

5.1. EL 2,4-D GENERA ESTRÉS OXIDATIVO EN PLANTAS DE PIMIENTO.

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es un compuesto xenobiótico de amplia estabilidad metabólica, que a altas concentraciones, presenta una importante actividad herbicida (Romero-Puertas et al., 2004). Aunque su mecanismo de acción no está aún definido, es conocido que el 2,4-D provoca importantes cambios morfológicos y fisiológicos en la planta (Grossmann 2000a; Romero-Puertas et al., 2004). Sin embargo, el 2,4-D cuando se encuentra a bajas concentraciones, presenta un comportamiento similar al

del ácido indolacético (AIA), la principal auxina natural en plantas superiores (Grossmann, 2000b). En este caso, el 2,4-D induce el crecimiento de raíces o tallos por división y elongación celular y estimula los procesos de germinación de semillas (Grabinska-Sota et al., 2002; Campanoni & Nick, 2005), así como la embriogénesis somática y la formación de callos a partir de cultivos de tejidos vegetales (Tautorus et al., 1991; Bronsema et al., 1998; Kitamiya et al., 2000; Ramanayake & Wanniarachchi, 2003).

En esta Tesis Doctoral se han empleado plantas de pimiento de dos cultivares distintos, Abdera y Herminio, sometidas a la acción del herbicida 2,4-D, aplicado por vía foliar. La concentración de 2,4-D utilizada (22,6 mM) fue establecida en base a estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio con plantas de guisante (McCarthy, 2004). En dicho trabajo se comprobó que el 2,4-D ejercía el mismo efecto independientemente de que fuera aplicado por vía foliar o radical, si bien los efectos eran más rápidos tras la administración por vía foliar. Se seleccionaron las variedades Abdera y Herminio por representar a dos tipos de pimiento diferentes: Abdera es del tipo Dulce italiano mientras que Herminio es del tipo Lamuyo. Además ambas variedades se habían empleado anteriormente por nuestro grupo de trabajo para llevar a cabo estudios de estrés por altas concentraciones de cadmio (León et al. 2002). En dicha investigación se observó que Abdera y Herminio mostraban una sensibilidad diferente al cadmio. Ello nos llevó a plantear que dichas variedades podrían responder de manera diferencial frente a otro agente de estrés abiótico.

En esta Memoria Doctoral se ha investigado la acción del 2,4-D sobre el metabolismo oxidativo, la concentración de proteínas y crecimiento de la planta de pimiento.

El 2,4-D administrado por vía foliar afectaba severamente al crecimiento de la planta de pimiento, sobre todo a corto y medio plazo. Las plantas de pimiento desarrollaban los típicos síntomas visuales producidos por los herbicidas auxínicos, como son la epinastia de las hojas, curvatura del tallo e inhibición de la raíz y de la parte aérea (Cardenas et al., 1968; Golebski et al., 1988; Key & Wold, 1961; Sterling & Hall, 1997). De hecho, se ha descrito que altos niveles de auxinas producen marchitamiento, senescencia, maduración de frutos, e incluso, necrosis foliar (Cárdenas et al., 1968; Agustí et al., 2002). Además, los herbicidas auxínicos estimulan la síntesis de etileno, lo cual parece estar relacionado con los efectos morfológicos de epinastia y senescencia (Sterling & Hall, 1997; Grossmann, 1998; 2000a). A su vez, el etileno induce la síntesis de ácido abscísico (ABA), el cual inhibe el crecimiento por cierre estomático, limitando así la asimilación de carbono y la consiguiente producción de biomasa (Kende & Zeevaart, 1997).

A largo plazo se estabilizó el crecimiento de las plantas de ambas variedades de pimiento de manera que a las dos semanas de tratamiento se amortiguaron los síntomas visuales detectados al principio del experimento, principalmente en Abdera. Este fenómeno de "recuperación" sin embargo no se reflejó en el metabolismo foliar como

comprobaremos en adelante, donde los efectos del 2,4-D sobre algunos parámetros se mantuvieron durante todo el experimento. Este comportamiento difería con lo observado en plantas de guisante, en las que tratamientos prolongados de más de una semana ocasionaban la muerte de la planta (McCarthy, 2004).

La detención en el crecimiento observado en las plantas de pimiento de las variedades Abdera y Herminio, se correspondía con una disminución en el contenido de proteínas en las hojas. Este mismo efecto fue observado en plantas de guisante (*Pisum sativum*) tratadas con 2,4-D a nivel foliar, donde parece ser que destacan los procesos catabólicos a diferencia de los tallos donde abundan los procesos anabólicos (McCarthy, 2004).

En estudios previos, llevados a cabo en otras especies vegetales, se demostró que mientras la fotosíntesis tiende a inhibirse, la fotorrespiración parece ser un proceso funcional ante la acción de las altas concentraciones de 2,4-D, llegando en algunos casos a inducirse (Kelly & Avery, 1949; Rasmussen, 1947; Romero-Puertas et al., 2004). En plantas de pimiento de la variedad Abdera la fotorrespiración parece seguir siendo funcional, como así lo atestigua el patrón de la glicolato oxidasa (GOX) e hidroxipiruvato reductasa (HPR) tras el tratamiento con 2,4-D. En plantas de pimiento de la variedad Herminio, el proceso de la fotorrespiración parece verse afectado de manera negativa ya desde el primer día de tratamiento.

Los resultados obtenidos en el análisis del metabolismo oxidativo parece indicar que el 2,4-D genera un estrés oxidativo generalizado en la parte aérea de la planta propiciado por un aumento en la producción de O_2^- y H_2O_2 , al igual que lo observado anteriormente en plantas de guisante (Romero-Puertas et al., 2004). En las dos variedades estudiadas se produce un aumento en la tasa de peroxidación lipídica como consecuencia del tratamiento con 2,4-D, si bien fue la variedad Abdera, la que mostró los cambios más patentes considerando el metabolismo oxidativo de forma global. Además se observó un patrón de respuesta distinto en las dos variedades en función del tiempo. Mientras que Abdera respondía de manera más gradual, detectándose los mayores efectos del 2,4-D al cabo de las dos semanas, en la variedad Herminio, los cambios más visibles se observaron en la primera semana. Sin duda esta respuesta diferencial podría estar asociada al tipo de pimiento que representa cada variedad. Así, Abdera, que es del tipo dulce italiano, con una maduración larga de los frutos, posea posiblemente un metabolismo más secuencial, regulado a más largo plazo. Herminio, del tipo lamuyo y maduración más corta que Abdera, muestra un metabolismo algo más activo, preparado posiblemente para respuestas más rápidas frente a cambios en el entorno. Ésto, además, podría estar relacionado con lo indicado anteriormente acerca de la mayor capacidad de Abdera para mitigar los síntomas visibles iniciales producidos por el 2,4-D.

La xantina oxidoreductasa (XOR) es una enzima que puede presentarse en dos

formas moleculares diferentes. La forma D (XDH; xantina deshidrogenasa; EC 1.17.1.4) se convierte de manera reversible en la forma O (XOD; xantina oxidasa; EC 1.1.3.22) mediante una oxidación, o de manera irreversible por una degradación proteolítica (Palma et al., 2002; del Río et al., 2003a). La XOD interviene en la ruta de degradación de ácidos nucleicos mediante la oxidación de xantina/hipoxantina a ácido úrico con la producción subsidiaria de radicales superóxido (Palma et al., 2002). El aumento de la actividad XOD en plantas de pimiento Abdera a los 14 días y Herminio a los 7 días sugiere que los niveles de superóxido posiblemente se incrementaron de manera notable en dichas plantas por el tratamiento con el 2,4-D. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Romero-Puertas et al. (2004) en plantas de guisante. Por otro lado, considerando que la XOD es una enzima que forma parte de la ruta de degradación de las purinas, el aumento observado en su actividad como consecuencia del tratamiento con 2,4-D podría ser indicativo de un aumento en el catabolismo de ácidos nucleicos en las hojas.

Los radicales superóxido generados en la reacción anterior son eliminados por las SODs que lo transforman en H_2O_2 y O_2 . La actividad SOD total aumentó considerablemente en plantas de pimiento tratadas con 2,4-D respecto a las plantas controles. Dicho aumento fue más notable en la variedad Abdera, mientras que en Herminio sólo se observó en el séptimo día de tratamiento. Por el contrario, plantas de pimiento de las variedades Abdera y Herminio sometidas a estrés abiótico provocado por altas concentraciones de cadmio experimentaron una disminución de dicha actividad SOD total (León et al., 2002). El incremento de la concentración de peróxido de hidrógeno a nivel foliar fue observado en plantas de guisante tratadas con 2,4-D mediante marcaje histoquímico (Romero-Puertas et al., 2004). En las plantas de pimiento tratadas con 2,4-D, se observó que las isoformas de SOD mayormente afectadas por dicho estrés abiótico fueron la Mn-SOD y Fe-SOD, del mismo modo que ocurría en el tratamiento de estas plantas con Cd (León et al., 2002). En nuestro caso la Mn-SOD parece estar regulada post-traduccionalmente, dado que no se produce un aumento en el contenido proteico de esta isoenzima por el tratamiento con el herbicida. El hecho de que la Mn-SOD se localice en mitocondrias y peroxisomas (del Río et al., 2003b), sugiere que estos orgánulos podrían tomar parte en la respuesta frente al 2,4-D.

El exceso de radicales superóxido y H_2O_2 , en presencia de metales, puede generar radicales hidroxilo ($\cdot OH$) mediante reacción de tipo Haber-Weiss. La sobreproducción de ROS es responsable posiblemente de la menor tasa fotosintética que presentan algunas plantas tratadas con 2,4-D, ya que estas especies inhiben potencialmente algunas de las enzimas del ciclo de reducción del carbono (Halliwell & Gutteridge, 2000). Además, los radicales $\cdot OH$ pueden atacar de manera rápida a las membranas biológicas y a todos los tipos de biomoléculas, incluidos el DNA y las proteínas, lo que conduce a disfunciones metabólicas irreparables y la muerte celular (Halliwell & Gutteridge, 2000). Este aumento

de ROS provocaba en las hojas de todas las plantas de pimiento un aumento en la peroxidación lipídica que se traducía en una mayor degradación de las membranas biológicas.

La catalasa es una metaloenzima que interviene generalmente en la eliminación de H_2O_2 en situaciones de estrés. No obstante, en hojas de pimiento la actividad catalasa no sufrió variaciones significativas por el tratamiento con 2,4-D en ninguna de las variedades. En plantas de guisante y arroz se describió una regulación a nivel transcripcional de dicha actividad catalasa por efecto del 2,4-D (Schmidt et al., 2002; Romero-Puertas et al., 2004). En maíz, los tres genes que codifican a la catalasa, y sus respectivas proteínas, se activaron por la acción de auxinas naturales y sintéticas en embriones inmaduros (Guan & Scandalios, 2002). Teniendo en cuenta que la actividad SOD, generadora de H_2O_2 , aumentó considerablemente en dichas plantas de pimiento tratadas con 2,4-D (especialmente en Abdera), se podría pensar que hay una superproducción de peróxido de hidrógeno en nuestras condiciones experimentales. Este supuesto estaría apoyado por el aumento observado en la actividad guayacol peroxidasa (GPX) en las variedades de pimiento. En nuestro caso, parece haber una participación más activa de la GPX, que de la catalasa en los mecanismos de defensa frente a una mayor producción de H_2O_2 en las plantas de pimiento tratadas con el herbicida.

El ciclo ascorbato-glutation es uno de los sistemas antioxidantes que más contribuyen a eliminar el peróxido de hidrógeno de las células vegetales (Noctor & Foyer, 1998; Asada, 2000; Pastori et al., 2003). Los datos de glutatión reductasa obtenidos en nuestras condiciones experimentales indican que el ciclo ascorbato-glutation también se ve afectado por el 2,4-D en hojas de pimiento. La actividad GR fue mayor en las plantas tratadas que en las controles de la variedad Abdera en todos los tiempos de tratamiento. Estos resultados sugieren que en la variedad Abdera, además de las peroxidasas inespecíficas, el ciclo ascorbato-glutation interviene en la eliminación de H_2O_2 . Sin embargo, en Herminio, esta ruta antioxidante no parece afectarse de igual forma. Antes bien a largo plazo se observa una menor actividad GR. En otras circunstancias se podría postular que la generación de H_2O_2 es mayor en Abdera como consecuencia del tratamiento con 2,4-D, dado que esta variedad hay un aumento simultáneo de la GPX y del ciclo ascorbato-glutation. Por el contrario, en Herminio, el 2,4-D no parece afectar la generación de H_2O_2 . En todo caso, habría que indicar que, a pesar de los cambios observados, la actividad catalasa podría contribuir de manera importante a la eliminación de H_2O_2 , ya que esta actividad no se ve afectada por el herbicida.

Las glutatión S-transferasas (GSTs) pertenecen a una familia de enzimas que poseen la capacidad para conjugar diferentes compuestos xenobióticos al glutatión. El complejo que se forma en esta reacción se transporta a la vacuola, disminuyendo, de esta manera, el efecto dañino potencial de tales compuestos (Marrs, 1996; Edwards et al., 2000). En las plantas de pimiento sometidas a tratamiento con 2,4-D por vía foliar, la actividad

GST era mayor en plantas tratadas que en controles, siendo este aumento mayor a medida que transcurrían los días desde el tratamiento. Este mecanismo de defensa nuevamente era más activo en la variedad Abdera que en Herminio. Esto nos hace pensar nuevamente que la variedad Abdera dispone de más mecanismos de resistencia frente al estrés provocado por el 2,4-D que la variedad Herminio. En este caso, el 2,4-D ejerce un efecto dual sobre las GSTs, ya que éstas son inducibles por auxinas y xenobióticos (Pascal et al., 1998). La naturaleza auxínica de esta sustancia, junto a su carácter xenobiótico podría hacer que las GSTs actuaran tanto en la desintoxicación del 2,4-D (por conjugación con GSH o por unión directa a la enzima, disminuyendo así las concentraciones de herbicida libre), como en su transporte intracelular. Teniendo en cuenta este mecanismo, el ciclo ascorbato-glutation tendría además una función adicional en este proceso de desintoxicación, proveyendo a la GST de GSH. Estudios previos adjudican también una actividad GSH-peroxidasa a la GST, capaz de reducir hidroperóxidos de ácidos grasos o timidin-hidroperóxidos, a los correspondientes hidroxilo derivados con producción de GSSG (Beeor-Tzahar et al., 1995; Edwards, 1996; Pascal et al., 1998; Fujita et al., 1998).

Tras el tratamiento con 2,4-D de las plantas de pimiento de las variedades Abdera y Herminio se observó un drástico aumento de las actividades G6PDH, 6PGDH, ICDH y enzima málico. El NADPH producido por estas enzimas es necesario en ciertos procesos metabólicos como el ciclo ascorbato-glutation. Además, el NADPH, aporta estabilidad a algunas enzimas como la catalasa frente al daño oxidativo (Schmidt et al., 2002) y la razón NADPH/NADP regula el transporte de proteínas dentro del peroxisoma (Schmidt et al., 2002). Existen NADPH-oxidasas de membrana que utilizan dicho NADPH para generar radicales superóxido en mecanismos de señalización molecular. Se sabe que la G6PDH y EM generan el NADPH necesario para la NADPH oxidasa en situaciones en las que la cadena de transporte electrónico del cloroplasto no lo puede llevar a cabo (Foreman et al., 2003).

En resumen, hemos observado como la aplicación foliar del herbicida auxínico 2,4-D genera un estrés oxidativo en la planta de pimiento, aunque no provoca la muerte de la planta. Dicho estrés oxidativo está justificado por el aumento de la oxidación de los lípidos de membrana, el aumento de la actividad de las enzimas GPX, GST, GR, SOD, XOD y deshidrogenasas NADP⁺-dependientes, en plantas tratadas con 2,4-D respecto a las plantas controles, sobre todo en Abdera. Además, estos niveles metabólicos se ven correlacionados con los efectos visibles de inhibición del crecimiento de la planta, clorosis difusa de las hojas, epinastia, enrollamiento de los bordes de las hojas y rizamiento de los tallos. En la variedad Herminio, se observaron daños oxidativos similares, sobre todo a nivel lipídico, aunque los sistemas antioxidantes no respondían tan activamente como en la variedad Abdera. El estrés oxidativo generado en ambas variedades no parece afectar a las proteínas de manera aparente, ya que no hay un aumento en los niveles de grupos carbonilo de las proteínas. Ello concuerda además con la ausencia de cambios en la

actividad endopeptidasa por efecto del 2,4-D, por lo que no puede pensarse que haya una degradación de proteínas modificadas oxidativamente tras el tratamiento con el herbicida, según el modelo propuesto en otras situaciones de estrés oxidativo (Palma et al. 2002).

En la Figura 5.1 se muestra un esquema que integraría las enzimas analizadas en las dos variedades de pimiento. Este modelo complementa el propuesto anteriormente sobre el mecanismo de acción del 2,4-D (Romero-Puertas et al., 2004). Dicho mecanismo incorpora la participación de la GPX y de las deshidrogenasas productoras de NADPH que pueden proporcionar el NADPH necesario para el funcionamiento del ciclo ascorbato-glutation e, indirectamente, la acción de la GST. El mecanismo de acción tendría un efecto a medio plazo en la variedad Herminio, mientras que en Abdera cursaría a más largo plazo en base a la evolución de los parámetros analizados.

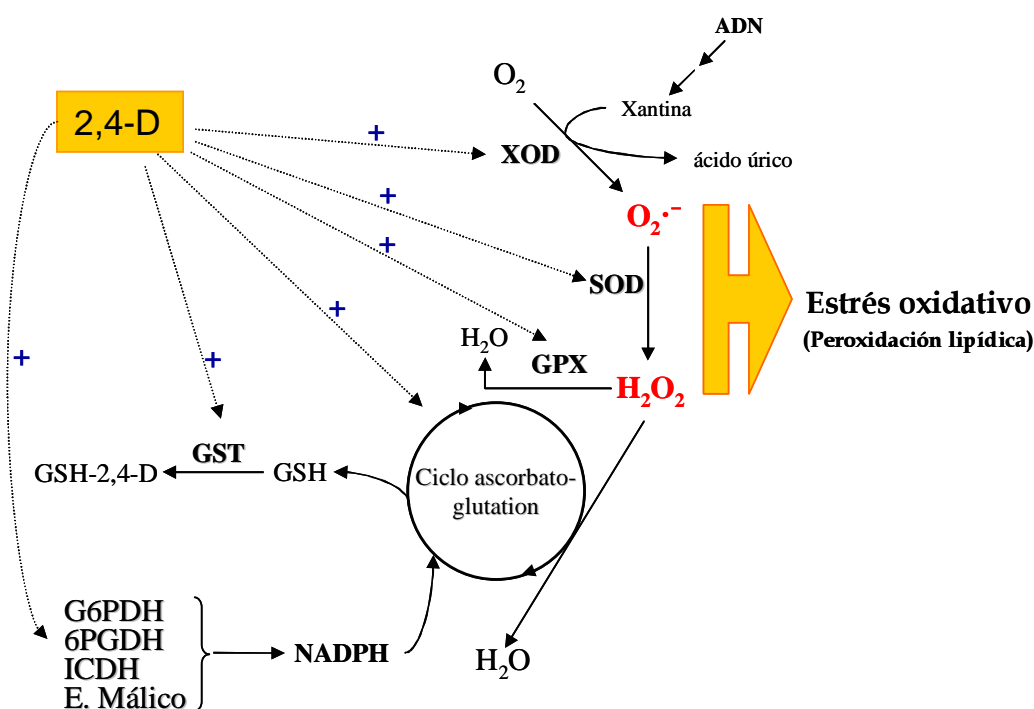


Fig. 5.1. Modelo propuesto para la acción del 2,4-D (22,6 mM) sobre las plantas de pimiento de dos variedades, Abdera y Herminio. El mecanismo de acción del 2,4-D tendría un efecto a medio plazo en la variedad Herminio, mientras que en Abdera cursaría a más largo plazo en base a la evolución de los parámetros analizados. +, activación de las actividades enzimáticas en plantas tratadas con el herbicida.

5.2. FUNCIÓN DE LAS ROS Y ANTIOXIDANTES EN LA MADURACIÓN DE LOS FRUTOS DE PIMIENTO.

En los últimos años se han descrito algunos trabajos que pretenden explicar los procesos bioquímicos que subyacen durante la maduración de los frutos de pimiento. De este modo, se sabe que durante este fenómeno se produce un incremento en la síntesis de carotenoides que está relacionada con la variación de color que experimentan dichos frutos (Davies et al., 1970; Hornero-Méndez et al., 2000; Howard et al., 2000; Thorup et al., 2000). Además, este aumento en la síntesis de carotenoides durante la maduración de los frutos, se traduce en una transformación estructural de cloroplastos en cromoplastos (Almela et al., 1996; Bouvier et al., 1998; Josse et al., 2000; Pérez-Gálvez & Mínguez-Mosquera, 2001). En cloroplastos, los carotenoides se asocian a las membranas celulares, pero en cromoplastos el exceso de carotenoides provoca una acumulación de éstos dentro de subestructuras plastídicas (Howard et al., 2000). De hecho, el 95% de los carotenoides se acumulan en los cromoplastos en forma de fibrillas de naturaleza lipoproteica, cuya formación está favorecida por el ABA (Howard et al., 2000). La desintegración granal e intergranal de los cloroplastos es la fuente de dicho sistema reticular de filamentos y esta desorganización lleva a la lisis final de los granas con un aumento paralelo de plastoglobulinas (Almela et al., 1996). Durante la maduración de los frutos de pimiento, también se observó un aumento en la actividad de algunas enzimas relacionadas con la catabolización de clorofila (Almela et al., 1996; Rodoni et al., 1997). Este fenómeno también fue detectado durante la senescencia y maduración de hojas y frutos (Almela et al., 1996). La degradación de clorofila durante la maduración de los frutos de pimiento (Ziegler et al., 1983; Cámara et al., 1995) provoca la desorganización del aparato fotosintético, y por tanto, la incapacidad de este mecanismo para la síntesis de ATP y NADPH, necesario para la fijación de CO₂ y la síntesis de almidón (Thom et al., 1998). Por ello, la glicolisis y la ruta de las pentosas fosfato parecen jugar un papel importante en la generación del poder reductor necesario para los procesos bioquímicos que acompañan a la transformación de cloroplastos en cromoplastos (Thom & Neuhaus, 1995; Thom et al., 1998).

Los cambios bioquímicos que se producen durante la maduración de los frutos de pimiento parecen estar acompañados de incrementos en la síntesis de α -tocoferol (vitamina E), flavonoides, equivalentes reductores solubles y ácidos fenólicos (Cámara et al., 1982; Howard et al., 2000). Por otro lado, se han descrito alteraciones en el contenido de capsaicina, lignina (Estrada et al., 2000) y poliaminas (Phelps & McDonald, 1990). Los frutos frescos de pimiento son también fuentes ricas de ácido ascórbico (Howard et al., 1994).

A pesar de toda esta información poco se sabe aún del comportamiento de los antioxidantes enzimáticos durante la maduración de los frutos de pimiento. En trabajos llevados a cabo en las pasadas décadas se observó un incremento en la actividad APX y

SOD plastidial (Schantz et al., 1995), posiblemente, en respuesta al aumento en la producción de radicales superóxido en dicho orgánulo (Livne & Gepstein, 1988; Simonne et al., 1997). Además, durante la maduración de los frutos de pimiento, se detectó un aumento en la actividad cisteína sintasa, glutatión sintasa y glutatión reductasa (Romer et al., 1992), lo que nos indica que el glutatión también podría jugar un papel importante en este fenómeno. Este contexto nos ha servido de plataforma para afrontar el estudio de los antioxidantes enzimáticos de frutos de distintas variedades de pimiento durante la maduración de éstos.

En esta Memoria Doctoral se analizó la actividad de algunas enzimas antioxidantes como la CAT, SOD, APX y GR en frutos de pimiento de distintas variedades (Vergasa, Biela, Lodosa y Bierzo) en dos estados de maduración a lo largo del periodo de cosecha (octubre-febrero). También, se llevó a cabo el estudio de la actividad de algunas enzimas deshidrogenasas generadoras de NADPH (G6PDH, 6PGDH, NADP-ICDH y enzima málico). Finalmente, se analizó la actividad enzimática de la GaILDH, enzima implicada en la última reacción de la ruta de síntesis de ascorbato, ya que dicha enzima parece ser uno de los principales puntos de regulación en dicha ruta.

La mayor actividad SOD durante la maduración de los frutos de pimiento analizados podría estar relacionado con un aumento en la generación de $O_2^{\cdot-}$ durante dicho proceso y consiguientemente de H_2O_2 , al ser producto de la reacción de la SOD. Los principales sistemas encargados de eliminar dicho peróxido de hidrógeno son la CAT y el ciclo ascorbato-glutatión. En las cuatro variedades analizadas, la actividad CAT disminuyó de manera general con la maduración del fruto, al igual que ya se había observado en el estudio de dicha enzima a nivel peroxisomal (Mateos et al., 2003). Este comportamiento fue similar al observado durante la senescencia de hojas de guisante (Pastori & del Río, 1997), lo que de alguna manera concuerda con considerar la maduración como una modalidad de senescencia. A su vez, la actividad APX, componente del ciclo ascorbato-glutatión y directamente relacionada con la eliminación de H_2O_2 , no parece afectarse de forma generalizada durante la maduración de los frutos de pimiento, ya que muestra comportamientos contrarios. Esta situación podría estar provocando una acumulación de H_2O_2 en los frutos maduros. Dado que éstos no mostraban síntomas de daño oxidativo, el H_2O_2 acumulado en los mismos podría estar actuando como molécula señal de los procesos de maduración.

Las células vegetales producen ROS, especialmente el H_2O_2 y el $O_2^{\cdot-}$, como mensajeros secundarios en la transducción de señales en muchos procesos asociados con el crecimiento y desarrollo de las plantas como la mitosis, tropismos y muerte celular (Schroeder et al., 2001a; 2001b; Foreman et al., 2003; del Río et al., 2003b; Foyer & Noctor, 2005; Zimmerman & Zentgraf, 2005). El H_2O_2 está implicado en las cascadas de señalización y en el control de la expresión de genes (Willekens et al., 1997). Por otro lado, la interacción entre el H_2O_2 y el ABA controla la apertura de estomas y, ambos, regulan la

función de los canales de Ca^{2+} (Pei et al., 2000). Además, una de las principales vías por las que las plantas transmiten información de las variaciones medioambientales es por medio de la producción de superóxido a nivel de la membrana plasmática (Doke et al., 1996). Este mecanismo de acción de las ROS no es considerado por algunos autores como un estrés oxidativo, sino más bien como un mecanismo de defensa de la planta genéticamente programada frente a situaciones adversas (Foyer & Noctor, 2005).

La concentración y estado redox del glutatión en la célula está regulada por un mecanismo complejo en el que están implicados la biosíntesis, utilización, degradación, oxidación/reducción, y transporte de este tripéptido (Noctor et al., 2002a). El estado redox del glutatión suele ser constante en la célula, salvo en situaciones provocadas por un estrés oxidativo extremo que lleva a la oxidación del glutatión hasta su forma oxidada GSSG. En plantas expuestas a ozono, ataque por patógenos o deficitarias en la actividad CAT, la oxidación del glutatión va acompañada de un aumento en la concentración total de éste (Gupta et al., 1991; Willekens et al., 1997; Vanacker et al., 2000; Noctor et al., 2002b). Sin embargo, en estrés por sequía la oxidación del glutatión no siempre está precedida de incrementos en la concentración del glutatión total (Smirnoff, 1993). Aunque el estado redox del glutatión depende del balance entre procesos oxidativos y la actividad GR *in vivo*, dicha actividad refleja en algunos casos tanto la aportación reductora del glutatión como la capacidad enzimática potencial de ésta (Noctor et al., 2002a). Durante la maduración de los frutos de pimiento, la actividad GR aumentó prácticamente en todas las variedades de pimiento analizadas. Este efecto también fue observado durante el almacenamiento de los frutos a 20°C durante 7 y 9 días (Jiménez et al., 2003). Ello nos indica que durante la maduración de los frutos de pimiento se mantuvo un reciclaje continuo del GSH, aunque éste no fuera utilizado por el ciclo ascorbato-glutatión en algunas variedades, como se puede desprender del análisis de la actividad APX, enzima inicial del ciclo.

Por otro lado, la concentración de glutatión total descendió en los extractos crudos de frutos de pimiento rojos con respecto a los de frutos verdes (Tabla 4.1), lo que nos hace pensar que el glutatión está interviniendo en la cascada de señalización del proceso de maduración o se está derivando hacia otras rutas metabólicas. De hecho, el glutatión es un metabolito muy abundante en plantas, donde tiene importantes y diversas funciones (Noctor & Foyer, 1998), interviniendo en la transducción de señales (Noctor et al., 2002a; Gómez et al., 2004), en los mecanismos de defensa celular y en el metabolismo del azufre (Noctor et al., 2002a). El GSH es necesario para el mantenimiento de la forma activa de algunas proteínas, ya que así se previene la formación de puentes disulfuros mixtos que generan la inactivación o agregación de éstas. Así, el GSH interviene manteniendo el estado redox, creando una barrera entre los residuos de cisteína de las proteínas y las ROS (Foyer & Noctor, 2005). La activación de la síntesis de GSH o su acumulación es un síntoma de una mayor oxidación del citosol (Foyer & Noctor, 2005). Durante la

maduración de los frutos de pimiento se detectó un incremento de la actividad cisteína sintasa, enzima relacionada con la síntesis de glutatión. Este hecho está relacionado además con la síntesis activa del potencial antioxidante y de modularores redox llevada a cabo durante la ya comentada transformación de cloroplastos en cromoplastos (Romer et al., 1992). En resumen, podría afirmarse que en nuestro caso, sería fundamental la presencia de un sistema de regeneración de glutatión reducido durante la maduración del fruto de pimiento.

Por otro lado, se observó una mayor capacidad de síntesis de ascorbato durante la maduración de los frutos de pimiento de las variedades estudiadas, dada la mayor actividad GalLDH detectada en dichos frutos, si bien los datos presentados sobre contenido de ascorbato en frutos verdes y rojos no mostrasen diferencias (Tabla 4.1.). Según este dato, 60 g de pimiento aportarían la cantidad diaria recomendada de vitamina C (60 mg). La ausencia de diferencias significativas entre los niveles de ascorbato de los extractos analizados concuerda con otros resultados descritos anteriormente para frutos de pimiento de distinta coloración y variedades (Simonne et al., 1997; Howard et al., 2000).

Por el contrario, otros autores han detectado un incremento en el contenido de ascorbato durante la maduración de los frutos de pimiento (Howard et al., 2000; Estrada et al., 2000; Martínez et al., 2005). Estudios previos llevados a cabo con pimientos morrones “Fresno de la Vera” demostraron que los frutos de pimiento verdes, almacenados a 20°C durante 10 días, llegaban a alcanzar los niveles de vitamina C presentes en los frutos de pimiento rojos directamente recogidos de la planta (Martínez et al., 2005). Sin embargo, los frutos rojos almacenados a 20°C perdían un 25% de su contenido en ascorbato. Por otro lado, durante la refrigeración de los frutos de pimiento a 4°C no se observaron diferencias significativas en el contenido de ascorbato, excepto en los frutos rojos, los cuales mostraron pérdidas de un 15% (Martínez et al., 2005). Esto podría explicar el que algunos autores detectaran los mismos niveles de ascorbato en frutos verdes y rojos (Simonne et al., 1997; Howard et al., 2000; Deepa et al., 2005). En base a todo ello, deducimos que este parámetro no presenta un comportamiento generalizado durante la transición del fruto verde al rojo, sino que ello parece depender de la variedad, del tipo de cultivo, las condiciones meteorológicas y la temporada de producción (Markus et al., 1999).

Los valores de ascorbato obtenidos en nuestro caso están en el rango de los descritos por otros autores (Howard et al., 2000) y mayores a los detectados en una gran variedad de frutas y verduras (fresas, uva, calabaza roja, calabaza verde, espinaca, brócoli y tomate, entre otros), cuyo rango está comprendido entre 2-61 mg/100 g de peso fresco (Proteggente et al., 2002). Sin embargo, cuando se midió la capacidad antioxidante total en equivalentes Trolox, los pimientos rojos mostraron menor contenido en ascorbato que la espinaca y el brócoli, pero mayor que la calabaza (Sofic et al., 1996). No obstante, la

capacidad antioxidante total incluye otras moléculas como carotenoides y flavonoides que no fueron determinados en este estudio.

En nuestro caso, el ascorbato, podría estar actuando junto al glutatión y H_2O_2 , en la señalización molecular del proceso de maduración de los frutos de pimiento. De hecho, cada vez existen más evidencias que apuntan hacia la importancia del ascorbato en biología vegetal, con funciones en la síntesis de hormonas, la expresión génica, la división y el crecimiento celular, y la muerte celular programada o apoptosis (Puppo et al 2005; Vanacker et al. 2006).

Sumando la actividad enzimática de las NADP-deshidrogenasas (G6PDH, 6PGDH, ICDH y enzima málico) se determinó la aportación teórica de estas enzimas al NADPH total de la célula. De este modo, se observó que el contenido de NADPH total aumentaba en frutos maduros respecto a verdes en las variedades Vergasa, Biela y Lodosa, lo que contribuiría al mantenimiento del estado redox celular durante la maduración de estas variedades

Aparte de otras rutas, el NADPH es utilizado para la regeneración del ascorbato por la MDAR y del GSH mediante la enzima GR, lo que complementaría la función del glutatión en la maduración del fruto, según se indicó anteriormente. Por otro lado, el NADPH podría ser empleado por las NADPH oxidasas de la membrana plasmática de las células vegetales. Estas NADPH oxidasas controlan el desarrollo de la planta produciendo ROS, las cuales regulan la expansión de las células de la planta a través de la activación de canales de Ca^{2+} (Foreman et al., 2003). Estas proteínas tienen una región citoplasmática de aproximadamente 300 residuos que está relacionada con los efectos reguladores de los iones Ca^{2+} (Foreman et al., 2003). El NADPH utilizado por esta proteína es principalmente aportado, en presencia de luz, por la cadena de transporte electrónico del cloroplasto, mientras que en oscuridad, parece que son la G6PDH y la EM las encargadas de aportar el NADPH necesario (Foyer et al., 1997). En ciertas situaciones de estrés, principalmente ataque por patógenos, se ha observado una activación de dicha actividad NADPH oxidasa. Ello genera un aumento en la liberación de radical superóxido al medio que rápidamente es desproporcionado a H_2O_2 , que es liberado e interviene en la transducción de señales (Mori & Schroeder, 2004). En nuestro material vegetal, en el que hay una desaparición del aparato fotosintético por la conversión de cloroplastos en cromoplastos la NADPH oxidasa podría ser uno de los mecanismos implicados en la maduración de los frutos de pimiento, si bien, hasta la fecha, no tenemos evidencias directas de que esto tenga lugar.

En general, tanto las ROS como el glutatión, el ascorbato y los niveles de NADPH pueden tomar parte en los procesos de señalización que tienen lugar durante la maduración del fruto de pimiento (Fig. 5.2). De hecho, el desarrollo y el crecimiento de las plantas están dirigidos por reacciones de transferencia electrónica, en las que el GSH, el ascorbato y el NAD(P)H son compuestos claves de la fase soluble de la célula para

interaccionar con las especies de oxígeno reactivo. El NADPH, el glutatión y el ascorbato actuarían como pares (formas reducidas y oxidadas) de manera global, o bien independientemente de forma secuencial para modular el estado redox de la célula y para transmitir la información específica que regula las rutas de señalización (Noctor, 2006). A ello hay que sumar otras posibles interacciones entre la ruta de biosíntesis del ascorbato y la ruta de las pentosas fosfato, proveedora de NADPH, puesto que ambas vías comparten en su inicio el mismo metabolito, la glucosa-6-fosfato. De hecho, en estudios recientes se ha observado que tanto el ascorbato como la L-galactono-g-lactona deshidrogenasa, enzima que sintetiza la vitamina C, estimulaban la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa citosólica en células de raíz de *Allium cepa* L. (Córdoba-Pedregosa et al., 2005).

En suma, la maduración del fruto de pimiento es un proceso de diferenciación que va acompañada de una serie de sucesos en los que se desarrolla un incremento en la producción de ROS. Como consecuencia, la célula induce sus sistemas antioxidantes como respuesta frente a las condiciones pro-oxidantes que se generan. En dichas circunstancias, las células que son capaces de mitigar los efectos nocivos de los ROS se diferencian; en caso contrario, las células mueren (Sauer et al., 2001; Ogawa, 2005; Puceat, 2005).

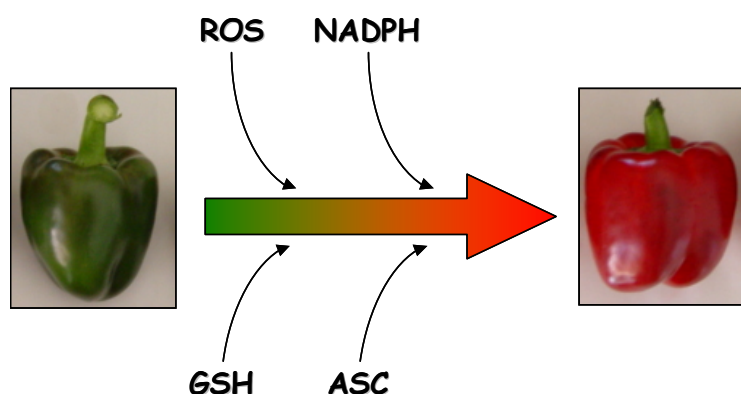


Fig. 5.2. Modelo que representa la posible implicación de las especies de oxígeno reactivo (ROS), los niveles de NADPH, el glutatión reducido (GSH) y el ascorbato (ASC) en los procesos de señalización que tienen lugar durante la maduración del fruto de pimiento.

5.3. FUNCIÓN DE LOS PEROXISOMAS EN LA MADURACIÓN DE FRUTO DE PIMIENTO.

En esta Tesis Doctoral se investigó también la participación de los peroxisomas en la maduración de los frutos de pimiento. En ella se desarrolló por primera vez la purificación y caracterización de peroxisomas de frutos de una planta superior. Para ello se tuvo que adaptar el método de López-Huertas et al. (1995) descrito para la purificación de peroxisomas de hojas de guisante, al aislamiento de peroxisomas de fruto de pimiento.

Entre los cambios realizados hay que destacar: (i) ajuste de la concentración de sacarosa del medio de extracción, incrementándose a 1,2 M. De este modo, se contrarrestaba la dilución de los reactivos del medio por el gran contenido acuoso de los frutos, lo que dañaría la débil estructura de dichos orgánulos por un choque osmótico; (ii) reducción de la velocidad de trituración del fruto en el homogenizador Omnimixer, siendo ésta más suave que en el aislamiento de peroxisomas de guisantes; (iii) incubación de 30 minutos en baño de hielo del extracto obtenido.

Por otro lado, dado que esta fue la primera vez que se purificaron peroxisomas de los frutos de pimiento, se llevó a cabo una caracterización completa del gradiente de densidad de sacarosa obtenido. La fracción peroxisomal se situaba a una densidad de equilibrio media de $1,24 \text{ g} \cdot \text{cm}^3$. Similar a lo descrito para los peroxisomas de hojas de guisante y característico de estos orgánulos (López-Huertas et al., 1995).

Una propiedad típica de los peroxisomas es su plasticidad metabólica debido a que su contenido enzimático varía dependiendo del organismo, tipo de célula o tejido y de las condiciones medioambientales en las que se encuentre (Mullen & Trelease, 1996; Corpas et al., 2001; del Río et al., 2002a). Como ejemplo tenemos la transformación de los glioxisomas en peroxisomas de hojas en presencia de la luz (Huang et al., 1983; Masters & Crane, 1995; Mullen & Trelease, 1996) o la transición inversa de los peroxisomas de hojas en glioxisomas durante la senescencia o en situaciones de estrés provocado por cadmio (Landolt & Matile, 1990; Pastori & del Río, 1994; Nishimura et al., 1996; del Río et al., 1998b; McCarthy et al., 2001).

En lo que respecta a la estructura de los peroxisomas de frutos de pimiento verdes y rojos, no se observaron diferencias significativas entre ambos tipos de peroxisomas. Habría que destacar la notable presencia de peroxisomas con cuerpos cristalinos de tamaños y formas variables en ambos tipos de frutos.

Mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión se detectó una notable transformación de los cloroplastos de frutos verdes en cromoplastos de frutos rojos. Estos cambios morfológicos, como se comentó anteriormente, parecen ir acompañados de variaciones a nivel bioquímico, como un aumento en la síntesis de carotenoides y degradación de clorofila, lo que podría explicar el cambio de color de dichos frutos de pimiento durante la maduración (Bramley, 1997; Bouvier et al., 1998; Josee et al., 2000). Esta peculiaridad de la población plastídica coincide con otros estudios anteriores sobre la formación de cromoplastos en pimiento y otras especies vegetales (Ljubesic et al., 1991; Cámara et al., 1995; Huguency et al., 1995). El proceso de diferenciación de los cromoplastos implica el desmantelamiento de las rutas fotosintéticas de los cloroplastos y la síntesis de nuevas enzimas, características del pimiento rojo, incluidas aquellas que son responsables de la biosíntesis de los carotenoides específicos de los cromoplastos (Bouvier et al., 1998).

Los peroxisomas de frutos de pimiento mostraban diferencias metabólicas

dependiendo de que el fruto fuera verde o estuviera maduro. Los peroxisomas de frutos rojos carecen de actividad HPR y GOX, lo que indica una ruptura del aparato fotosintético y rutas asociadas producidas por la conversión de cloroplastos en cromoplastos y una importante transformación de los peroxisomas a nivel bioquímico. A su vez, se observó una actividad limitada de la β -oxidación de ácidos grasos en los peroxisomas de frutos de pimiento rojos provocada por una disminución en la actividad ACOX y una alteración del ciclo del glioxilato, cuya actividad es menor nuevamente en los peroxisomas de frutos rojos. Estos resultados sugieren que el efecto de la maduración en los peroxisomas de frutos de pimiento es distinto al desarrollado por la senescencia foliar, donde los peroxisomas de hojas se transforman en glioxisomas con una marcada actividad de la β -oxidación de ácidos grasos y del ciclo del glioxilato para la generación de azúcares a partir de reservas de lípidos (Pastori & del Río, 1997). De hecho habría que destacar la particularidad de los peroxisomas de frutos de pimiento, ya que sobre todo en verdes coexisten las enzimas de la fotorrespiración y del ciclo del glioxilato, rutas que parecían incompatibles en orgánulos en el mismo estado metabólico. La presencia simultánea de estas rutas en los peroxisomas de frutos de pimiento hace de ellas un buen modelo para estudiar la transición de peroxisomas en glioxisomas.

Aunque la actividad tiolasa (enzima que cataliza la última etapa de la β -oxidación peroxisomal; Baker et al., 2006) y su contenido proteico eran similares en frutos verdes y rojos, parece que esta ruta no es funcional de forma igual en ambos frutos. De hecho, la actividad de la ACOX, la primera enzima de la ruta, es más baja en los pimientos rojos, lo que podría estar limitando la ruta de la β -oxidación en estos frutos. Éste puede ser un punto de regulación del metabolismo de ácidos grasos en peroxisomas de los frutos rojos, lo que explicaría el mayor contenido de cuerpos lipídicos observado por microscopía electrónica en estos frutos. La menor actividad de las enzimas del ciclo del glioxilato en los frutos rojos se podría explicar por la baja β -oxidación de ácidos grasos, ya que esta ruta proporciona el acetil-CoA necesario para la actividad malato sintasa.

Con respecto al metabolismo relacionado con ROS en los peroxisomas de frutos de pimiento cabría destacar que la menor actividad de la GOX y la ACOX en frutos rojos supondrían unos niveles menores de H_2O_2 en los peroxisomas de estos frutos. Por otro lado, a pesar de la ausencia de actividad NADP⁺-isocitrato deshidrogenasa en los frutos rojos, los niveles de NADP proporcionados por la G6PDH y la 6PGDH podrían ser suficientes para proveer a estos orgánulos de poder reductor. Por tanto, la presencia de las deshidrogenasas de la ruta de las pentosas fosfato representa un sistema antioxidante eficiente de reciclaje del NADPH para su posterior utilización en el metabolismo peroxisomal, especialmente en el ciclo ascorbato-glutation, lo que contribuiría a disminuir la concentración de peróxido de hidrógeno en la célula.

La presencia de xantina oxidasa y superóxido dismutasa en los peroxisomas de frutos de pimiento confirma que, de manera general, estas enzimas forman parte del

metabolismo de estos orgánulos en células vegetales, independientemente de la especie y del tipo de tejido analizado. La isoenzima de la SOD detectada en este estudio corresponde a una Mn-SOD, al igual que las descritas anteriormente en otras especies vegetales (del Río et al., 2002a). Además el tamaño de la subunidad de esta isoenzima (27 kDa) es el característico de las Mn-SODs vegetales (Palma et al., 1998).

Los resultados de actividad XOD y SOD sugieren que los niveles de radicales O_2^- en los peroxisomas son mayores en los frutos rojos que en los verdes. Por tanto, esta ROS podría tener una función en la maduración de los frutos de pimiento, de manera que la SOD actuaría modulando la concentración de superóxido. De hecho, se ha propuesto que los ROS regulan la biosíntesis de carotenoides en pimiento. Se ha observado que las ROS son potentes inductores de la expresión de los RNAm de genes carotenogénicos durante el desarrollo de cromoplastos (Bouvier et al., 1998) y la diferenciación de los plastos en general (Vanyushin et al., 2004). Esto confirma la hipótesis de que las ROS están implicadas en los mecanismos de señalización oxidativa durante la maduración del fruto de pimiento.

En la Figura 5.3 se muestra un modelo del posible funcionamiento del metabolismo oxidativo presente en peroxisomas de frutos de pimiento. En él aparecen indicadas las posibles interacciones entre los sistemas de producción y eliminación de ROS.

En estudios previos, se ha descrito una activación de la biogénesis de peroxisomas por acción del H_2O_2 (López-Huertas et al., 2000). Por otro lado, en otras situaciones de estrés oxidativo como el generado por la senescencia y el tratamiento con altas concentraciones de Cd provocan un aumento en el número de peroxisomas (Pastori & del Río, 1997; McCarthy et al., 2001). Por el contrario nuestros datos no parecen mostrar cambios importantes en la población peroxisomal durante la maduración de los frutos de pimiento.

También se determinó la concentración de ascorbato y glutatión total en los extractos crudos y peroxisomas de ambos tipos de frutos, verdes y rojos. Aunque los niveles de glutatión a nivel peroxisomal fueron similares en ambos tipos de frutos, los niveles de ascorbato son unas 3 veces mayores en peroxisomas de frutos verdes que en los de frutos rojos. Por lo tanto, la contribución de los peroxisomas al contenido de ascorbato, aunque poco en comparación con el contenido de ascorbato en extractos crudos, podría ser significativa, considerando la cantidad de vitamina C que los frutos de pimiento aportan a la dieta humana. Sin embargo, estos niveles son más propios de procesos que impliquen transducción de señales, por lo que, a este nivel, los peroxisomas desempeñarían un papel importante en la señalización molecular durante la maduración del fruto, y constituirían el esquema general indicado anteriormente.

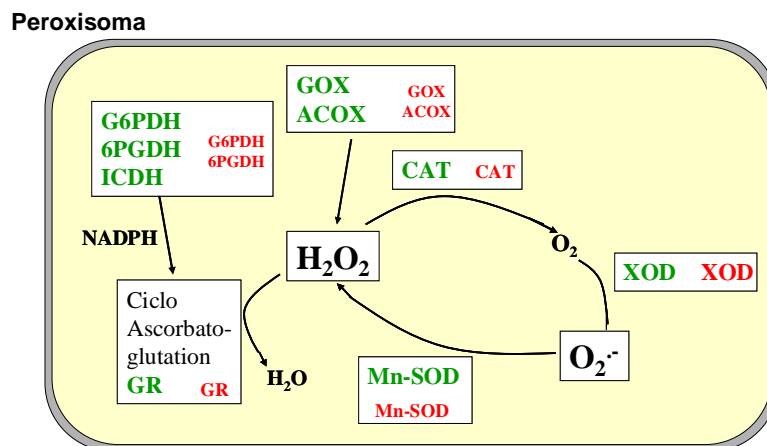


Fig. 5.3. Metabolismo de ROS en peroxisomas de frutos de pimiento. En peroxisomas de frutos rojos se detectó una menor actividad de la glicolato oxidasa (GOX) y acil-CoA oxidasa (ACOX), ambas generadoras de H₂O₂ en estos orgánulos. A su vez, la catalasa (CAT) y la glutatión reductasa (GR) presentaban actividad más baja en los frutos rojos que en verdes. La reducida actividad de la GR y la CAT en peroxisomas de frutos de pimiento rojo podría suponer un aumento en el contenido de H₂O₂ en dichos frutos. También se observó menor actividad de las deshidrogenasas G6PDH, 6PGDH e ICDH en los peroxisomas de frutos rojos respecto a los de los verdes. Ello supondría una menor producción de NADPH, lo que podría ser el factor limitante del ciclo ascorbato-glutation en los peroxisomas de frutos rojos. Por otro lado, se detectaron los mismos niveles de actividad XOD en los peroxisomas de frutos verdes y rojos. Ello indica que en ambos tipos de peroxisomas, la XOD está generando niveles similares de O₂^{•-}. Al ser la actividad SOD menor en los peroxisomas de frutos rojos, dicho radical superóxido se estaría acumulando más en los frutos maduros que en los verdes. Este aumento en la generación de radical superóxido en frutos rojos podría ser uno de los factores que desencadenasen los procesos de maduración del fruto. GOX, glicolato oxidasa; ACOX, acil-CoA oxidasa; CAT, catalasa; XOD, xantina oxidasa; Mn-SOD, Mn-superóxido dismutasa; GR, glutatión reductasa; G6PDH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 6PGDH, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; ICDH, NADP-isocitrato deshidrogenasa.

5.4. LOS ANTIOXIDANTES COMO MARCADORES DE LAS VARIEDADES DE PIMIENTO Y DE LA RESPUESTA FRENTE A VARIACIONES AMBIENTALES.

Para desarrollar esta investigación se han analizado la actividad y expresión génica, mediante PCR semicuantitativa de las enzimas catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR), galactono- γ -lactona deshidrogenasa (GalLDH), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP (ICDH) y enzima málico (EM). Comparando los resultados de actividad, contenido proteico y de expresión génica, podríamos deducir que la regulación de la mayoría de ellas en las condiciones estacionales estudiadas ocurriría, principalmente, a nivel post-transcripcional. No obstante, en el caso de la NADP-ICDH, y considerando la correspondencia entre los patrones de actividad y el contenido proteico, obtenido por transferencia de western empleando un anticuerpo frente a la enzima de hojas de guisante, también se podría pensar que hay una regulación post-traduccional. En cualquier caso, este aspecto de la regulación está aún por estudiar. Hay que considerar que las variedades de pimiento empleadas corresponden a híbridos muy seleccionados por la empresa Syngenta Seeds S.A. y, por tanto, poseen una estabilidad genética bastante

elevada. Esto hace que las posibles regulaciones a nivel génico se produzcan en condiciones extremas, y no en las empleadas en nuestro diseño experimental. Pero, por otro lado, es conveniente considerar que no siempre es sencillo establecer una correlación entre la expresión génica y la actividad enzimática, sobre todo en los sistemas antioxidantes que nosotros hemos estudiado ya que, en la mayoría de los casos, estos sistemas enzimáticos constan de varias isoenzimas con codificación génica y ubicación celular diferentes.

En una investigación paralela a ésta, llevada a cabo en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CSIC, Murcia), y encuadrada dentro del mismo proyecto de investigación, se han analizado los niveles de ascorbato (ascorbato más deshidroascorbato: ASC + DHA), actividad antioxidante total (AAT), peroxidación lipídica (PL) y oxidación de proteínas (grupos carbonilo; CO) (Mateos et al. 2005; 2006). Así pues, nuestros resultados son complementarios con los del centro de Murcia, y, en ocasiones, haremos referencia a ellos a lo largo de este capítulo.

De todos los parámetros medioambientales analizados, la radiación lumínica y la temperatura son los factores que más pudieron afectar a los frutos analizados, ya que en los invernaderos donde fueron cultivados se mantuvieron constantes otro tipo de parámetros como los niveles de CO₂ y disponibilidad de agua y nutrientes. En este trabajo hemos observado que los frutos de pimiento sometidos a periodos más largos de alta radiación lumínica y temperatura (E03) presentaban mayor contenido en ascorbato reducido que los que cuajaron y se desarrollaron en un periodo más frío y con menor radiación lumínica (F03) (Mateos et al. 2005; 2006). Sin embargo, los niveles de ascorbato total (ascorbato + deshidroascorbato) se mantuvieron constantes en las dos cosechas analizadas. En F03, se detectó un descenso en la actividad GalLDH, por lo que deducimos que bajo estas condiciones medioambientales, la regulación de los niveles de ascorbato implica la reducción de la síntesis de *novoo* del ascorbato. Como ha sido descrito anteriormente por otros autores (Tabata et al., 2002; Pateraki et al., 2004), la GalLDH es susceptible a la luz y dicha enzima es más activa cuando las condiciones luminosas son altas, como ocurre durante E03. De hecho, dicho descenso en actividad GalLDH coincide además con una menor expresión génica de dicha enzima en las variedades Dulce Italiano y Galileo. La mayor tasa de síntesis de ascorbato en E03 podría estar relacionada con una mayor tasa fotosintética en los frutos que estaban expuestos a intensidades de luz más altas. Este hecho ya fue anteriormente descrito por otros autores, que observaron que el contenido en ácido ascórbico se correlacionaba con la capacidad fotosintética de las hojas de cebada (Smirnoff & Pallanca, 1996). A su vez, el descenso en ascorbato reducido durante F03 coincide con un aumento en la actividad APX en dicho periodo, sobre todo en Vergasa y Biela. Por el contrario, la actividad GR, que forma parte del ciclo ascorbato-glutation junto a la APX, disminuye en F03 respecto a E03, lo que hace pensar en que más que en el ciclo, la APX podría actuar regulando el estado redox del ascorbato. La menor

actividad GR coincide a su vez con un descenso en los niveles de NADPH en F03, que podrían estar limitando dicha actividad GR. Además, un descenso en los niveles de NADPH, como el observado en los frutos F03, podría ocasionar una reducción en el funcionamiento de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Moller, 2001). Se podría explicar así el descenso que experimenta la actividad GalLDH, relacionada con la cadena de transporte mitocondrial a nivel del complejo III y IV (Bartoli et al., 2000). La asociación de la GalLDH a la membrana mitocondrial interna y a la cadena de transporte electrónico de ésta (Mutsuda et al., 1995; Siendones et al., 1999; Bartoli et al., 2000), implicaría una menor utilización del ascorbato, como donador de electrones a dicho nivel. Por lo tanto, nuevamente observamos, que el estado redox del ascorbato podría estar desempeñando un papel importante durante los procesos de adaptación de los frutos de pimiento a las condiciones ambientales existentes durante el desarrollo del fruto en el periodo de tiempo analizado.

Se aplicó el paquete estadístico del análisis de componentes principales (PCA, *Principal Components Analysis*) a los resultados obtenidos en el estudio de la capacidad antioxidante de los frutos de pimiento de distintas variedades, sometidos a variaciones ambientales. Los parámetros analizados han sido los descritos en esta Memoria Doctoral (CAT, SOD, APX, GR, GalLDH, G6PDH, 6PGDH, NADP-ICDH, EM y NADPH total), además de los medidos en el CEBAS (CSIC) de Murcia (PL, CO, AAT, ASC y DHA) (Mateos et al., 2006) (Fig. 5.4).

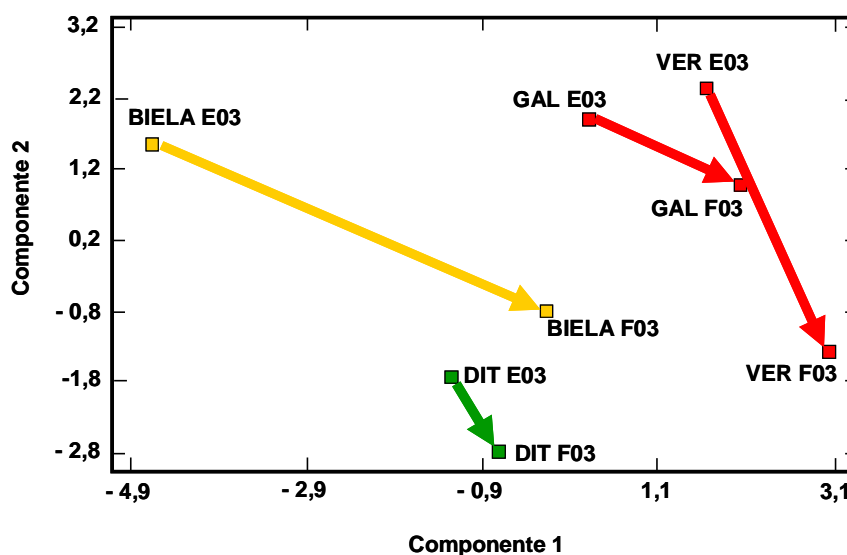


Fig. 5.4. Análisis de componentes principales (PCA) en frutos de diferentes variedades de pimiento sometidas a las variaciones ambientales establecidas (E03 y F03) (Mateos et al., 2006). Las variedades de fruto de pimiento utilizadas en este análisis han sido: Vergasa (VER), Biela (BIE), Galileo (GAL) y Dulce Italiano (DIT) y los parámetros analizados han sido: la peroxidación lipídica (PL), concentración de ascorbato (ASC) y deshidroascorbato (DHA), grupos carbonilo (C=O), actividad antioxidante total (AAT) y las actividades enzimáticas catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), NADP-isocitrato deshidrogenasa (ICDH), enzima málico (EM) y NADPH total.

El PCA nos permite, mediante algoritmos, obtener unos componentes principales por los que se asigna un valor a cada una de las recogidas (E03 y F03) de las cuatro variedades (Vergasa, Biela, Dulce italiano y Galileo) en función de los parámetros estudiados. En nuestro caso, la aplicación del PCA nos proporcionó tres componentes que representaban el 83% de la variabilidad total de las medidas efectuadas. En la Fig. 5.4 se muestran los valores calculados para cada variedad en las dos cosechas en base a los dos componentes principales mayoritarios. Uniendo los valores correspondientes a cada variedad se obtiene un vector cuyo tamaño es indicativo de la variabilidad que muestra dicha variedad con respecto a los parámetros medidos en cada cosecha. Basándonos en esta distribución de vectores, se dedujo que las variedades de pimiento que sufrían más variación y, por tanto, eran más inestables a los cambios ambientales, eran Biela y Vergasa, mientras que las más estables a estas variaciones estacionales eran Dulce italiano y Galileo.

Según el PCA, los parámetros de más peso específico para el cálculo de sus respectivos algoritmos fueron la SOD, la APX y la PL en las variedades Vergasa y Galileo. Biela se caracterizó por ser la variedad más inestable frente los cambios ambientales, debido principalmente a las variaciones detectadas a nivel del NADPH total, la ICDH, la 6PGDH, la GalLDH, la EM, la GR, las proteínas oxidadas y el contenido en ascorbato. Por el contrario, Dulce Italiano fue la variedad que mostró mayor estabilidad, debiéndose esto a una menor variabilidad en la mayoría de sus parámetros. Esta diferenciación entre las cuatro variedades en base al metabolismo oxidativo de las mismas se corresponde con las características de cada una de ellas. Así, es lógico pensar que Biela al ser de maduración más corta sea la que más variabilidad presente en su metabolismo. En el lado opuesto está Dulce italiano que es de maduración más larga, lo que hace que su metabolismo sea más estable. En estas circunstancias podemos considerar a los sistemas antioxidantes estudiados como unos buenos marcadores de la variedad así como de la respuesta frente a los cambios ambientales.

En general, los parámetros más sensibles a las variaciones ambientales (temperatura y radiación luminosa fundamentalmente) en los frutos de pimiento empleados fueron la peroxidación lipídica, las actividades deshidrogenasas dependientes de NADP⁺, la GalLDH y la GR. Como ya se ha visto en otras ocasiones a lo largo de esta Memoria Doctoral, el NADPH es un componente importante para el ciclo ascorbato-glutation. Además, la GR está directamente relacionada con dicho proceso y con el reciclaje del glutation reducido. Y como también se ha comentado anteriormente, la GalLDH está implicada en la síntesis de ascorbato. Esto nos lleva a pensar que en los mecanismos de adaptación de los frutos de pimiento a los cambios estacionales estudiados juegan un papel importante la concentración y estado redox del ascorbato y del glutation. En nuestras condiciones, estos compuestos, además de actuar como potentes antioxidantes frente a las condiciones cambiantes, posiblemente participan

también en la transducción de señales celulares emitidas como respuesta a las variaciones ambientales.

5.5. SÍNTESIS DE ASCORBATO EN FRUTOS DE PIMIENTO.

Teniendo en cuenta la importancia del ascorbato en los procesos de maduración del fruto de pimiento y en la respuesta frente a las variaciones ambientales, según se ha indicado anteriormente, consideramos oportuno abordar el estudio de la biosíntesis de la vitamina C y su posible regulación en los frutos de pimiento. Nos centramos, sobre todo, en las dos últimas etapas más comunes descritas en plantas de la síntesis de ascorbato: las catalizadas por la L-galactosa deshidrogenasa (GalDH) y por la L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa (GalLDH). Se sabe además que esta última enzima participa en otra ruta de síntesis de ascorbato descubierta más recientemente en plantas (Wheeler et al., 1998; Agius et al., 2003).

En frutos maduros de la variedad Biela se observó un incremento en la actividad GalLDH con respecto a los frutos verdes que estaba acompañada de un aumento paralelo de la actividad GalDH, importante punto de regulación de la ruta de Smirnoff-Wheeler, propuesta para la síntesis de ascorbato en plantas superiores (Mieda et al., 2004). Ésto demuestra que durante la maduración de los frutos de pimiento se mantiene activa la mencionada ruta. Ello no descarta que en nuestro material se esté llevando a cabo otra ruta alternativa de síntesis de ascorbato, como la que se ha descrito en la fresa (Agius et al., 2003). Dicha ruta implica la inversión del esqueleto de carbono, pero de forma distinta a la llevada a cabo en animales y, hasta el momento, sólo ha sido descrita durante la maduración de las fresas (Agius et al., 2003). En esta nueva vía de síntesis de vitamina C en plantas interviene el D-galacturonato, producto de la degradación de pectinas y principal componente de las paredes celulares. De hecho, la pérdida de turgencia de los frutos de pimiento durante la maduración podría estar relacionada con la degradación de pectinas, destinadas a un incremento en la síntesis de ascorbato por la ruta del D-galacturónico. Además, la pérdida de la firmeza del mesocarpo, provocada por la ruptura de la pared celular, podría constituir una estrategia para conservar las pérdidas de carbono durante los procesos de maduración según se ha descrito anteriormente (Davey et al., 2000). No obstante, aún no se ha investigado si esta nueva ruta de síntesis de ascorbato es operativa en los frutos de pimiento. Actualmente éste es uno de los temas prioritarios de nuestro grupo de investigación.

Por el contrario, en la variedad Vergasa, al mismo tiempo que la actividad GalDH aumentaba durante la maduración del fruto, la actividad GalLDH experimentaba un descenso. En esta variedad la GalLDH podría estar inhibiéndose por el ascorbato por una regulación de retroalimentación. Ésto estaría apoyado por la hipótesis propuesta por otros autores que indican que la GalLDH juega un papel importante en la regulación de la síntesis de ascorbato (Tabata et al., 2002; Tamaoki et al., 2003). Por el contrario, en cultivos

celulares de *Arabidopsis* se observó que la cantidad de ascorbato final era mayor de la requerida para un crecimiento saludable de la planta, por lo que se dedujo que, en ese caso, no había una regulación de retroalimentación a nivel de la GalLDH (Davey et al., 2000).

Los resultados de expresión y actividad de la GalLDH en las variedades Biela y Vergasa sugieren que existen diversas formas de modulación de la síntesis de vitamina C en frutos de pimiento que pueden depender de la variedad y, posiblemente, del tipo de fruto, ya sea californiano, lamuyo o dulce italiano. Por otro lado, el que no se estén produciendo variaciones en la expresión de la GalLDH durante la maduración de los frutos, tanto de la variedad Vergasa como de Biela, nos indica que dicha enzima está siendo regulada post-transcripcionalmente.

Otro aspecto importante a tener en cuenta en la regulación de la síntesis de ascorbato es el estado redox de la célula (Wolucke & Van Montagu, 2003). La actividad GDP-manosa-3,5-epimerasa, posible punto de regulación de la ruta de síntesis de ascorbato Smirnoff-Wheeler, es sensible al estado redox de la célula, siendo inhibida en presencia de NAD(P)H (Wolucka & Van Montagu, 2003). De hecho, se observó que para que se llevara a cabo una tasa óptima de síntesis de ascorbato por esta ruta era imprescindible el flujo de electrones a través del complejo I de la cadena de transporte mitocondrial (Millar et al., 2003). Sin embargo, para que se lleve a cabo la ruta de síntesis del D-galacturónico es necesaria la presencia de NADPH a nivel de la D-galacturónico reductasa (GalUR). Durante la maduración de los frutos de pimiento se observó un incremento en la producción de NADPH. Por lo tanto, el estado redox de la célula podría ser el mecanismo encargado de discernir entre una u otra vía de síntesis de ascorbato dependiendo de las condiciones intra y extracelulares.

La actividad GDP-manosa pirofosforilasa, otra enzima de la ruta de Smirnoff-Wheeler que cataliza la transformación de la D-manosa-1P en GDP-manosa (Ishikawa et al., 2006), también participa en otros procesos como la síntesis de carbohidratos de la pared celular o la glicosilación de proteínas. De hecho, la GDP-manosa es una fuente de manosa para la pared celular. Estudios previos han demostrado que la infiltración con GDP-manosa de frutos de pimiento verdes no provocaba un aumento en la síntesis de ascorbato como ocurría cuando se les infiltraba con L-galactona-1,4-lactona (Barata-Soares et al., 2004). Esto puede deberse a que la fosforilación de la manosa es un factor limitante en la síntesis de ascorbato, ya que ello requiere un suplemento energético, por lo que, en ese caso, la manosa podría destinarse a otras rutas. Como dicha enzima es dependiente de GTP, se ha propuesto que el GTP podría ser producido por la nucleosido difosfato quinasa (NDPK). De hecho, dicha NDPK podría utilizar el GDP generado por una reacción posterior en la ruta y que está catalizada por la enzima GDP-L-galactosa fosforilasa (Ishikawa et al., 2006), la cual lleva a cabo la transformación de la GDP-L-galactosa en L-galactosa-1P y GDP (Ishikawa et al., 2006). Durante la maduración de los

frutos de pimiento analizados, se ha observado un descenso en la producción de GTP a nivel de la NDPK, que coincide con un descenso en la síntesis de ascorbato (resultados no presentados). Ello también podría estar limitando la ruta Smirnoff-Wheeler durante la maduración de los frutos. Por otro lado, el descenso en los niveles de GTP también podría estar limitando la producción de GDP-manosa para la síntesis de polisacáridos de la pared celular.

En resumen, según nuestros resultados, parece que la síntesis de ascorbato en frutos de pimiento está regulada en, al menos, tres etapas que corresponden a las reacciones de la GalDH, de la GalLDH y de la fosforilación de la manosa.

Por otro lado, se observó que la expresión de la GalLDH era mayor en flores y hojas de la planta de pimiento que en los frutos, si bien este compartamiento no se correspondía con los valores de actividad enzimática. En hojas, este patrón de la GalLDH apoyaría la hipótesis de que parte del ascorbato producido en ella sería transportado vía floema hasta órganos “sumidero” de ascorbato (Franceschi & Tarlyn, 2002; Lorence et al., 2004). Aunque el ascorbato se encuentra en la mayoría de los tejidos de la planta, este antioxidante suele estar más concentrado en los órganos fotosintéticos, frutos y meristemas que en los órganos no fotosintéticos como las raíces (Davey et al., 2000). En nuestro caso, el ascorbato generado por la GalLDH de las hojas, aparte de ser empleado en el propio metabolismo foliar podría ser exportado a los frutos, donde participaría como antioxidante pero también en procesos de maduración y respuesta frente a estreses ambientales según se apuntó anteriormente. En este último caso, el ascorbato aportado por las hojas complementaría el producido por el mismo fruto, como ha sido recientemente descrito (Ishikawa et al., 2006).

En el caso de las flores, la discrepancia entre los niveles de expresión y la actividad detectada en este órgano podría ser debida a un complejo sistema de regulación en el que no se descartaría la implicación de iRNA (RNA de interferencia). En cualquier caso, la potencialidad de las flores de sintetizar ascorbato sería de utilidad en los primeros estadios de la polinización y del cuaje del fruto, situaciones en las que posiblemente aún no se haya activado la ruta de síntesis en los frutos. En flores de *Arabidopsis thaliana* se han detectado altos niveles de ascorbato que están relacionados, a su vez, con una alta expresión del gen *miox4*, el cual codifica una mioinositol oxigenasa, enzima implicada en otra posible ruta de síntesis de ascorbato en plantas superiores (Lorence et al., 2004). Por el contrario, en flores de fresa, los niveles de ascorbato y de expresión de la GalUR no eran detectables (Agius et al., 2003).

En los tallos de pimiento analizados los niveles de expresión de la GalLDH eran mayores que los detectados en hojas o flores. La demanda de ascorbato por los tejidos en crecimiento es alta, ya que la vitamina C es posiblemente requerida para la regulación de la división y elongación celular (Smirnoff, 2000). Posiblemente el patrón de actividad GalLDH en los tallos de pimiento sea debido a un mayor requerimiento de este órgano, de

cuyo crecimiento depende la cosecha de cada planta de esta especie.

Los resultados descritos hasta ahora enfatizan la relevancia de la GalLDH en el metabolismo del fruto de pimiento. Por consiguiente, consideramos interesante caracterizar dicha enzima en nuestro material vegetal. Aunque la actividad enzimática encargada de la oxidación de la L-galactono- γ -lactona a ácido ascórbico fue descrita hace algunas décadas en plantas superiores (Mapson et al., 1954), la enzima que cataliza dicha reacción, la GalLDH, no fue caracterizada hasta mucho más tarde. Dicha caracterización fue llevada a cabo en distintas especies vegetales, incluyendo patata (Ôba et al., 1995; Imai et al., 1998), coliflor (Ostergaard et al., 1997), espinaca (Mutsuda et al., 1995) y tabaco (Yabuta et al., 2000). La detección de actividad GalLDH en la fracción mitocondrial, obtenida por centrifugación en gradientes de densidad de sacarosa, demostraba que esta enzima se encontraba localizada en dichos orgánulos (Ôba et al., 1994). Más tarde, el estudio de la secuencia proteica corroboró lo anteriormente propuesto sobre la localización mitocondrial de esta enzima, ya que presentaba un péptido señal característico de mitocondria que era de longitud variable, dependiendo de la especie (Ostergaard et al., 1997; Imai et al., 1998). Según nuestros datos, la GalLDH de fruto de pimiento consta de un péptido señal mitocondrial de 37 aminoácidos. Dicho péptido señal se caracteriza por tener un número relativamente alto de residuos de Leu, Arg, Ser e His (3, 6, 5, 7, respectivamente) mientras que presenta pocos o ningunos residuos de Asp, Glu, Ile y Val (0, 0, 1, 0, respectivamente). Se ha descrito que la GalLDH se encuentra ubicada en la membrana mitocondrial interna (Mutsuda et al., 1995; Siendones et al., 1999; Bartoli et al., 2000). Con respecto a la ubicación de la enzima en la membrana existen ciertas discrepancias. Así, mientras algunos autores han propuesto que la GalLDH se localizarían entre los complejos III y IV de la cadena de transporte electrónico de este orgánulo, otros investigadores han propuesto que la enzima estaría asociada al complejo I (Millar et al., 2003).

La masa molecular de la proteína madura en frutos de pimiento (62 kDa) es algo mayor que la descrita en espinaca (57 kDa) (Mutsuda et al., 1995), coliflor (56 kDa) (Ostergaard et al., 1997), patata (56 kDa) (Imai et al., 1998), tabaco (56 kDa) (Yabuta et al., 2000), *Arabidopsis* (57 kDa) (Tamaoki et al., 2003), melón (57 kDa) (Pateraki et al., 2004) y fresa (57 kDa) (do Nascimento et al., 2005).

Como se comentó en el apartado de Resultados, la GalLDH de frutos de pimiento parece tener un solo dominio transmembrana, próximo al extremo N-terminal. Dicho dominio transmembrana sería el constituido por los aminoácidos 9 a 28, quedando los aminoácidos 1 a 9 hacia la matriz y los residuos 29 a 549 estarían en su mayoría expuestos al espacio intermembranal. En este último fragmento expuesto a la cara externa de la membrana interna se observaban cuatro secuencias con un número bajo de aminoácidos que podrían corresponder a regiones transmembrana con una probabilidad menor al 5%. El fragmento de 29 a 549 aminoácidos podría constituir una estructura pivotante que

tuviera acceso a los distintos citocromos c repartidos por la membrana mitocondrial interna (Fig. 5.5), lo que incrementaría la efectividad de la respiración mitocondrial asociada a la síntesis de ascorbato. A su vez, dicho fragmento tiene un sitio de unión para el FAD situado en el espacio intermembrana de la mitocondria, como ya predijeran Bartoli et al. (2000) para la GalLDH de patata. Sin embargo, para la GalLDH de patata se describieron tres regiones transmembrana, y se postuló que la enzima podría ser prácticamente una proteína integral de la membrana mitocondrial (Bartoli et al., 2000).

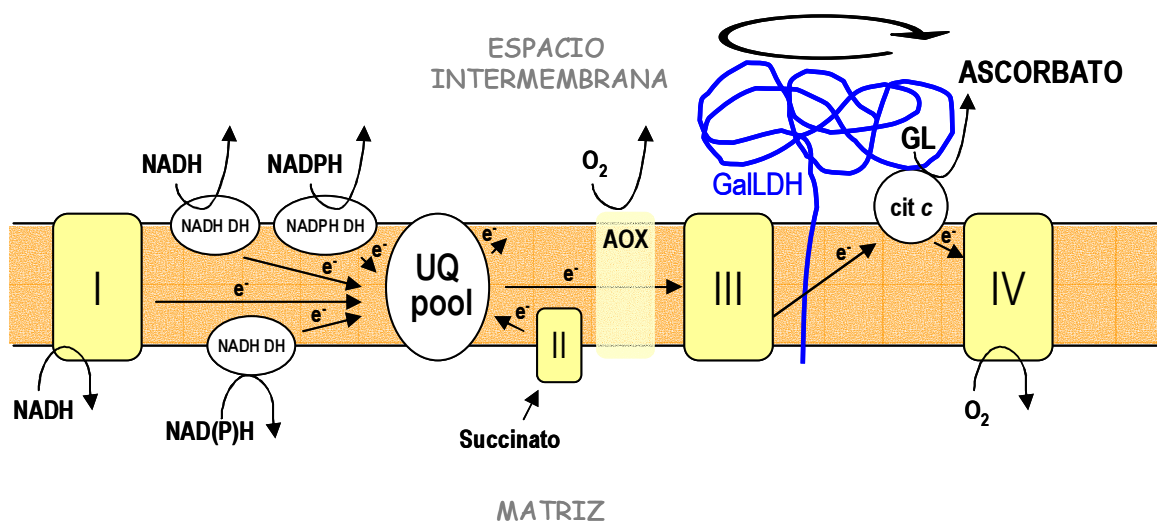


Fig. 5.6. Modo de interacción hipotético entre la L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa (GalLDH) y la cadena de transporte electrónico mitocondrial en frutos de pimiento. La GalLDH cede electrones al citocromo c (cit c) entre los complejos III y IV, mientras la L-galactono-1,4-lactona (GL) es convertida a ascorbato. AOX, oxidasa alternativa; DH, deshidrogenasa; e⁻, electrones. Se indican además la ubicación y reacciones de los complejos I y II y de la ubiquinona (UQ).

Comparando la secuencia de los cDNAs de *GalLDH* descritos hasta ahora, observamos que dicha enzima es una proteína altamente conservada. Además, la secuencia aminoacídica de la GalLDH de pimiento presenta una identidad del 32% con la L-gulono-1,4-lactona oxidasa (GulLO) de rata y un 26% con la D-arabino-1,4-lactona oxidasa (ALO) de *Candida albicans* (Kim et al., 1996). Se ha comprobado que la GalLDH de pimiento, como la enzima de coliflor o de patata, tiene un dominio de unión al FAD, pero este FAD no se une covalentemente, a diferencia de la unión que presentan las flavinas con la GulLO (Kenney et al., 1976; Kiuchi et al., 1982) y la ALO (Kenney et al., 1979). Esta diferencia se debe a la presencia de una Lys en lugar de una His en el residuo 134 de la secuencia proteica de la GalLDH de pimiento, como ya se describió en patata (Imai et al., 1998).

En patata, la GalLDH tiene un 100% de especificidad por el sustrato L-galactono-1,4-lactona frente al 20% de eficiencia que presenta con la L-gulono- γ -lactona (Ôba et al.,

1994; Ostergaard et al., 1997). Por el contrario, en frutos de pimiento no se detectó actividad cuando se empleó la L-gulono- γ -lactona como sustrato (resultados no mostrados).

Hasta ahora, se ha descrito que la GalLDH está codificada por un solo gen en patata (Imai et al., 1998) y en melón (Pateraki et al., 2004). En esta última especie, la expresión de la GalLDH aumentaba durante la maduración del fruto y estaba regulada por la luz (Pateraki et al., 2004) mientras que en fresa no se observaron incrementos significativos en la expresión de la GalLDH durante la maduración del fruto (do Nascimento et al., 2005). La ACCO (ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxilo oxidasa), la enzima que cataliza la última reacción en la síntesis de etileno, requiere ácido ascórbico como cofactor (Abeles, 1992). Pero en melón, se observó que el desarrollo y maduración del fruto era independiente de la acción del etileno, ya que la actividad ACCO se mantenía constante en las muestras analizadas (Pateraki et al., 2004). Este aspecto es de gran interés en un fruto como el pimiento que, al ser no climatérico, no depende de etileno para su maduración. A pesar de todo cuanto se ha avanzado en el estudio de la biosíntesis del ascorbato en frutos de pimiento por la contribución de esta Tesis Doctoral, aún quedan bastantes aspectos que abordar. Así, a partir de estos primeros datos se abren nuevas líneas de investigación que atañen a la propia cinética de la síntesis de ascorbato, los puntos de regulación de ésta y otras posibles rutas de síntesis, el transporte de ascorbato entre órganos y orgánulos celulares, etc. El pimiento, como se ha ido repitiendo en esta Memoria, es un producto de gran interés agronómico y nutricional, pero además, dado su complicado metabolismo, es un excelente modelo para estudiar la maduración de los frutos desde una perspectiva bioquímica, celular y molecular.

CONCLUSIONES

1.- El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) parece generar estrés oxidativo en hojas de pimiento. El análisis de los parámetros del metabolismo oxidativo de las hojas y la evolución de los mismos con el tiempo indican que el efecto del 2,4-D depende de la variedad, y muy posiblemente esté vinculado al tipo de pimiento. Así, la variedad Abdera que tiene maduración larga del fruto muestra una respuesta a más largo plazo, mientras que Herminio, que presenta maduración corta, responde de una forma más rápida.

2.- La maduración del fruto de pimiento está asociada a cambios importantes en la actividad de los antioxidantes enzimáticos. Al igual que en otros procesos de diferenciación en los que es necesario un aumento en el contenido de antioxidantes, la mayor tasa de producción de glutatión, ascorbato y NADPH en los frutos maduros confiere a estos compuestos un papel relevante en la maduración. Por otro lado, los resultados del metabolismo de peroxisomas sugieren que estos orgánulos pueden tener igualmente una función importante en la maduración de los frutos.

3.- El análisis conjunto de los antioxidantes de frutos de pimiento revela que estos compuestos pueden emplearse como marcadores de la variedad, así como indicadores de los cambios sufridos como consecuencia de las variaciones ambientales de radiación y temperatura.

4.- Los estudios de predicción de la estructura primaria de la L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa (GalLDH) de frutos de pimiento, encargada de la síntesis de ascorbato, asocian esta enzima a la membrana mitocondrial en una disposición que podría ceder los electrones del ascorbato a varias moléculas de citocromo c ubicadas en la proximidad. Asimismo, los resultados de expresión y de actividad de la GalLDH en distintos órganos de la planta parecen indicar que el ascorbato, además de actuar como un potente antioxidante y de tener una función importante en la maduración de los frutos de pimiento, podría participar en otros procesos como la polinización y el cuaje del fruto.

CONCLUSIÓN GENERAL

Los datos aportados en esta Tesis Doctoral atribuyen al ascorbato un papel central en el metabolismo de las plantas de pimiento. La tasa de síntesis y el estado redox de la vitamina C resultan ser fundamentales para procesos como la formación y maduración de los frutos, la polinización y la respuesta frente a estrés ambiental. Por otro lado, el fruto de

pimiento, además de ser una fuente importante de vitamina C en nuestra dieta, es un excelente material para estudiar la bioquímica y la biología molecular y celular del ascorbato.

BIBLIOGRAFÍA

- Abeles FB** (1992) *Ethylene in Plant Biology* (Eds. Abeles). Academic Press
- Aebi H** (1984) Catalase *in vitro*. *Methods Enzymology* **105**: 121-126
- Affek HP & Yakir D** (2002) Protection by isoprene against singlet oxygen in leaves. *Plant Physiology* **129**: 269-277
- Agius F, González-Lamothe R, Caballero JL, Muñoz-Blanco J, Botella MA & Valpuesta V** (2003) Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnology* **21**: 177-181
- Agrawal GK, Jwa N, Iwahashi H & Rakwal R** (2003) Importance of ascorbate peroxidases *OsAPx1* and *OsAPx2* in the rice pathogen response pathway and growth and reproduction revealed by their transcriptional profiling. *Gene* **322**: 93-103
- Agustí M., S. Zaragoza, D.J. Iglesias, V. Almela, E. Primo-Millo y M. Talón** (2002) The synthetic auxin 3,5,6-TPA stimulates carbohydrate accumulation and growth in citrus fruit. *Plant Growth Regulation* **32**: 141-147
- Alfenito MR, Souer E, Goodman CD, Buell R, Mol J, Koes R & Walbot V** (1998) Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *Plant Cell* **10**: 1135-1149
- Allan AC & Fluhr R** (1997) Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco. *Plant Cell* **9**: 1559-1572
- Almela L, Fernández-López JA, Candela ME, Egea C & Alcázar MD** (1996) Changes in pigments, chlorophyllase activity, and chloroplast ultrastructure in ripening pepper for paprika. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**: 1704-1711
- Alscher RG, Erturk N & Lenwood SH** (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1331-1341
- Amit Krishna De** (2003) *Capsicum. The genus Capsicum*. Eds. Amit Krishna De. Taylor & Francis, London
- Ananvoranich S, Varin L, Gulick P & Ibrahim R** (1994) Cloning and regulation of flavonol 3-sulfotransferase in cell suspension cultures of *Flaveria bidentis*. *Plant Physiology* **106**: 485-491
- Anderson JV, Hess JL & Chevone BI** (1990) Purification, characterization, and immunological properties of two isoforms of glutathione reductase from Eastern white pine needles. *Plant Physiology* **94**: 1402-1409
- Angermuller S, Bruder G, Volkl A, Wesch H & Fahimi HD** (1987) Localization of xanthine oxidase in crystalline cores of peroxisomes. A cytochemical and biochemical study. *European Journal of Cell Biology* **45**: 137-144
- Annanyev G, Reuger G, Wacker V & Klimov V** (1994) The photoproduction of superoxide radicals and the superoxide dismutase activity in photosystem II. The possible involvement of cytochrome b₅₅₉. *Photosynthesis Research* **41**: 327-338
- Apostol I, Heinsteint PF & Low PS** (1989) Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Role in defense and signal transduction. *Plant Physiology* **90**: 109-116
- Archer EK & Ting BL** (1996) A virescent plastid mutation in tobacco decreases peroxisome enzyme activities in seedlings. *Journal of Plant Physiology* **149**: 520-526
- Argyrou E, Sophianopoulou V, Schultes N & Diallinas G** (2001) Functional characterization of a maize purine transporter by expression in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell* **13**: 953-964

- Arvy MP, Imbault N, Naudascher F, Thiersault M & Doireau P** (1994) 2,4-D and alkaloid accumulation in periwinkle cell suspensions. *Biochimie* **76**: 410-416
- Asada K & Badger MR** (1984) Photoreduction of O₂¹⁸ and (H₂O)-O₂¹⁸ with concomitant evolution of O₂¹⁶ in intact spinach chloroplasts. Evidence for scavenging of hydrogen peroxide by peroxidase. *Plant and Cell Physiology* **25**: 1169-1179
- Asada K & Takahashi M** (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. En *Photoinhibition* (eds. Kyle DJ, Osmond DB & Arntzen DJ), pp. 227-287. Elsevier, Amsterdam
- Asada K** (1992) Ascorbate peroxidase. A hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* **85**: 235-241
- Asada K** (1994) Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. En *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants* (eds. Foyer CH & Mullineaux PM), pp. 77-104. CRC Press, Boca Raton
- Asada K** (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 601-639
- Asada K** (2000) The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **355**: 1419-1430
- Atkins CA, Shelp BJ, Storer PJ & Pate JS** (1984) Nitrogen nutrition and the development of biochemical functions associated with nitrogen fixation and ammonia assimilation of nodules on cowpea seedlings. *Planta* **162**: 327-333
- Baier M & Dietz KJ** (1997) The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein: its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants. *Plant Journal* **12**: 179-190
- Baier M & Dietz KJ** (1999) Protective function of chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in photosynthesis. Evidence from transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **119**: 1407-1414
- Baker A & Graham I** (2002) Plant Peroxisomes. En *Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Baker A, Graham IA, Holdsworth, Smith SM & Theodoulou FL** (2006) Chewing the fat: β -oxidation in signalling and development. *Trend Plant Science* **11**: 124-132
- Ballou D, Palmer G & Massey V** (1969) Direct demonstration of superoxide anion production during the oxidation of reduced flavin and of its catalytic decomposition by erythrocyte cytochrome c. *Biochemistry and Biophysical Research Community*. **36**: 898-904
- Bannister JV, Bannister WH & Rotilio G** (1987) Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* **22**: 111-180
- Barata-Soares AD, Gómez ML, Henrique de Mesquita C & Lajolo FM** (2004) Ascorbic acid biosynthesis: a precursor study on plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **16(3)**: 147-154
- Barr R, Bottger M & Crane FL** (1993) The effect of boron on plasma membrane electron transport and associated proton secretion by cultured carrot cells. *Biochemistry and Molecular Biology International* **31**: 31-39
- Barrier GE & Loomis WE** (1957) Absorption and translocation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and P-32 by leaves. *Plant Physiology* **32**: 225-231
- Barrierbrygoo H, Ephritikhine G, Klambt D, Ghislain M & Guern J** (1989) Functional evidence for an auxin receptor at the plasmalemma of tobacco mesophyll protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 891-895

- Barth C, Moeder W, Klessig DF & Conklin PL** (2004) The timing of senescence and response to pathogens is altered in the ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant vitamin c-1. *Plant Physiology* **134**: 1784-1792
- Bartling D, Radzio R, Steiner U & Weiler EW** (1993) A glutathione S-transferase with glutathione-peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*. Molecular cloning and functional characterization. *European Journal of Biochemistry* **216**: 579-586
- Bartoli CG, Pastori GM & Foyer CH** (2000) Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiology* **123**: 335-343
- Basra AS & Basra RK** (1997) *Mechanisms of Environmental Stress Resistance in Plants*. Harwood Academic Publishers
- Bayliss MW** (1977) Effects of 2,4-D on growth and mitosis in suspension cultures of *Daucus carota*. *Plant Science Letters* **8**: 99-103
- Beauchamp C & Fridovich I** (1971) Superoxide dismutase. Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**: 276-287
- Becana R, Paris FJ, Sandalio LM & del Río LA** (1989) Isozymes of SOD in nodules of *Phaseolus vulgaris* L., *Pisum sativum* L. and *Vigna unguiculata* L. walp. *Plant Physiology* **90**: 1286-1292
- Beoor-Tzahar T, Ben Hayyim G, Holland D, Faltin Z & Eshdat Y** (1995) A stress-associated citrus protein is a distinct plant phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *FEBS Letters* **366**: 151-155
- Beyer W, Imlay J & Fridovich I** (1991) Superoxide dismutases. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **40**: 221-253
- Bhat MA, Ishida T, Horiike K, Vaidyanathan CS & Nozaki M** (1993) Purification of 3,5-dichlorocatechol 1,2-dioxygenase, a nonheme iron dioxygenase and a key enzyme in the biodegradation of a herbicide, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), from *Pseudomonas cepacia* CSV90. *Archive Biochemistry and Biophysics* **300**: 738-746
- Bielawski W & Joy KW** (1986) Properties of glutathione reductase from chloroplasts and roots of pea. *Phytochemistry* **25**: 2261-2265
- Bilang J, Macdonald H, King PJ & Sturm A** (1993) A soluble auxin-binding protein from *Hyoscyamus muticus* is a glutathione S-transferase. *Plant Physiology* **102**: 29-34
- Boger P** (1988) Mechanisms of action, selectivity and resistance in plants to peroxidizing herbicides. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **196**: 130-AGRO
- Bolwell GP, Buti VS, Davies DR & Zimmerlin A** (1995) The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radical Research* **23**: 517-532
- Bonini C, D'Auria M & Ferri R** (2002) Singlet oxygen mediated degradation of lignin. Isolation of oxidation products from steam-exploded lignin from pine. *Photochemical & Photobiological Sciences* **1**: 570-573
- Bouvier F, Backhaus RA & Cámara B** (1998) Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 30651-30659
- Boveris A & Chance B** (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal* **134**: 707-716
- Boveris A** (1984) Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods of Enzymology*. **105**: 429-435

- Bowditch ML & Donaldson RP** (1990) Ascorbate free-radical reduction by glyoxisomes membranes. *Plant Physiology* **94**: 531-537
- Bradford MM** (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254
- Bramley PM** (1997) The regulation and genetic manipulation of carotenoid biosynthesis in tomato fruit. *Pure and Applied Chemistry* **69**: 2159-2162
- Bridges SM & Salin ML** (1981) Distribution of iron-containing superoxide dismutase in vascular plants. *Plant Physiology* **68**: 275-278
- Bronsema FBF, van Oostveen WJF, Prinsen E & van Lammeren AAM** (1998) Distribution of [C-14] dichlorophenoxyacetic acid in cultured zygotic embryos of *Zea mays* L. *Journal of Plant Growth Regulation* **17**: 81-88
- Buege JA & Aust SD** (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* **52**: 302-310
- Bueno P & del Río LA** (1992) Purification and properties of glyoxisomal cuprozinc superoxide dismutase from watermelon cotyledons (*Cytrullus vulgaris* Schrad.). *Plant Physiology* **98**: 331-336
- Bunkelmann JR & Trelease RN** (1996) Ascorbate peroxidase. A prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes. *Plant Physiology* **110**: 589-598
- Burns JJ** (1957) Missing step in man, monkey and guinea pig required for the biosynthesis of L-ascorbic acid. *Nature* **180**: 552-552
- Burns JJ, Conney AH, Dayton PG, Evans C, Martin GR & Taller D** (1960) Observations on the drug-induced synthesis of D-glucuronic, L-gulonic and L-ascorbic acids in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **129**: 132-138
- Butt A** (1980) Direct oxidases and related enzymes. En *The biochemistry of Plants Vol.2* (eds. Davies DD), pp. 81-123. Academic Press, New York
- Cajaraville MP, Cancio M, Ibabe A & Orbea A** (2003) Peroxisome proliferation as a biomarker in environmental pollution assessment. *Microscopy Research and Technique* **61**: 191-202
- Cámara B, Bardat F & Moneger R** (1982) Sites of biosynthesis of carotenoids in *Capsicum* chromoplasts. *European Journal of Biochemistry* **127**: 255-258
- Cámara B, Huguene P, Bouvier F, Kuntz M & Moneger R** (1995) Biochemistry and molecular biology of chromoplast development. *International Review of Cytology* **163**: 175-247
- Campanoni P & Nick P** (2005) Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-Naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. *Plant Physiology* **137**: 939-948
- Candeias LP, Folkes LK & Wardman P** (1996) Enhancement of peroxidase-induced lipid peroxidation by indole-3-acetic acid: Effect of antioxidants. *Redox Report* **2**: 141-147
- Cao G, Sofic E & Prior RL** (1996) Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**: 3426-3431
- Cardenas J, Slife FW, Hanson JB & Butler H** (1968) Physiological changes accompanying death of cocklebur plants treated with 2,4-D. *Weed Science* **16**: 96.
- Casano LM, Gómez LD, Lascano HR, González CA & Trippi VS** (1997) Inactivation and degradation of CuZn-SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photooxidative stress. *Plant and Cell Physiology* **38**: 433-440
- Cerutti PA** (1985) Prooxidant states and tumor promotion. *Science* **227**: 375-381

- Chance B, Sies H & Boveris A** (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews* **59**: 527-605
- Charles JM, Cifone MA, Lawlor T, Murli H, Young RR & Leeming NM** (2000) Evaluation of the *in vitro* genetic toxicity of 4-(2, 4-dichlorophenoxy) butyric acid. *Mutation Research* **472**: 75-83
- Chaudhuri CR & Chatterjee D** (1969) L-Ascorbic Acid Synthesis in Birds - Phylogenetic Trend. *Science* **164**: 435-436
- Chaudiere J & Ferrari-Iliou R** (1999) Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology* **37**: 949-962
- Chen GX & Asada K** (1989) Ascorbate peroxidase in tea leaves. Occurrence of 2 isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant and Cell Physiology* **30**: 987-998
- Cherry JH** (1970) Effect of auxin-herbicides on plant and animal biochemistry. *Horticultural Science* **5**: 205-207
- Chew O, Whelan J & Millar AH** (2003) Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 46869-46877
- Cho YS, Park SH, Kim CK & Oh KH** (2000) Induction of stress shock proteins DnaK and GroEL by phenoxyherbicide 2,4-D in *Burkholderia* sp YK-2 isolated from rice field. *Current Microbiology* **41**: 33-38
- Chomczynski P & Sacchi N** (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**: 156-159
- Chu YF, Sun J, Wu XZ & Liu RH** (2002) Antioxidant and anti proliferative activities of common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 6910-6916
- Cleary SP, Tan FC, Nakrieko KA, Thompson SJ, Mullineaux PM, Creissen GP, von Stedingk E, Glaser E, Smith AG & Robinson C** (2002) Isolated plant mitochondria import chloroplast precursor proteins *in vitro* with the same efficiency as chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 5562-5569
- Clor MA, Crafts AS & Yamaguchi S** (1962) Effects of high humidity on translocation of foliar-applied labeled compounds in plants. 1. *Plant Physiology* **37**: 609-617
- Clor MA, Crafts AS & Yamaguchi S** (1963) Effects of high humidity on translocation of foliar-applied labeled compounds in plants. 2. Translocation from starved leaves. *Plant Physiology* **38**: 501-507
- Cobb A** (2006) Auxin-type herbicides. En *Herbicides and Plant Physiology* (eds. Cobb A), pp. 82-106. Chapman & Hall, London
- Conklin PL, Norris SR, Wheeler GL, Williams EH, Smirnoff N & Last RL** (1999) Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 4198-4203
- Conklin PL, Saracco SA, Norris SR & Last RL** (2000) Identification of ascorbic acid-deficient *Arabidopsis thaliana* mutants. *Genetics* **154**: 847-856
- Conklin PL & Barth C** (2004) Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant Cell and Environment* **27**: 959-970
- Córdoba-Pedregosa MD, Córdoba F, Villalba JM & González-Reyes JA** (2003a) Zonal changes in ascorbate and hydrogen peroxide contents, peroxidase, and ascorbate-related enzyme activities in onion roots. *Plant Physiology* **131**: 697-706

- Córdoba-Pedregosa MD, Córdoba F, Villalba JM & González-Reyes JA** (2003b) Differential distribution of ascorbic acid, peroxidase activity, and hydrogen peroxide along the root axis in *Allium cepa* L. and its possible relationship with cell growth and differentiation. *Protoplasma* **221**: 57-65
- Córdoba-Pedregosa MD, Villalba JM, Córdoba F & González-Reyes JA** (2005) Changes in intracellular and apoplastic peroxidase activity, ascorbate redox status, and root elongation induced by enhanced ascorbate content in *Allium cepa* L. *Journal of Experimental Botany* **56**: 685-694
- Corpas FJ, Palma JM, del Río LA** (1993) Evidence for the presence of proteolytic activity in peroxisomes. *European Journal of Cell Biology* **61**: 81-85
- Corpas FJ, de la Colina C, Sánchez-Rasero F & del Río LA** (1997) A role for leaf peroxisomes in the catabolism of purines. *Journal of Plant Physiology* **151**: 246-250
- Corpas FJ, Barroso JB, Sandalio LM, Distefano S, Palma JM, Lupiáñez JA & del Río LA** (1998a) A dehydrogenase mediated recycling system of NADPH in plant peroxisomes. *Biochemical Journal* **330** (Pt 2): 777-784
- Corpas FJ, Sandalio LM, del Río LA & Trelease RN** (1998b) Copper-zinc superoxide dismutase is a constituent enzyme of the matrix of peroxisomes in the cotyledons of oilseed plants. *New Phytologist* **138**: 307-314
- Corpas FJ, Palma JM, Sandalio LM, López-Huertas E, Romero-Puertas MC, Barroso JB & del Río LA** (1999a) Purification of catalase from pea leaf peroxisomes: Identification of five different isoforms. *Free Radical Research* **31**: S235-S241
- Corpas FJ, Barroso JB, Sandalio LM, Palma JM, Lupiáñez JA & del Río LA** (1999b) Peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase. Characterization and activity regulation during natural senescence. *Plant Physiology* **121**: 921-928
- Corpas FJ, Barroso JB & del Río LA** (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science* **6**: 145-150
- Corpas FJ, Pedrajas JR, Sandalio LM, León AM, Carreras A, Palma JM, Valderrama R, del Río LA & Barroso JB** (2003) Localization of peroxiredoxin in peroxisomes from pea leaves. *Free Radical Research* **37**: 19-20
- Corpas FJ, Fernández-Ocaña A, Carreras A, Valderrama R, Luque F, Esteban FJ, Rodríguez-Serrano M, Chaki M, Pedrajas JR, Sandalio LM, del Río LA & Barroso JB** (2006) The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*olea europaea* L.) leaves. *Plant Cell Physiology* (En prensa)
- Cosper NJ, Stalhandske CMV, Saari RE, Hausinger RP & Scott RA** (1999) X-ray absorption spectroscopic analysis of Fe(II) and Cu(II) forms of a herbicide-degrading alpha-ketoglutarate dioxygenase. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **4**: 122-129
- Creissen G, Edwards EA, Enard C, Wellburn A & Mullineaux P** (1992) Molecular characterization of glutathione reductase cDNAs from pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Journal* **2**: 129-131
- Creissen G, Edwards EA & Mullineaux PM** (1994) Glutathione reductase and ascorbate peroxidase. En *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants* (eds. Foyer C & Mullineaux PM), pp. 343-364. CRC Press
- Creissen G, Reynolds H, Xue Y & Mullineaux P** (1995) Simultaneous targeting of pea glutathione reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplasts and mitochondria in transgenic tobacco. *Plant Journal* **8**: 167-175
- Creissen G, Jiménez A & Mullineaux PM** (2001) Characterization and genetic manipulation of dehydroascorbate reductase in *Arabidopsis thaliana*. En *Oxygen, Free Radicals and Oxidative Stress in Plants*. Nice

- Cummins I, Cole DJ & Edwards R** (1997) Purification of multiple glutathione transferases involved in herbicide detoxification from wheat (*Triticum aestivum* L.) treated with the safener fenchlorazole-ethyl. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **59**: 35-49
- Dalton DA, Langeberg L & Robbins M** (1992) Purification and characterization of monodehydroascorbate reductase from soybean root nodules. *Archive of Biochemistry and Biophysics* **292**: 281-286
- Dalton TD, Shertzer HG & Puga A** (1999) Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **39**: 67-101
- Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D & Van Breusegem F** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**: 779-795
- Datta DB, Triplett EW & Newcomb EH** (1991) Localization of xanthine dehydrogenase in cowpea root nodules. Implications for the interaction between cellular compartments during ureide biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 4700-4702
- Davey MW, Van Montagu M, Inzé D, Sanmartin M, Kanellis A, Smirnoff N, Benzie IJJ, Strain JJ, Favell D & Fletcher J** (2000) Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**: 825-860
- Davies BH, Matthews S & Kirk JTO** (1970) Nature and Biosynthesis of Carotenoids of Different Colour Varieties of Capsicum-Annuum. *Phytochemistry* **9**: 797-805
- De Bellis L, Picciarelli P, Pistelli L & Alpi A.** 1990. Localization of glyoxylate-cycle enzymes in peroxisomes of senescent leaves and green cotyledons. *Planta* **180**, 435-439
- Deepa N, Kaur C, George B, Singh B & Kapoor HC** (2005) Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes during maturity. *Swiss Society of Food Sciences and Technology*. (En prensa)
- DeFelice M** (1999) Using Growth Regulator (Synthetic Auxin) Herbicides. En *Crop Management & Agronomics-Weed Management & Herbicide Resistance*. Pioneer Hi-Bred International Inc. Web Site: http://www.pioneer.com/usa/crop_management/national/auxin
- De Gara L, Pinto MC & Arrigoni O** (1997) Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. *Physiologia Plantarum* **100**: 894-900
- Dhaunsi GS, Singh I & Hanevold CD** (1993) Peroxisomal participation in the cellular response to the oxidative stress of endotoxin. *Molecular and Cellular Biochemistry* **126**: 25-35
- Díaz MA** (1979) Acción de herbicidas sobre la actividad fotosintética de cloroplastos de espinacas. Tesis Doctoral. Universidad de Granada
- Dietz KJ** (2003) Plant peroxiredoxins. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 93-107
- Dipierro S & Borraccino G** (1991) Dehydroascorbate reductase from potato tubers. *Phytochemistry* **30**: 427-429
- Distefano S, Palma JM, Gómez M & del Río LA** (1997) Characterization of endoproteases from plant peroxisomes. *Biochemical Journal* **327**: 399-405
- Doke N, Miura Y, Sánchez LM, Park HJ, Noritake T, Yoshioka H & Kawakita K** (1996) The oxidative burst protects plants against pathogen attack: Mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence. *Gene* **179**: 45-51

- Dominov JA, Stenzler L, Lee S, Schwarz JJ, Leisner S & Howell SH** (1992) Cytokinins and auxins control the expression of a gene in *Nicotiana plumbaginifolia* cells by feedback regulation. *Plant Cell* **4**: 451-461
- do Nascimento JRO, Higuchi BK, Gómez MLPA, Oshiro RA & Lajolo FM** (2005) L-ascorbate biosynthesis in strawberries: L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase expression during fruit development and ripening. *Post-harvest Biology and Technology* **38**: 34-42
- Donnelly JK & Robinson DS** (1995) Free radicals in foods. *Free Radical Research* **22**: 147-173
- Doulis AG, Donahue JL & Alscher RG** (1998) Differential responses to paraquat-induced oxidative injury in a pea (*Pisum sativum*) protoplast system. *Physiologia Plantarum* **102**: 461-471
- Droillard MJ & Paulin A** (1990) Isozymes of superoxide dismutase in mitochondria and peroxisomes isolated from petals of carnation (*Dianthus caryophyllus*) during senescence. *Plant Physiology* **94**: 1187-1192
- Drotar A, Phelps P & Fall R** (1985) Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Science* **42**: 35-40
- Dudits D, Borge I & Gyorgyey J** (1993) Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *Journal of Cell Science* **99**: 475-484
- Dugo P, Lo Presti M, Ohman M, Fazio A, Dugo G & Mondello L** (2005) Determination of flavonoids in citrus juices by micro-HPLC-ESI/MS. *Journal of Separation Science* **28**: 1149-1156
- Edwards EA, Rawsthorne S & Mullineaux PM** (1990) Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum Sativum* L.). *Planta* **180**: 278-284
- Edwards R** (1996) Characterisation of glutathione transferases and glutathione peroxidases in pea (*Pisum sativum*). *Physiologia Plantarum* **98**: 594-604
- Edwards R, Dixon DP & Walbot V** (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science* **5**: 193-198
- Eising R, Trelease RN & Ni WT** (1990) Biogenesis of catalase in glyoxysomes and leaf type peroxisomes of sunflower cotyledons. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **278**: 258-264
- Elstner EF** (1987) Metabolism of activated oxygen species. En *The biochemistry of Plants* (eds. Davis DD), pp. 253-315. Academic Press, San Diego
- Engel M, Veron M, Theisinger B, Lacombe ML, Seib T, Dooley S & Welter C** (1995) A novel serine threonine-specific protein phosphotransferase activity of Nm23 nucleoside-diphosphate kinase. *European Journal of Biochemistry* **234**: 200-207
- Erickson AN & Markhart AH** (2001) Flower production, fruit set, and physiology of bell pepper during elevated temperature and vapor pressure deficit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **126**: 697-702
- Erickson AN & Markhart AH** (2002) Flower developmental stage and organ sensitivity of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) to elevated temperature. *Plant Cell and Environment* **25**: 123-130
- Escher CL & Widmer F** (1997) Lipid mobilization and gluconeogenesis in plants: do glyoxylate cycle enzyme activities constitute a real cycle? A hypothesis. *Biological Chemistry* **378**: 803-813
- Eshdat Y, Holland D, Faltin Z & Ben Hayyim G** (1997) Plant glutathione peroxidases. *Physiologia Plantarum* **100**: 234-240

- Estrada B, Bernal MA, Diaz J, Pomar F & Merino F** (2000) Fruit development in *Capsicum annuum*: changes in capsaicin, lignin, free phenolics, and peroxidase patterns. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 6234-6239
- Ettlinger C & Lehle L** (1988) Auxin induces rapid changes in phosphatidylinositol metabolites. *Nature* **331**: 176-178
- Faludi B, Gyurjan I, Faludi DA & Pacsery M** (1965) Molecular structure and tumorous growth inducing effect of chlorosubstituted phenoxyacetic acids in potato tissue culture. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* **15**: 321-329
- Fang SC & Butts JS** (1954) Studies in plant metabolism. 3. Absorption, translocation and metabolism of radioactive 2,4-D in corn and wheat plants. *Plant Physiology* **29**: 56-60
- Fedtke C** (1982) *Biochemistry and Fisiology of Herbicide Action*. Springer, Berlin-New York
- Feung CS, Mumma RO & Hamilton RH** (1974) Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. VI. Biological properties of amino acid conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **22**: 307-309
- Fielding M, Barceló D, Helweg A, Galassi S, Tortensson L, Van Zoonen P, Wolter R & Angeletti G** (1992) Pesticides in ground and drinking water. (eds. Guyot SA), Brussels
- Finkel T** (2000) Redox dependent signal transduction. *FEBS Letters* **476**: 52-54
- Fites RC, Hanson JB & Slife FW** (1969) Alteration of messenger RNA and ribosome synthesis in soybean hypocotyl by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Botanical Gazette* **130**: 118.
- Flohé L & Günzler WA** (1985) Assays of glutathione peroxidase. *Methods of Enzymology* **105**: 114-121
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JDG, Davies JM & Dolan L** (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**: 442-446
- Forgacs E, Cserhati T & Barta I** (2000) The binding of amino acids to the herbicide 2,4-dichlorophenoxy acetic acid. *Amino Acids* **18**: 69-79
- Foyer CH & Halliwell B** (1977) Purification and properties of dehydroascorbate reductase from spinach leaves. *Phytochemistry* **16**: 1347-1350
- Foyer C, Rowell J & Walker D** (1983) Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta* **157**: 239-244
- Foyer C, Lelandais M, Galap C & Kunert KJ** (1991) Effects of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *Plant Physiology* **97**: 863-872
- Foyer CH, López-Delgado H, Dat JF & Scott IM** (1997) Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum* **100**: 241-254
- Foyer CH, Theodoulou FL & Delrot S** (2001) The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. *Trends in Plant Science* **6**: 486-492
- Foyer CH & Noctor G** (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell and Environment* **28**: 1056-1071
- Franceschi VR & Tarlyn NM** (2002) L-ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants. *Plant Physiology* **130**: 649-656

- Fridovich I** (1983) Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **23**: 239-257
- Fridovich I** (1986) Biological effects of the superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **247**: 1-11
- Franco AR, Gee MA & Guilfoyle TJ** (1990) Induction and superinduction of auxin-responsive messenger-RNAs with auxin and protein-synthesis inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* **265**: 15845-15849
- Frova C** (2003) The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. *Physiologia Plantarum* **119**: 469-479
- Frugoli JA, Zhong HH, Nuccio ML, McCourt P, Mcpeek MA, Thomas TL & McClung CR** (1996) Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. *Plant Physiology* **112**: 327-336
- Fufezan C, Rutherford AW & Krieger-Liszkay A** (2002) Singlet oxygen production in herbicide treated photosystem II. *FEBS Letters* **532**: 407-410
- Fujita M, Adachi Y & Sakato N** (1998) Purification of pumpkin glutathione S-transferase species specifically present in cultured cells treated by excessive concentration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid but absent in normal plants. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **62**: 2431-2434
- Fujita M & Hossain MZ** (2003) Modulation of pumpkin glutathione S-transferases by aldehydes and related compounds. *Plant Cell Physiology* **44**: 481-490
- Gallup AH & Gustafson FG** (1952) Absorption and translocation of radioactive 2,4-dichloro-5-iodo¹³¹-phenoxyacetic acid by green plants. *Plant Physiology* **27**: 603-612
- Gálvez S & Gadal P** (1995) On the function of the NADP-dependent isocitrate dehydrogenase isoenzymes in living organisms. *Plant Science* **105**: 1-14
- Gamaley IA & Klyubin IV** (1999) Roles of reactive oxygen species: Signaling and regulation of cellular functions. *International Review of Cytology. A Survey of Cell Biology*, **188**: 203-255
- Gatzek S, Wheeler GL & Smirnof N** (2002) Antisense suppression of L-galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated L-galactose synthesis. *Plant Journal* **30**: 541-553
- Gechev T, Gadjev I, Van Breusegem F, Inzé D, Dukiandjiev S, Toneva V & Minkov I** (2002) Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**: 708-714
- Gechev T, Willekens H, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W, Toneva V & Minkov I** (2003) Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *Journal of Plant Physiology* **160**: 509-515
- Gee MA, Hagen G & Guilfoyle TJ** (1991) Tissue specific and organ specific expression of soybean auxin-responsive transcripts *Gh3* and *Saurs*. *Plant Cell* **3**: 419-430
- Gehring CA, Irving HR & Parish RW** (1990) Effects of auxin and abscisic acid on cytosolic calcium and Ph in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 9645-9649
- Gerhardt B** (1983) Localization of beta-oxidation enzymes in peroxisomes isolated from nonfatty plant tissues. *Planta* **159**: 238-246

- Goddijn OJ, de Kam RJ, Zanetti A, Schilperoort RA & Hoge JH** (1992) Auxin rapidly down-regulates transcription of the tryptophan decarboxylase gene from *Catharanthus roseus*. *Plant Molecular Biology* **18**: 1113-1120
- Goldberg DM & Ellis G** (1983) Isocitrate. En *Methods of Enzymatic Analysis* (eds. HU Bergmeyer), pp.183-190. Academic Press, New York
- Goldenberg H, Grebing C & Low H** (1983) NADH-monodehydroascorbate reductase in human erythrocyte membranes. *Biochemistry International* **6**: 1-9
- Golebski W, Meyer R & Wagner KG** (1988) Changes in the nucleotide pools in leaves and buds of tobacco plants upon treatment with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Physiologia Plantarum* **72**: 29-35
- Gollapudi BB, Charles JM, Linscombe VA, Day SJ & Bus JS** (1999) Evaluation of the genotoxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives in mammalian cell cultures. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **444**: 217-225
- Gómez JM, Hernández JA, Jiménez A, del Río LA & Sevilla F** (1999) Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants. *Free Radical Research* **31** Suppl: S11-S18
- Gómez JM, Jiménez A, Olmos E & Sevilla F** (2004) Location and effects of long-term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea (*Pisum sativum* cv. Puget) chloroplasts. *Journal of Experimental Botany* **55**: 119-130
- González-Flecha B & Boveris A** (1995) Mitochondrial sites of hydrogen peroxide production in reperfused rat kidney cortex. *Biochimica et Biophysica Acta* **1243**: 361-366
- González-Reyes JA, Hidalgo A, Caler JA, Palos R & Navas P** (1994) Nutrient uptake changes in ascorbate free radical-stimulated onion roots. *Plant Physiology* **104**: 271-276
- González-Reyes JA, Alcain FJ, Caler JA, Serrano A, Córdoba F & Navas P** (1995) Stimulation of onion root elongation by ascorbate and ascorbate free radical in *Allium cepa* L. *Protoplasma* **184**, 31-35
- Grant JJ & Loake GJ** (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology* **124**: 21-29
- Grantz AA, Brummell DA & Bennett AB** (1995) Ascorbate free radical reductase mRNA levels are induced by wounding. *Plant Physiology* **108**: 411-418
- Grabinska-Sota E, Wisniowska E, Kalka J & Scieranka B** (2002) Genotoxicological effects of some phenoxyherbicides and their metabolites on *Bacillus subtilis* M45 Rec(-) and H17 Rec(+) strains. *Chemosphere* **47**: 81-85
- Griffith OM** (1983) Techniques of preparative, zonal and continuous flow ultracentrifugation. Beckman Instruments Inc., Palo Alto
- Grossmann K** (1998) Quinclorac belongs to a new class of highly selective auxin herbicides. *Weed Science* **46**: 707-716
- Grossmann K** (2000a) Mode of action of auxin herbicides: a new ending to a long, drawn out story. *Trends Plant Science* **5**: 506-508
- Grossmann K** (2000b) Cinidon-ethyl (Lotus (R)): Studies on the mode of action and selectivity and behaviour in combination with auxin herbicides. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection* 509-516
- Grossmann K, Kwiatkowski J & Tresch S** (2001) Auxin herbicides induce H₂O₂ overproduction and tissue damage in cleavers (*Galium aparine* L.). *Journal of Experimental Botany* **52**: 1811-1816

- Gruda, N** (2005) Impact of environmental factors on product quality of greenhouse vegetables for fresh consumption. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**: 227-247
- Guan LQM & Scandalios JG** (2002) Catalase gene expression in response to auxin-mediated developmental signals. *Physiologia Plantarum* **114**: 288-295
- Guilfoyle TJ, Lin CY, Chen YM, Nagao RT & Key JL** (1975) Enhancement of soybean RNA polymerase I by auxin. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* **72**: 69-72
- Gupta AS, Alscher RG & Mccune D** (1991) Response of photosynthesis and cellular antioxidants to ozone in populus leaves. *Plant Physiology* **96**: 650-655
- Guy CL & Carter JV** (1984) Characterization of partially purified glutathione reductase from cold-hardened and nonhardened spinach leaf tissue. *Cryobiology* **21**: 454-464
- Gyorgyey J, Nemeth K, Magyar Z, Kelemen Z, Alliotte T, Inzé D & Dudits D** (1997) Expression of a novel-type small proline-rich protein gene of alfalfa is induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in dedifferentiated callus cells. *Plant Molecular Biology* **34**: 593-602
- Habig WH, Pabst MJ & Jakoby WB** (1974) Glutathione S-transferases. First enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* **249**: 7130-7139
- Halliwell B & Foyer CH** (1976) Ascorbic acid, metal ions and the superoxide radical. *Biochemical Journal* **155**: 697-700
- Halliwell B** (1987) Oxidative Damage, Lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. *Chemistry and Physics of Lipids* **44**: 327-340
- Halliwell B & Gutteridge J** (1992) Biologically relevant metal ion dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Letters* **307**: 108-112
- Halliwell B & Gutteridge JMC** (2000) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, London
- Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**: 557-580
- Hancock JT, Desikan R & Neill SJ** (2001) Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical Society Transactions* **29**: 345-350
- Hanks JF, Tolbert NE & Schubert KR** (1981) Localization of enzymes of ureide biosynthesis in peroxisomes and microsomes of nodules. *Plant Physiology* **68**: 65-69
- Hansen H & Grossmann K** (2000) Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. *Plant Physiol* **124**: 1437-1448
- Harrison R** (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now? *Free Radical Biology and Medicine* **33**: 774-797
- Hattori Y, Kobayashi K, Kawasaki S, Okino F, Yanagiuchi K, Tsuyoshi A, Nakayama M, Nakajima K, Kimura K & Touhara H** (1998) Direct thermal fluorination of DLC surfaces. *Carbon* **36**: 1399-1401
- Hay JR & Thimann KV** (1956a) The fate of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in bean seedlings. 1. Recovery of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its breakdown in the plant. *Plant Physiology* **31**: 382-387
- Hay JR & Thimann KV** (1956b) The fate of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in bean seedlings .2. translocation. *Plant Physiology* **31**: 446-451

- Herbert M, Burkhard C & Schnarrenberger C** (1979) Survey for isoenzymes of glucose-phosphate isomerase, phosphoglucomutase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in C3-, C4-metabolism and crassulacean acid metabolism plants, and green algae. *Planta* **145**: 95-104
- Hernández JA, Corpas FJ, Gómez M, del Río LA & Sevilla F** (1993) Salt induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Physiologia Plantarum* **89**: 103-110
- Hernández JA, del Río LA & Sevilla F** (1994) Salt stress induced changes in superoxide dismutase isozymes in leaves and mesophyll protoplast from *Vigna unguiculata* L. walp. *New Phytologist* **126**: 37-44
- Hernández JA, Olmos E, Corpas FJ, Sevilla F, del Río LA** (1995) Salt-induced oxidative stress in chloroplast of pea plants. *Plant Science* **105**: 151-167
- Heukeshoven J & Dernick R** (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide Gels and the Mechanism of Silver Staining. *Electrophoresis* **6**: 103-112
- Hewitt EJ** (1966) Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Technical Communication. *Commonwealth Agricultural Bureaux* **22**: 237-315
- Hicks C & Morre DJ** (1998) Oxidation of NADH by intact segments of soybean hypocotyls and stimulation by 2,4-D. *Biochimica et Biophysica Acta* **1375**: 1-5
- Hill RL & Bradshaw RA** (1969) Fumarase. *Methods of Enzymology* **13**: 91-99
- Hock B & Beevers H** (1966) Development and decline of glyoxylate cycle enzymes in watermelon seedlings (*Citrullus vulgaris* Schrad). Effects of dactinomycin and cycloheximide. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie* **55**: 405-&
- Hoey BM, Butler J & Halliwell B** (1988) On the specificity of allopurinol and oxypurinol as inhibitors of xanthine oxidase. A pulse radiolysis determination of rate constants for reaction of allopurinol and oxypurinol with hydroxyl radicals. *Free Radical Research Communications* **4**: 259-263
- Hogan DA, Buckley DH, Nakatsu CH, Schmidt TM & Hausinger RP** (1997) Distribution of the *tfdA* Gene in Soil Bacteria that do not degrade 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Microbial Ecology* **34**: 90-96
- Holtum JAM & Winter K** (1982) Activity of enzymes of carbon metabolism during the induction of crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Planta* **155**: 8-16
- Hong YN & Schopfer P** (1981) Control by phytochrome of urate oxidase and allantoinase activities during peroxisome development in the cotyledons of mustard (*Sinapis Alba* L.) seedlings. *Planta* **152**: 325-335.
- Horemans N, Foyer CH, Potters G & Asard H** (2000a) Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 531-540
- Horemans N, Foyer CH & Asard H** (2000b) Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends in Plant Science* **5**: 263-267
- Horemans N, Potters G, De Wilde L & Caubergs RJ** (2003) Dehydroascorbate uptake activity correlates with cell growth and cell division of tobacco bright yellow-2 cell cultures. *Plant Physiology* **133**: 361-367
- Horling F, König J & Dietz KJ** (2002) Type II peroxiredoxin C, a member of the peroxiredoxin family of *Arabidopsis thaliana*: its expression and activity in comparison with other peroxiredoxins. *Plant Physiology and Biochemistry* **40** (6-8) 491-499

- Hormaetxe K, Hernández A, Becerril JM & García-Plazaola JI** (2004) Role of red carotenoids in photoprotection during winter acclimation in *Buxus sempervirens* leaves. *Plant Biology* **6**: 325-332
- Hornero-Méndez D, de Guevara RGL & Mínguez-Mosquera MI** (2000) Carotenoid biosynthesis changes in five red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars during ripening. Cultivar selection for breeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 3857-3864
- Hossain MA & Asada K** (1984a) Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and Its characterization as a thiol enzyme. *Plant and Cell Physiology* **25**: 85-92
- Hossain MA & Asada K** (1984b) Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide. Its protection by ascorbate. *Plant and Cell Physiology* **25**: 1285-1295
- Hossain MA, Nayako Y & Asada K** (1984) Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplast and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging of hydrogen peroxide. *Plant and Cell Physiology* **25**: 385-395
- Hossain MA & Asada K** (1985) Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **260**: 12920-12926
- Howard LR, Smith RT, Wagner AB, Villalon B & Burns EE** (1994) Provitamin-A and ascorbic-acid content of fresh pepper cultivars (*Capsicum annuum*) and processed jalapenos. *Journal of Food Science* **59**: 362-365
- Howard LR, Talcott ST, Brenes CH & Villalon B** (2000) Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 1713-1720
- Huang AH, Trelease RN & Moore TS Jr** (1983) *Plant Peroxisomes*. Academic Press, New York
- Hugueney P, Badillo A, Chen HC, Klein A, Hirschberg J, Cámara B & Kuntz M** (1995) Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. *Plant Journal* **8**: 417-424
- Humphreys TE & Dugger WM** (1957) The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on pathways of glucose catabolism in higher plants. *Plant Physiology* **32**: 136-140
- Imai T, Karita S, Shiratori G, Hattori M, Nunome T, Oba K & Hirai M** (1998) L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase from sweet potato: purification and cDNA sequence analysis. *Plant Cell Physiology* **39**: 1350-1358
- Ishida S, Takahashi Y & Nagata T** (1996) The mode of expression and promoter analysis of the *arcA* gene, an auxin-regulated gene in tobacco BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology* **37**: 439-448
- Ishikawa T, Takeda T & Shigeoka S** (1996) Purification and characterization of cytosolic ascorbate peroxidase from komatsuna (*Brassica rapa*). *Plant Science* **120**: 11-18
- Ishikawa T, Yoshimura K, Tamoi M, Takeda T & Shigeoka S** (1997) Alternative mRNA splicing of 3'-terminal exons generates ascorbate peroxidase isoenzymes in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. *Biochemical Journal* **328**: 795-800
- Ishikawa T, Yoshimura K, Sakai K, Tamoi M, Takeda T & Shigeoka S** (1998) Molecular characterization and physiological role of a glyoxysome-bound ascorbate peroxidase from spinach. *Plant and Cell Physiology* **39**: 23-34
- Ishikawa T, Dowdle J & Smirnoff N** (2006) Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. *Physiologia Plantarum* **126**: 343-355

- Jablonski PP & Anderson JW** (1981) Light dependent reduction of dehydroascorbate by ruptured pea chloroplasts. *Plant Physiology* **67**: 1239-1244
- Jackson WT** (1972) Regulation of mitosis. 3. Cytological effects of 2,4,5-trichloro-phenoxyacetic acid and of dioxin contaminants in 2,4,5-T formulations. *Journal of Cell Science* **10**: 15-25
- Jiménez A, Hernández JA, del Río LA & Sevilla F** (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology* **114**: 275-284
- Jiménez A, Romojaro F, Gómez JM, Llanos MR & Sevilla F** (2003) Antioxidant systems and their relationship with the response of pepper fruits to storage at 20 degrees C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 6293-6299
- Jones AM & Herman EM** (1993) Kdel-containing auxin-binding protein is secreted to the plasma-membrane and cell wall. *Plant Physiology* **101**: 595-606
- Josse EM, Simkin AJ, Gaffe J, Laboure AM, Kuntz M & Carol P** (2000) A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. *Plant Physiology* **123**: 1427-1436
- Kalt-Torres W, Burke JJ & Anderson JM** (1984) Chloroplast glutathione reductase: purification and properties. *Physiologia Plantarum* **61**: 271-278
- Kaminaka H, Morita S, Tokumoto M, Masumura T & Tanaka K** (1999) Differential gene expressions of rice superoxide dismutase isoforms to oxidative and environmental stresses. *Free Radical Research* **31** Suppl: S219-S225
- Kanematsu S & Asada K** (1990) Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of CuZn-superoxide dismutase in spinach, rice and horsetail. *Plant and Cell Physiology* **31**: 99-112
- Kangasjarvi J, Jaspers P & Kollist H** (2005) Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Cell and Environment* **28**: 1021-1036
- Kappus H** (1985) Lipid peroxidation: mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance (eds. Sies H), pp. 272-309. Academic Press, New York
- Karpinski S, Escobar C, Karpinska B, Creissen G & Mullineaux PM** (1997) Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress. *Plant Cell* **9**: 627-640
- Kato A, Hayashi M, Takeuchi Y & Nishimura M** (1996) cDNA cloning and expression of a gene for 3-ketoacyl-CoA thiolase in pumpkin cotyledons. *Plant Molecular Biology* **31**: 843-852
- Kato Y, Urano J, Maki Y & Ushimaru T** (1997) Purification and characterization of dehydroascorbate reductase from rice. *Plant and Cell Physiology* **38**: 173-178
- Kelly S & Avery GS** (1949) The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and other physiologically active substances on respiration. *American Journal of Botany* **36**: 421-426
- Kende H & Zeevaart J** (1997) The five "classical" plant hormones. *Plant Cell* **9**: 1197-1210
- Kenney WC, Edmondson DE, Singer TP, Nakagawa H, Asano A & Sato R** (1976) Identification of covalently bound flavin of L-gulonolactone oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **71**: 1194-1200
- Kenney WC, Edmondson DE, Singer TP, Nishikimi M, Noguchi E & Yagi K** (1979) Identification of the covalently-bound flavin of L-galactonolactone oxidase from yeast. *FEBS Letters* **97**: 40-42

- Kerk NM & Feldman LJ** (1995) A biochemical-model for the initiation and maintenance of the quiescent center. Implications for organization of root meristems. *Development* **121**: 2825-2833
- Key JL & Wold F** (1961) Some effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on oxidation-reduction state of soybean seedlings. *Journal of Biological Chemistry* **236**: 549-553
- Khalatkar AS & Bhargava YR** (1982) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-a new environmental mutagen. *Mutant Research* **103**: 111-114
- Khizbullin FF, Estrina GI, Mavrodieva NN, Khaziev FS, Kruglov EI & Amirova ZK** (1997) Pollution of the agricultural lands of Bashkortostan by the herbicide 2,4-D and dioxins. *Meditzin Tr Prom Ekol* **8**: 26-31
- Kiddle G, Pastori GM, Bernard S, Pignocchi C, Antoniw J, Verrier PJ & Foyer CH** (2003) Effects of leaf ascorbate content on defense and photosynthesis gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Antioxidants & Redox Signaling* **5**: 23-32
- Kim HS, Huh WK, Kim JY, Hwang SW & Kang SO** (1996) D-Arabinose dehydrogenase and biosynthesis of D-erythroascorbic acid in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1297**: 1-8
- Kimball J** (2002) Auxin and abscisic acid. En <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages>
- Kindl H & Lazarow PB** (1982) *Peroxisomes and Glyoxysomes*. The New York Academic of Sciences, New York
- Kitamiya E, Suzuki S, Sano T & Nagata T** (2000) Isolation of two genes that were induced upon the initiation of somatic embryogenesis on carrot hypocotyls by high concentrations of 2,4-D. *Plant Cell Reports* **19**: 551-557
- Kiuchi K, Nishikimi M & Yagi K** (1982) Purification and characterization of L-gulonolactone oxidase from chicken kidney microsomes. *Biochemistry* **21**: 5076-5082
- Kong W, Shiota S, Shi Y, Nakayama H & Nakayama K** (2000) A novel peroxiredoxin of the plant *Sedum lineare* is a homologue of *Escherichia coli* bacterioferritin co-migratory protein (Bcp). *Biochemical Journal* **351**: 107-114
- Kruk J, Hollander-Czytko H, Oettmeier W & Trebst A** (2005) Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. *Journal of Plant Physiology* **162**: 749-757
- Kuijpers AM, Bouman H & deKlerk GJ** (1996) Increase of embryogenic callus formation in cucumber by initial culture on high concentration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **46**: 81-83
- Kunze CM & Trelease RN** (1986) Heterogeneity of catalase in maturing and germinated cotton seeds. *Plant Physiology* **81**: 1134-1139
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lamb CJ** (1978) Hormone binding in plants. *Nature* **274**: 312-314
- Landolt R & Matile P** (1990) Glyoxisome-like microbodies in senescent spinach leaves. *Plant Science* **72**: 159-163
- Lascano HR, Gómez LD, Casano LM & Trippi VS** (1998) Changes in glutathione reductase activity and protein content in wheat leaves and chloroplasts exposed to photooxidative stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**: 321-329
- Lauchli A** (1993) Selenium in plants: Uptake, functions and environmental toxicity. *Botanica Acta* **106(6)**: 455-468

- Lázaro JJ, Chueca A, López-Gorgé J & Mayor F** (1974) Fructose-1,6-diphosphatase from spinach leaf chloroplasts. Purification and heterogeneity. *Phytochemistry* **13**: 2455-2461
- León AM, Palma JM, Corpas FJ, Gómez M, Romero-Puertas MC, Chatterjee D, Mateos RM, del Río LA & Sandalio LM** (2002) Antioxidative enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 813-820
- Leterrier M, Corpas FJ, Barroso JB, Sandalio LM & del Río LA** (2005) Peroxisomal monodehydroascorbate reductase. Genomic clone characterization and functional analysis under environmental stress conditions. *Plant Physiology* **138**: 2111-2123
- Levine A, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, AHN BW, Shaltiel S & Stadtman R** (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods of Enzymology* **186**: 464-478
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER & Shacter E** (1991) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods of Enzymology* **233**: 346-363
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER & Shacter E** (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583-593
- Liang WJ, Johnson D & Jarvis SM** (2001) Vitamin C transport systems of mammalian cells. *Molecular Membrane Biology* **18**: 87-95
- Liebler DC** (1998) Antioxidant chemistry of alpha-tocopherol in biological systems. Roles of redox cycles and metabolism. *Subcellular Biochemistry* **30**: 301-317
- Limam F, Chahed K, Ouelhazi N, Ghrir R & Ouelhazi L** (1998) Phytohormone regulation of isoperoxidases in *Catharanthus roseus* suspension cultures. *Phytochemistry* **49**: 1219-1225
- Lin LS & Varner JE** (1991) Expression of ascorbic-acid oxidase in zucchini squash (*Cucurbita-Pepo* L). *Plant Physiology* **96**: 159-165
- Lisenbee CS, Lingard MJ, Trelease RN** (2005) *Arabidopsis* peroxisomes possess functionally redundant membrane and matrix isoforms of monodehydroascorbate reductase. *Plant Journal* **43**: 900-914
- Liu W & Saint DA** (2002) Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochemistry and Biophysics Research Community* **294**: 347-353
- Livak KJ & Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408
- Livne A & Gepstein S** (1988) Abundance of the major chloroplast polypeptides during development and ripening of tomato fruits. An immunological study. *Plant Physiology* **87**: 239-243
- Ljubescic N, Wrisher M & Devide Z** (1991) Chromoplasts-the last stages in plastid development. *International Journal of Developmental Biology* **35**: 251-258
- Lledías F, Rangel P & Hansberg W** (1998) Oxidation of catalase by singlet oxygen. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 10630-10637
- Lloyd CW, Lowe SB & Peace GW** (1980) The mode of action of 2,4-D in counteracting the elongation of carrot cells grown in culture. *Journal of Cell Science* **45**: 257-268
- Loewus FA** (1963) Tracer studies on ascorbic acid formation in plants. *Phytochemistry* **2**: 109-128
- Loewus FA** (1988) Ascorbic acid and its metabolic products. En *The Biochemistry of Plants* (eds. Press Journal) Vol. 14, pp. 85-107. Academic Press, New York

- Loewus MW, Bedgar DL, Saito K & Loewus FA** (1990) Conversion of L-sorbosone to L-ascorbic acid by a NADP-dependent dehydrogenase in bean and spinach leaf. *Plant Physiology* **94**: 1492-1495
- Loos MA** (1975) Phenoxyalcanoic acids. En *Herbicides: Chemistry, Degradation and Mode of Action* (eds. Kearney PC & Kaufman DD), pp. 1-128. Dekker Publishers, New York-Basel
- López-Huertas E, Sandalio, LM & del Río, LA** (1995) Integral membrane polypeptides of pea leaf peroxisomes. Characterization and response to plant stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **33**: 295-302
- López-Huertas E, Sandalio LM, Gómez M & del Río LA** (1997) Superoxide radical generation in peroxisomal membranes: evidence for the participation of the 18 kDa integral membrane polypeptide. *Free Radical Research* **26**: 497-506
- López-Huertas E, Corpas FJ, Sandalio LM & del Río LA** (1999) Characterization of membrane polypeptides from pea leaf peroxisomes involved in superoxide radical generation. *Biochemical Journal* **337** (Pt 3): 531-536
- López-Huertas E, Charlton WL, Johnson B, Graham IA & Baker A** (2000) Stress induces peroxisome biogenesis genes. *EMBO Journal* **19**: 6770-6777
- López-Jaramillo J, Chueca A, Sahrawy M, López-Gorgé J** (1998) Hybrids from pea chloroplast thioredoxins f and m: physicochemical and kinetic characteristics. *Plant Journal* **15**: 155-163
- Lord JM, Kagawa T, Moore TS & Beevers H** (1973) Endoplasmic reticulum as the site of lecithin formation in castor bean endosperm. *Journal of Cell Biology* **57**: 659-667
- Lorence A, Chevone BI, Mendes P & Nessler CL** (2004) myo-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiology* **134**: 1200-1205
- Lotlikar PD, Remmert LF & Freed VH** (1968) Effects of 2,4-D and other herbicides on oxidative phosphorylation in mitochondria from cabbage. *Weed Science* **16**: 161-&
- Lucotte G & Baneyx F** (1993) *Introduction to Molecular Cloning Techniques*. VCH Publishers Inc., New York
- Luschning C & Fink GR** (1999) Two pieces of the auxin puzzle. *Trends in Plant Science* **4**: 162-164
- Lyon BR, Llewellyn DJ, Huppertz JL, Dennis ES & Peacock WJ** (1989) Expression of a bacterial gene in transgenic tobacco plants confers resistance to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Molecular Biology* **13**: 533-540
- Madamanchi NR, Anderson JV, Alschler RG, Cramer CL & Hess JL** (1992) Purification of multiple forms of glutathione reductase from pea (*Pisum sativum* L.) seedlings and enzyme levels in ozone-fumigated pea leaves. *Plant Physiology* **100**: 138-145
- Maddison J, Lyons T, Plochl M & Barnes J** (2002) Hydroponically cultivated radish fed L-galactono-1,4-lactone exhibit increased tolerance to ozone. *Planta* **214**: 383-391
- Mapson LW, Isherwood FA & Chen YT** (1954) Biological synthesis of L-ascorbic acid - the conversion of L-galactono-gamma-lactone into L-ascorbic acid by plant mitochondria. *Biochemical Journal* **56**: 21-28
- Marapara JL, Omar M, Luis JC, Rodríguez M, Martín R, García VP & Valdés F** (1999) Embriogénesis somática *in vitro* de *Aconitum napellus* subsp *lusitanicum* L. (*Ranunculaceae*). En *XIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal: VI Congreso Hispano-Luso* 330-Sevilla
- Mariko N, Genovese MI & Lajolo FM** (2005) Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables and comercial frozen fruit pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 2928-2935

- Markus F, Daood HG, Kapitany J & Biacs PA** (1999) Change in the carotenoid and antioxidant content of spice red pepper (paprika) as a function of ripening and some technological factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 100-107
- Marone M, Mozzetti S, De Ritis D, Pierelli L & Scambia G** (2001) Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biological Proceeding Online* **3**: 19-25
- Marrs KA** (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 127-158
- Martín JD, Pintos B, Rebordinos I, Villalobos N, Martín L & Guerra H** (1999) Embriogénesis somática en explantos de *Medicago arborea* L. en función de un balance citoquinina / auxina. En *XIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal: VI Congreso Hispano-Luso* 213-Sevilla
- Martínez-Rivas JM & Vega JM** (1998) Purification and characterization of NAD-isocitrate dehydrogenase from *chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* **118**: 249-255
- Martínez S, López M, González-Raurich M & Álvarez AB** (2005) The effects of ripening stage and processing systems on vitamin C content in sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **56**: 45-51
- Masters CJ & Crane DI** (1995) On the role of the peroxisome in ontogeny, ageing and degenerative disease. *Mechanisms of Ageing and Development* **80**: 69-83
- Mateos RM, León AM, Sandalio LM, Gómez M, del Río LA & Palma JM** (2003) Peroxisomes from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.): purification, characterisation and antioxidant activity. *Journal of Plant Physiology* **160**: 1507-1516
- Mateos RM, Jiménez A, Bacarizo S, Corpas FJ, Lundkvist M, Sevilla F, del Río LA & Palma JM** (2005) Metabolismo del ascorbato durante la maduración de frutos de pimiento (*Capsicum annuum* L.). IX Congreso Luso-Español de Fisiología Vegetal, Libro de Resúmenes, p. 126.
- Mateos RM, Román P, Lundkvist M, Jiménez A, Bacarizo S, van Doorn H, Corpas FJ, Leterrier M, Gómez M, Sevilla F, del Río LA & Palma JM** (2006) Antioxidative systems from pepper fruits involved in the response to seasonal changes. (En preparación).
- McCarthy I, Romero-Puertas MC, Palma JM, Sandalio LM, Corpas FJ, Gómez M & del Río LA** (2001) Cadmium induces senescence symptoms in leaf peroxisomes of pea plants. *Plant Cell and Environment* **24**: 1065-1073
- McCarthy, I.** (2004) Estudio del estrés oxidativo inducido por el 2,4-D en plantas de guisante (*Pisum sativum* L.) y en peroxisomas de hojas. Tesis Doctoral. Universidad de Granada
- McCord JM & Fridovich I** (1969) Superoxide dismutase: an enzyme function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein) *Journal of Biological Chemistry* **244**: 6049-6055
- McCracken DA, Ort DR & Nadakavukaren M** (1981) The effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid altered chloroplast development on photosynthesis. *Physiologia Plantarum* **52**: 285-291
- Meister A & Anderson ME** (1983) Glutathione. *Annual Review of Biochemistry* **52**: 711-760
- Menezes-Benavente L, Kernodle SP, Margis-Pinheiro M & Scandalios JG** (2004a) Salt-induced antioxidant metabolism defenses in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Redox Report* **9**: 29-36
- Menezes-Benavente L, Teixeira FK, Kamei CL & Margis-Pinheiro M** (2004b) Salt stress induces expression of genes encoding antioxidant enzymes in seedlings of a Brazilian indica rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science* **166**: 323-331

- Mennes AM, Quint A, Gribnau JH, Boot CJM, Vanderzaal EJ, Maan AC & Libbenga KR** (1992) Specific transcription and reinitiation of 2,4-D-induced genes in tobacco nuclei. *Plant Molecular Biology* **18**: 109-117
- Mieda T, Yabuta Y, Rapolu M, Motoki T, Takeda T, Yoshimura K, Ishikawa T & Shigeoka S** (2004) Feedback inhibition of spinach L-galactose dehydrogenase by L-ascorbate. *Plant and Cell Physiology* **45**: 1271-1279
- Millar AH, Mittova V, Kiddle G, Heazlewood JL, Bartoli CG, Theodoulou FL & Foyer CH** (2003) Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiology* **133**: 443-447
- Miller DM, Buettner GR & Aust SD** (1990) Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radical Biology and Medicine* **8**: 95-108
- Minetti M, Forte T, Soriani M, Quaresima V, Menditto A & Ferrari M** (1992) Iron induced ascorbate oxidation in plasma as monitored by ascorbate free radical formation. No spin trapping evidence for the hydroxyl radical in iron overloaded plasma. *Biochemical Journal* **282**: 459-465
- Mitchell JW & Brown JW** (1947) Relative sensitivity of dormant and germinating seeds to 2,4-D. *Science* **106**: 266-267
- Mittler R & Zilinskas BA** (1991) Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiology* **97**: 962-968
- Mittler R, Feng X & Cohen M** (1998) Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Plant Cell* **10**: 461-473
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**: 405-410
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M & Van Breusegem F** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**: 490-498
- Mittova V, Tal M, Volokita M & Guy M** (2002) Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiologia Plantarum* **115**: 393-400
- Mittova V, Theodoulou FL, Kiddle G, Gómez L, Volokita M, Tal M, Foyer CH & Guy M** (2003a) Coordinate induction of glutathione biosynthesis and glutathione-metabolizing enzymes is correlated with salt tolerance in tomato. *FEBS Letters* **554**: 417-421
- Mittova V, Tal M, Volokita M & Guy M** (2003b) Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Plant Cell and Environment* **26**: 845-856
- Miyake C & Asada K** (1992) Thylakoid bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant and Cell Physiology* **33**: 541-553
- Miyake C, Schreiber U, Hormann H, Sano S & Asada K** (1998) The FAD-enzyme monodehydroascorbate radical reductase mediates photoproduction of superoxide radicals in spinach thylakoid membranes. *Plant and Cell Physiology* **39**: 821-829
- Miyazawa Y, Sakai A, Miyagishima S, Takano H, Kawano S & Kuroiwa T** (1999) Auxin and cytokinin have opposite effects on amyloplast development and the expression of starch synthesis genes in cultured bright yellow-2 tobacco cells. *Plant Physiology* **121**: 461-469
- Mizoguchi T, Gotoh Y, Nishida E, Yamaguchi-Shinozaki K, Hayashida N, Iwasaki T, Kamada H & Shinozaki K** (1994) Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in

- Arabidopsis thaliana* and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells. *Plant Journal* **5**: 111-122
- Moller IM** (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 561-591
- Monk LS, Braendle R & Crawford RMM** (1987) Catalase activity and postanoxic injury in monocotyledonous species. *Journal of Experimental Botany* **38**: 233-246
- Monk LS, Fagerstedt KV & Crawford RMM** (1989) Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. *Physiologia Plantarum* **76**: 456-459
- Montalbini P** (1992) Changes in xanthine oxidase activity in bean leaves induced by uromyces *Phaseoli* infection. *Journal of Phytopathology. Phytopathologische Zeitschrift* **134**: 63-74
- Moons A** (2005) Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs). *Vitamins and Hormones* **72**: 155-202
- Mori IC & Schroeder JI** (2004) Reactive oxygen species activation of plant Ca²⁺ channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiology* **135**: 702-708
- Morimura Y, Ohya T & Ikawa T** (1996) Presence of ascorbate-peroxidizing enzymes in roots of *Brassica campestris* L cv Komatsuna. *Plant Science* **117**: 55-63
- Morre DJ, Gripshover B, Monroe A & Morre JT** (1984) Phosphatidylinositol turnover in isolated soybean membranes stimulated by the synthetic growth hormone 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Journal of Biological Chemistry* **259**: 15364-15368
- Mullen RT & Trelease RN** (1996) Biogenesis and membrane properties of peroxisomes: Does the boundary membrane serve and protect? *Trends in Plant Science* **1**: 389-394
- Muller M, Tausz M, Wonisch A & Grill D** (1999) Effects of an oxidizing agent (hydrogen peroxide) on the glutathione system in epidermal cells of *Allium cepa* L. investigated by histochemical staining. *Free Radical Research* **31** Suppl: S121-S127
- Mullineaux P, Creissen G, Broadbent P, Reynolds H, Kular B & Wellburn A** (1994) Elucidation of the role of glutathione reductase using transgenic plants. *Biochemical Society Transactions* **22**: 931-936
- Mullineaux PM, Karpinski S, Jiménez A, Cleary SP, Robinson C & Creissen GP** (1998) Identification of cDNAs encoding plastid-targeted glutathione peroxidase. *Plant Journal* **13**: 375-379
- Munné-Bosch S, Shikanai T & Asada K** (2005) Enhanced ferredoxin-dependent cyclic electron flow around photosystem I and alpha-tocopherol quinone accumulation in water-stressed *ndhB*-inactivated tobacco mutants. *Planta* **222**: 502-511
- Munkres KD, Rana RS & Goldstein E** (1984) Genetically determined conidial longevity is positively correlated with superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, cytochrome *c* peroxidase, and ascorbate free radical reductase activities in *Neurospora crassa*. *Mechanisms of Ageing and Development* **24**: 83-100
- Murthy SS & Zilinskas BA** (1994) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding pea monodehydroascorbate reductase. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 31129-31133
- Mutsuda M, Ishikawa T, Takeda T & Shigeoka S** (1995) Subcellular localization and properties of L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase in spinach leaves. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **59**: 1983-1984

- Naik PS, Chanemougasoundharam A, Khurana SMP & Kalloo G** (2003) Genetic manipulation of carotenoid pathway in higher plants. *Current Science* **85**: 1423-1430
- Namesny A** (1996) *Pimientos I*. En *Compendios de Horticultura*. Ediciones de Horticultura S.L., Reus
- Namesny A** (2006) *Pimientos II*. En *Compendios de Horticultura*. Ediciones de Horticultura S.L., Reus
- Navari-Izzo F & Izzo R** (1994) Induction of enzyme activities and antioxidant production in barley plants as a result of SO₂ fumigation. *Plant Science* **96**: 31-40
- Navari-Izzo F & Rascio N** (1999) Plant response to water deficit conditions. En *Handbook of Plant and Crop Stress* (eds. Pessaraki M and Dekker M), pp.231-270. New York
- Navarro JM, Flores P, Garrido C & Martínez V** (2006) Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chemistry* **96**: 66-73
- Nguyen J** (1986) Plant xanthine dehydrogenase. Its distribution, properties and function. *Physiologie Vegetale* **24**: 263-281
- Nguyen J, Machal L, Vidal J, Perrotrechenmann C & Gadal P** (1986) Immunochemical studies on xanthine dehydrogenase of soybean root nodules. Ontogenic changes in the level of enzyme and immunocytochemical localization. *Planta* **167**: 190-195
- Ni WT & Trelease RN** (1991) Posttranscriptional regulation of catalase isozyme expression in cotton seeds. *Plant Cell* **3**: 737-744
- Nichols MB & Low PS** (1986) The redox centers of xanthine oxidase are on independent structural domains of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **250**: 488-497
- Nishikimi M, Tolbert BM & Udenfriend S** (1976) Purification and characterization of L-gulonogamma-lactone oxidase from rat and goat liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **175**: 427-435
- Nishimura M, Takeuchi Y, Debellis L & Haranishimura I** (1993) Leaf peroxisomes are directly transformed to glyoxysomes during senescence of pumpkin cotyledons. *Protoplasma* **175**: 131-137
- Nishimura M, Hayashi M, Kato A, Yamaguchi K & Mano S** (1996) Functional transformation of microbodies in higher plant cells. *Cell Structure and Function* **21**: 387-393
- Nishino T** (1994) The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury. *Journal of Biochemistry* **116**: 1-6
- Noctor G & Foyer CH** (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 249-279
- Noctor G, Veljovic-Jovanovic S, Driscoll S, Novitskaya L & Foyer CH** (2002a) Drought and oxidative load in the leaves of C-3 plants: a predominant role for photorespiration? *Annals of Botany* **89**: 841-850
- Noctor G, Gómez L, Vanacker H & Foyer C** (2002b) Interaction between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1283-1304
- Noctor G** (2006) Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant Cell and Environment* **29**: 409-425
- Nuez FR, Gil J & Costa J** (1996) El cultivo de pimiento, chiles y ajíes. *Mundi-Prensa, Madrid*. pp. 607
- Nunoshiba T, Obata F, Boss AC, Oikawa S, Mori T, Kawanishi S & Yamamoto E** (1999) Role of iron and superoxide for generation of hydroxyl radical, oxidative DNA lesions, and mutagenesis in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 34832-34837

- Nutricati E, Miceli A, Blando F & De Bellis L** (2006) Characterization of two *Arabidopsis thaliana* glutathione S-transferases. *Plant Cell Report*. (En prensa)
- Nyska A & Kohen R** (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology* **30**: 620-650
- Ôba K, Fukui M, Imai Y, Iriyama S & Nogami K** (1994) L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase. Partial characterization, induction of activity and role in the synthesis of ascorbic acid in wounded white potato tuber tissue. *Plant and Cell Physiology* **35**: 473-478
- Ôba K, Ishikawa S, Nishikawa M, Mizuno H & Yamamoto T** (1995) Purification and properties of L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots. *The Journal of Biochemistry (Tokyo)* **117**: 120-124
- Obara K, Sumi K & Fukuda H** (2002) The use of multiple transcription starts causes the dual targeting of *Arabidopsis* putative monodehydroascorbate reductase to both mitochondria and chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* **43**: 697-705
- Ogawa K, Kanematsu S & Asada K** (1995) Attachment of CuZn-superoxide dismutase to thylakoid membranes at the site of superoxide generation (PSI) in spinach chloroplast: detection by immunogold labeling after rapid freezing and substitution method. *Plant and Cell Physiology* **36**: 565-573
- Ogawa K, Kanematsu S & Asada K** (1996) Intra- and extra-cellular localization of "cytosolic" CuZn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyl. *Plant and Cell Physiology* **37**: 790-799
- Ogawa K** (2005) Glutathione-associated regulation of plant growth and stress responses. *Antioxidants and Redox Signaling* **7**: 973-981
- Okamoto H, Tanaka Y & Sakai S** (1995) Molecular cloning and analysis of the cDNA for an auxin-regulated calmodulin gene. *Plant Cell Physiology* **36**: 1531-1539
- Okamura M** (1980) An improved method for determination of L-ascorbic acid and L-dehydroascorbic acid in blood plasma. *Clinica Chimica Acta* **103**: 259-268
- O'Neill RA & Scott TK** (1987) Rapid effects of IAA on cell surface proteins from intact carrot suspension culture cells. *Plant Physiology* **84**: 443-446
- op den Camp RGL, Przybyla D, Ochsenbein C, Laloi C, Kim CH, Danon A, Wagner D, Hideg E, Gobel C, Feussner I, Nater M & Apel K** (2003) Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**: 2320-2332
- Ostergaard J, Persiau G, Davey MW, Bauw G & Van Montagu M** (1997) Isolation of a cDNA coding for L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase, an enzyme involved in the biosynthesis of ascorbic acid in plants. Purification, characterization, cDNA cloning, and expression in yeast. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 30009-30016
- Padh H** (1990) Cellular functions of ascorbic acid. *Biochemistry and Cell Biology* **68**: 1166-1173
- Pagano EA, Chueca A, López-Gorgé J** (2000) Expression of thioredoxins f and m, and of their targets fructose-1,6-bisphosphatase and NADP-malate dehydrogenase in pea plants grown under normal and light/temperature stress conditions. *Journal Experimental Botany* **51**: 1299-1307
- Pallas JE** (1960) Effects of temperature and humidity on foliar absorption and translocation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and benzoic acid. *Plant Physiology* **35**: 575-580
- Palma JM, Garrido M, Rodríguez-García MI & del Río LA** (1991) Peroxisome proliferation and oxidative stress mediated by activated oxygen species in plant peroxisomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **287**: 68-74

- Palma JM, Pastori GM, Bueno P, Distefano S & del Río LA** (1997) Purification and properties of cytosolic copper, zinc superoxide dismutase from watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad) cotyledons. *Free Radical Research* **26**: 83-91
- Palma JM, López-Huertas E, Corpas FJ, Sandalio LM, Gómez M & del Río LA** (1998) Peroxisomal manganese superoxide dismutase: Purification and properties of the isozyme from pea leaves. *Physiologia Plantarum* **104**: 720-726
- Palma JM, Sandalio LM, Corpas FJ, Romero-Puertas MC, McCarthy I & del Río LA** (2002) Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 521-530
- Pascal S, Debrauwer L, Ferte MP, Anglade P, Rouimi P & Scalla R** (1998) Analysis and characterization of glutathione S-transferase subunits from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science* **134**: 217-226
- Pastori GM & del Río LA** (1994) Activated oxygen species and superoxide dismutase activity in peroxisomes from senescent pea leaves. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B-Biological Sciences* **102**: 505-509
- Pastori GM & del Río LA** (1997) Natural senescence of pea leaves. An activated oxygen mediated function for peroxisomes. *Plant Physiology* **113**: 411-418
- Pastori GM, Kiddle G, Antoniow J, Bernard S, Veljovic-Jovanovic S, Verrier PJ, Noctor G & Foyer CH** (2003) Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant Cell* **15**: 939-951
- Pateraki I, Sanmartin M, Kalamaki MS, Gerasopoulos B & Kanellis AK** (2004) Molecular characterization and expression studies during melon fruit development and ripening of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1623-1633
- Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E & Schroeder JI** (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**: 731-734
- Pérez-Gálvez A & Mínguez-Mosquera MI** (2001) Structure-reactivity relationship in the oxidation of carotenoid pigments of the pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 4864-4869
- Peterson J & Dwyer J** (1998) Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research* **18**: 1995-2018
- Phelps DC & McDonald RE** (1990) Inhibition of electron-transport activities in mitochondria from avocado and pepper fruit by naturally-occurring polyamines. *Physiologia Plantarum* **78**: 15-21
- Pignocchi C & Foyer CH** (2003) Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 379-389
- Plochl M, Lyons T, Ollerenshaw J & Barnes J** (2000) Simulating ozone detoxification in the leaf apoplast through the direct reaction with ascorbate. *Planta* **210**: 454-467
- Poh R, Xia X, Bruce IJ & Smith ARW** (2001) 2,4-Dichlorophenoxyacetate/alpha-ketoglutarate dioxygenases from *Burkholderia cepacia* 2a and *Ralstonia eutropha* JMP134. *Microbios* **105**: 43-63
- Polle A** (2001) Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate peroxidase-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as step towards flux analysis. *Plant Physiology* **126**: 445-462
- Prasad PV & Jones AM** (1991) Putative receptor for the plant growth hormone auxin identified and characterized by antiidiotypic antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **88**: 5479-5483

- Price AH & Hendry GAF** (1989) Stress and the role of activated oxygen scavengers and protective enzymes in plants subjected to drought. *Biochemical Society Transactions* **17**: 493-493
- Primo Yúfera E** (1958) *Herbicidas y Fitorreguladores*. Eds. Aguilar. Madrid
- Proteggente AR, Pannala AS, Paganga G, Van Buren L, Wagner E, Wiseman S, Van De Put F, Dacombe C & Rice-Evans CA** (2002) The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radical Research* **36**: 217-233
- Puceat M** (2005) Role of Rac-GTPase and reactive oxygen species in cardiac differentiation of stem cells. *Antioxidants and Redox Signaling* **7**: 1435-1439
- Puppo A, Groten K, Bastian F, Carzaniga R, Soussi M, Lucas MM, De Felipe MR, Harrison J, Vanacker H, Foyer CH** (2005). Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytologist* **165**: 683-701
- Quessada MP & Macheix JJ** (1984) Caractérisation d'une peroxidase impliqué spécifiquement dans la lignification, en relation avec l'incompatibilité au greffage chez l'abricotier. *Physiol.Véget.* **22**: 533-540
- Rabie RK, Arima Y & Kumazawa K** (1980) Uptake and distribution of combined nitrogen and Its incorporation into seeds of nodulated soybean plants as revealed by N-15 studies. *Soil Science and Plant Nutrition* **26**: 427-436
- Rabinowitch HD & Fridovich I** (1983) Superoxide radicals, superoxide dismutases and oxygen toxicity in Plants. *Photochemistry and Photobiology* **37**: 679-690
- Raha S & Robinson BH** (2000) Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochemistry Science* **25**: 502-508
- Rajagopalan KV** (1985) Purification of bovine milk xanthine oxidase. En *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research* (eds. Greenwald RA), pp. 21-23. CRC PRESS, Boca Ratón
- Ramanayake SMSD & Wanniarachchi WAVR** (2003) Organogenesis in callus derived from an adult giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Wall. ex Munro). *Scientia Horticulturae* **98**: 195-200
- Rasmussen LW** (1947) The physiological action of 2,4-dichlorophen-oxyacetic acid on dandelion, *Taraxacum officinale*. *Plant Physiology* **22**: 377-392
- Rautenkranz A, Li L, Machler F, Martinoia E & Oertli JJ** (1994) Transport of ascorbic and dehydroascorbic acids across protoplast and vacuole membranes isolated from barley (*Hordeum vulgare* L. cv Gerbel) leaves. *Plant Physiology* **106**: 187-193
- Reinheckel T, Noack H, Lorenz S, Wiswedel I & Augustin W** (1998) Comparison of protein oxidation and aldehyde formation during oxidative stress in isolated mitochondria. *Free Radical Research* **29**: 297-305
- Reiter RJ, Carneiro RC & Oh CS** (1997) Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Hormone and Metabolic Research* **29**: 363-372
- Rennenberg H** (1982) Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochemistry* **21**: 2771-2781
- Reuber MD** (1983) Carcinogenicity and toxicity of 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid. *Science of the Total Environment* **31**: 203-218
- del Río LA, Gómez M, Leal A & López-Gorgé J** (1977) More sensitive modification of catalase assay with Clark oxygen electrode. Application to kinetic study of pea leaf enzyme. *Analytical Biochemistry* **80**: 409-415

- del Río LA, Lyon DS, Olah I, Glick B & Salin ML** (1983) Immunocytochemical evidence for a peroxisomal localization of manganese superoxide dismutase in leaf protoplasts from a higher plant. *Planta* **158**: 216-224
- del Río LA, Sandalio LM, Yanez J, & Gómez M** (1985) Induction of a manganese containing superoxide dismutase in leaves of *Pisum sativum* L. by high nutrient levels of zinc and manganese. *Journal of Inorganic Biochemistry* **24**: 25-34
- del Río LA, Fernández VM, Ruperez FL, Sandalio LM & Palma JM** (1989) NADH induces the generation of superoxide radicals in leaf peroxisomes. *Plant Physiology* **89**: 728-731
- del Río LA, Sandalio LM, Palma JM, Bueno P & Corpas FJ** (1992) Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radical Biology and Medicine* **13**: 557-580
- del Río LA & Donaldson RP** (1995) Production of superoxide radicals in glyoxysomal membranes of castor bean endosperm. *Journal of Plant Physiology* **146**: 283-287
- del Río LA, Pastori GM, Palma JM, Sandalio LM, Sevilla F, Corpas FJ, Jiménez A, López-Huertas E & Hernández JA** (1998a) The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology* **116**: 1195-1200
- del Río LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gómez M & Barroso JB** (2002a) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1255-1272
- del Río LA** (2002b) Peroxisomes, reactive oxygen metabolism and stress related enzyme activities. En *Plant Peroxisomes. Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications* (eds. Baker A & Graham IA), pp. 221-258. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- del Río LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM & Barroso JB** (2003a) Plant peroxisomes, reactive oxygen metabolism and nitric oxide. *IUBMB Life* **55**: 71-81
- del Río LA, Sandalio LM, Altomare DA & Zilinskas BA** (2003b) Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **54**: 923-933
- del Río LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB** (2006) ROS and RNS in peroxisomes: production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* **141** (en prensa)
- Rodoni S, Vicentini F, Schellenberg M, Matile P & Hortensteiner S** (1997) Partial purification and characterization of red chlorophyll catabolite reductase, a stroma protein involved in chlorophyll breakdown. *Plant Physiology* **115**: 677-682
- Rohrbaugh LM & Rice EL** (1956) Relation of phosphorus nutrition to the translocation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in tomato plants. *Plant Physiology* **31**: 196-199
- Romer S, Dharlingue A, Cámara B, Schantz R & Kuntz M** (1992) Cysteine synthase from *Capsicum annuum* chromoplasts. Characterization and cDNA cloning of an up-regulated enzyme during fruit-development. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 17966-17970
- Romero-Puertas MC, McCarthy I, Sandalio LM, Palma JM, Corpas FJ, Gómez M & del Río LA** (1999) Cadmium toxicity and oxidative metabolism of pea leaf peroxisomes. *Free Radical Research* **31** Suppl: S25-S31
- Romero-Puertas MC, Palma JM, Gómez M, del Río LA & Sandalio LM** (2002a) Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant Cell and Environment* **25**: 677-686
- Romero-Puertas MC** (2002b) Metabolismo de especies de oxígeno reactivo en plantas de guisante (*Pisum sativum* L.) y en peroxisomas de hojas en condiciones de estrés por cadmio. Tesis Doctoral. Universidad de Granada

- Romero-Puertas MC, McCarthy I, Gómez M, Sandalio LM, Corpas FJ, del Río LA & Palma JM** (2004) Reactive oxygen species-mediated enzymatic systems involved in the oxidative action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Cell and Environment* **27**: 1135-1148
- Romero-Puertas MC, Corpas FJ, Sandalio LM, Leterrier M, Rodríguez-Serrano M, del Río LA & Palma JM** (2006) Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New phytologist* **170**: 43-52
- Rouhier N & Jacquot JP** (2005) The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radical Biology & Medicine* **38**: 1413-1421
- Rudhe C, Clifton R, Whelan J & Glaser E** (2002) N-terminal domain of the dual-targeted pea glutathione reductase signal peptide controls organellar targeting efficiency. *Journal of Molecular Biology* **324**: 577-585
- Rudhe C, Clifton R, Chew O, Zemam K, Richter S, Lamppa G, Whelan J & Glaser E** (2004) Processing of the dual targeted precursor protein of glutathione reductase in mitochondria and chloroplasts. *Journal of Molecular Biology* **343**: 639-647
- Rumsey SC, Kwon O, Xu GW, Burant CF, Simpson I & Levine M** (1997) Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 18982-18989
- Saito K, Nick JA & Loewus FA** (1990) D-glucosone and L-sorbosone, putative intermediates of L-ascorbic-acid biosynthesis in detached bean and spinach leaves. *Plant Physiology* **94**: 1496-1500
- Sakamoto A, Ohsuga H & Tanaka K** (1992) Nucleotide sequence of two cDNA clones encoding different Cu/Zn-superoxide dismutases expressed in developing rice seed (*Oryza sativa L.*). *Plant Molecular Biology* **19**: 323-327
- Sakihama Y, Mano J, Sano S, Asada K & Yamasaki H** (2000) Reduction of phenoxyl radicals mediated by monodehydroascorbate reductase. *Biochemical and Biophysical Research Community* **279**: 949-954
- Salin ML & Bridges SM** (1980) Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eukaryote, *Brassica campestris*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **201**: 369-374
- Salin ML** (1988) Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiologia Plantarum* **72**: 681-689
- Sandalio LM & del Río LA** (1987) Localization of superoxide dismutase in glyoxysomes from *Citrullus vulgaris*. Functional implications in cellular metabolism. *Journal of Plant Physiology* **127**: 395-409
- Sandalio LM & del Río LA** (1988) Intraorganellar distribution of superoxide dismutase in plant peroxisomes (glyoxysomes and leaf peroxisomes). *Plant Physiology* **88**: 1215-1218
- Sandalio LM, López-Huertas E, Bueno P & del Río LA** (1997) Immunocytochemical localization of copper,zinc superoxide dismutase in peroxisomes from watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad) cotyledons. *Free Radical Research* **26**: 187-194
- Sandalio LM, Dalurzo HC, Gómez M, Romero-Puertas MC & del Río LA** (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany* **52**: 2115-2126
- Sandmann G & Boger P** (1980) Copper mediated lipid peroxidation processes in photosynthetic membranes. *Plant Physiology* **66**: 797-800
- Sandmann G & González HG** (1989) Peroxidative processes induced in bean leaves by fumigation with sulphur dioxide. *Environmental Pollution* **56**: 145-154

- Sano S & Asada K** (1994) cDNA cloning of monodehydroascorbate radical reductase from cucumber: a high degree of homology in terms of amino acid sequence between this enzyme and bacterial flavoenzymes. *Plant Cell Physiology* **35**: 425-437
- Sano S, Tao S, Endo Y, Inaba T, Hossain MA, Miyake C, Matsuo M, Aoki H, Asada K & Saito K** (2005) Purification and cDNA cloning of chloroplastic monodehydroascorbate reductase from spinach. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **69**: 762-772
- Sattler SE, Gilliland LU, Magallanes-Lundback M, Pollard M & DellaPenna D** (2004) Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell* **16**: 1419-1432
- Sauer H, Wartenberg M & Hescheler J** (2001) Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiology and Biochemistry* **11**: 173-186
- Sautter C, Bartscherer HC & Hock B** (1981) Separation of plant-cell organelles by zonal centrifugation in reorienting density gradients. *Analytical Biochemistry* **113**: 179-184
- Schantz ML, Schreiber H, Guillemaut P & Schantz R** (1995) Changes in ascorbate peroxidase activities during fruit ripening in *Capsicum annuum*. *FEBS Letters* **358**: 149-152
- Scherer GFE & Andre B** (1989) A rapid response to a plant hormone. Auxin stimulates phospholipase-A2 *in vivo* and *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **163**: 111-117
- Scherer GFE & Arnold B** (1997) Inhibitors of animal phospholipase A(2) enzymes are selective inhibitors of auxin-dependent growth. Implications for auxin-induced signal transduction. *Planta* **202**: 462-469
- Schiavone FM & Cooke TJ** (1987) Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot. Developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors. *Cell Differentiation* **21**: 53-62
- Schmidt M, Dehne S, Feierabend J** (2002) Post-transcriptional mechanisms control catalase synthesis during its light-induced turnover in rye leaves through the availability of the heme cofactor and reversible changes of the translation efficiency of mRNA. *Plant Journal* **31**: 601-613
- Schnarre C, Oeser A & Tolbert NE** (1973) 2 Isoenzymes each of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in spinach leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **154**: 438-448
- Schneide EA & Wightman F** (1974) Metabolism of auxin in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **25**: 487-513
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM & Waner D** (2001b) Guard cell signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 627-658
- Schroeder JI, Kwak JM & Allen GJ** (2001a) Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature* **410**: 327-330
- Schulz H & Hartling S** (2001) Biochemical parameters as biomarkers for the early recognition of environmental pollution on Scots pine trees. II. The antioxidative metabolites ascorbic acid, glutathione, alpha-tocopherol and the enzymes superoxide dismutase and glutathione reductase. *Zeitschrift fur Naturforschung* **56**: 767-780
- Schutzendubel A & Polle A** (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1351-1365
- Schwitzguebel JP & Siegenthaler PA** (1984) Purification of peroxisomes and mitochondria from spinach leaf by percoll gradient centrifugation. *Plant Physiology* **75**: 670-674

- Sen S, Rahmani MA & Aikens I** (1983) RNA synthesis in 2,4,5-T-induced tumors in bean embryos. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **30**: 229-233
- Shigeoka S, Onishi T, Nakano Y & Kitaoka S** (1987) Characterization and physiological function of glutathione reductase in *Euglena gracilis* z. *Biochemical Journal* **242**: 511-515
- Shioi Y, Tamai H & Sasa T** (1978) Effects of copper on photosynthetic electron transport systems in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* **19**: 203-209
- Siendones E, González-Reyes JA, Santos-Ocana C, Navas P & Córdoba F** (1999) Biosynthesis of ascorbic acid in kidney bean. L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase is an intrinsic protein located at the mitochondrial inner membrane. *Plant Physiology* **120**: 907-912
- Simonne AH, Simonne EH, Eitenmiller RR, Mills HA & Green NR** (1997) Ascorbic acid and provitamin A contents in unusually coloured bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Food Composition and Analysis Academic Press* **10**: 299-311
- Smejkal CW, Vallaeyts T, Seymour FA, Burton SK & Lappin-Scott HM** (2001) Characterization of (R/S)-mecoprop [2-(2-methyl-4-chlorophenoxy) propionic acid]-degrading *Alcaligenes* sp CS1 and *Ralstonia* sp CS2 isolated from agricultural soils. *Environmental Microbiology* **3**: 288-293
- Smirnoff N** (1993) Tansley review 52. The role of active oxygen in the response of plants to water-deficit and desiccation. *New Phytologist* **125**: 27-58
- Smirnoff N & Pallanca JE** (1996) Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* **24**: 472-478
- Smirnoff N** (2000) Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **355**: 1455-1464
- Smirnoff N, Conklin PL & Loewus FA** (2001) Biosynthesis of ascorbic acid in plants: A renaissance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 437- 467
- Smith IK, Vierheller TL & Thorne CA** (1989) Properties and functions of glutathione reductase in plants. *Physiologia Plantarum* **77**: 449-456
- Sofic E, Cao G & Prior RL** (1996) Antioxidant capacity of tea and vegetables. *Faseb Journal* **10**: 1148-1148
- Sommerburg O, Keunen JEE, Bird AC & van Kuijk FJGM** (1998) Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: the macular pigment in human eyes. *British Journal of Ophthalmology* **82**: 907-910
- Spector A, Wang RR, Wang GM, Kleiman NJ, Pasternak A, Ankersson M & Wilson SR** (1991) A GSH peroxidase mimic (Pws248) protects lens epithelial-cells from oxidative stress. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **32**: 725-725
- Stacy RA, Munthe E, Steinum T, Sharma B & Aalen RB** (1996) A peroxiredoxin antioxidant is encoded by a dormancy-related gene, *Per1*, expressed during late development in the aleurone and embryo of barley grains. *Plant Molecular Biology* **31**: 1205-1216
- Stacy RA, Nordeng TW, Culianez-Macia FA & Aalen RB** (1999) The dormancy-related peroxiredoxin anti-oxidant, PER1, is localized to the nucleus of barley embryo and aleurone cells. *Plant Journal* **19**: 1-8
- Stadtman ER** (1990) Discovery of glutamine synthetase cascade. *Methods Enzymology*. 182: 793-809
- Stadtman ER & Berlett BS** (1991) Fenton chemistry. Amino acid oxidation. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 17201-17211

- Stadtman ER** (1992) Protein oxidation and aging. *Science* **257**: 1220-1224
- Steffens JC, Hunt DF & Williams BG** (1986) Accumulation of nonprotein metal binding polypeptides (gamma-glutamyl-cysteinyl) N-glycine in selected cadmium resistant tomato cells. *Journal of Biological Chemistry* **261**: 3879-3882
- Steiner AA** (1961) A universal method for preparing nutrient solution of a certain desired composition. *Plant Soil* **15**: 134-154
- Sterling TM & Hall JC** (1997) Mechanism of action of natural auxins and the auxinic herbicides. En *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology* (eds. Roe RM, Burton JD & Kuhr JR), pp. 111-114. IOS Press, Amsterdam
- Stevens RG, Creissen GP & Mullineaux PM** (1997) Cloning and characterisation of a cytosolic glutathione reductase cDNA from pea (*Pisum sativum* L.) and its expression in response to stress. *Plant Molecular Biology* **35**: 641-654
- Stevens RG, Creissen GP & Mullineaux PM** (2000) Characterisation of pea cytosolic glutathione reductase expressed in transgenic tobacco. *Planta* **211**: 537-545
- Stocker R, Bowry VW & Frei B** (1991) Ubiquinol-10 protects human low-density-lipoprotein more efficiently against lipid-peroxidation than does alpha-tocopherol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 1646-1650
- Streb P, Feierabend J & Bligny R** (1997) Resistance to photoinhibition of photosystem II and catalase and antioxidative protection in high mountain plants. *Plant Cell and Environment* **20**: 1030-1040
- Streller S & Wingsle G** (1994) *Pinus sylvestris* L. needles contain extracellular CuZn superoxide dismutase. *Planta* **192**: 195-201
- Sugaya S & Sakai S** (1996a) A soluble auxin-binding protein from mung bean hypocotyls has indole-3-acetaldehyde reductase activity. *Physiologia Plantarum* **97**: 433-439
- Sugaya S & Sakai S** (1996b) Identification of a soluble auxin-binding protein as a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. *Plant Science* **114**: 1-9
- Sugaya S, Ohmiya A, Kikuchi M & Hayashi T** (2000) Isolation and characterization of a 60 kDa 2,4-D-binding protein from the shoot apices of peach trees (*Prunus persica* L.); It is a homologue of protein disulfide isomerase. *Plant and Cell Physiology* **41**: 503-508
- Sundstrom G, Jensen S, Jansson B & Erne K** (1979) Chlorinated phenoxyacetic acid-derivatives and tetrachlorodibenzo-para-dioxin in foliage after application of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid-esters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **8**: 441-448
- Szarka A, Horemans N, Banhegyi G & Asard H** (2004) Facilitated glucose and dehydroascorbate transport in plant mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **428**: 73-80
- Tabata K, Takaoka T & Esaka M** (2002) Gene expression of ascorbic acid-related enzymes in tobacco. *Phytochemistry* **61**: 631-635
- Taguchi G, Fujikawa S, Yazawa T, Kodaira R, Hayashida N, Shimosaka M & Okazaki M** (2000) Scopoletin uptake from culture medium and accumulation in the vacuoles after conversion to scopolin in 2,4-D-treated tobacco cells. *Plant Science* **151**: 153-161
- Takahashi T, Yamashita H, Kato E, Mitsumoto M & Murakawa S** (1976) Purification and some properties of D-glucono-gamma-lactone dehydrogenase D-erythorbic acid producing enzyme of *Penicillium cyaneum fulvum*. *Agricultural and Biological Chemistry* **40**: 121-129
- Takahashi Y & Nagata T** (1992) Parb, an auxin regulated gene encoding glutathione S-transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 56-59

- Tamaoki M, Mukai F, Asai N, Nakajima N, Kubo A, Aono M & Saji H** (2003) Light-controlled expression of a gene encoding L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase which affects ascorbate pool size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* **164**: 1111-1117
- Tamura K, Liu H & Takahashi H** (1999) Auxin induction of cell cycle regulated activity of tobacco telomerase. *Journal of Biological Chemistry*. **274**: 20997-21002
- Tanaka K, Takeuchi E, Kubo A, Sakaki T, Haraguchi K & Kawamura Y** (1991) 2 Immunologically different isozymes of ascorbate peroxidase from spinach leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **286**: 371-375
- Tautorus TE, Fowke LC & Dunstan DI** (1991) Somatic embryogenesis in conifers. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **69**: 1873-1899
- Taylor CG, Nagy LE & Bray TM** (1996) Nutritional and hormonal regulation of glutathione homeostasis. *Current Topics in Cellular Regulation*, **34**: 189-208
- Teixeira FK, Menezes-Benavente L, Galvao VC, Margis R & Margis-Pinheiro M** (2006) Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta* (En prensa)
- Telfer A, Dhimi S, Bishop SM, Phillips D & Barber J** (1994) Beta-carotene quenches singlet oxygen formed by isolated photosystem-II reaction centers. *Biochemistry* **33**: 14469-14474
- Thom E & Neuhaus HE** (1995) Oxidation of imported or endogenous carbohydrates by isolated-chloroplasts from green-pepper fruits. *Plant Physiology* **109**: 1421-1426
- Thom E, Mohlmann T, Quick WP, Camara B & Neuhaus HE** (1998) Sweet pepper plastids: enzymic equipment, characterisation of the plastidic oxidative pentose-phosphate pathway, and transport of phosphorylated intermediates across the envelope membrane. *Planta* **204**: 226-233
- Thom R, Dixon DP, Edwards R, Cole DJ & Laphorn AJ** (2001) The structure of a zeta class glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana*: Characterisation of a GST with novel active-site architecture and a putative role in tyrosine catabolism. *Journal of Molecular Biology* **308**: 949-962
- Thorpe GHG, Kricka LJ, Moseley SB & Whitehead TP** (1985) Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase luminol hydrogen peroxide reaction. Application in luminescence monitored enzyme immunoassays. *Clinical Chemistry* **31**: 1335-1341
- Thorup TA, Tanyolac B, Livingstone KD, Popovsky S, Paran I & Jahn M** (2000) Candidate gene analysis of organ pigmentation loci in the *Solanaceae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **97**: 11192-11197
- Tisserat B & Murashige T** (1977) Repression of asexual embryogenesis in vitro by some plant growth regulators. *In Vitro* **13**: 799-805
- Tolbert NE & Essner E** (1981) Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. *Journal of Cell Biology* **91**: 271s-283s
- Top EM, Van Daele P, De Saeyer N & Forney LJ** (1998) Enhancement of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degradation in soil by dissemination of catabolic plasmids. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **73**: 87-94
- Travkin VM, Jadan AP, Briganti F, Scozzafava A & Golovleva LA** (1997) Characterization of an intradiol dioxygenase involved in the biodegradation of the chlorophenoxy herbicides 2,4-D and 2,4,5-T. *FEBS Letters* **407**: 69-72
- Trebst A, Depka B & Hollander-Czytko H** (2002) A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters* **516**: 156-160

- Trehin C, Planchais S, Glab N, Perennes C, Tregear J & Bergounioux C** (1998) Cell cycle regulation by plant growth regulators: involvement of auxin and cytokinin in the re-entry of *Petunia* protoplasts into the cell cycle. *Planta* **206**: 215-224
- Trumper S, Follmann H & Haberlein I** (1994) A novel dehydroascorbate reductase from spinach-chloroplasts homologous to plant trypsin-inhibitor. *FEBS Letters* **352**: 159-162
- Tsakaguchi H, Tokui T, MacKenzie B, Berger UV, Chen XZ, Wang YX, Brubaker RF & Hediger MA** (1999) A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature* **399**: 70-75
- Turcsányi E, Darko E, Borbely G & Lehoczki E** (1998) The activity of oxyradical-detoxifying enzymes is not correlated with paraquat resistance in *Conyza canadensis* (L.) cronq. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **60**: 1-11
- Urano J, Nakagawa T, Maki Y, Masumura T, Tanaka K, Murata N & Ushimaru T** (2000) Molecular cloning and characterization of a rice dehydroascorbate reductase. *FEBS Letters* **466**: 107-111
- Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Gómez-Rodríguez MV, Chaki M, Pedrajas JR, Fernández-Ocaña A, del Río LA & Barroso JB** (2006) The dehydrogenase mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant Cell and Environment* **29** (En prensa)
- Valpuesta V & Botella MA** (2004) Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. *Trends Plant Science* **9**: 573-577
- Vanacker H, Carver TLW & Foyer CH** (2000) Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiology* **123**: 1289-1300
- Vanacker H, Sandalio LM, Jiménez A, Palma JM, Corpas FJ, Meseguer V, Gómez M, Sevilla F, Letierrier M, Foyer CH, del Río LA** (2006) Roles for redox regulation in leaf senescence of pea plants grown on different sources of nitrogen nutrition. *Journal of Experimental Botany*, en prensa
- van den Bosch H, Schutgens RB, Wanders RJ & Tager JM** (1992) Biochemistry of peroxisomes. *Annual Review of Biochemistry* **61**: 157-197
- Vanyushin BF, Bakeeva LE, Zamyatnina VA, Aleksandrushkina NI** (2004) Apoptosis in plants: specific features of plant apoptotic cells and effect of various factors and agents. *International Review of Cytology* **233**: 135-179
- Vera JC, Reyes AM, Carcamo JG, Velasquez FV, Rivas CI, Zhang RH, Strobel P, Iribarren R, Scher HI, Slebe JC & Golde DW** (1996) Genistein is a natural inhibitor of hexose and dehydroascorbic acid transport through the glucose transporter, GLUT1. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 8719-8724
- Verdoucq L, Vignols F, Jacquot JP, Chartier Y & Meyer Y** (1999) *In vivo* characterization of a thioredoxin H target protein defines a new peroxiredoxin family. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 19714-19722
- Vianello A, Zancani M & Macri F** (1990) Hydrogen peroxide formation and iron ion oxidoreduction linked to NADH oxidation in radish plasmalemma vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* **1023**: 19-24
- Vianello A & Macri F** (1991) Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide at the surface of plant cells. *Journal of Bioenergetic Biomembranes* **23**: 409-423
- Vicentini F & Matile P** (1993) Gerontosomes, a multifunctional type of peroxisome in senescent leaves. *Journal of Plant Physiology* **142**: 50-56
- Vigil EL** (1983) Microbodies. En *Isolation of membranes and organelles from plant cells* (eds. Hall JL & Moore AL), pp.211-236. Academic Press, London

- Villalba JM, Córdoba F & Navas P** (1995) Ascorbate and the plasma membrane: a new view of cell growth control. En *Ascorbic Acid: Biochemistry and Biomedical Cell Biology 4* (eds. Haris JR), pp. 57-81. Plenum Press, New York
- Vroumsia T, Steiman R, Seigle-Murandi F & Benoit-Guyod JL** (1999) Effects of culture parameters on the degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) by selected fungi. *Chemosphere* **39**: 1397-1405
- Walk RA & Hock B** (1977) Glyoxysomal malate dehydrogenase of watermelon cotyledons - *de novo* synthesis on cytoplasmic ribosomes. *Planta* **134**: 277-285
- Wang T & Brown MJ** (1999) Quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: Validation and comparison with RNase protection. *Analytical Biochemistry* **269**(1): 198-201
- Wang X & Quinn PJ** (2000) The location and function of vitamin E in membranes. *Molecular Membrane Biology* **17**: 143-156
- Weaver RJ & Derose HR** (1946) Absorption and translocation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Botanical Gazette* **107**: 509-521
- Wheeler GL, Jones MA & Smirnoff N** (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* **393**: 365-369
- White PJ** (2002) Recent advances in fruit development and ripening: an overview. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1995-2000
- Willcox JK, Ash SL & Catignani GL** (2004) Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **44**: 275-295
- Willekens H, Langebartels C, Tire C, Van Montagu M, Inzé D & Vancamp W** (1994) Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **91**: 10450-10454
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D & Van Camp W** (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C-3 plants. *EMBO Journal* **16**: 4806-4816
- Wingsle G** (1989) Purification and characterization of glutathione reductase from Scots pine needles. *Physiologia Plantarum* **76**: 24-30
- Wingsle G & Karpinski S** (1996) Differential redox regulation by glutathione of glutathione reductase and CuZn-superoxide dismutase gene expression in *Pinus sylvestris* L. needles. *Planta* **198**: 151-157
- Winston** (1990) Physicochemical basis for free radical formation in cells: production and defenses. En *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimatization Mechanism* (eds. Alscher RG & Cumming JR), pp.57-86. Wiley-Liss Inc, New York
- Wolf DE, Vermillion G, Wallace A & Ahlgren GH** (1950) Effect of 2,4-D on carbohydrate and nutrient-element content and on rapidity of kill of soybean plants growing at different nitrogen levels. *Botanical Gazette* **112**: 188-197
- Wolucka BA, Persiau G, Van Doorselaere J, Davey MW, Demol H, Vandekerckhove J, Van Montagu M, Zabeau M & Boerjan W** (2001) Partial purification and identification of GDP-mannose 3', 5'-epimerase of *Arabidopsis thaliana*, a key enzyme of the plant vitamin C pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **98**: 14843-14848
- Wolucka BA & Van Montagu M** (2003) GDP-mannose 3',5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the *de novo* biosynthesis of vitamin C in plants. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 47483-47490

- Wu SC, Blumer JM, Darvill AG & Albersheim P** (1996) Characterization of an endo-beta-1,4-glucanase gene induced by auxin in elongating pea epicotyls. *Plant Physiology* **110**: 163-170
- Yabuta Y, Yoshimura K, Takeda T & Shigeoka S** (2000) Molecular characterization of tobacco mitochondrial L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase and its expression in *Escherichia coli*. *Plant and Cell Physiology* **41**: 666-675
- Yamaguchi J, Nishimura M & Akazawa T** (1984) Maturation of catalase precursor proceeds to a different extent in glyoxysomes and leaf peroxisomes of pumpkin cotyledons. *Proceedings of the National Academy of Science of the U S A* **81**: 4809-4813
- Yamaguchi LF, Vassao DG, Kato MJ & Di Mascio P** (2005) Biflavonoids from Brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potentials protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. *Phytochemistry* **66**: 2238-2247
- Yan LJ, Orr WC & Sohal RS** (1998) Identification of oxidized proteins based on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, immunochemical detection, isoelectric focusing, and microsequencing. *Analytical Biochemistry* **263**: 67-71
- Yang T & Davies PJ** (1999) Promotion of stem elongation by indole-3-butyric acid in intact plants of *Pisum sativum* L. *Plant Growth Regulation* **27**: 157-160
- Yang JG, Miyao S & Uchiyama T** (1999) Responses of *Mentha* suspension-cultured cells to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and accumulation of esterified phenolic acids in their cell walls. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **63**: 1522-1527
- Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T & Shigeoka S** (2000) Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology* **123**: 223-233
- Zhang H, Wang J, Nickel U, Allen RD & Goodman HM** (1997) Cloning and expression of an *Arabidopsis* gene encoding a putative peroxisomal ascorbate peroxidase. *Plant Molecular Biology* **34**: 967-971
- Zhu D & Scandalios JG** (1995) The maize mitochondrial Mn-SOD encoded by multiple genes are localized in the mitochondrial matrix of transformed yeast cells. *Free Radical Biology and Medicine* **18**: 179-183
- Zhu YL, Pilon-Smits EA, Tarun AS, Weber SU, Jouanin L & Terry N** (1999) Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiology* **121**: 1169-1178
- Ziegler H, Schafer E & Schneider MM** (1983) Some metabolic changes during chloroplast-chromoplast transition in *Capsicum annuum*. *Physiologie Vegetale* **21**: 485-494
- Zimmermann P & Zentgraf U** (2005) The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular & Molecular Biology Letters* **10**: 515-534
- Zipper C, Bolliger C, Fleischmann T, Suter MJ, Angst W, Muller MD & Kohler HP** (1999) Fate of the herbicides mecoprop, dichlorprop, and 2,4-D in aerobic and anaerobic sewage sludge as determined by laboratory batch studies and enantiomer-specific analysis. *Biodegradation* **10**: 271-278

ANEXOS

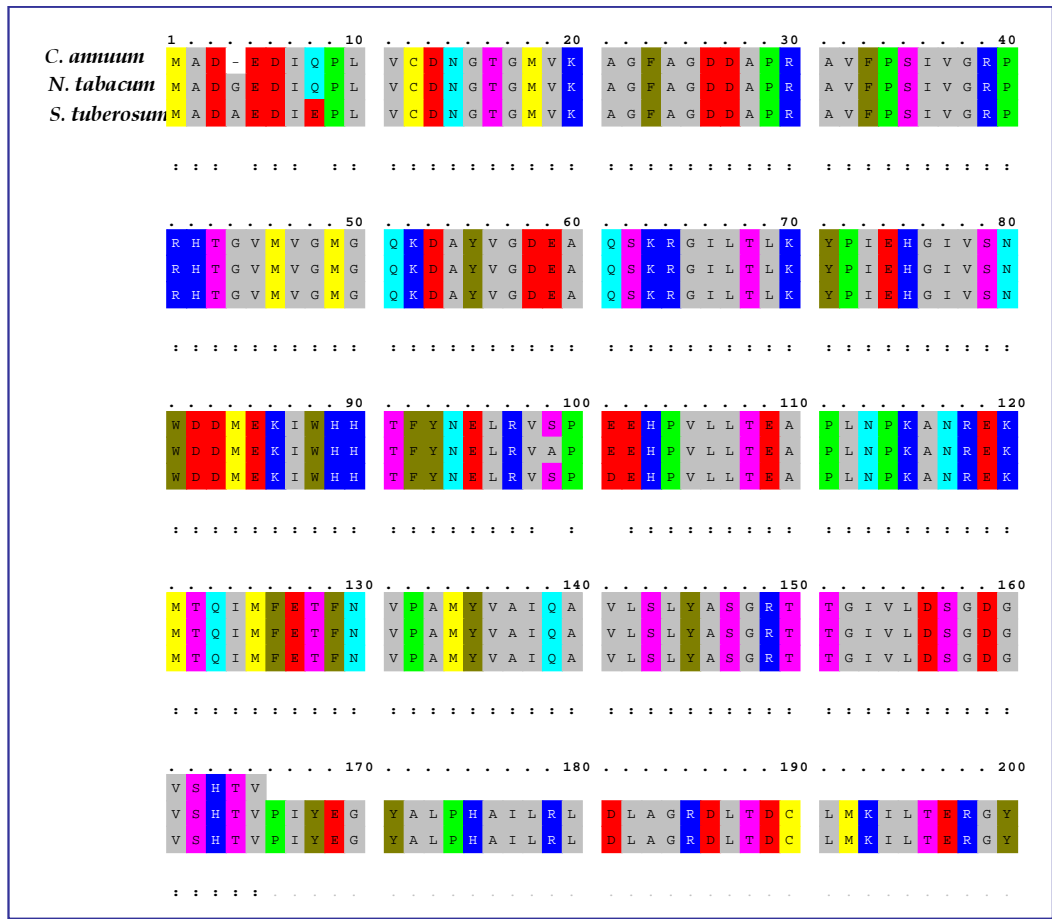


Fig. 1. Alineamiento entre la secuencia de 164 aminoácidos (573 pb) de actina de pimiento clonada con los cebadores F-ACT y R-ACT, la secuencia proteica de la actina de *Nicotiana tabacum* (BAD27408, 377 aminoácidos) y la de *Solanum tuberosum* (CAA39281, 377 aminoácidos).

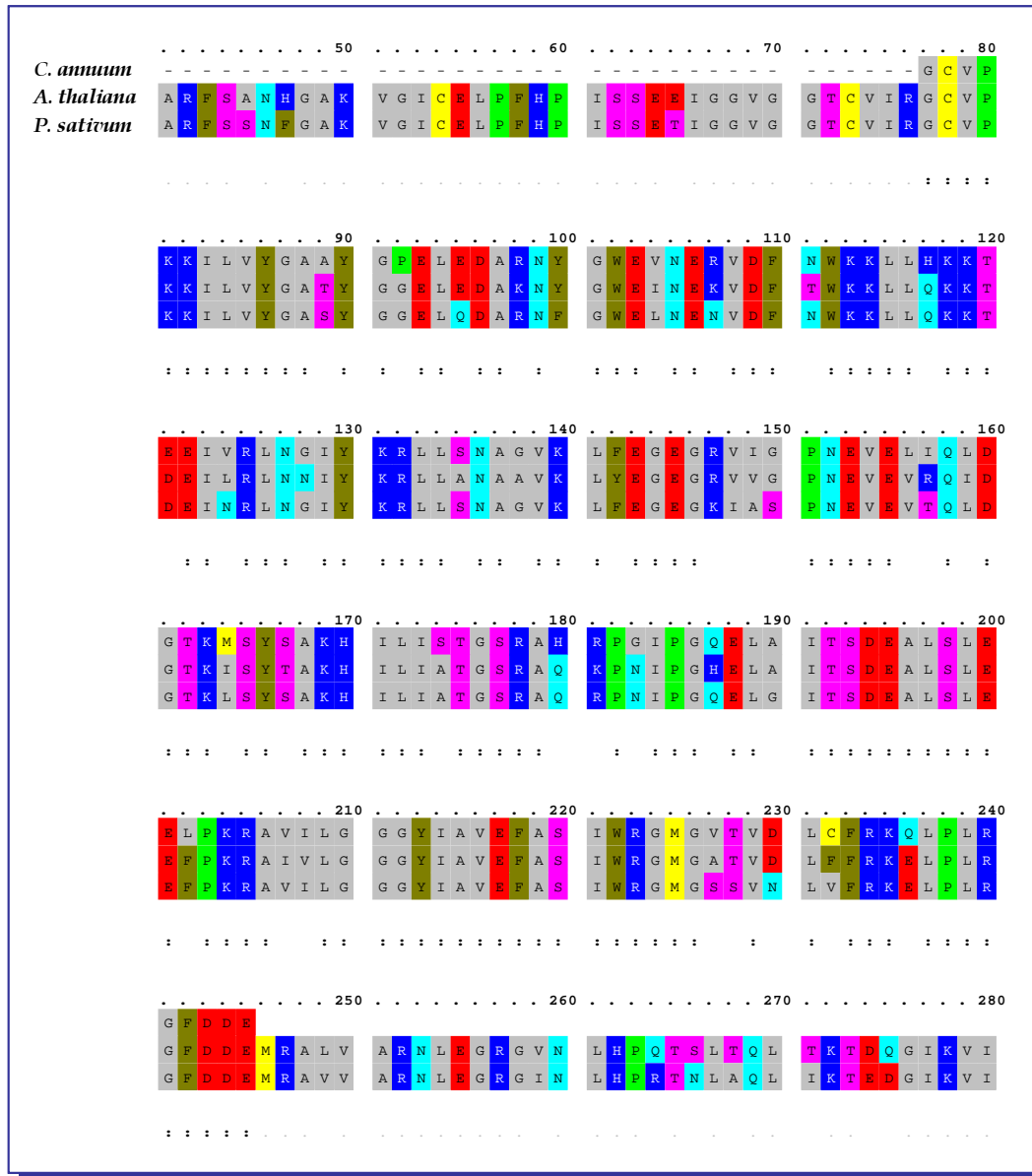


Fig. 2. Alineamiento entre la secuencia de 169 aminoácidos de glutation reductasa de pimienta clonada con los cebadores F-GR1 y R-GR1, la secuencia proteica de la GR de *Arabidopsis thaliana* (AAB67841, 499 aminoácidos) y la de *Pisum sativum* (CAA66924, 300 aminoácidos).

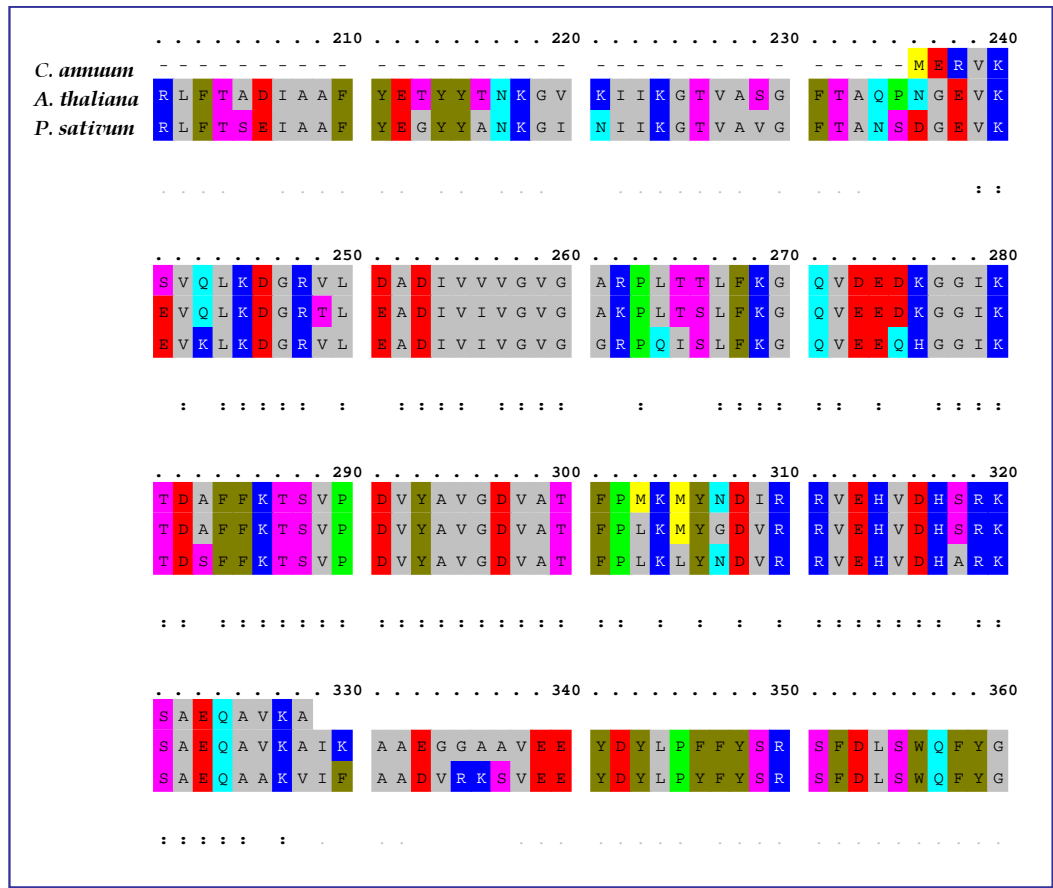


Fig. 3. Alineamiento entre la secuencia de 93 aminoácidos de MDAR de pimiento clonada con los cebadores F-MDAR1 y R-MDAR1, la secuencia proteica de la MDAR de *Arabidopsis thaliana* (CAB86892, 434 aminoácidos) y la de *Pisum sativum* (AAU11490, 433 aminoácidos).

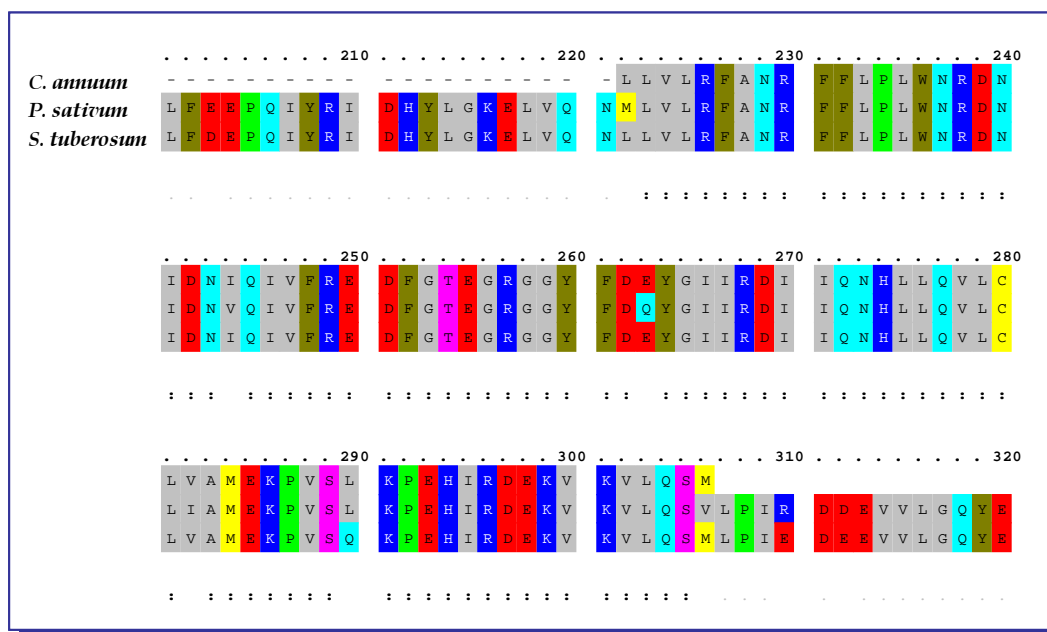


Fig. 4. Alineamiento entre la secuencia de 85 aminoácidos de G6PDH de pimiento clonada con los cebadores F-G6PDH1 y R-G6PDH1, la secuencia proteica del fragmento de la G6PDH de *Pisum sativum* (ABB01679, 264 aminoácidos) y la de la secuencia proteica de *Solanum tuberosum* (P37830, 511 aminoácidos).

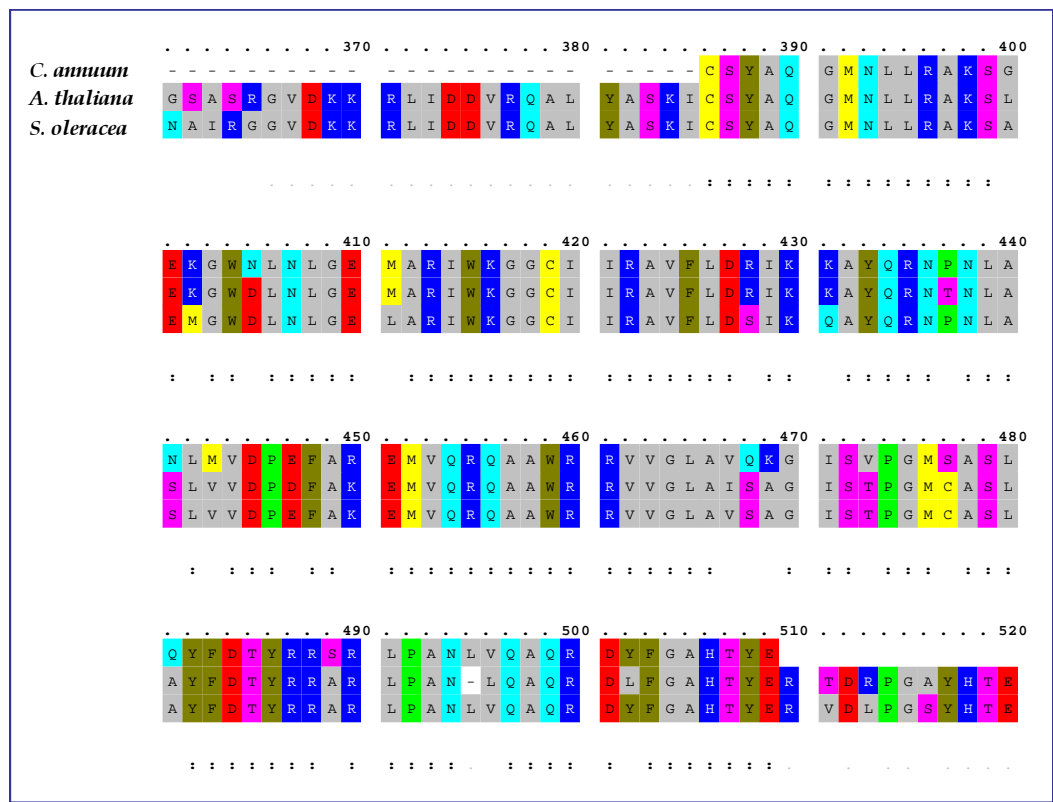


Fig. 5. Alineamiento entre la secuencia de 124 aminoácidos de 6PGDH de pimiento clonada con los cebadores F-6PGDH1 y R-6PGDH1, la secuencia proteica de la 6PGDH de *Arabidopsis thaliana* (AAM61057, 486 aminoácidos) y la de *Spinacia oleracea* (AAK49897, 537 aminoácidos).

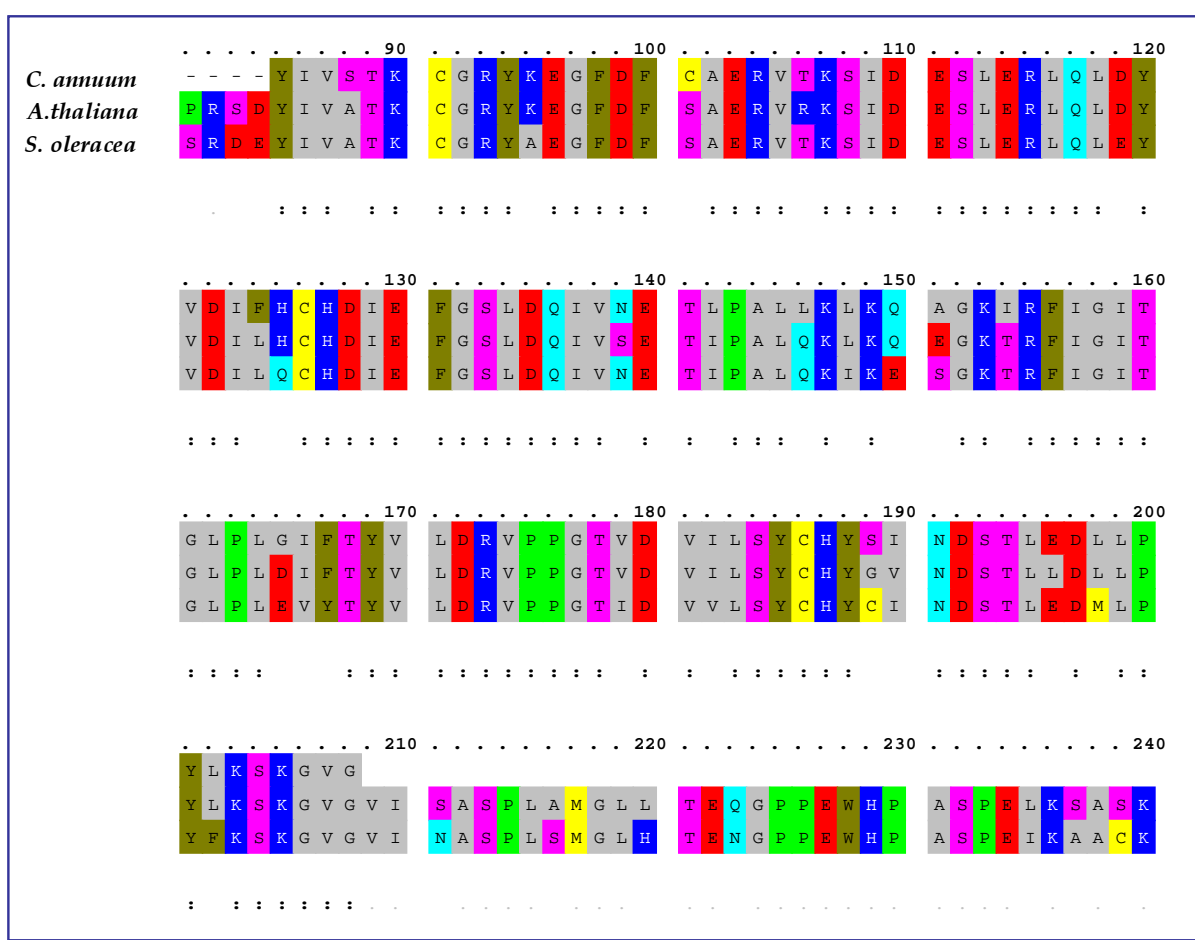


Fig. 7. Alineamiento entre la secuencia de 124 aminoácidos de GalDH de pimiento clonada con los cebadores F-GalDH1 y R-GalDH1, la secuencia proteica de la GalDH de *Arabidopsis thaliana* (AJ417563, 319 aminoácidos) y *Spinacia oleracea* (AB160990, 322 aminoácidos).

Gen	Número de ciclos	(Pb)	Número de acceso
<i>Actina</i>	28	573	AY572427
<i>Catalasa</i>	24	418	AF227952
<i>Mn-SOD</i>	28	314	AF036936
<i>Fe-SOD</i>	28	352	AY173123
<i>CuZn-SOD</i>	24	459	AF009734
<i>APX</i>	24	485	X81376
<i>MDAR</i>	26	279	AY652702
<i>GR</i>	28	509	AY547351
<i>G6PDH</i>	28	255	AY652703
<i>6PGDH</i>	36	374	AY532646
<i>NADP-ICDH</i>	28	418	AY572426
<i>GalLDH</i>	34	388	AY547352

Fig. 1. Número de ciclos utilizados en el análisis de expresión del mRNA de genes diana mediante PCR semicuantitativa. En todos se usó como patrón interno la actina (28 ciclos).

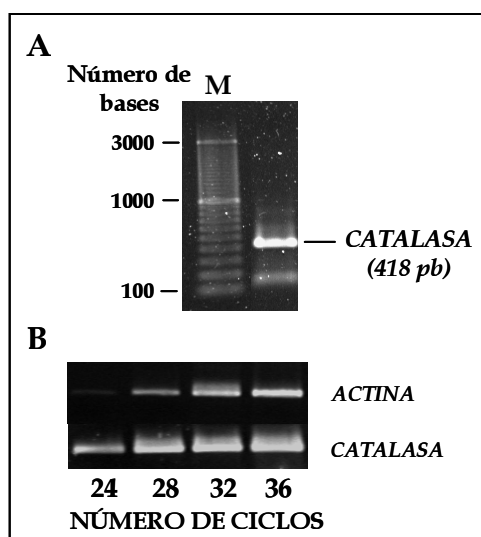


Fig. 2. Obtención del cDNA parcial de *catalasa* (A) y optimización de condiciones para PCR semicuantitativa (B). En ambos casos se emplearon geles de agarosa-TBE al 0,8%. M, marcadores de tamaño molecular.

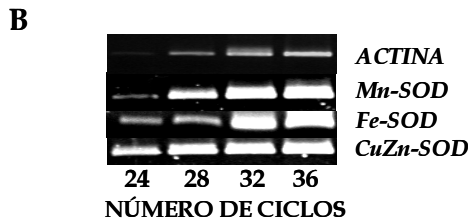
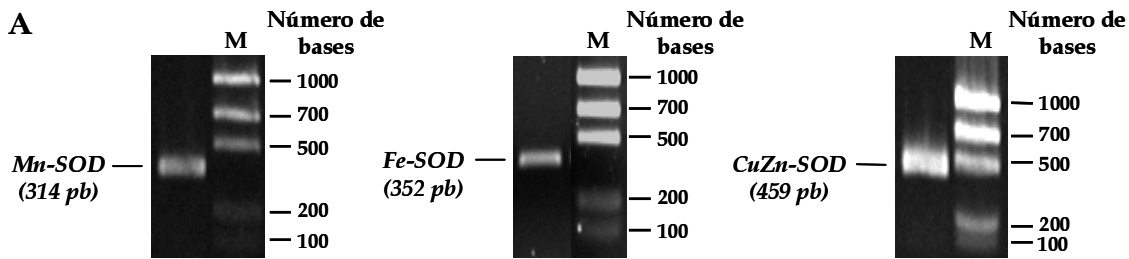


Fig. 3. Obtención de cDNA parcial de *Mn-SOD*, *Fe-SOD* y *CuZn-SOD* (A) y optimización de condiciones para PCR semicuantitativa (B). En ambos casos se emplearon geles de agarosa-TBE al 0,8%. M, marcadores de tamaño molecular.

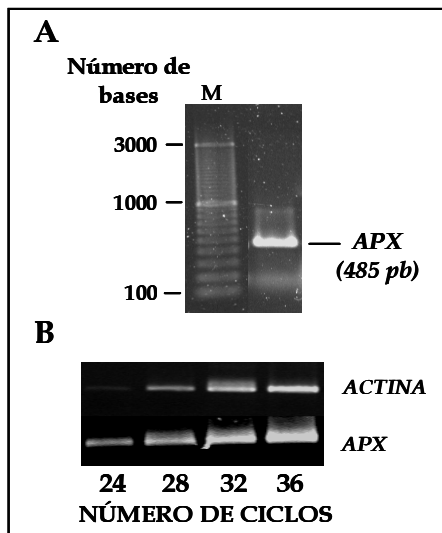


Fig. 4. Obtención del cDNA parcial de *ascorbato peroxidasa (APX)* (A) y optimización de condiciones para PCR semicuantitativa (B). En ambos casos se emplearon geles de agarosa-TBE al 0,8%. M, marcadores de tamaño molecular.

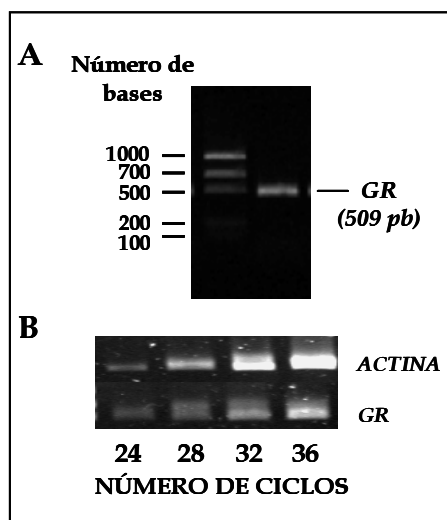


Fig. 5. Obtención del cDNA parcial de *glutathione reductasa (GR)* (A) y optimización de condiciones para PCR semicuantitativa (B). En ambos casos se emplearon geles de agarosa-TBE al 0,8%. M, marcadores de tamaño molecular.

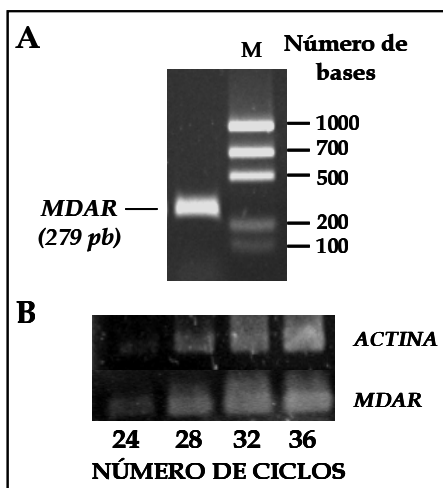


Fig. 6. Obtención del cDNA parcial de *monodeshidroascorbato reductasa (MDAR)* (A) y optimización de condiciones para PCR semicuantitativa (B). En ambos casos se emplearon geles de agarosa-TBE al 0,8%. M, marcadores de tamaño molecular.

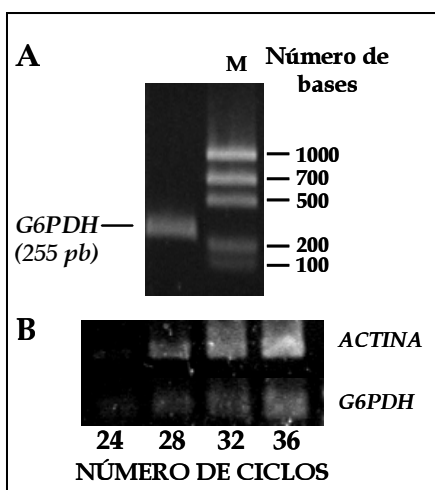


Fig. 7. Obtención del cDNA parcial de *glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)* (A) y optimización de condiciones para PCR semicuantitativa (B). En ambos casos se emplearon geles de agarosa-TBE al 0,8%. M, marcadores de tamaño molecular.

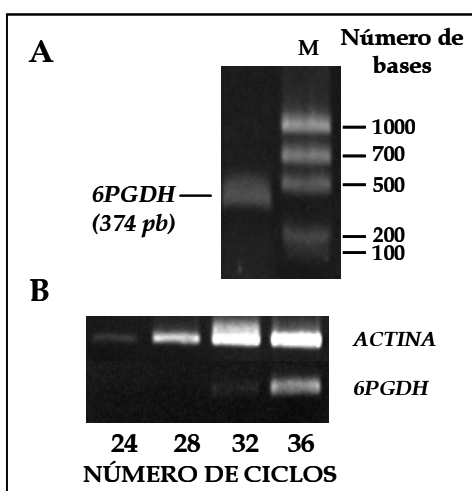


Fig. 8. Obtención del cDNA parcial de *6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH)* (A) y optimización de condiciones para PCR semicuantitativa (B). En ambos casos se emplearon geles de agarosa-TBE al 0,8%. M, marcadores de tamaño molecular.

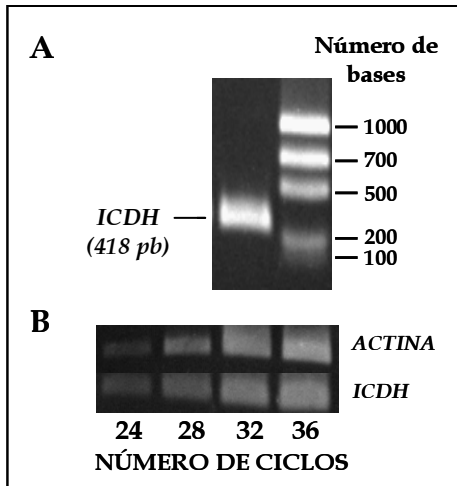


Fig. 9. Obtención del cDNA parcial de *NADP-isocitrato deshidrogenasa (ICDH)* (A) y optimización de condiciones para PCR semicuantitativa (B). En ambos casos se emplearon geles de agarosa-TBE al 0,8%. M, marcadores de tamaño molecular.

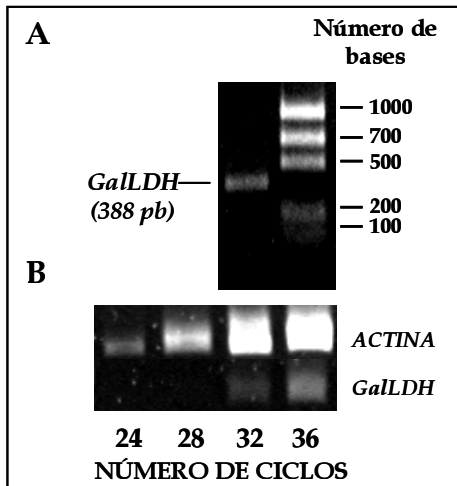


Fig. 10. Obtención del cDNA parcial de *L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa (GalLDH)* (A) y optimización de condiciones para PCR semicuantitativa (B). En ambos casos se emplearon geles de agarosa-TBE al 0,8%. M, marcadores de tamaño molecular.

Tabla	Título	Página
Tabla 1.1.	Principales especies de oxígeno reactivo (ROS).....	6
Tabla 1.2.	Sitios de producción de ROS a nivel subcelular en plantas.....	6
Tabla 1.3.	Principales sistemas antioxidantes descritos en plantas.....	14
Tabla 1.4.	Distribución subcelular de SODs en plantas superiores.....	15
Tabla 1.5.	Capacidad antioxidante total y ascorbato total en extractos de frutas y verduras.....	33
Tabla 1.6.	Clasificación de los herbicidas auxínicos.....	36
Tabla 1.7.	Empleo del 2,4-D en sistemas de experimentación <i>in vitro</i>	39
Tabla 3.1.	Contenido de las cubetas, controles y problema, para la medida de la actividad glutatión reductasa.....	51
Tabla 3.2.	Protocolo de inmunización llevado a cabo en conejos para la obtención del antisuero frente a la Fe-SOD de tabaco.....	65
Tabla 3.3.	Oligonucleótidos diseñados para la obtención de cDNA parciales en pimiento	68
Tabla 3.4.	Cebadores específicos utilizados en la PCR semicuantitativa.....	69
Tabla 3.5.	Programa utilizado en el análisis por PCR semicuantitativa de la expresión de algunas enzimas de frutos de pimiento de distintas variedades y estados de maduración.....	76
Tabla 3.6.	Cebadores utilizados en la PCR cuantitativa a tiempo real.....	77
Tabla 4.1.	Contenido de ascorbato y glutatión total en extractos crudos y peroxisomas de frutos de pimientos rojos y verdes.....	111
Tabla 4.2.	Propiedades moleculares de la L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa de frutos de pimiento basadas en la predicción a partir de la secuencia de aminoácidos.....	137

Figura	Título	Página
Fig. 1.1.	Características del pimiento.....	1
Fig. 1.2.	Temperaturas críticas para pimiento en las distintas fases de desarrollo.....	2
Fig. 1.3.	Principales productores de pimiento en el mundo durante las campañas de 1996 y 2004.....	3
Fig. 1.4.	Formación de especies de oxígeno reactivo (ROS) durante la reducción del oxígeno a H ₂ O.....	5
Fig. 1.5.	Formación de radicales \cdot OH por la reacción de Haber-Weiss.....	7
Fig. 1.6.	Ciclo asorbato-glutation.....	18
Fig. 1.7.	Comparación de la síntesis de ácido ascórbico y eritroascórbico en varios organismos.....	28
Fig. 1.8.	Rutas propuestas para la biosíntesis de ácido ascórbico en animales y plantas.....	29
Fig. 1.9.	Función del asorbato en la fotosíntesis.....	30
Fig. 1.10.	Reacciones de oxidación-reducción del ácido ascórbico en el citoplasma y apoplasto	31
Fig. 1.11.	Modelo descrito por Conklin y Barth (2004), donde se ilustra que bajas concentraciones de asorbato (AA), presencia de ozono y patógenos puede activar rutas similares a las de defensa en plantas.....	31
Fig. 1.12.	Frutas y verduras, productos con alto contenido en antioxidantes.....	33
Fig. 1.13.	Modelo propuesto por Grossmann et al. (2001) para explicar el modo de acción de los herbicidas auxínicos en la inducción del daño tisular y la senescencia en <i>Gallium aparine</i>	41
Fig. 1.14.	Modelo propuesto por Romero-Puertas et al. (2004) para la acción del 2,4-D sobre el metabolismo oxidativo de hojas de guisante.....	42
Fig. 3.1.	Corte de los frutos en los distintos ensayos.....	47
Fig. 3.2.	Reacciones enzimáticas implicadas en la medida de la actividad tiolasa.....	55
Fig. 3.3.	Reacciones enzimáticas implicadas en la medida de la actividad fructosa 1,6-bifosfatasa (FBPasa).....	57
Fig. 3.4.	Reacciones enzimáticas implicadas en la medida de grupos carbonilos de proteínas..	59
Fig. 3.5.	Reacciones enzimáticas implicadas en la medida de glutacion.....	61
Fig. 3.6.	Cebadores diseñados para la secuenciación del cDNA de GalLDH a partir del alineamiento entre las secuencias de cDNA de <i>Lycopersicum esculentum</i> y <i>Arabidospis thaliana</i>	70
Fig. 3.7.	Aislamiento de DNA plasmídico a partir de cultivos bacterianos (“Wizard Plus SV Miniprep” de Promega).....	72
Fig. 3.8.	RT-PCR para la obtención de copias de cDNA del extremo 5’ de la GalLDH a partir del Kit “BD SMART™ RACE cDNA Amplification” de BD Biosciences.....	74
Fig. 3.9.	Cálculo de la eficiencia de la amplificación (E) para la curva de PCR.....	78

Figura	Título	Página
Fig. 4.1.	Efecto del 2,4-D en dos variedades de pimiento cultivadas en invernadero.....	81
Fig. 4.2.	Contenido proteico en hojas de dos variedades de pimiento tratadas con 2,4-D.....	82
Fig. 4.3.	Efecto del 2,4-D sobre la actividad glicolato oxidasa (GOX) e hidroxipiruvato reductasa (HPR) de hojas de dos variedades de pimiento.....	83
Fig. 4.4.	Efecto del tratamiento con 2,4-D sobre la actividad catalasa (CAT), guayacol peroxidasa (GPX) y xantina oxidasa (XOD) de hojas de dos variedades de pimiento	85
Fig. 4.5.	Superóxido dismutasa (SOD) de hojas de dos variedades de pimiento tratadas con 2,4-D durante 1,7 y 14 días.....	86
Fig. 4.6.	Efecto del 2,4-D sobre la actividad glutatión reductasa (GR) y glutatión S-transferasa (GST) de hojas de dos variedades de pimiento.....	87
Fig. 4.7.	Efecto del 2,4-D en la actividad NADP-deshidrogenasas de hojas de dos variedades de pimiento.....	90
Fig. 4.8.	Peroxidación lipídica y oxidación de proteínas de hojas de dos variedades de pimiento tratadas con 2,4-D.....	91
Fig. 4.9.	Estudio de la actividad endopeptidasa en solución en hojas de dos variedades de pimiento tratadas con 2,4-D.....	92
Fig. 4.10.	Variedades de pimiento empleadas para el estudio del efecto de la maduración en las enzimas antioxidantes de fruto.....	93
Fig. 4.11.	Actividad catalasa en frutos de cuatro variedades de pimiento.....	95
Fig. 4.12.	Actividad superóxido dismutasa en frutos de cuatro variedades de pimiento.....	95
Fig. 4.13.	Actividad ascorbato peroxidasa en frutos de cuatro variedades de pimiento.....	97
Fig. 4.14.	Actividad glutatión reductasa en frutos de cuatro variedades de pimiento.....	97
Fig. 4.15.	Actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en frutos de cuatro variedades de pimiento.....	99
Fig. 4.16.	Actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa en frutos de cuatro variedades de pimiento.....	99
Fig. 4.17.	Actividad NADP-isocitrato deshidrogenasa en frutos de cuatro variedades de Pimiento.....	101
Fig. 4.18.	Actividad de la enzima málico en frutos de cuatro variedades de pimiento.....	101
Fig. 4.19.	NADPH total en frutos de cuatro variedades de pimiento.....	102
Fig. 4.20.	Actividad galactono- γ -lactona deshidrogenasa en frutos de cuatro variedades de Pimiento.....	103
Fig. 4.21.	Microscopía electrónica de frutos de pimiento verde y rojo.....	104
Fig. 4.22.	Método de aislamiento y purificación de peroxisomas de frutos de pimiento mediante centrifugaciones diferenciales y en gradientes de densidad de sacarosa..	105

Figura	Título	Página
Fig. 4.23.	Purificación de peroxisomas de frutos de pimiento verde y rojo en gradientes de densidad de sacarosa.....	106
Fig. 4.24.	Concentración de proteínas y densidad en los gradientes de densidad de sacarosa..	106
Fig. 4.25.	Microscopía electrónica de peroxisomas de frutos de pimiento purificados en los gradientes de densidad de sacarosa.....	107
Fig. 4.26.	Enzimas de la fotorrespiración en peroxisomas de frutos verdes y rojos de pimiento.....	109
Fig. 4.27.	Enzimas de la β -oxidación de ácidos grasos en peroxisomas de frutos verdes y rojos.....	109
Fig. 4.28.	Enzimas del ciclo del glioxilato en peroxisomas de frutos verdes y rojos de pimiento.....	109
Fig. 4.29.	Enzimas del metabolismo de ROS en peroxisomas de frutos verdes y rojos de pimiento.....	109
Fig. 4.30.	Superóxido dismutasa en peroxisomas de frutos verdes y rojos de pimiento.....	111
Fig. 4.31.	NADP- deshidrogenasas en peroxisomas de frutos de pimiento verdes y rojos.....	111
Fig. 4.32.	Datos meteorológicos, correspondientes al periodo de octubre de 2002 a febrero de 2003.....	112
Fig. 4.33.	Varietades de pimiento empleadas para el estudio de la influencia de las variaciones ambientales en los antioxidantes de fruto.....	113
Fig. 4.34.	Expresión del mRNA del gen de la <i>actina</i> de frutos de cuatro variedades de pimiento analizados por PCR.....	114
Fig. 4.35.	Actividad catalasa en frutos de distintas variedades de pimiento.....	114
Fig. 4.36.	Expresión diferencial de <i>catalasa</i> de frutos de las variedades Galileo, Biela, Dulce Italiano y Vergasa sometidos a cambios ambientales.....	116
Fig. 4.37.	Actividad superóxido dismutasa (SOD) en frutos de distintas variedades de pimiento.....	116
Fig. 4.38.	Actividad isoenzimática superóxido dismutasa (SOD) en frutos de pimiento de distintas variedades sometidas a variaciones ambientales.....	117
Fig. 4.39.	Expresión diferencial de <i>Mn-SOD</i> de frutos de las variedades Galileo, Biela, Dulce Italiano y Vergasa sometidos a cambios ambientales.....	118
Fig. 4.40.	Expresión diferencial de <i>Fe-SOD</i> de frutos de las variedades Galileo, Biela, Dulce Italiano y Vergasa sometidos a cambios ambientales.....	119
Fig. 4.41.	Expresión diferencial de <i>CuZn-SOD</i> de frutos de las variedades Galileo, Biela, Dulce Italiano y Vergasa sometidos a cambios ambientales.....	119
Fig. 4.42.	Actividad ascorbato peroxidasa (APX) en frutos de distintas variedades de pimiento	120

Figura	Título	Página
Fig. 4.43.	Expresión diferencial de <i>ascorbato peroxidasa (APX)</i> de frutos de las variedades Galileo, Biela, Dulce Italiano y Vergasa sometidos a cambios ambientales.....	121
Fig. 4.44.	Actividad glutatión reductasa (GR) en frutos de distintas variedades de pimiento..	121
Fig. 4.45.	Expresión diferencial de <i>glutatión reductasa (GR)</i> de frutos de las variedades Galileo, Biela, Dulce Italiano y Vergasa sometidos a cambios ambientales.....	123
Fig. 4.46.	Expresión diferencial de <i>monodeshidroascorbato reductasa (MDAR)</i> de frutos de las variedades Galileo, Biela, Dulce Italiano y Vergasa sometidos a cambios ambientales.....	124
Fig. 4.47.	Actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en frutos de distintas variedades de pimiento.....	125
Fig. 4.48.	Expresión diferencial de <i>glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)</i> de frutos de las variedades Galileo, Biela, Dulce Italiano y Vergasa sometidos a cambios ambientales.....	126
Fig. 4.49.	Actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) en frutos de distintas variedades de pimiento.....	127
Fig. 4.50.	Expresión diferencial de <i>6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH)</i> de frutos de las variedades Galileo, Biela, Dulce Italiano y Vergasa sometidos a cambios ambientales.....	128
Fig. 4.51.	Actividad NADP-isocitrato deshidrogenasa (NADP-ICDH) en frutos de distintas Variedades de pimiento.....	129
Fig. 4.52.	Expresión diferencial de <i>NADP-isocitrato deshidrogenasa (NADP-ICDH)</i> de frutos de las variedades Galileo, Biela, Dulce Italiano y Vergasa sometidos a cambios ambientales.....	130
Fig. 4.53.	Actividad de la enzima málico en frutos de distintas variedades de pimiento.....	130
Fig. 4.54.	NADPH total en frutos de cuatro variedades de pimiento.....	131
Fig. 4.55.	Actividad L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa (GalLDH) en frutos de distintas variedades de pimiento.....	131
Fig. 4.56.	Expresión diferencial de <i>ascorbato peroxidasa (APX)</i> de frutos de las variedades Galileo, Biela, Dulce Italiano y Vergasa sometidos a cambios ambientales.....	132
Fig. 4.57.	Actividad L-galactosa deshidrogenasa (GalDH) en distintos órganos de plantas de pimiento de la variedad Vergasa.....	133
Fig. 4.58.	Actividad L-galactosa deshidrogenasa (GalDH) en distintos órganos de plantas de pimiento de la variedad Biela.....	133
Fig. 4.59.	Actividad L-galactono- γ -lactono deshidrogenasa (GalLDH) en distintos órganos de plantas de pimiento de la variedad Vergasa.....	134

Figura	Título	Página
Fig. 4.60.	Actividad L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa (GalLDH) en distintos órganos de plantas de pimiento de la variedad Biela.....	134
Fig. 4.61.	Expresión del mRNA de la galactono- γ -lactona deshidrogenasa en distintos órganos de plantas de pimiento de la variedad Vergasa.....	135
Fig. 4.62.	Expresión del mRNA de la galactono- γ -lactona deshidrogenasa en distintos órganos de plantas de pimiento de la variedad Biela.....	135
Fig. 4.63.	Estudios de la actividad nucleósido difosfato quinasa (NDPK), en frutos de pimiento verde, rojo y amarillo.....	135
Fig. 4.64.	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la GalLDH de pimiento y la de la <i>Nicotiana tabacum</i> y <i>Lycopersicum esculentum</i>	137
Fig. 4.65.	Dominios de unión de la L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa de fruto de pimiento	138
Fig. 4.66.	Dominios transmembrana de la L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa de fruto de pimiento.....	138
Fig. 5.1.	Modelo propuesto para la acción del 2,4-D (22,6 mM) sobre las plantas de pimiento de dos variedades, Abdera y Herminio.....	144
Fig. 5.2.	Modelo que representa la posible implicación de las especies de oxígeno reactivo (ROS), los niveles de NADPH, el glutatión reducido (GSH) y el ascorbato (ASC) en los procesos de señalización que tienen lugar durante la maduración del fruto de pimiento.....	151
Fig. 5.3.	Metabolismo de ROS en peroxisomas de frutos de pimiento.....	155
Fig. 5.4.	Análisis de componentes principales (PCA) en frutos de diferentes variedades de pimiento sometidas a las variaciones ambientales establecidas (E03 y F03).....	157
Fig. 5.5.	Modo de interacción hipotético entre la L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa (GalLDH) y la cadena de transporte electrónico mitocondrial en frutos de pimiento....	163

ABA: ácido abscísico
ABP: "Auxin Binding Protein" o proteína unidora de auxinas
ACC: ácido 1-aminociclopropano carboxílico
AIA: ácido indolacético
AS: ácido salicílico
ASB: albúmina de suero bovina
ASC: ascorbato / ácido ascórbico
BCIP: fosfato de 5-bromo-4-cloro-3 indolilo
CAPS: ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propano sulfónico
cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario
CDNB: cloro-2,4-dinitrobenceno
CFA: adyuvante completo de Freud
CLOFIBRATO: ácido 2-(p-clorofenoxi)-2-metilpropiónico
CLOPYRALID: ácido 3,6-dicloro-2-piridín-carboxílico
CORAMBEN: ácido 2,5-dicloro-3-amino-benzoico
2-CPA: ácido 2-clorofenoxiacético
4-CPA: ácido 4-clorofenoxiacético
4-CPBA: ácido 2-(4-clorofenoxi) butírico
4-CPPA: ácido 2-(4-clorofenoxi) propiónico
2,4-D: ácido diclorofenoxiacético
DAB: 3-3'-diaminobencidina
DAS: "Dense Aligment Surface" o método de alineamiento de superficies densas
2,4-DB: ácido α (2,4-diclorofenoxi) butírico
2,4-DEB: 2-(2,4-diclorofenoxi) acetilbenzoato
2,4-DEP: tris[2-(2,4-diclorofenoxiacetil)] fosfito
DEPC: dietilpirocarbonato
DHA: deshidroascorbato
DICAMBA: ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzoico
DICLORPROP (2,4-DP): ácido 2-(2,4-diclorofenoxi)propiónico
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucleico
DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina
dNTP: desoxinucleótidos
DTT: 1,4-ditiotreitol
EDTA-Na₂: sal sódica de ácido etilendiaminotetraacético
ESM: error estandar de la media
EGPA: electroforesis en gel de poliacrilamida
ERBON: ácido 2-(2,4,5-triclorofenoxi) etil 2,2-dicloropropiónico
FAD: flavín adenín dinucleótido

FENOPROP (2,4,5-TP): ácido 2-(2,4,5-triclorofenoxi) propiónico
FMN: flavín mononucleótido
GAE: equivalentes de ácido gálico
GSH: glutathion reducido (γ -glutamyl-cisteinil glicina)
GSSG: glutathion oxidado
GTP: guanosina trifosfato
GMP: guanosina monofosfato
Hepes: ácido N-2-hidroxiethylpiperacina-N'-2-etanosulfónico
HPLC: cromatografía líquida de alta presión
IEF: isoelectroenfoque
IFA: adyuvante incompleto de Freud
IgG: inmunoglobulina G
IPTG: 1-isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
JA: ácido jasmónico
KLH: "Keyhole limpet hemacyanin" (proteína transportadora)
LB: medio de Luria-Bertani
MAPK: quinasa de la proteína activada por mitógeno
MBS: éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisiccinimida
MCPA: ácido (4-cloro-2 metilfenoxi) acético
MCPB: ácido 4-(4-cloro-2 metilfenoxi butírico)
MCPES: 2-(4-cloro-2-metil-fenoxi) acetilsulfato sódico
MDA: monodeshidroascorbato / malondialdehido
MECOPROP (MCP): ácido (2-(2-metil-4-clorofenoxi) propiónico
MP: membrana plasmática
mRNA: ácido ribonucleico mensajero
NAA: 1-naftilacético
NAD(P)/NAD(P)H: 2-fosfonucleótido de nicotinamida y adenina oxidado/reducido
NAT: transportador de ascorbato dependiente de Na⁺
NBT: azul de nitrotetrazolio
NEM: N-etilmaleimida
NO: óxido nítrico
ORF: "Open Reading Fragment" o Fragmento de lectura abierta
PAL: fenilalanina amonioliasa
PARAQUAT: dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo
PBS: tampón fosfato salino (fosfato-k 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM)
PCA: análisis de componentes principales
PCD: muerte celular programada
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PICLORAM: ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridín-carboxílico

PQ: plastoquinona
 Pipes: ácido piperazina-N,N'-bis-2-etanosulfónico
 PMP: polipéptido de membrana peroxisomal
 PMSF: fluoro de fenil metil sulfonilo
 PSI / II: fotosistema I / II
 PTS: secuencia señal de entrada al peroxisoma
 PVDF: difluoruro de polivinilo
 QUINCLORAC: ácido 3,7-dicloro-8-quinolín-carboxílico
 QUINMERAC: ácido 7-cloro-3-metil-8-quinolín-carboxílico
 RH: respuesta hipersensible
 RNA: ácido ribonucleico
 RNS: especies de nitrógeno reactivo
 ROS: especies de oxígeno reactivo
 RUBISCO: ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa
 SAGs: genes relacionados con los mecanismos de defensa y la senescencia
 SAR: respuesta sistémica adquirida
 SDS: lauril sulfato sódico
 SESONE: 2-(2,4-diclorofenoxi) acetil sulfato sódico
 S-GAL: 3,4-ciclohexenoesculetina- β -D-galactopiranósido
 2,4,5-T: ácido 2,4,5-tricloro-fenoxiacético
 2,4,5-TB: ácido 4-(2,4,5-triclorofenoxi) butírico
 TBE: tampón tris de baja concentración salina
 TBS: tampón tris salino (Tris-HCl 20 mM, pH 7,8, NaCl 0,18 M)
 TBST: tampón tris salino con Tween-20 0,05% (v/v)
 TBSTA: TBST con ASB 2% (p/v)
 TCA: ácido tricloroacético
 TCB: ácido triclorobenzoico
 TEMED: N, N, N', N'-tetrametil-etilendiamina
 2,4,5-TEs: 2-(2,4,5-triclorofenoxi) acetil sulfato sódico
 TMHMM: "Transmembrane Helices based on the Hidden Markov Model" o Hélices
 Transmembrana basado en el Modelo Oculto de Markov
 Tris: tris-hidroximetilaminometano
 UV-B: luz ultravioleta B
 VDE: violaxantina depoxigenasa

