

~~T. Proo. 23/68~~

T 10/56

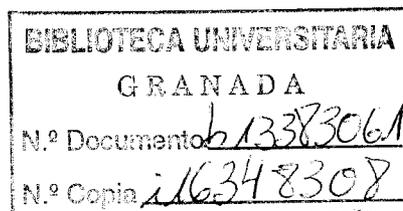
UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS DOCTORAL



**EVOLUCIÓN DEL SISTEMA MODULADOR DE LA FRUCTOSA-1,6-
BISFOSFATASA Y DE LA NADP-MALATO DESHIDROGENASA
DURANTE LA ONTOGENIA DE PLANTAS DE GUISANTE, Y EN
CONDICIONES DE ESTRÉS LUMÍNICO Y TÉRMICO**



EDUARDO ANTONIO PAGANO

1999

EVOLUCIÓN DEL SISTEMA MODULADOR DE LA FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA Y DE LA NADP-MALATO DESHIDROGENASA DURANTE LA ONTOGENIA DE PLANTAS DE GUISANTE, Y EN CONDICIONES DE ESTRÉS LUMÍNICO Y TÉRMICO

Memoria que presenta el Ingeniero Agrónomo Eduardo Antonio Pagano para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.



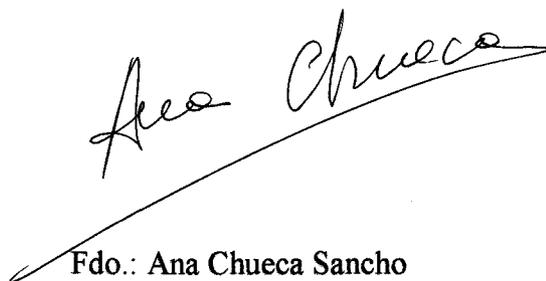
Fdo.: Eduardo Antonio Pagano

V° B°

LOS DIRECTORES DEL TRABAJO



Fdo.: Julio López Gorgé
Doctor en Farmacia
Profesor de Investigación
del C.S.I.C.



Fdo.: Ana Chueca Sancho
Doctora en Farmacia
Profesora de Investigación
del C.S.I.C.

El trabajo que se presenta en esta Memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de Plantas de la Estación Experimental del Zaidín, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en Granada.

Para su elaboración se ha contado con una Beca DEL "Programa Mutis" de la Agencia Española de Cooperación Internacional.

Algunos de los resultados de esta tesis han sido presentados a los siguientes congresos:

- XTth International Congress on Photosynthesis, Budapest, Hungría, 17 al 22 de Agosto de 1998.
- XXII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Mar del Plata, Argentina, 23 al 25 de Setiembre de 1998.

Quisiera agradecer profundamente a los Dres. Ana Chueca Sancho y Julio López Gorgé, directores de esta tesis, por todo lo que me han brindado durante la ejecución de este trabajo, apoyo, orientación, estímulo y muchas otras cosas que van más allá del plano estrictamente científico.

Además, quisiera agradecer especialmente a:

La Dra. María Dolores Suárez Ortega, mi tutora en el programa de Doctorado, por manifestarse siempre dispuesta a ayudarme y orientarme a fin de poder llegar a buen término en mis estudios.

A los Dres Rosario Hermoso, Matilde Barón y Juan José Lázaro, por sus constantes manifestaciones de apoyo y por estar siempre dispuestos a escucharme y a resolver mis dudas.

A la Dra. María Isabel Rodríguez por los trabajos de microscopía electrónica.

A mis compañeros de laboratorio Ester Ocón, Mariam Sahrawy, Carlos Gutiérrez, Jaber Rahoutei, Juristo Fonollá, Owen Wangensteen y Roland Cazalis, mis grandes amigos.

A Francisca Castro y Narciso Algaba por su auxilio en tareas de laboratorio.

A la Profesora Adela Fraschina por siempre apoyarme en mis propósitos y darme todos los medios para poder efectuar mi trabajo en España, al igual que a los decanos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, Guillermo Murphy y Fernando Vilella.

Al Dr Ricardo Wolosiuk por alentarme a realizar este trabajo.

A mis compañeros de la Catedra de Bioquímica de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, por hacer frente a todo el trabajo adicional ocasionado por mi ausencia.

A mis amigos argentinos, que mantuvieron viva la llama de mis afectos, y en especial a Adriana Kantolic, Marisa Wawrczkiewicz, Alfredo Curá y Gustavo Trincherro.

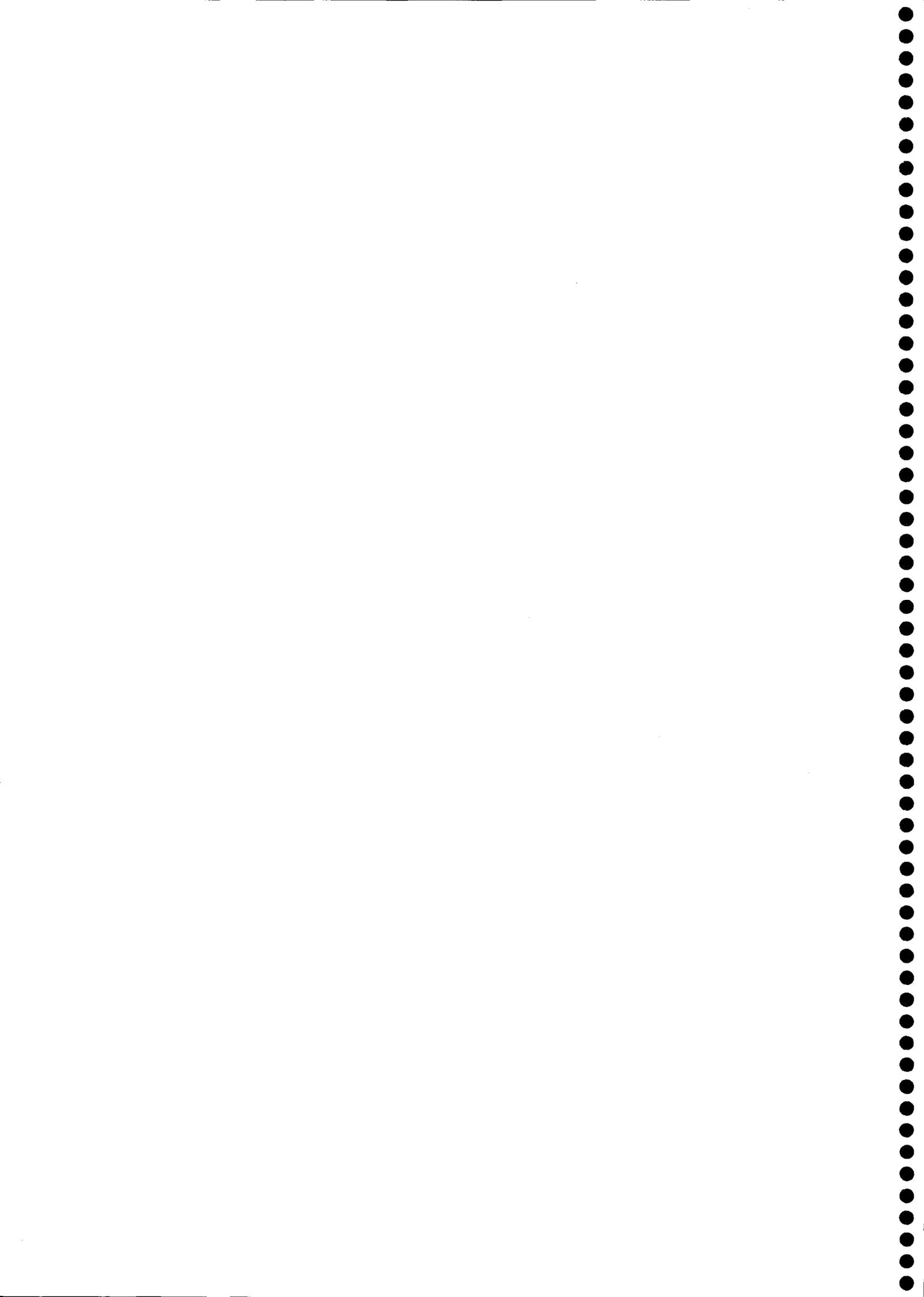
A mis nuevos amigos residentes en Granada, que hicieron mi estancia aquí de lo más placentera, además, por facilitar la adaptación de mi familia.

A mis padres, suegros, cuñados y sobrinos, por estar siempre a nuestro lado.

Por último, y mucho más que especialmente, quisiera agradecer a mi esposa y a mis hijas por cosas que no se podrían expresar con palabras.

A la memoria de mi tía Silvia

A mi familia



1.Introducción	1
1.1-Fotosíntesis	3
1.1.1-Generalidades	3
1.1.2-Regulación	9
1.1.3-Fructosa-1,6-bisfosfatasa	11
1.1.4-NADP-malato deshidrogenasa	17
1.1.5-Tiorredoxinas	20
1.2-Respuesta de las plantas a condiciones de estrés	23
1.2.1-Estrés lumínico y fotoinhibición	26
1.2.2-Estrés lumínico asociado a estrés térmico	27
2.Objetivos	29
3.Materiales y métodos	37
3.1-Material botánico	37
3.2-Condiciones de crecimiento	37
3.2.1-Germinación	37
3.2.2-Crecimiento en hidroponía	37
3.2.3-Tratamientos de estrés	39
3.3-Fotosíntesis neta	39
3.3.1-Fundamento y descripción del equipo	39
3.3.2-Medida de fotosíntesis neta	41
3.4-Medidas de fluorescencia	41
3.4.1-Descripción del fluorímetro de fluorescencia modulada	44
3.4.2-Determinación de los valores de F_0 y F_M	45
3.5-Toma de muestras y preparación de extractos foliares	45
3.6-Determinación del contenido en clorofila	45
3.7-Determinación del contenido de proteínas	46
3.8-Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	46
3.9-Expresión heteróloga de FBPasa y de Trx <i>m</i> de guisante en <i>E. coli</i> , y posterior purificación de la proteína obtenida	47
3.9.1-Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	48
3.9.2-Transformación de células competentes	48
3.9.3-Expresión de plásmidos recombinantes	49

3.9.4-Purificación de FBPasa cloroplastídica	50
3.9.5-Purificación de Tiorredoxina <i>m</i>	51
3.10-Actividades enzimáticas	51
3.10.1-Actividad FBPasa no dependiente de tiorredoxina endógena	51
3.10.2-Actividad FBPasa dependiente de tiorredoxina endógena	52
3.10.3-Actividad FBPasa dependiente de tiorredoxina exógena	53
3.10.4-Actividad NADP ⁺ -MDH dependiente de tiorredoxina endógena	53
3.10.5-Actividad NADP ⁺ -MDH dependiente de tiorredoxina exógena	54
3.11-Generación de anticuerpos policlonales	54
3.12-ELISA	55
3.13-Western-blot	56
3.14-Síntesis “in vivo” y determinación de la vida media de proteínas	57
3.15-Aislamiento de DNA	58
3.15.1-Extracción de DNA genómico de tejidos vegetales	58
3.15.2-Aislamiento de DNA plasmídico	60
3.15.3-Extracción de DNA de geles de agarosa	61
3.16-Extracción de RNA total	61
3.17-Extracción de RNA mensajero	62
3.18-RT-PCR	64
3.18.1-Diseño de oligonucleótidos	65
3.18.2-Mezcla de reacción	65
3.18.3-Programa	66
3.19-Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa	67
3.20-Transferencia de ácidos nucleicos a membrana de nylon	67
3.21-Revelado de la digoxigenina incorporada durante la reacción de RT-PCR	67
3.22-Densitometría y cuantificación de las bandas resultantes	68
3.23-Análisis estadísticos	68
4.Resultados	69
4.1-Evolución del sistema modulador de la FBPasa y de la NADP-MDH	
Durante la ontogenia de plantas de guisante crecidas en condiciones normales de luz y temperatura	71
4.1.1-Parámetros de crecimiento	71

4.1.2-Clorofila	73
4.1.3-Fotosíntesis neta	75
4.1.4-Proteínas totales	75
4.1.5-Actividad FBPasa no dependiente de tiorredoxina (a pH 8.8)	75
4.1.6-Actividad FBPasa dependiente de tiorredoxina endógena (a pH 7.9)	75
4.1.7-Actividad NADP-MDH dependiente de tiorredoxina endógena	78
4.1.8-Actividades FBPasa y NADP-MDH dependientes de tiorredoxina exógena	78
4.1.9-Niveles proteicos de FBPasa, NADP-MDH, Trx <i>f</i> y Trx <i>m</i>	78
4.1.10-Expresión transcripcional	82
4.1.10.1-Estudios preliminares	82
4.1.10.2-Optimización del RT-PCR	89
4.1.10.3-Niveles de transcritos de FBPasa, NADP-MDH, Trx <i>f</i> y Trx <i>m</i> durante la ontogenia	94
4.1.11-Expresión transcripcional en hojas etioladas e iluminadas	99
4.1.12-Amplificación de secuencias parciales de FBPasa	99
4.1.13-Amplificación de secuencias genómicas	99
4.2-Expresión de FBPasa, NADP-MDH y tiorredoxinas <i>f</i> y <i>m</i> en diferentes órganos de la planta de guisante	102
4.2.1-Comparación entre folíolos sésiles y peciolados	102
4.2.2-Expresión transcripcional	106
4.2.3-Niveles proteicos	111
4.2.4-Actividades enzimáticas	116
4.3-Evolución del sistema modulador de la FBPasa y de la NADP-MDH en condiciones de estrés lumínico	122
4.3.1-Tratamientos de 96 h bajo luz continua, y en condiciones de luz saturante	122

4.3.2-Tratamientos de 30 días bajo luz continua ó saturante	127
4.3.2.1-Niveles proteicos	133
4.3.2.2-Niveles de transcritos	135
4.3.2.3-Determinación de la vida media de proteínas	144
4.4-Evolución del sistema modulador de la FBPasa y de la NADP-MDH en condiciones de estrés lumínico asociado a estrés térmico	146
4.4.1-Estrés lumínico asociado a altas o bajas temperaturas en tratamientos de 10 días	146
4.4.1.1-Expresión transcripcional	146
4.4.1.2-Niveles proteicos	152
4.4.1.3-Clorofila y proteínas solubles totales	152
4.4.1.4-Actividades enzimáticas	152
4.4.1.5-Análisis microscópico	161
4.4.2-Tratamientos de alta irradiancia asociada a bajas temperaturas aplicados en forma continua durante 48 horas	161
4.4.2.1-Proteínas totales y actividades enzimáticas	163
4.4.2.2-Expresión a niveles traduccional y transcripcional	163
5.Discusión	175
5.1-Evolución del sistema modulador de FBPasa y de NADP-MDH durante la ontogenia, y en diferentes órganos de plantas de guisante bajo condiciones normales de crecimiento	177
5.2-Niveles de expresión de tiorredoxinas <i>f</i> y <i>m</i> , y de sus proteínas diana FBPasa y NADP-MDH, en condiciones de estrés lumínico y de estrés lumínico asociado a estrés térmico	185
6.Conclusiones	199
7.Bibliografía	203

ATP: Adenosín trifosfato
b, kb: Base, kilobase
cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario
CTAB: Bromuro de cetiltrimetil amonio
Da, kDa: Dalton, kilodalton
DEAE: Dietil amino etil
DNA: Ácido desoxirribonucleico
dNTP: Desoxirribonucleótido
DTT: Ditioneitol
EDTA: Ácido etilendiaminotetracético
EGTA: Ácido etilenglicoltetracético
ELISA: Inmunoensayo enzimático en soporte sólido
F₀: Fluorescencia inicial
FBP: Fructosa-1,6-bisfosfato
FBPasa: Fructosa-1,6-bisfosfatasa
Fd: Ferredoxina
F_M: Fluorescencia máxima
F_V: Fluorescencia variable
GTC: Tiocianato de Guanidina
IgG: Inmunoglobulina G
IPTG: Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
LHC I: Antena principal del fotosistema I
LHC II: Antena principal del fotosistema II
mRNA: Ácido ribonucleico mensajero
NADP⁺: Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato oxidado
NADPH: Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido
NADP-MDH: Malato deshidrogenasa dependiente de NADP
NTP: Nucleótido trifosfato
p/v: peso/volumen
P680: Centro de reacción del fotosistema II
PCR: Reacción en cadena de la DNA polimerasa
PBS: Tampón fosfato salino de pH 7.4

PF: Peso fresco

Phe: Feofitina

Pi: Fosfato inorgánico

PS: Fotosistema

Q: Plastoquinona

QH₂: Plastoquinol

RNA: Ácido ribonucleico

RT-PCR: Transcripción inversa seguida de reacción en cadena de la DNA polimerasa

Rubisco: Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa

RuBP: Ribulosa-1,5-bisfosfato

SDS: Dodecil sulfato sódico

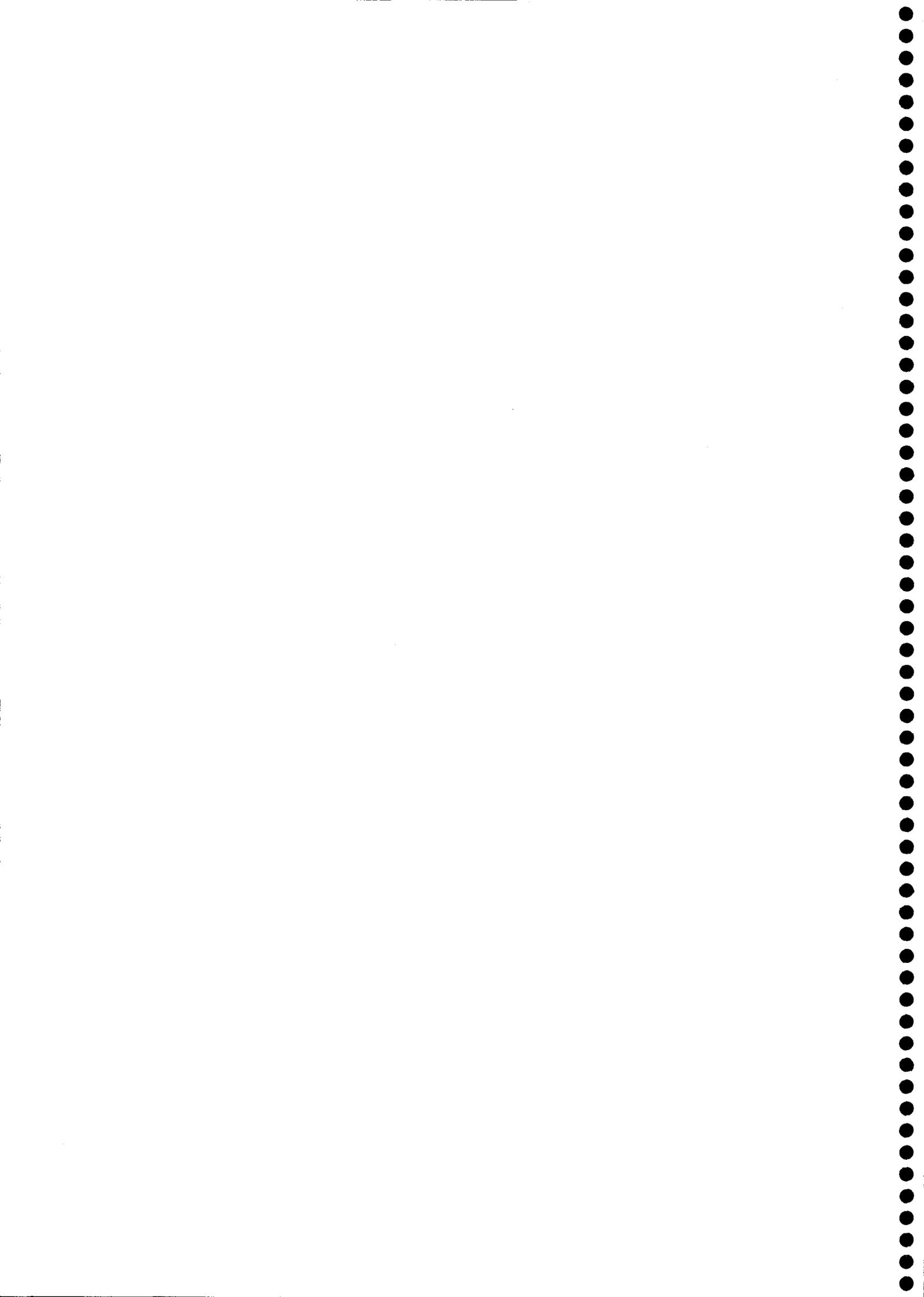
TEMED: N,N,N',N' -tetrametilendiamino-(1,2-bis(dimetilamino))-etano

Tris: Trihidroxi metil aminoetano

Trx: Tiorredoxina



1. Introducción



1.1 – FOTOSÍNTESIS

1.1.1 – Generalidades

El carbono inorgánico es la base de la vida orgánica sobre la tierra. Los organismos fotosintéticos (plantas superiores, algas, algunas bacterias) constituyen el núcleo central de esta transformación, convirtiendo el dióxido de carbono inorgánico (CO_2) de la atmósfera en carbono orgánico, en la biosfera, mediante el proceso llamado Fotosíntesis. En las plantas superiores el asiento de este proceso es una organela subcelular denominada cloroplasto (Figura 1.1). Este presenta dos envolturas, externa e interna, que encierran un ambiente hidrofílico, el estroma. Suspendida en el estroma se encuentra una estructura membranal, la membrana tilacoide, la cual presenta invaginaciones denominadas discos tilacoides. El apilamiento de varios discos tilacoides constituye la grana, y la membranas tilacoides que unen los discos granales reciben el nombre de membranas intergrana. La presencia de discos tilacoides, huecos, intercomunicados, genera un nuevo recinto dentro del cloroplasto, llamado lumen tilacoidal.

Dado que casi toda la energía requerida por los sistemas biológicos se genera vía fotosíntesis, es de entender el interés que se ha demostrado en comprender el mecanismo y la regulación de este proceso. El mecanismo de la fotosíntesis se ha dividido históricamente en dos procesos: 1) Etapa lumínica, y 2) Etapa oscura. Como se aclarará más adelante, estas denominaciones no guardan relación estricta con la realidad, ya que la segunda, en mayor o menor medida, depende también de la luz. Existe una compartimentación de ambas etapas. Mientras que la etapa lumínica es un proceso de membrana, y se lleva a cabo en los discos tilacoides del cloroplasto, la etapa oscura comprende una serie de reacciones catalizadas por enzimas solubles en el estroma del mismo. En la etapa lumínica (Figura 1.2) se produce la transducción de la energía. Los encargados de este proceso, donde la energía luminosa se transforma en energía química, son los fotosistemas, el fotosistema I (PS I) y el fotosistema II (PS II). Estos fotosistemas son complejos de proteínas con pigmentos de naturaleza liposoluble, clorofilas y carotenoides, derivados del tetrapirrol los primeros y de una unidad isoprenoide los segundos. En esta primera etapa la excitación producida por la energía luminosa da como resultado la síntesis de un compuesto de elevado poder reductor, el NADPH, a expensas de la oxidación de un reductor débil como el agua, dando oxígeno

molecular (O_2). Topográficamente el PS II está relacionado con la fotólisis del agua, y el PS I con la reducción del NADP. Además, entre ambos fotosistemas se establece una cadena de transporte electrónico, donde se libera la energía suficiente para la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi. Tal como sucede en la cadena respiratoria mitocondrial, la síntesis de ATP tiene lugar gracias a la intervención de un sistema de bombeo de protones de un lado hacia el otro de la membrana tilacoidal, y la posterior intervención de una ATP sintetasa, que aprovecha la liberación de energía producida por la reversión del tráfico de protones a favor del gradiente anterior. En el caso del cloroplasto el bombeo de protones, como consecuencia de la actividad de la cadena transportadora de electrones, se produce desde el exterior del disco tilacoidal hacia el lumen. Es decir, cuando un cloroplasto es iluminado el pH en el lumen desciende y en el estroma asciende. Este fenómeno tiene suma importancia en la regulación indirecta que la luz ejerce sobre las enzimas del ciclo de la etapa oscura, pues muchas de ellas muestran un activación a pH cercanos a la alcalinidad. En cualquier caso existe una dependencia de una etapa de la fotosíntesis por parte de la otra, ya que la etapa oscura necesita el poder reductor y el ATP generado en la etapa lumínica para su funcionamiento, que la fotosíntesis del carbono es la reducción del CO_2 y su fijación en un compuesto orgánico. El ciclo de reducción fotosintética del carbono, o ciclo de Calvin, tiene lugar en el estroma, y se puede dividir en tres etapas (Figura 1.3): 1) fijación del CO_2 sobre la ribulosa-1,5- bisfosfato (RuBP), 2) reducción del carbono recién fijado, y 3) regeneración de la RuBP consumida inicialmente.

En forma resumida se puede considerar que por cada tres moléculas de CO_2 que ingresan en el ciclo se sintetiza un compuesto orgánico de tres carbonos, una triosa fosfato, que se podría considerar el producto del mismo. La reacción inicial es, entonces, la carboxilación de tres moléculas de RuBP, una pentosa bifosforilada, con la incorporación de tres moléculas de CO_2 atmosférico, en una reacción catalizada por la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), para dar 6 moléculas de 3-fosfoglicerato, compuesto orgánico de tres carbonos (C_3). El 3-fosfoglicerato es entonces fosforilado a 1,3-bisfosfoglicerato por una fosfoglicerato quinasa y, posteriormente, reducido a 3-fosfogliceraldehído por una NADP-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Estas reacciones consumen ATP y NADPH. El 3-fosfogliceraldehído, y su isómero la dihidroxiacetona fosfato, se denominan

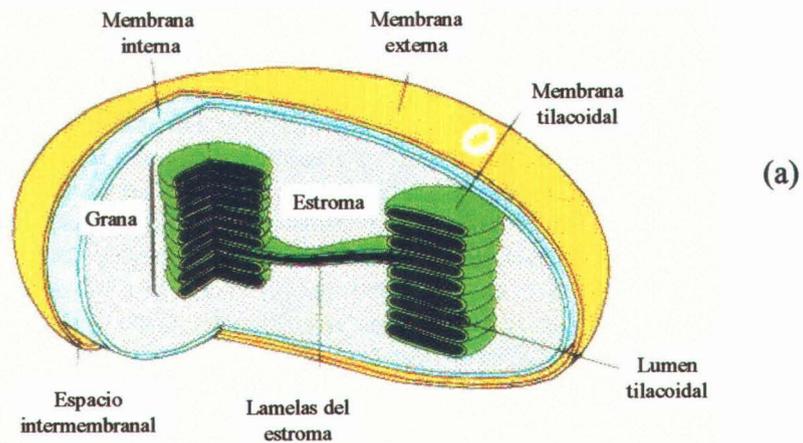


Figura 1.1 - Esquema de un cloroplasto de planta superior (tomado de Stryer, 1995) (a), y fotografía al microscopio electrónico de una porción de célula foliar de guisante bajo plena iluminación (b), donde se aprecia el gran desarrollo de gránulos de almidón (A).

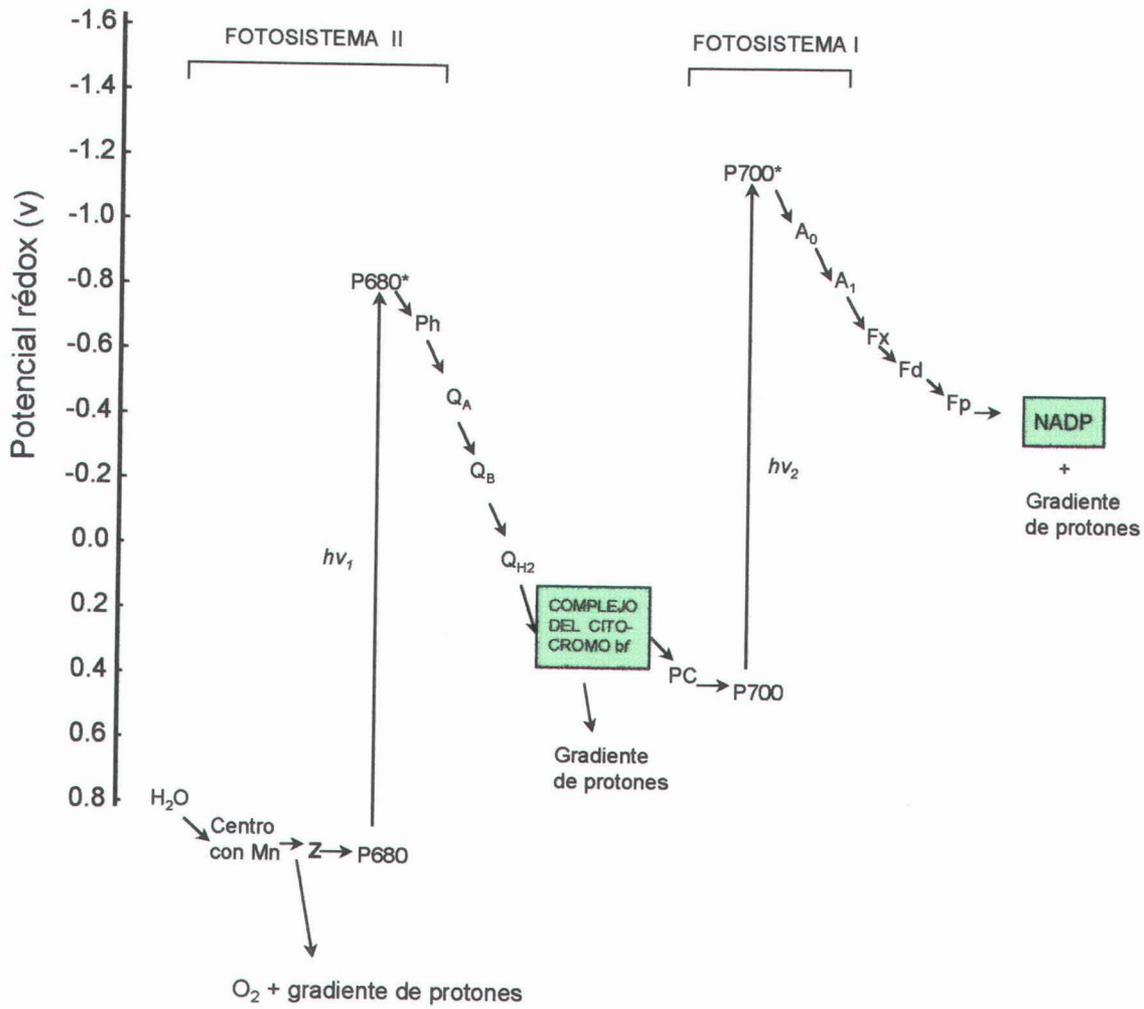


Figura 1.2 - Esquema de la etapa lumínica de la Fotosíntesis

genéricamente triosas fosfato. La transformación de una a otra está catalizada por una triosa fosfato isomerasa. De las 6 moléculas de triosa-fosfato generadas, 5 (15 carbonos en total) son utilizadas para la reobtención de las 3 moléculas de RuBP utilizadas inicialmente, mediante una serie de condensaciones e isomerizaciones. La sexta molécula de triosa fosfato, verdadero producto del ciclo, puede dirigirse hacia la síntesis del almidón en el mismo cloroplasto, o ser exportada al citoplasma para la síntesis de sacarosa.

El proceso de regeneración de la RuBP se inicia con la condensación de una molécula de 3-fosfogliceraldehído con otra de dihidroxiacetona-fosfato para formar fructosa-1,6-bisfosfato (FBP), una reacción catalizada por una aldolasa. Seguidamente, la FBP es hidrolizada a fructosa-6-fosfato por la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa). Los dos primeros átomos de carbono de la molécula de fructosa-6-fosfato son entonces transferidos mediante una transcetolasa a una tercera molécula de 3-fosfogliceraldehído, originándose eritrosa-4-fosfato y xilulosa-5-fosfato. Una aldolasa cataliza la formación de sedoheptulosa-1,7-bisfosfato por condensación de la eritrosa-4-fosfato con una cuarta molécula de triosa-fosfato. La sedoheptulosa-1,7-bisfosfato, por acción de la sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa, se hidroliza a sedoheptulosa-7-fosfato. Sus dos primeros átomos de carbono son transferidos por una segunda transcetolasa a la quinta molécula de 3-fosfogliceraldehído, formándose así xilulosa-5-fosfato y ribosa-5-fosfato. Tanto la xilulosa-5-fosfato como la ribosa-5-fosfato se transforman en ribulosa-5-fosfato, por acción de una pentosa epimerasa en el primer caso, y de una pentosa isomerasa en el segundo. La ribulosa-5-fosfato, finalmente, es fosforilada a RuBP, con consumo de ATP, por una fosforribuloquinasa.

Debido al carácter autocatalítico del ciclo, la sexta molécula de triosas-fosfato podría también incorporarse al mismo, con lo que aumentaría el nivel cloroplastídico de RuBP y, consecuentemente, el del resto de los intermediarios del ciclo.

Analizando la energética del ciclo, puede observarse que la asimilación en cada vuelta del mismo de 3 moles de CO_2 supone un consumo de 9 moles de ATP y 6 de NADPH, con formación neta de 1 mol de triosas fosfato. Si tenemos en cuenta que la variación de energía libre en la oxidación del NADP es de -52.6 kcal/mol, y en la hidrólisis del ATP de -7.6 kcal/mol, la cantidad de energía consumida en cada vuelta de ciclo resulta ser de 384 kcal. Dado que la energía acumulada en la síntesis de un mol de

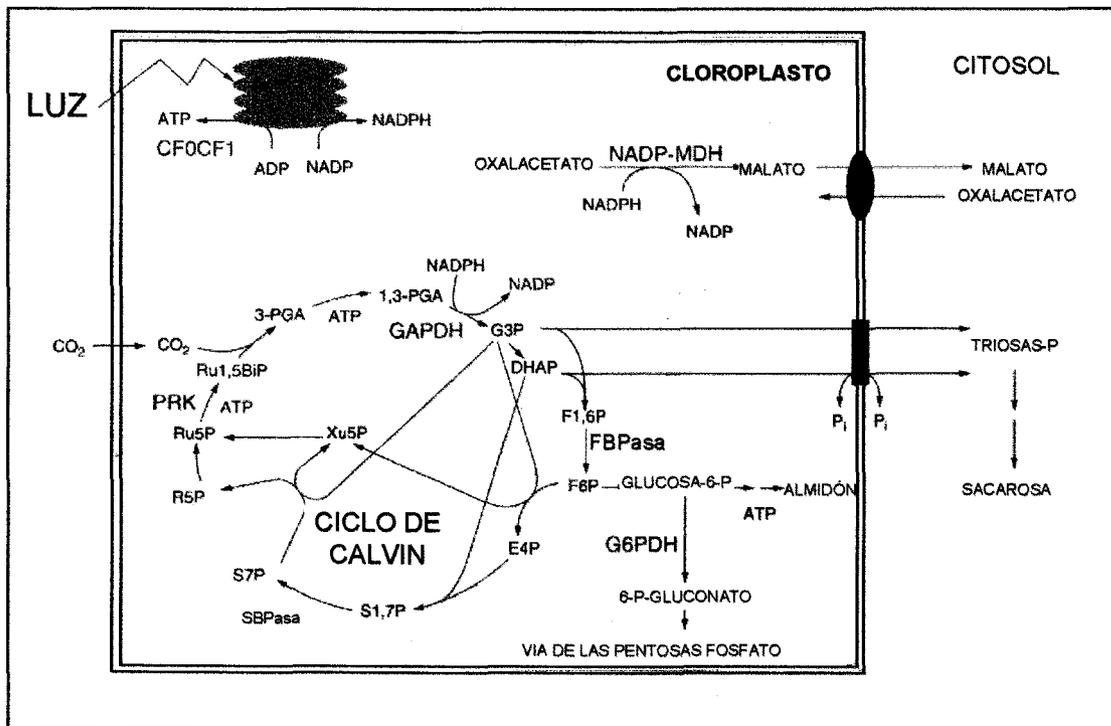


Figura 1.3 - Ciclo de reducción fotosintética del carbono en plantas C₃ (ciclo de Calvin). CF₀CF₁, ATPasa cloroplastica; NADP-MDH, NADP-malato deshidrogenasa; PRK, fosforribuloquinasa; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; FBPasa, fructosa-1,6 bisfosfatasa; SBPasa, sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa; G6PDH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Adaptado de Ruelland y Miginiac-Maslow (1999).

triosas fosfato es de 350.4 kcal, la energía disipada en cada vuelta del ciclo sería sólo de 33.6 kcal. Ello representa un rendimiento teórico de alrededor del 91 %.

1.1.2 - Regulación

El ciclo de Calvin está integrado por 11 sistemas enzimáticos. Se trata de un proceso sometido a una regulación muy precisa, según exigen: a) su elevado rendimiento teórico, b) las limitaciones en los niveles cloroplastídicos de adenilatos y piridín nucleótidos, y c) el destino final del CO₂ asimilado. Con respecto a este último aspecto, el carbono fijado puede utilizarse para aumentar la concentración de intermediarios del ciclo, especialmente la RuBP, para la síntesis de almidón en el propio cloroplasto, o ser exportado como triosas fosfato al citosol para la síntesis de sacarosa. El destino que seguirá el producto de la reducción fotosintética del carbono dependerá de múltiples factores, actuantes a diferentes niveles de regulación. Ésta se ejerce a nivel de algunos de los sistemas enzimáticos arriba mencionados (Bassham y Krause, 1969), y resulta de la acción concertada de factores como el pH, la concentración de ciertos iones y metabolitos (Heldt *et al.*, 1973; Werdam *et al.*, 1975; Krause, 1977; Heber *et al.*, 1982; Gardemann *et al.*, 1986), y el nivel rédox del sistema (Slovacek y Vaughn, 1982).

Aunque todos estos factores dependen de la transición oscuridad-luz, hay que hacer énfasis en la fotoactivación que dichas enzimas reguladoras experimentan al reducirse, vía transporte electrónico fotosintético, determinados grupos S-S de la molécula enzimática. Esta reducción introduce modificaciones estructurales esenciales para la expresión de la actividad (Buchanan, 1980). La activación, que se alcanza de forma relativamente rápida con la iluminación, es la responsable del fenómeno de "inducción", fase de un bajo nivel de asimilación de CO₂ que tiene lugar cuando la planta o cloroplastos íntegros son expuestos a la luz después de un período prolongado de oscuridad (Walker, 1976). En la actualidad es comunmente aceptado que esta activación enzimática dependiente de la luz constituye un importante proceso regulador, que dirige el metabolismo hacia la síntesis de azúcares y compuestos de reserva durante el período de iluminación, y hacia su catabolismo en la oscuridad.

La primera indicación del papel regulador ejercido por la luz sobre determinadas enzimas del ciclo de Calvin se debe a Ziegler y colaboradores, quienes pusieron de

manifiesto la activación por la luz de la NADP-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Ziegler *et al.*, 1965; Ziegler y Ziegler, 1965 y 1967). Experiencias posteriores con cloroplastos aislados mostraron que la luz estimula la actividad de la fructosa-1,6-bisfosfatasa, sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa, NADP-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y fosforribuloquinasa (Champigny y Bismuth, 1976; Kelly *et al.*, 1976; Fischer y Latzko, 1980; Akamba y Anderson, 1981); paralelamente, inhibe la actividad de una enzima clave del ciclo oxidativo de las pentosas fosfato, la NADP-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Anderson y Duggan, 1976; Yuan y Anderson, 1987). La comprobación, después de la purificación a homogeneidad, de que estas enzimas no poseen cromóforos susceptibles de ser excitados directamente por la luz, sugirió la necesidad de la existencia de un sistema capaz de captar la señal luminosa y transformarla para su utilización en la regulación enzimática. La acción de la luz sobre la cadena de transporte electrónico fotosintético origina cambios en la membrana tilacoidal y en la composición del estroma, los cuales modifican la capacidad catalítica de ciertas enzimas.

A partir de la purificación de las enzimas del ciclo, se pudo establecer que determinados factores proteicos solubles eran funcionales en la estimulación de la actividad enzimática por la luz (Schurmann *et al.*, 1976; Wolosiuk y Buchanan, 1977). Concretamente, en presencia de membranas tilacoidales y bajo iluminación, un conjunto de tres proteínas (ferredoxina, ferredoxin-tiorredoxin reductasa y tiorredoxina), que constituyen el llamado sistema ferredoxina-tiorredoxina, se mostró capaz de incrementar la actividad específica de las enzimas cloroplastídicas fotoactivables (Wolosiuk *et al.*, 1977; Wolosiuk y Buchanan, 1977; Brezeale *et al.*, 1978; Tischner y Huttermann, 1978; Wolosiuk y Buchanan, 1978a y 1978b; Buchanan *et al.*, 1979; McKinney *et al.*, 1979; Buchanan, 1980; Mills *et al.*, 1980; Jacquot *et al.*, 1981; Soulie *et al.*, 1981; Wink y Hartmann, 1981; Tischner y Schmidt, 1982; Schwenn y Schriek, 1984; Kleczkowski y Randall, 1985; Droux *et al.*, 1988). Estas proteínas exhiben grupos tiólicos que juegan un papel esencial en el proceso de activación. La ferredoxina, fotoquímicamente reducida vía transporte electrónico fotosintético, reduce entonces, con el concurso de la ferredoxin-tiorredoxin-reductasa a la tiorredoxina, que a su vez ejerce la activación reductora de las enzimas fotoactivables (Figura 1.4). La activación reductora mediada por el sistema ferredoxina-tiorredoxina induce un cambio

conformacional de la molécula enzimática hacia una forma activa, como consecuencia de la reducción de ciertos grupos S-S de la proteína inactiva. Hay que indicar que las agrupaciones -SH liberadas no intervienen directamente en el propio proceso catalítico. Ello viene corroborado por el hecho de que la FBPasa fotosintética puede ser también activada, en condiciones no fisiológicas, por agentes caotrópicos y alcoholes, que deben introducir cambios estructurales equivalentes por interacciones hidrofóbicas, independientes de procesos rédox.

Bassham y Krause (1969) calcularon la variación de energía libre de cada una de las reacciones del ciclo de Calvin en una situación fisiológica de equilibrio. Los pasos que se muestran limitantes en este sentido son, por este orden, los catalizados por la Rubisco, sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa y FBPasa, fosforribuloquinasa y NADP-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Por otra parte, la síntesis de carbohidratos (fundamentalmente sacarosa) en el citoplasma requiere la exportación de triosas fosfato resultantes de la asimilación carbonada. Estos compuestos aparecen en el ciclo entre la reacción de carboxilación y la catalizada por la FBPasa; en cambio, el material de partida para la síntesis de almidón en el propio cloroplasto (fructosa-6-fosfato) es el producto de la actividad de esta última. La modulación de las actividades de estos sistemas enzimáticos (Rubisco y FBPasa) llevará aparejada la acumulación de unos u otros intermediarios del ciclo, en respuesta a las necesidades de la planta.

1.1.3 – Fructosa-1,6-bisfosfatasa

Existen dos enzimas con actividad FBPasa en la célula fotosintética; la ya mencionada de localización cloroplastídica, y una segunda ubicada en el citosol (Buchanan, 1980; Kelly *et al.*, 1982). Ambas catalizan la hidrólisis, dependiente de Mg^{2+} , de la FBP a fructosa-6-fosfato y ortofosfato. La FBPasa cloroplastídica juega un papel muy importante en la regulación del ciclo de Calvin; por su parte, la FBPasa citosólica está implicada en la síntesis de sacarosa a partir de las triosas fosfato exportadas desde el cloroplasto (Zimmermann *et al.*, 1978; Stitt y Heldt, 1985; Khayat y Daie, 1991; Prado *et al.*, 1991).

En principio, al igual que en las restantes enzimas del ciclo de Calvin, se suponía que la FBPasa se encontraba soluble en el estroma. En cambio, Rodríguez Andrés *et al.* (1987) encontraron un significativo porcentaje de esta enzima ligada a las

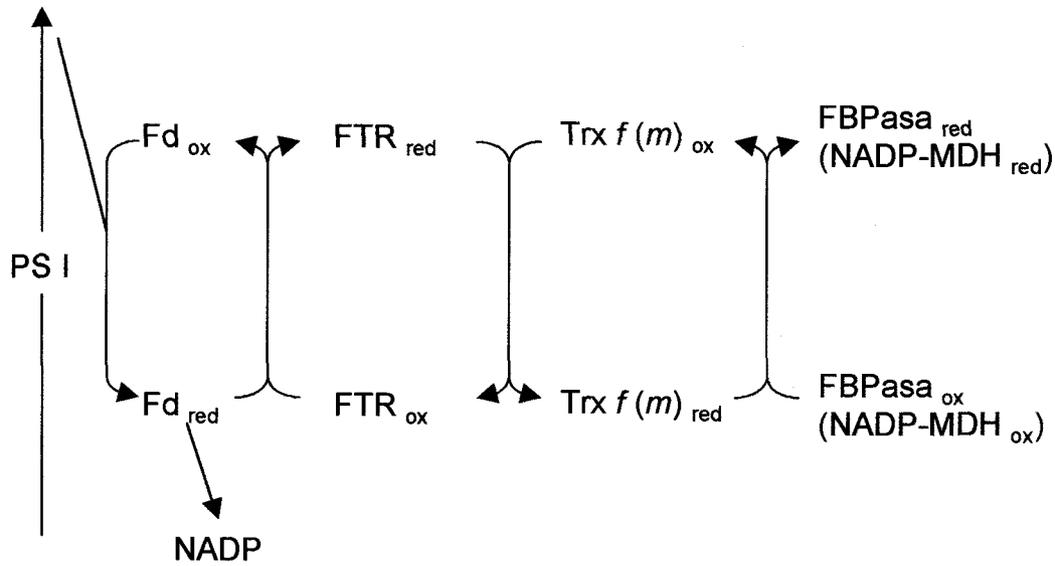


Figura 1.4 - Mecanismo de fotoactivación de FBPasa y NADP-MDH por el sistema ferredoxina (Fd)-tiorredoxina (Trx). FTR: ferredoxina-tiorredoxina reductasa.

membranas tilacoidales, dependiendo de la concentración de Mg^{2+} , K^+ o Na^+ del medio de lisis. Asimismo, observaron que la presencia de alcoholes alifáticos favorecía dicha unión (Rodríguez Andrés *et al.* 1990), deduciendo que en la unión de la enzima a la membrana estarían implicados *loci* hidrofóbicos. De acuerdo con esto, Hermoso *et al.*, (1992) mostraron en hojas de espinaca una importante incidencia de la asociación a membranas de la FBPasa y su activador natural, tiorredoxina *f*.

La FBPasa cloroplastídica nativa es un tetramero, donde cada subunidad posee una masa molecular de 40 kDa (Lázaro *et al.*, 1974 y 1975b; Zimmermann *et al.*, 1976). Posee un alto porcentaje de residuos de ácido aspártico y glutámico (Buchanan *et al.*, 1971; Lázaro *et al.*, 1975a), lo que le confiere carácter ácido, con un punto isoeléctrico de 4.1-4.3 (Lázaro *et al.*, 1974). El número de residuos de cisteína-cistina, de importancia en el proceso de activación reductora, se sitúa en torno a los 28 en trigo (Raines *et al.*, 1988) y *Arabidopsis* (Horsnell y Raines, 1991), y 32 en espinaca (Chueca *et al.*, 1977) y patata (Kosman *et al.*, 1992).

Esta enzima presenta una actividad dependiente del pH (Smillie, 1960; Lázaro *et al.*, 1975a), con un óptimo de 8.5, y es inactiva por debajo de 7.8 (Racker y Schroeder, 1958). Es, asimismo, dependiente de Mg^{2+} , y presenta con respecto a éste una cinética sigmoidea (Zimmermann *et al.*, 1976), y una K_m para la forma nativa de 9mM (Charles y Halliwell, 1980). La cinética se hace hiperbólica y el valor de la K_m pasa a ser de 2mM en presencia de DTT o de tiorredoxina reducida (Charles y Halliwell, 1981). Esta dependencia del Mg^{2+} afecta al pH óptimo de actividad, que pasa a ser 8.0 frente a una concentración de Mg^{2+} de 4-5 mM y en presencia de tiorredoxina reducida.

Con respecto a la concentración del sustrato, la cinética de la enzima es sigmoide según Lázaro *et al.* (1975a) y Zimmermann *et al.* (1976). Charles y Halliwell (1980) calcularon un valor para la K_m de 0.8 mM. En presencia de DTT este valor disminuye a 33 μ M y la cinética se hace hiperbólica. Los datos presentados por Zimmermann *et al.* (1976) muestran la existencia de una fuerte y similar cooperatividad en la unión del Mg^{2+} y del sustrato, tanto en forma nativa como disociada. Ello resalta el carácter regulador del Mg^{2+} y FBP y, al mismo tiempo, minimiza el efecto que la disociación de la enzima puede tener sobre su regulación. Según Gontero *et al.* (1984) el sustrato no ejerce ningún efecto regulador sobre la enzima reducida por el sistema ferredoxina-tiorredoxina, de forma similar a lo que ocurre con la sedoheptulosa-1,7-

bisfosfatasa. Un análisis global de todos los factores reguladores llevó a Hertig y Wolosiuk (1983) a proponer un comportamiento histerético para esta enzima. Más adelante estudios realizados con disolventes orgánicos y sales neutras llevaron a proponer que un microambiente hidrofóbico facilitaría *in vivo* el proceso de activación reductora promovido por la luz (Wolosiuk, 1986; Stein y Wolosiuk, 1987).

A nivel molecular la activación de la FBPasa cloroplastídica por la luz supone una serie de modificaciones químicas y conformacionales, a las que contribuyen de manera directa los cambios de pH y de concentración de Mg^{2+} y de FBP que se producen en el estroma del cloroplasto como consecuencia de la iluminación, así como la reducción de la enzima a partir de la cadena de transporte electrónico fotosintético, vía ferredoxina-tiorredoxina. Aragnol *et al.* (1985) observaron que el incremento de pH, y la unión de la enzima al sustrato y al Mg^{2+} , dan lugar a una mayor accesibilidad de los grupos tiólicos de la molécula enzimática. Encuentran que la unión de la enzima reducida al Mg^{2+} tiene un valor de relajación idéntico al que ocurre en la fase catalítica, proponen que se trata de dos procesos concomitantes, y que el cambio conformacional inducido por el pH es el paso limitante de la activación de la FBPasa. Esta regulación indirecta de la FBPasa cloroplastídica por la luz se suma así a la ya descrita fotoactivación reductora de la enzima.

Se encuentran disponibles secuencias aminoacídicas de FBPasas de bacterias fotosintéticas, cianobacterias y de cloroplastos de plantas superiores (espinaca, guisante, *Brassica napus*, trigo, *Arabidopsis thaliana* y soja, Jacquot *et al.*, 1995). Todas estas enzimas son muy similares entre sí y muestran gran homología con la FBPasa de hígado de cerdo, una enzima involucrada en la gluconeogénesis, y también con la FBPasa citosólica de plantas, lo que sugiere que todas poseen una arquitectura similar. Cuando se comparan con secuencias de enzimas animales o con la proteína de *Rhodobacter sphaeroides*, no reguladas vía rédox (Gibson *et al.*, 1990), las FBPasas fotosintéticas, que sí poseen ese tipo de regulación, muestran algunos aspectos distintivos. Todas las enzimas de cianobacterias muestran dos residuos conservados de cisteínas en posiciones 102 y 109 y, además, un tercero en posición 18 (numeración de *Synechocystis* sp). Estos residuos están ausentes en las secuencias de FBPasas cloroplastídicas de plantas, las cuales contienen una inserción de alrededor de 17 aminoácidos con tres residuos de cisteína (Cys153, Cys173, y Cys178, según secuencia de guisante) (Marcus *et al.*, 1988;

Raines *et al.*, 1988; Carrasco *et al.*, 1994; Jacquot *et al.*, 1995). De acuerdo con estas comparaciones de secuencias, la naturaleza redox regulatoria de las FBPasa cloroplastídicas y de cianobacterias no tienen el mismo origen molecular. La mayor evolución de las FBPasas de plantas se deduce de la inserción de 17 aminoácidos en un "loop" situado entre las unidades estructurales $\beta 4$ y $\beta 5$ (Figura 1.5a). Concordantemente, la Trx *f* cataliza muy eficientemente la activación de este tipo de FBPasas. La estructura tridimensional de FBPasa de espinaca (Villeret *et al.*, 1995) muestra una gran similitud con la de hígado de cerdo, salvo por la citada región de inserción. Esta región está localizada en un "loop" distal con respecto al sitio activo, en una esquina exterior en cada uno de los monómeros. La definición de la estructura no fue suficiente, sin embargo, para localizar el puente disulfuro donde reside la regulación redox. Estudios de mutagénesis dirigida han proporcionado más información acerca de la naturaleza de dicho sitio. Estos resultados sugieren que en las FBPasas cloroplastídicas, la Cys153 se une alternativamente a la Cys173 y/o a la Cys178 (Jacquot *et al.*, 1997b). Además, estas enzimas podrían poseer un puente disulfuro no regulatorio situado entre los residuos Cys49 y Cys190, según estudios realizados en guisante (Villeret *et al.*, 1995). La regulación de la FBPasa cloroplastídica parece ser, por lo tanto, un proceso más complejo que la simple reducción de un puente disulfuro, y podría involucrar procesos de isomerización transitorios todavía no suficientemente aclarados (Ruelland y Miginiac-Maslow, 1999).

El correcto funcionamiento de la célula fotosintética requiere una total coordinación entre las actividades del cloroplasto y su entorno citoplasmático. En esa línea, el núcleo ha asumido un cierto control sobre la génesis y funcionamiento del cloroplasto. En efecto, algunas proteínas cloroplastídicas están codificadas en el genoma nuclear y se sintetizan en ribosomas citoplasmáticos, de donde, posteriormente, pasan al interior del cloroplasto. Este es el caso, por ejemplo, de la subunidad pequeña de la Rubisco (Kuhlemeier *et al.*, 1987), plastocianina (Grossman *et al.*, 1982), etc. Más aún, algunas de estas proteínas exhiben una síntesis fotoinducida, como la subunidad pequeña de la Rubisco (Kuhlemeier *et al.*, 1987), NADP-malato deshidrogenasa (Vidal y Gadal, 1981), FBPasa cloroplastídica de espinaca (Chueca *et al.*, 1984), guisante (Sahrawy *et al.*, 1988) y trigo (Raines *et al.*, 1988), polipéptidos del LCH II (Kuhlemeier *et al.*, 1987), la ferredoxin-NADP reductasa, y la tiorredoxina *f* de espinaca

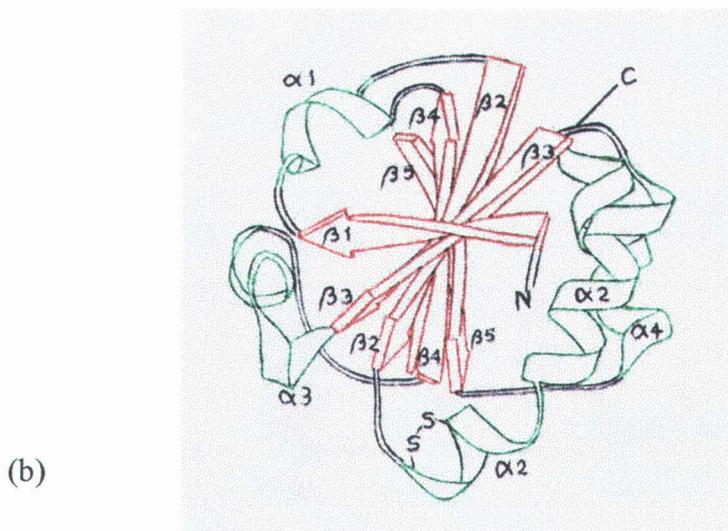
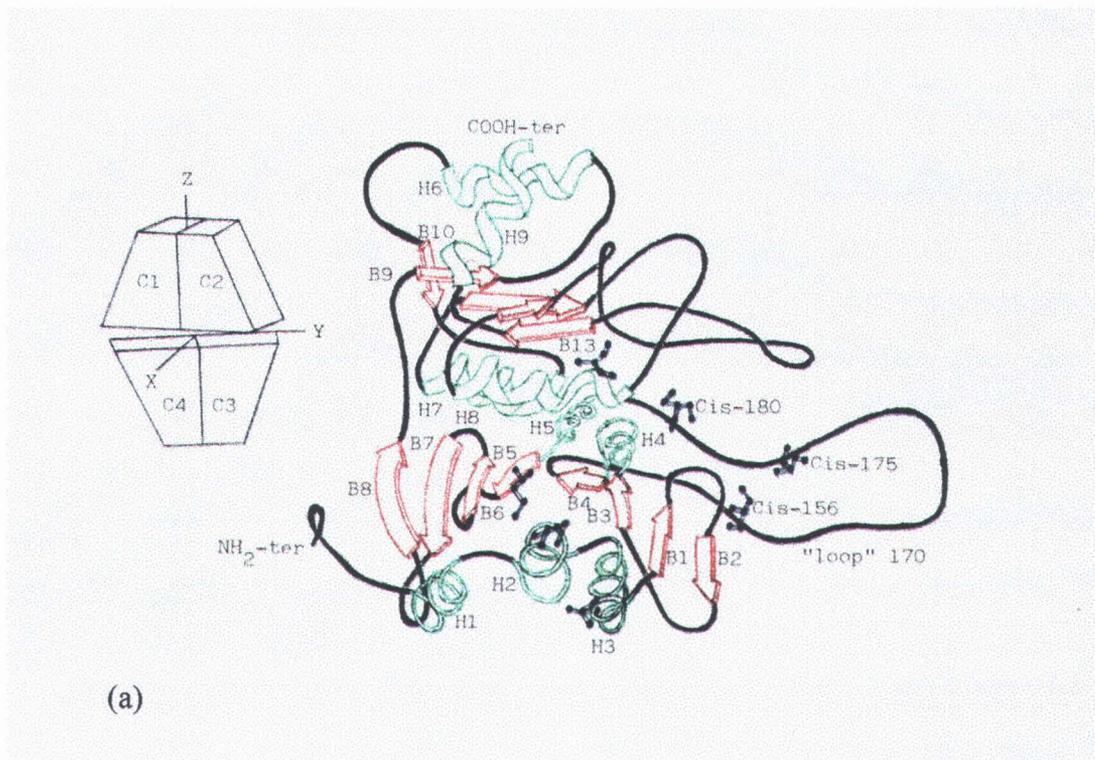


Figura 1.5 -Modelos estructurales de FBPasa cloroplastídica (a) y de Trx f(b).

(Carrasco *et al.*, 1992). Estas proteínas cloroplásticas de codificación nuclear se sintetizan como formas precursoras inactivas, de mayor masa molecular que las enzimas funcionales, merced a una extensión existente en el lado N-terminal de la cadena. Dicha extensión, denominada péptido procesador, desempeña una función esencial en el tránsito de la proteína al interior del cloroplasto, perdiéndose y originando la forma activa. En el caso de la FBPasa fotosintética de guisante se ha determinado que la síntesis del precursor de ésta proteína en el citosol comprende, además de la secuencia correspondiente a la proteína (49 kDa), un péptido de tránsito de unos 10 kDa (Sahrawy *et al.*, 1990b; Carrasco *et al.*, 1992), relacionado con el transporte hacia el cloroplasto de la enzima. Se ha descrito, en algunos casos, una síntesis fotoinducida de enzimas de plantas superiores a nivel traduccional (Fromm *et al.*, 1985) o post-traduccional (Apel y Kloppstech, 1978; Ernst *et al.*, 1987), si bien en este último caso puede tratarse asimismo de una consecuencia de la demanda de ATP para el tránsito (Olsen *et al.*, 1989). En la mayoría de los casos, sin embargo, dicha regulación es transcripcional (Gallagher y Ellis, 1982; Raines *et al.*, 1988).

1.1.4 - NADP-malato deshidrogenasa

La malato deshidrogenasa (MDH) es de las enzimas más activas en glioxisomas, mitocondrias, peroxisomas, cloroplastos, y citosol. Los tejidos de plantas contienen múltiples formas de MDH, y la importancia fisiológica de esta situación reside en su participación en diferentes vías metabólicas. Diferencias en la función se corresponden con diferencias en la localización subcelular. Todas las MDH son dependientes de NAD, excepto el tipo cloroplástico (NADP-MDH), que requiere NADP como cofactor. Las diferentes isoenzimas son codificadas en el núcleo y sintetizadas en los ribosomas citoplasmáticos. El equilibrio de la reacción catalizada por la MDH generalmente está desplazado hacia la formación de malato por reducción de oxalacetato (OAA).

En el caso de las plantas C₄ el OAA es el producto primario de la fijación del CO₂ atmosférico sobre el fosfoenolpiruvato, reacción catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxilasa. En estas plantas una abundante actividad NADP-MDH está localizada exclusivamente en los cloroplastos de las células del mesófilo. El malato producido es, entonces, transportado a las células adyacentes de la vaina vascular,

donde es descarboxilado (Figura 1.6); el CO₂ liberado es nuevamente fijado, pero en este caso por la Rubisco, ingresando en el ciclo de Calvin (Hatch y Slack, 1969; Ray y Black, 1979). En plantas C₄ la NADP-MDH ha sido ampliamente estudiada (Kagawa y Bruno, 1988), y la secuencia completa de aminoácidos deducida a partir de la nucleotídica de cDNA, o clones genómicos de maíz (Metzler *et al.*, 1989) y sorgo (Cretin *et al.*, 1990; Luchetta *et al.*, 1990; Luchetta *et al.*, 1991). En plantas CAM (metabolismo ácido de la Crasuláceas), de metabolismo parecido en algunos aspectos a las C₄, las reacciones de carboxilación y descarboxilación indicadas están separadas por el tiempo, en vez de espacialmente, como ocurre en las C₄. La mayor parte de la captura y fijación de CO₂ ocurre durante la noche, generándose OAA que reducido por la NADP-MDH a malato, se acumula en la vacuola. Durante el día las plantas cierran sus estomas para evitar la pérdida de agua por evaporación, y utilizan el malato acumulado como fuente de CO₂ para su refijación en el ciclo de Calvin.

Mientras que la NADP-MDH en plantas C₄ está básicamente involucrada en la fijación del CO₂, en plantas C₃ su función está asociada con la transferencia de equivalentes de reducción entre el cloroplasto y el citosol, mecanismo conocido como lanzadera del malato (Heber, 1974). El malato, generado en el cloroplasto a expensas del OAA y el NAPH producido en fotosíntesis, es transportado hacia el citosol mediante un translocador de ácidos dicarboxílicos ubicado en la membrana interna del cloroplasto (Ebbighausen *et al.*, 1987). La NADP-MDH es especialmente activa en situaciones donde se produce un desbalance entre el NADPH y el ATP generados en el cloroplasto, o cuando se produce más NADPH del que puede ser consumido. Esto último ocurre en la fase de inducción, que se da cuando las plantas son iluminadas después de un periodo prolongado de oscuridad (Scheibe *et al.*, 1986), así como en condiciones extremas de iluminación, donde todos los sistemas de disipación de energía estén operando al máximo. La sobreproducción de NADPH es exportada al citosol vía reducción cloroplastídica de OAA a malato, exportación de éste al citosol mediante el translocador de dicarboxilatos, donde tiene lugar el proceso inverso mediante otra malato deshidrogenasa, ahora NAD-dependiente, con liberación de NADH. Alternativamente otra válvula, llamada reducción fotosintética del O₂, actúa en reemplazo de la lanzadera del malato. Evidencias experimentales sugieren que la válvula del malato opera prioritariamente y que este segundo mecanismo sólo se produce en condiciones de

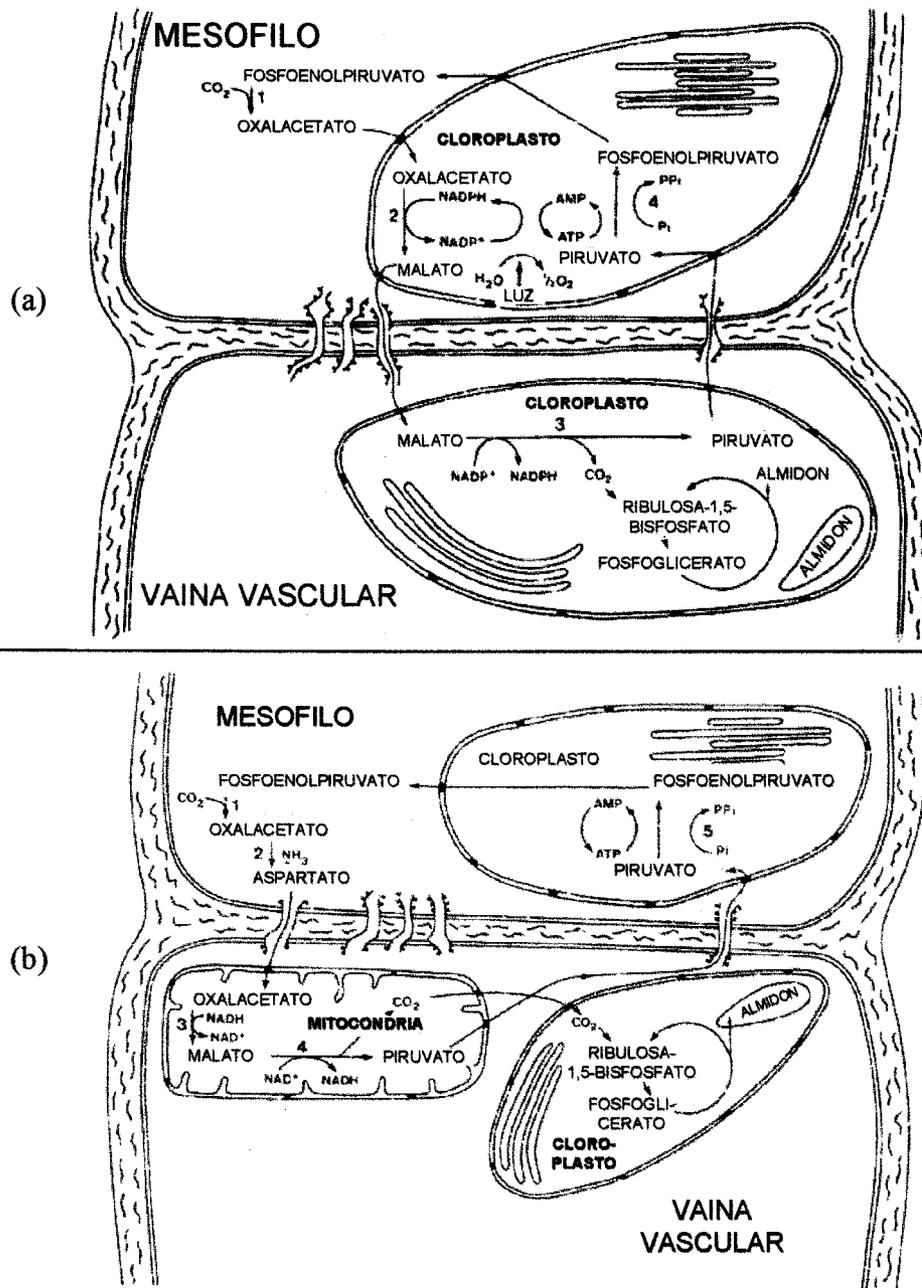


Figura 1.6 - Flujo de metabolitos entre organelas y entre células del mesófilo y de la vaina vascular en plantas C_4 , *Zea mays* (a) y *Amaranthus* (b). En (a) las enzimas son: 1, fosfoenolpiruvato carboxilasa; 2, NADP-malato deshidrogenasa; 3: enzima málica; 4, piruvato diquinasa. En (b): 1, fosfoenolpiruvato carboxilasa; 2, oxalacetato-aspartato aminotransferasa; 3, NADP-malato deshidrogenasa; 4, enzima málica; 5, piruvato diquinasa. Adaptado de Gietl (1992).

emergencia, para prevenir la sobre-reducción de los constituyentes de la cadena de transporte electrónico fotosintético y subiguiente fotoinhibición (Steiger y Beck, 1981). La válvula de malato es un mecanismo menos perjudicial para la célula que la del O₂, ya que cuando opera esta última la concentración de H₂O₂ aumenta, siendo necesaria entonces la participación de procesos de detoxificación del H₂O₂ y productos de su metabolismo. La importancia fisiológica de la válvula de malato aumenta al considerar que los equivalentes de reducción liberados al citosol pueden ingresar a la mitocondria y dar lugar a la síntesis de ATP (Ebbighausen *et al.*, 1987).

Varios residuos de cisteína están localizados en la secuencia de la NADP-MDH, y todos son específicos de la isoforma regulada vía rédox. Dos de estos residuos están ubicados en el lado N-terminal, y uno en el C-terminal. Los estudios de Decottignies *et al.* (1988) realizados en sorgo, han demostrado que el puente disulfuro ubicado en la región N-terminal es regulado por la luz. De hecho, experimentos de mutagénesis dirigida han confirmado que dicho puente disulfuro es reducible por Trx (Issakidis *et al.*, 1992). Estudios posteriores han determinado que las cisteínas de la región C-terminal podrían constituir un segundo punto de regulación (Issakidis *et al.*, 1993; Issakidis *et al.*, 1994). Sin embargo, estudios realizados en guisante han arrojado algunos resultados diferentes; no obstante, fue comprobado el mecanismo basado en dos disulfuros regulatorios (Reng *et al.*, 1993). Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que la enzima, al estado oxidado, se mantiene en una conformación cerrada, mientras que el relajamiento de la estructura, provocado por reducción, favorecería la aparición de las propiedades catalíticas de la misma.

Es de comprender el sentido fisiológico de la regulación de la NADP-MDH por la luz. Esta se produce a través del sistema ferredoxina/tiorredoxina, tal como ocurre con la FBPasa, aunque en este caso una forma diferente de tiorredoxina, la tiorredoxina *m*, es la encargada de su modulación.

1.1.5 - Tiorredoxinas

Las Trxs son proteínas de baja masa molecular (alrededor de 12 kDa), con actividad protein-disulfuro oxido-reductasa, ubicuas en bacterias, levaduras, animales y plantas superiores. Fueron descubiertas en *E. coli* como involucradas en la reducción de ribonucleótidos a sus correspondientes desoxi-ribonucleótidos (Holmgren, 1985).

A pesar de su baja homología en la secuencia de aminoácidos, presentan entre sí un tamaño y plegamiento similar, con un núcleo de 5 láminas β , rodeadas por una corona de 4 α -hélices (Ecklund *et al.*, 1991). Dentro de la hélice α -2 todas ellas muestran la secuencia -W-C-G-P-C-, altamente conservada, la cuál posee las dos cisteínas involucradas en los procesos rédox en los que las Trxs participan (Figura 1.5b). Se han caracterizado en cloroplastos de plantas superiores dos isoformas de Trx: Trx *f*, involucrada en la modulación de la FBPasa y algunas otras enzimas del ciclo de Calvin, y Trx *m*, encargada de la regulación de la NADP-MDH (Jacquot *et al.*, 1997a). En este proceso de activación la ferredoxina-tiorredoxina reductasa (FTR) canaliza los equivalentes de reducción generados en la cadena de transporte electrónico fotosintética desde Fd a Trx. Esta Trx reduce la enzima activable en una reacción de intercambio tiol-disulfuro, no enzimática (Buchanan, 1992). Ambas Trxs son de codificación nuclear, sintetizadas en formas precursoras, perdiendo el péptido de tránsito en el transporte hacia el cloroplasto. En el citosol existe un tercer grupo de Trxs, denominadas Trxs *h*, de las cuales hasta 5 isoformas han sido descritas en *Arabidopsis* (Rivera-Madrid *et al.*, 1995). Análisis de comparación de secuencias muestran una filogenia divergente en ambas Trxs cloroplastídicas, siendo el tipo *m* cercano a las Trxs procarióticas, y el *f* similar a las de mamíferos (Hartman *et al.*, 1990).

Hay amplia evidencia de la dependencia del sistema cloroplastídico de ferredoxina-tiorredoxina de varias proteínas relacionadas con la fijación del CO₂ (ciclo de Calvin) y procesos anejos de la actividad fotosintética, como la NADP-MDH y la CF₁-ATPasa (Buchanan *et al.*, 1994). Existe también una isoforma cloroplastídica de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la cual es inactivada por la luz con intervención del sistema ferredoxina-tiorredoxina. Esta enzima interviene no sólo en procesos anabólicos, sino también en catabólicos (Scheibe, 1991). Todos los componentes necesarios del sistema ferredoxina-tiorredoxina, a saber, ferredoxina, ferredoxina-tiorredoxina reductasa y tiorredoxina, han sido aislados de organismos fotosintéticos, desde cianobacterias hasta plantas C₄ (Droux *et al.*, 1987; Huppe *et al.*, 1990; Cossar *et al.*, 1994), sugiriendo la universalidad de este sistema en el reino vegetal. Aunque estos estudios han proporcionado una base bioquímica bastante firme sobre la función de las tiorredoxinas en el cloroplasto, algunas cuestiones permanecen pobremente entendidas (Jacquot *et al.*, 1997a). Nuevas proteínas relacionadas con las tiorredoxinas, como la

glutarredoxina y protein disulfuro isomerasas, han sido recientemente descubiertas en plantas, y es posible que ellas, al igual que las Trxs, puedan tener participación en la regulación rédox cloroplastídica.

Por otra parte, no está claramente demostrado el significado fisiológico de la existencia de varios tipos de Trx en la célula fotosintética. Generalmente es asumido que la Trx *f* es la única capaz de activar eficientemente a la FBPasa (Jacquot *et al.*, 1997a). Sin embargo, en presencia de los moduladores FBP y Ca²⁺, la Trx *m* de espinaca es capaz de activar la FBPasa homóloga (Schürmann *et al.*, 1985). Más aún, en nuestro laboratorio se ha demostrado que la Trx *m* de guisante puede activar a la FBPasa homóloga aún en ausencia de dichos moduladores (López Jaramillo *et al.*, 1997). Por otro lado, el descubrimiento de Pasternak *et al.* (1996) de que el promotor del gen de Trx en *Rhodobacter sphaeroides* contiene una secuencia regulada por oxígeno, apoyaría la idea de que el tipo procariótico de Trx (Trx *m*) puede tener participación en la defensa contra el estrés.

Se ha descrito un nuevo grupo de peroxididasas dependientes de grupos tioles. Las peroxididasas dependientes de tiorredoxinas (peroxirredoxinas) forman un grupo de enzimas protectoras anti-peróxido que no guardan homología con otras isoperoxidasas, pero conservan la secuencia DFTPVCPTTE en la región C-terminal de la proteína. El residuo de cisteína en esta secuencia tiene un papel central en la actividad catalítica (Chae *et al.*, 1994). La reducción del sustrato peróxido implica la oxidación de este residuo de cisteína, para finalmente formar un puente disulfuro con otro resto de cisteína de la molécula proteica. La regeneración de la enzima es llevada a cabo por el sistema ferredoxina/tiorredoxina. En plantas han sido identificadas peroxirredoxinas en *Bromus secalinas* (Goldmark *et al.*, 1992), cebada (Aalen *et al.*, 1994), espinaca y *Arabidopsis* (Baier y Dietz 1996). Si la tiorredoxin-peroxidasa está, de hecho, presente en el cloroplasto, podría usar Trx *m* como sistema de regeneración. Otra posible función del tipo procariótico, la Trx *m*, podría ser el control traduccional del mRNA, como fue postulado en *C. Reinhardtii* (Danon y Mayfield, 1994).

Con respecto a las Trxs extracloroplastídicas, a las Trxs *h* se les ha asignado distintas funciones en plantas. Varios estudios las involucran en el proceso de removilización de reservas en semillas (Lozano *et al.*, 1996), pero todavía no se les ha asignado una clara función en hojas. Esto se debe principalmente a la gran cantidad de

isoformas de Trxs *h* presentes. Por ejemplo, una de éstas se manifiesta como un potente activador *in vitro* de la NADP-MDH, siendo eficientemente reducida por el sistema ferredoxina-tiorredoxina (Stein *et al.*, 1995). Hay observaciones que asignan funciones específicas a las Trxs *h* en órganos reproductivos (Li *et al.*, 1995; Bower *et al.*, 1996). Finalmente, la observación en plantas de arroz de la elevada concentración de Trx *h* en el floema (Ishiwatari *et al.*, 1995), ha hecho pensar que la función fisiológica más importante de las Trxs *h* tenga que ver con la participación en la expresión de determinados genes, vía señales moleculares asociadas a cierto tipo de receptores. Se ha encontrado que los factores de transcripción *fos* y *jun*, involucrados en respuestas frente al estrés oxidativo, son regulados en forma redox con la posible participación de Trx *h* (Babiychuk *et al.* 1994). Recientemente, además, se ha encontrado que una proteína tipo tiorredoxina, localizada en el cloroplasto, se induce por déficit hídrico en patata (Rey *et al.*, 1998). Esta evidencia experimental está apoyando la idea de que las tiorredoxinas podrían ejercer un papel protector frente a diferentes situaciones de estrés.

1.2 - RESPUESTA DE LAS PLANTAS A CONDICIONES DE ESTRÉS

Las plantas están siempre expuestas a la fluctuación de muchos factores ambientales que afectan al ritmo fotosintético. El factor más importante para la fotosíntesis, la radiación solar, está continuamente variando, y los otros factores no siempre están en condiciones favorables cuando la luz no es limitante. La disponibilidad de CO₂ para los cloroplastos es deprimida por la sequía vía cierre estomático, mientras que las bajas temperaturas disminuyen la tasa de fijación del CO₂. Ante tales circunstancias la capacidad de drenaje de los fotones absorbidos está disminuída, con acúmulo de potencial reductor (NADPH) y energético (ATP). Esto, junto con el efecto directo de la radiación sobre moléculas fotosensibles de los fotosistemas (clorofilas, D1, D2, etc), produce daños que pueden poner en peligro la viabilidad de la planta, y siempre disminuir su rendimiento.

Cuando la cantidad de fotones incidente en una hoja excede la capacidad de utilización de los mismos, la energía de excitación y los equivalentes de reducción generados producen especies parcialmente reducidas de oxígeno y radicales libres en el cloroplasto, moléculas reactivas que oxidan determinadas moléculas diana. Las plantas tienen muchos sistemas para disipar la energía procedente del exceso de fotones, bien

suprimiendo la producción de moléculas reactivas, bien drenando la energía en exceso en forma de fluorescencia y calor. Varios mecanismos son puestos en juego por las células fotosintéticas para evitar el daño producido por el exceso de fotones: fotorrespiración, regulación del PS II asociada al gradiente de protones tilacoidal, fotorreducción del oxígeno molecular a agua, fotofosforilación cíclica, y ajuste de la tasa de excitación del PS I y PS II.

Deficiencias de ciertos nutrientes minerales, tanto macro (fosfatos, Mg^{2+}) como micro (Fe, Cu, etc) pueden también hacer disminuir el ritmo fotosintético. Sumado a las condiciones ambientales, algunos factores endógenos afectan la capacidad de utilización de los fotones por parte de la hoja. Por ejemplo, una baja utilización de fotosintatos en los órganos de destino afecta negativamente la capacidad fotosintética de la hoja.

Es importante considerar, además, que la foto-producción de radicales y especies activas de oxígeno siempre existe en el cloroplasto, aún cuando las condiciones para la fotosíntesis sean favorables. Por lo tanto, la presencia de un sistema protector es esencial para evitar el daño celular. El oxígeno liberado en el cloroplasto, producto de la fotólisis del agua, es principalmente reducido al nivel del Fotosistema I (reacción de Mehler), con la formación resultante de superóxido. Este radical es dismutado a O_2 y H_2O_2 por la superóxido dismutasa. Este peróxido puede rápidamente alcanzar niveles tóxicos (10 μM), deletéreo para algunas de las enzimas reguladas por sistemas redox (tiol-disulfuro) en el mecanismo de asimilación del carbono. El peróxido de hidrógeno es, entonces, removido por una ascorbato peroxidasa cloroplastídica, con la formación secuencial de monodehidroascorbato y dehidroascorbato (Foyer y Mullineaux, 1998). En el proceso de regeneración de ascorbato (Figura 1.7), el primero es reducido por Fd vía una monodehidroascorbato reductasa, y el segundo a través de una glutathion reductasa acoplada a NAD(P)H (reacción peroxidasa de Mehler), un sistema esencial bajo condiciones de estrés (Noctor *et al.*, 1998). La alta concentración de ascorbato en el cloroplasto (10-30 mM) aumenta como respuesta al incremento de la intensidad de la luz debido a su participación, no sólo en el ciclo de la peroxidasa de Mehler, sino también como reductor de otras especies activas de oxígeno. Además, éste compuesto está también comprometido en los pasos de deepoxidación del ciclo de la violoxantina.

En relación a estos mecanismos, la alta concentración de Trx *h* encontrada en el floema (Ishiwatari *et al.*, 1995) ha permitido sugerir que la Trx *h* puede ejercer una

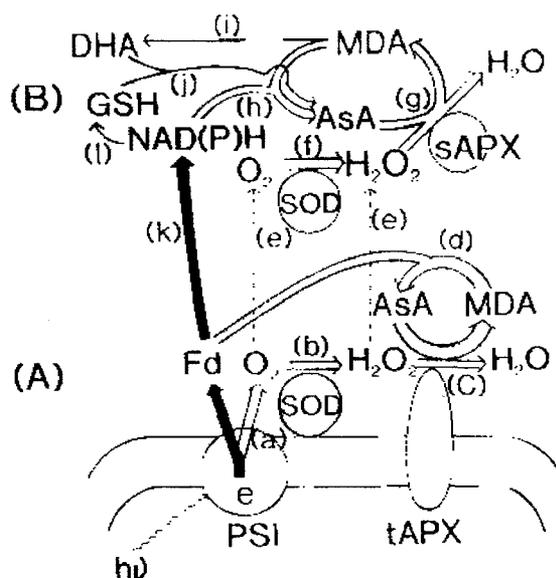


Figura 1.7 - Sistemas detoxificantes del anión superóxido y peróxido de hidrógeno que operan en el cloroplasto. (A) sistema tilacoidal: (a) difusión al estroma del radical superóxido generado dentro de las membranas tilacoidales; (b) dismutación del anión superóxido catalizada por la superóxido dismutasa (SOD) ligada a las membranas tilacoidales; (c) reducción del peróxido de hidrógeno por ascorbato (AsA) catalizada por la ascorbato peroxidasa ligada a la membrana tilacoidal (tAPX), (d) reducción del radical monodehidroascorbato (MDA) por la ferredoxina reducida en el PS I. (B) sistema que opera en el estroma: (f) reacción de SOD de estroma; (g) reducción de peróxido por la ascorbato peroxidasa de estroma (sAPX); (h) reducción del monodehidroascorbato por NAD(P)H, catalizada por monodehidroascorbato reductasa; (i) dismutación espontánea del MDA a dehidroascorbato (DHA) y AsA; (j) reducción de DHA a AsA por una GSH catalizada por DHA reductasa; (k) reducción de NADP por ferredoxina reducida catalizada por Fd-NADP reductasa, y producción de NADH catalizada por una transhidrogenasa; y (l) reducciones del glutatión oxidado por NADPH catalizada por glutatión reductasa. Adaptado de Asada (1994).

función como agente antioxidante bajo condiciones de estrés. Esto está apoyado por el bajo potencial rédox de las Trxs (entre -200 y -300 mV), en comparación con los de ascorbato ($+58$ mV) y glutatión (-250 mV) (Salamon *et al.*, 1995).

1.2.1 - Estrés lumínico y fotoinhibición

La fotoinhibición se puede definir como la inhibición, dependiente de la luz, de las reacciones fotosintéticas reguladas por ésta (Osmond, 1994). Entender la fotoinhibición requiere aclarar primero cómo opera el aparato fotosintético en presencia de un exceso de fotones. Con intensidades de luz cercanas a $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PAR), las plantas están ya expuestas a un exceso de fotones del 50 % (Anderson y Osmond, 1987), lo que en otras palabras significa que la eficiencia fotosintética puede bajar al 50 %. El blanco principal de la fotoinhibición es el PS II. Su vulnerabilidad está relacionada con la capacidad que tiene de generar oxidantes, y reductores, lo suficientemente fuertes como para quedar fuera del control de los mecanismos fisiológicos de regulación.

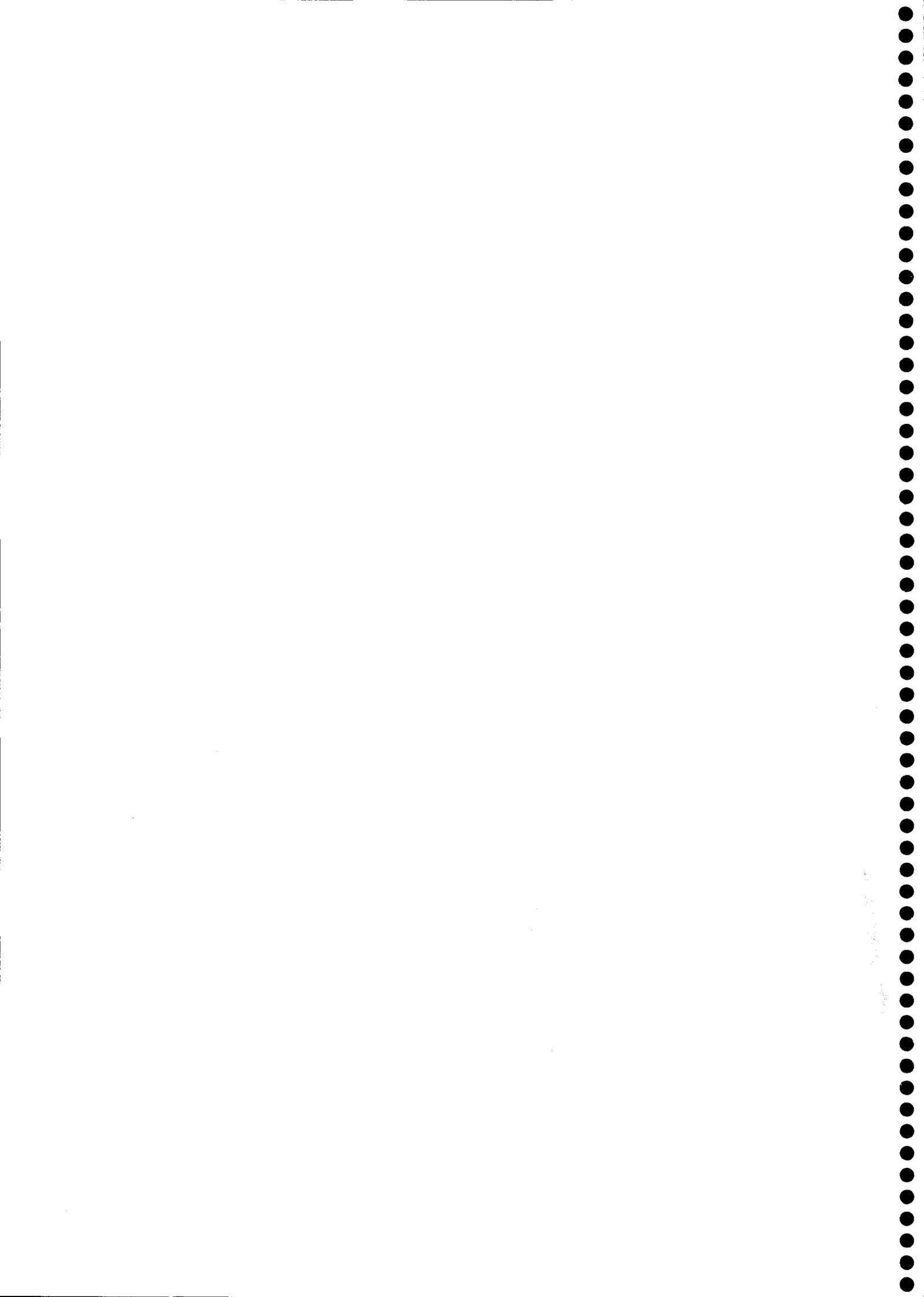
Se han identificado dos rutas distintas para el daño fotoinducido al PS II, denominadas como mecanismos del lado aceptor, y mecanismos del lado dador (Andersson y Barber, 1996). Los primeros conllevan la recombinación del par $\text{P680}^+\text{Phe}^-$, donde el P680 es el dador primario del PS II y Phe (feofitina) el aceptor primario de electrones de este fotosistema (Figura 1.2). La recombinación ocurre cuando la plastoquinona Q_A es doblemente, no secuencialmente, reducida, por ejemplo con alta iluminación, lo que provoca la formación de un estado triplete del P680 que lleva a la formación del altamente tóxico oxígeno singlete. Como consecuencia se produce la proteólisis de la proteína D1. Los mecanismos que operan del lado del dador no son, sin embargo, dependientes de la presencia de oxígeno, y resultan del daño debido a la larga vida de ciertos estados de oxidación (por ejemplo P680^+). El alto potencial rédox de esos estados provocan la oxidación de pigmentos y aminoácidos. La generación de especies reactivas de oxígeno no afecta exclusivamente al PS II. En especial se cita a ciertas enzimas del ciclo de Calvin, FBPasa y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, como afectadas inicialmente por la fotoinhibición (Asada, 1994). Para hacer frente a este daño las plantas poseen varios mecanismos para la supresión de las moléculas reactivas foto-producidas, ya mencionados anteriormente.

Cuando la capacidad de los mecanismos de protección es excedida, el daño conlleva la degradación de la clorofila y la destrucción del cloroplasto.

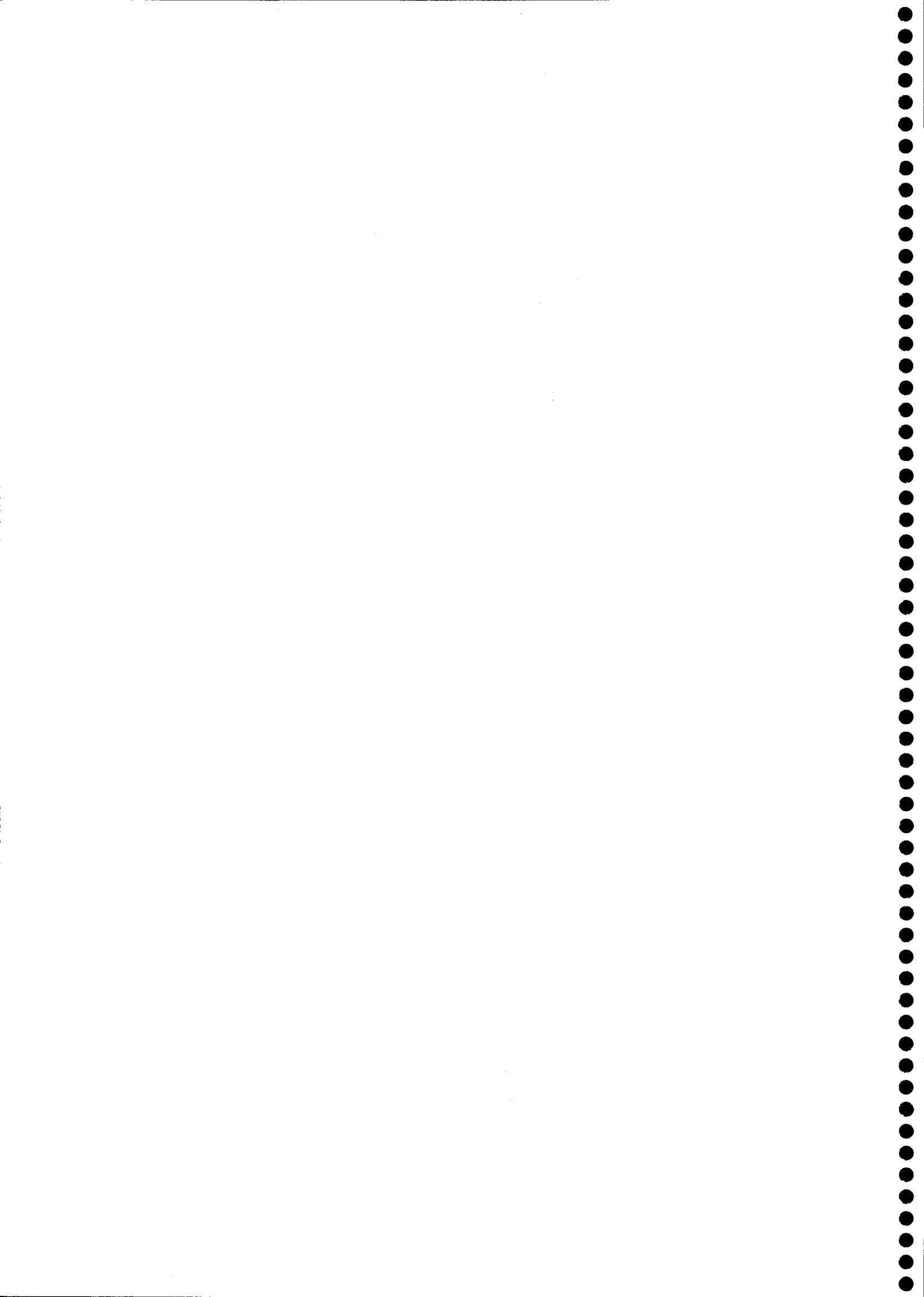
1.2.2 – Estrés lumínico asociado a estrés térmico

Como se ha mencionado, la exposición de las hojas a una elevada irradiancia puede redundar en el daño de la maquinaria fotosintética. La presencia simultánea de otros factores estresantes, como la sequía o las bajas temperaturas, puede aumentar la susceptibilidad a la fotoinhibición por elevadas irradiancias (Powles, 1984). En contraposición, la luz parece tener un efecto protector frente a altas temperaturas (Havaux y Strasser, 1990, 1992; Havaux *et al.*, 1991). El sentido biológico de esta protección se puede explicar considerando que ambos factores, alta luz y calor, generalmente se dan en forma simultánea en la naturaleza. Pero en algunos casos, en climas templados y fríos, las plantas están a menudo expuestas a altas irradiancias junto a bajas temperaturas.

A la fotoinhibición que se da en estas condiciones se la ha relacionado generalmente con la actividad del PS II, provocando la generación de muchos centros de reacción inactivos de este fotosistema (Krause, 1994). Este fenómeno tiene el sentido fisiológico de conferir estabilidad al aparato fotosintético frente a un exceso de fotones que no puede ser aprovechado por el mismo. Desde este punto de vista la fotoinhibición ejercería una función protectora. A medida que se prolongan las condiciones de estrés las plantas se hacen menos susceptibles de sufrir fotoinhibición, logrando cierto tipo de aclimatación. Algunos autores han propuesto, incluso, que la aclimatación a bajas temperaturas podría aumentar la tolerancia a elevadas intensidades de luz (Somersalo y Krause 1989, 1990). La mayoría de los trabajos relacionados con el efecto de las altas irradiaciones asociadas a elevadas o bajas temperaturas, se circunscriben a la etapa lumínica de la fotosíntesis. Es lógico pensar que las plantas necesitan adecuar otros mecanismos, como el de la reducción del CO₂, para hacer frente a estas condiciones de estrés. Como se ha mencionado, el estrés implica la generación en el cloroplasto de especies reactivas de oxígeno, con la consecuente alteración del equilibrio redox del mismo. Será interesante analizar cómo responden los sistemas enzimáticos regulados por óxido-reducción frente a estas condiciones.



2. Objetivos



Aparte de su papel regulador en el ciclo de Calvin, la enzima FBPasa tiene una importante función fisiológica, que es la de desviar el carbono reducido en fotosíntesis hacia la formación de almidón transitorio dentro del cloroplasto, en momentos en que las condiciones ambientales permiten una alta tasa de fotosíntesis, y en que la demanda de azúcares por otros órganos de la planta no es apremiante, con una síntesis de sacarosa en el citosol deprimida. Esto permite que cuando las condiciones de movilización de sacarosa vía floema se restablezcan, el almidón se degrade para dar lugar a la formación nuevamente de triosas-fosfato, que son exportadas al citosol para servir de sustrato para la síntesis de sacarosa. Se ha determinado en estudios previos la modulación por la luz de la expresión de esta enzima, tanto a nivel traduccional como transcripcional, así como la regulación de su actividad. Esta última tiene lugar por un proceso redox vía la intervención de su activador fisiológico, la *Trx f*.

Por su parte, la NADP-MDH en plantas C_4 cumple una función importante en el ciclo de movilización del carbono, primariamente fijado en las células del mesófilo, hacia las células de la vaina vascular, en cuyos cloroplastos tiene lugar la reducción fotosintética del mismo. Pero en plantas C_3 , como es el caso del guisante, su actividad estaría dedicada casi exclusivamente a equilibrar el estado de óxido-reducción entre el estroma del cloroplasto y el citosol. Esta enzima, al igual que la FBPasa, está regulada vía redox, y su activador fisiológico es la *Trx m*.

Los objetivos a cumplir en una primera etapa se llevaron a cabo sobre plantas crecidas en condiciones normales de luz, temperatura y humedad, tendentes a resolver las siguientes cuestiones:

- I. Evolución del sistema modulador de la FBPasa y de la NADP-MDH durante la ontogenia de plantas de guisante. Estos estudios se realizaron a los niveles de: a) medición de las correspondientes actividades enzimáticas, y b) determinación de la expresión transcripcional y traduccional de las citadas enzimas, y de sus moduladores *Trx f* y *Trx m*.
- II. Niveles de actividad y expresión transcripcional y traduccional de FBPasa, NADP-MDH, *Trx f* y *Trx m*, en distintos órganos de la planta de guisante durante su ontogenia.

Las plantas durante su desarrollo están sujetas en numerosas ocasiones a condiciones adversas del ambiente. Para hacer frente a tales situaciones ponen en juego diversos sistemas de protección. Si la capacidad de estos sistemas no es superada, las plantas sobreviven logrando aclimatarse. En general, los primeros síntomas de estrés están relacionados con la generación de especies activas de oxígeno, y los mecanismos de defensa que se ponen en juego tienden a detoxificar la célula de tales compuestos perjudiciales. Por su potencial rédox, las Trxs podrían actuar como moléculas antioxidantes, cumpliendo funciones similares al ascorbato y glutatión. Además, en lo que atañe al proceso fotosintético en sí, el PS II es especialmente sensible a condiciones de estrés ambiental. El funcionamiento de la maquinaria fotosintética, en estos casos, depende de la velocidad de reparación, síntesis y ensamblado de los componentes de dicho complejo. Existen antecedentes que dan a la regulación rédox, vía el sistema ferredoxina/tiorredoxina, especial intervención en estos mecanismos de reparación.

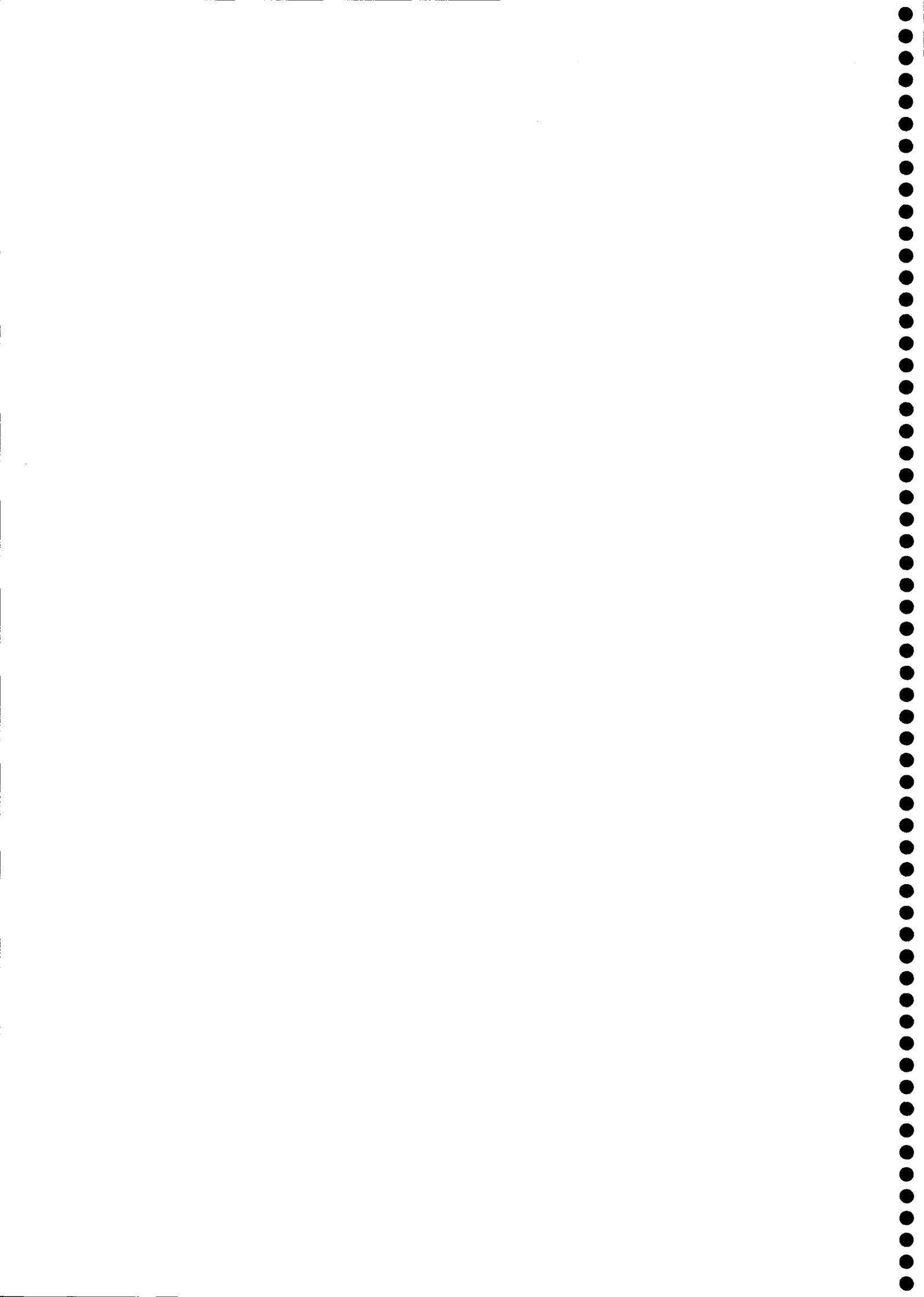
En una segunda etapa los estudios se realizaron en plantas expuestas a condiciones desfavorables del ambiente, y los objetivos a cumplir fueron los siguientes:

- III. Analizar los niveles de expresión de las Trxs *f* y *m* y de sus proteínas diana FBPasa y NADP-MDH, en plantas sometidas a elevadas irradiancias.
- IV. Asociar las condiciones de estrés lumínico a altas o bajas temperaturas, y estudiar los niveles de expresión de las citadas proteínas.

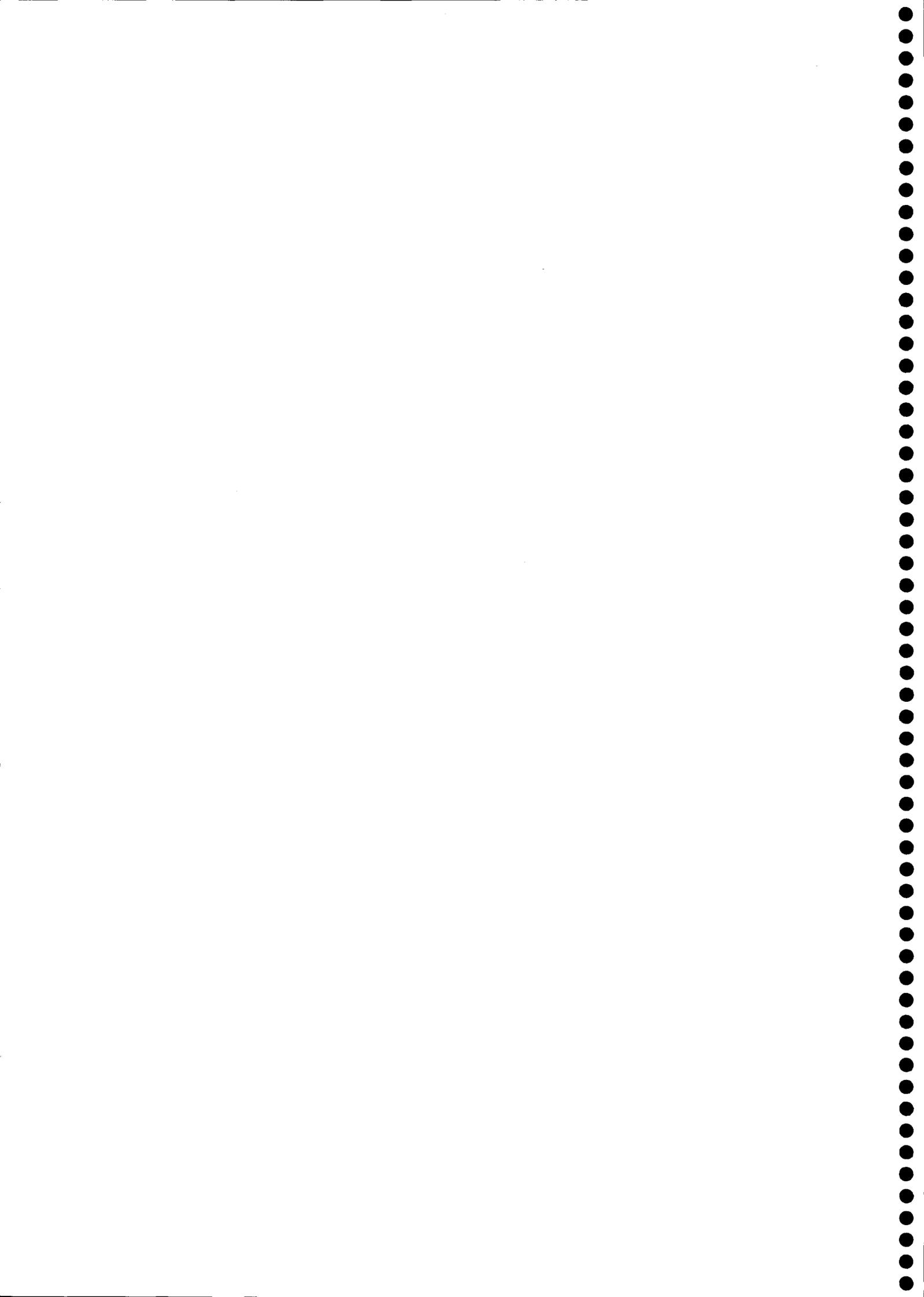
Con estos objetivos se pretendía, por un lado, ayudar a dilucidar la participación de las Trxs en los mecanismos de defensa antiestrés y, además, estudiar las posibles modificaciones en la actividad y en los niveles de expresión de las enzimas FBPasa y NADP-MDH cuando las condiciones dejan de ser las adecuadas para un crecimiento normal de las plantas.

Para alcanzar los objetivos enunciados se diseñó el siguiente plan de trabajo:

- a - Expresión heteróloga y purificación de FBPasa para obtener anticuerpos policlonales. De anti-NADP-MDH, anti-Trx *f* y anti-Trx *m* existía una dotación suficiente en nuestro laboratorio.
- b - Expresión heteróloga y purificación de Trx *m* con vistas a su utilización en las determinaciones de actividad NADP-MDH dependiente de Trx exógena. Para la medición de la actividad FBPasa se utilizó Trx *f* expresada y purificada previamente en nuestro laboratorio.
- c - Estandarización de las condiciones de cultivo adecuadas para que las plantas de guisante pudieran completar el ciclo ontogénico en hidroponía.
- d - Puesta a punto de la técnica de RT-PCR para el análisis de los niveles de expresión transcripcional en muestras foliares, y de otros órganos, de plantas de guisante.
- e - Determinación de actividades enzimáticas y niveles de expresión transcripcional y traduccional durante la ontogenia, en muestras foliares y de diferentes órganos procedentes de plantas crecidas en condiciones ambientales normales.
- f - Imposición de condiciones de estrés, y medición de respuestas de tipo fisiológico de las plantas para analizar la magnitud del efecto alcanzado.
- g - Mediciones de actividades enzimáticas, niveles proteicos y de mRNAs específicos, en plantas expuestas a condiciones de estrés lumínico, y de estrés lumínico asociado a estrés térmico.



3. Materiales y Métodos



3.1 - Material botánico

Los estudios se realizaron utilizando plantas de guisante (*Pisum sativum* cv Lincoln).

3.2 - Condiciones de crecimiento

3.2.1 - Germinación

Las semillas se dispusieron sobre vermiculita adecuadamente humedecida en bandejas de plástico. La germinación se condujo en cámara climática a $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (PAR) de irradiación, en fotoperiodo de 16 horas y 25/20°C de temperatura día/noche. Se aplicó un riego periódico y las plántulas se recogieron transcurridos 10 días para proceder a su colocación en macetas de cultivo hidropónico.

3.2.2 - Crecimiento en hidroponía

Plántulas de 10 días desde la siembra inicial fueron transplantadas a macetas de cultivo hidropónico en las condiciones descritas para germinación (condiciones control). Las macetas utilizadas fueron de dos tipos. Cubetas cilíndricas de metacrilato transparente de 2 litros de capacidad, recubiertas con plástico negro para evitar el desarrollo de algas. La tapa de las mismas también era de color negro y poseía seis agujeros por los que se introducían las plántulas, sostenidas por pequeños cilindros de espuma de plástico. Este tipo de macetas se utilizó en los ensayos de ontogenia. Para los ensayos de estrés lumínico resultaron inadecuadas debido a que la excesiva irradiancia provocaba el calentamiento de la solución hidropónica, a causa del plástico negro que las recubría. En estos ensayos se emplearon recipientes de corcho blanco (tergopol) de 5 litros de capacidad, herméticamente cerrados para evitar el paso de la luz. En cada uno de ellos se colocaron 12 plantas a través de sendos agujeros, sostenidas con cilindros del mismo material que el recipiente, que no dejaban pasar la luz al interior del mismo. Los medios de cultivo eran continuamente aireados a través de finos tubos de vidrio que se introducían en las soluciones hidropónicas, por los que se insuflaban pequeñas corrientes de aire producidas por bombas impulsoras. En los ensayos de ontogenia, a medida que el tamaño de las plantas lo exigía, fue necesario ir colocando guías de madera fijadas en las tapas de las macetas.

El medio líquido de cultivo utilizado fue del de Hewitt (1960), con la siguiente

fórmula de preparación:

Solución A de micronutrientes:

BO ₃ H ₃	1.4375 g
SO ₄ Zn.7H ₂ O	0.1099 g
Cl ₂ Mn.4H ₂ O	0.9002 g
SO ₄ Cu.5H ₂ O	0.1000 g
H ₂ O	hasta 500 ml

Solución B de macronutrientes:

(NO ₃) ₂ Ca.4H ₂ O	22.5220 g
NO ₃ K	1.7620 g
(NO ₃) ₂ Mg.6H ₂ O	3.1932 g
EDTA Fe	1.4112 g
H ₂ O	hasta 1000 ml

Solución C de macronutrientes:

SO ₄ Mg.7H ₂ O	5.7460 g
H ₂ O	hasta 1000 ml

Solución D de macronutrientes:

PO ₄ H ₂ K	12.6880 g
H ₂ O	hasta 1000 ml

La fórmula para la preparación de 5 litros de medio nutritivo fue la siguiente:

Solución A de micronutrientes	5 ml
Solución B de macronutrientes	250 ml
Solución C de macronutrientes	250 ml
Solución D de macronutrientes	250 ml
H ₂ O	hasta 5000 ml

Posteriormente se ajustó el pH hasta un valor de 5.5 con KOH 1N.

La concentración final del medio de cultivo era entonces:

NO ₃ ⁻	11.65 meq/l
PO ₄ H ₂ ⁻	4.66 "
SO ₄ ²⁻	2.33 "
K ⁺	5.96 "
Ca ²⁺	9.54 "
Mg ²⁺	3.58 "
Fe	10.00 ppm
Mn	0.50 "
B	0.50 "
Cu	0.05 "
Zn	0.05 "

Diariamente se reponía el agua transpirada, y el medio de cultivo se cambiaba totalmente cada 10 días.

3.2.3 - Tratamientos de estrés

En estos ensayos los recipientes conteniendo las plantas se colocaron bajo focos halógenos de 1500 W, interponiendo entre ambos, para evitar un sobrecalentamiento del material vegetal, una piscina con una columna de agua circulante de 5 cm de espesor. En estas condiciones se consiguió que la radiación fotosintéticamente activa que incidía sobre las plantas fuera de 2000 a 2500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Este sistema se colocó dentro de una cámara climática Koxka, modelo Api 19/2 MPG, en la cual se ajustó el control de temperatura día/noche a valores de 25/20°C (temperatura normal) ó 35/30°C (temperatura alta). Para ensayos a bajas temperaturas (15/10°C, u 8°C en luz continua) fueron desconectadas las resistencias de la cámara. Con este sistema se lograron diferentes combinaciones de estrés lumínico y térmico.

3.3 - Fotosíntesis neta

3.3.1 – Fundamento y descripción del equipo

La determinación de la tasa de fotosíntesis neta se realizó mediante IRGA (infra-red gas analyzer). El método se basa en que las moléculas gaseosas heteroatómicas (CO₂ y H₂O, fundamentalmente entre las existentes en el aire) exhiben una absorción al infrarrojo,

siendo máxima para el CO₂ a 4.25 μm. Una fuente de incompatibilidad es el vapor de agua de la atmósfera, así como el emitido por la propia planta en la transpiración, hecho agravado por su presencia en cantidades muy superiores a la del CO₂ atmosférico (unas 340 partes por millón). Sin embargo, el vapor de agua tiene su máximo de absorción a 2.7 μm, con lo que el problema se podría obviar efectuando la medida a 4.25 μm, longitud de onda a la que la absorción del vapor de agua es pequeña. No obstante, y para eliminar problemas adicionales, el vapor de agua se va retirando del circuito gaseoso haciendo circular éste por una columna de perclorato potásico, un desecante poderoso.

Hay que indicar que mediante este procedimiento se lleva a cabo una medida de fotosíntesis neta, es decir, se determina el CO₂ asimilado por la hoja menos el CO₂ emitido por respiración, tanto mitocondrial como en fotorrespiración. Por lo tanto, se mide el CO₂ neto incorporado por la planta. El equipo utilizado es un LiCor mod. LI-6200, de circuito cerrado. Ello quiere decir que, una vez iniciada la medida, no hay aporte exógeno de gas alguno. En consecuencia, la concentración de CO₂ del circuito irá disminuyendo con el tiempo a causa de la actividad fotosintética de la planta, constituyendo la medida de esta caída la base de la determinación. El esquema experimental del equipo está constituido por la cámara fotosintética, que albergará la planta o parte de la misma, unida mediante tubos adecuados (impermeables y no absorbentes para el CO₂) al equipo de medida o IRGA propiamente dicho. Entre ambos se intercala una bomba de impulsión de la masa gaseosa estanqueizada, así como la columna absorbente de perclorato potásico antes mencionada. Adicionalmente el equipo permite intercalar opcionalmente una columna de cal sodada (Figura 3.1 a).

La célula de medida es una cámara de metacrilato incoloro de 250 ml de capacidad, que puede cerrarse a través de una charnela, aprisionando entre las dos mitades de forma estanqueizada una hoja, o parte de la misma en nuestro caso. Mediante un dispositivo fabricado al efecto, la cámara delimita como superficie a fotosintetizar un disco foliar de 3.14 cm². Esta célula fotosintética alberga varios sensores en su interior: de humedad, de temperatura del aire, y de temperatura de la hoja, amén de unos microventiladores que homogeneizarán el contenido gaseoso de la célula. En el exterior existe adosado un sensor cuántico para medida de la radiación incidente sobre la cámara (Figura 3.1b).

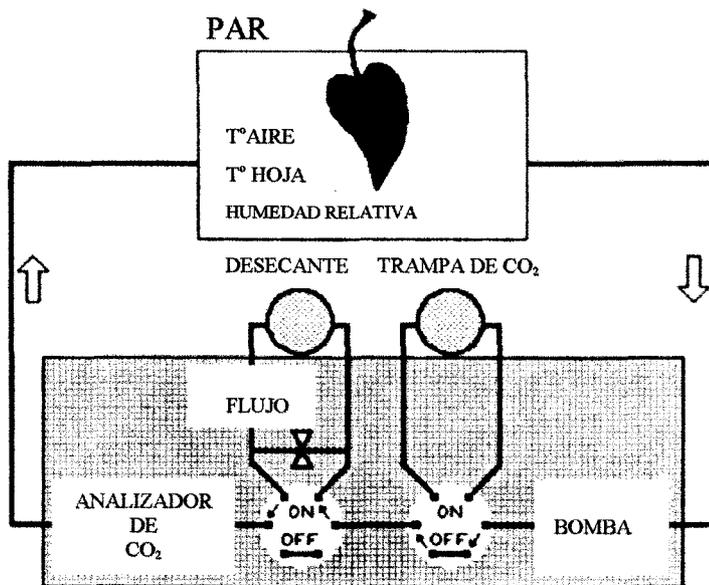
3.3.2 – Medida de fotosíntesis neta

La fotosíntesis neta se determinó a la concentración de CO₂ ambiental (aproximadamente 340 ppm), medida al comienzo de la experiencia, y bajo una irradiación del tejido foliar de la cámara de 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR, determinada *in situ* por el sensor cuántico anejo a la célula de medida. El equipo se calibró antes de cada serie de determinaciones con una concentración de CO₂ de 300 ppm en aire, suministrada por un pequeño cilindro de concentración certificada (Abelló-Linde). De las distintas posibilidades del equipo, el IRGA se configuró para que realizase una medida del CO₂ circulante cada 30 segundos, durante 5 minutos. Una vez introducidos en la memoria del equipo los datos de superficie foliar irradiada y la presión atmosférica ambiental, los datos finales de fotosíntesis neta eran proporcionados por el ordenador del IRGA a partir de las medidas anteriores. La presión atmosférica ambiental, así como la temperatura del aire circulante, sirven para reducir los valores de CO₂ leídos a condiciones normales de presión y temperatura, lo que lleva a cabo el aparato de forma continuada merced a la capacidad de cálculo de la computadora incorporada.

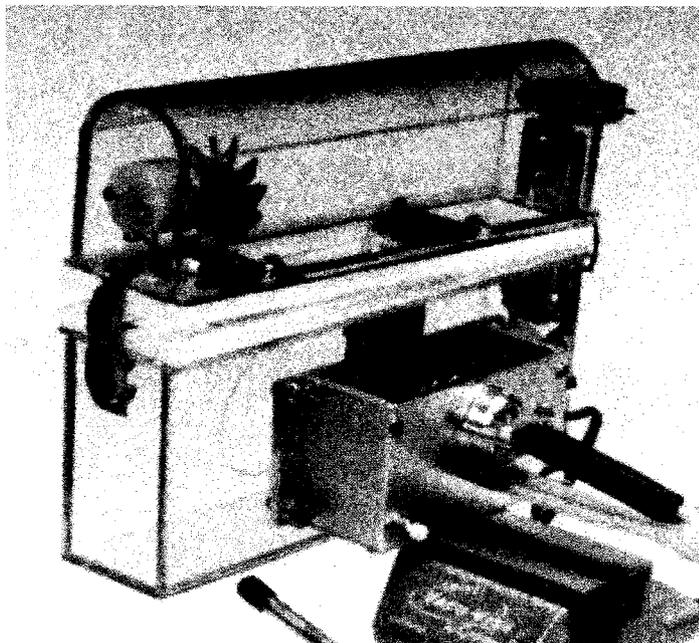
La determinación se lleva a cabo *in vivo*, es decir, sin separar la hoja del pie de planta, hoja que luego queda incorporada al metabolismo general del vegetal. Los valores de CO₂ circulante leídos cada 30 segundos vienen expresados en partes por millón (ppm) en relación v/v. Teniendo en cuenta que la medida en IRGA es una determinación espectrofotométrica basada, como todas ellas, en relaciones molares, los datos primeros obtenidos por el aparato vendrán expresados en $\mu\text{mol/litro}$, que son inmediatamente transformados en ppm (v/v) por el ordenador incorporado. No obstante, los valores finales de fotosíntesis neta aparecen expresados en μmol de CO₂ asimilado por unidad de tiempo (segundos) y de superficie foliar (m^2).

3.4 - Medidas de fluorescencia

La energía luminosa absorbida por la clorofila de una hoja es usada fundamentalmente para llevar a cabo el proceso fotosintético, aunque parte puede perderse como calor o volver a emitirse como fluorescencia. La fluorescencia de la clorofila *a* de plantas superiores refleja la actividad fotosintética que tiene lugar en el cloroplasto, dependiendo de múltiples factores como el transporte electrónico fotosintético a lo



(a)



(b)

Figura 3.1 - Esquema experimental (a) y cámara de medida (b) del IRGA (infra-red gas analyzer)

largo de la membrana tilacoidal, el gradiente protónico generado entre el estroma y el lumen tilacoidal, la síntesis de ATP, la fosforilación del LHC II, y las reacciones enzimáticas del ciclo de Benson-Calvin. A temperaturas fisiológicas la fluorescencia es emitida fundamentalmente por el fotosistema II, por lo que los cambios inducidos en fluorescencia y su cinética como respuesta a situaciones de estrés, se deben principalmente a variaciones en dicho complejo (Baker y Horton, 1988).

Kautsky y Hirsch (1931) observaron cambios en la fluorescencia de la clorofila α cuando una hoja se iluminaba rápidamente después de un periodo de adaptación a la oscuridad de unos 15-20 minutos. La cinética característica de esta inducción de la fluorescencia constituye el efecto Kautsky, cuyas fases se denominan OI-DP-SMT (Papageorgiu, 1975). En el presente trabajo solamente se han analizado las fases OI-DP. Cuando el tejido foliar utilizado se ilumina con una intensidad de luz incapaz de generar un transporte electrónico, y todos los centros de reacción aún permanecen "abiertos" (Q_A oxidado), aparece una señal de fluorescencia inicial denominada F_0 , propia de la antena. Posteriormente, la iluminación con luz actínica suficientemente intensa provoca un incremento de fluorescencia desde F_0 a un punto de inflexión I, seguida de una depresión denominada fase D, que reflejan situaciones de equilibrio entre las formas de reducción y reoxidación de Q_A . Finalmente se alcanza un pico (P) o valor de fluorescencia máxima (F_M) cuando todos los centros de reacción están "cerrados" (Q_A reducido). La relación F_M/F_0 tiene un valor comprendido entre 4 y 5, y distintas condiciones de estrés son capaces de inducir variaciones en el mismo.

La medida de la fluorescencia se puede efectuar utilizando luz de una longitud de onda determinada, y detectar la fluorescencia en la zona correspondiente a 685 nm. Este método de medida, aunque útil, limita las posibilidades experimentales, ya que es difícil medir la fluorescencia inicial F_0 (se consigue drenando los electrones que pudieran existir atrapados a nivel del PS II, mediante unos cuantos pulsos de baja intensidad por arriba de 700 nm, que pone en marcha el PS I y drena dichos electrones), no permite el análisis del "quenching", y cada aumento de intensidad lumínica provocará el de la fluorescencia, complicando aún más la interpretación de los resultados. Sin embargo, el uso de una luz modulada débil como radiación de medida, en conjunción con un sistema de fluorescencia que sólo recoge la emitida a la frecuencia y fase de la luz modulada, permite hacer una

medida de la fluorescencia en presencia de luz continua de cualquier longitud de onda. Normalmente, la luz modulada es de una intensidad baja ($10 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$), incapaz de generar una curva de fluorescencia. Una fuente de luz continua (luz actínica) con una intensidad de, al menos, $20 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ se incluye en instrumentos de este tipo para inducir la curva de Kautsky.

3.4.1 - Descripción del fluorímetro de fluorescencia modulada

El sistema mínimo del fluorímetro de fluorescencia modulada desarrollado por el Dr. Schreiber (Universidad de Würzburg) se denomina PAM (Walz, Effeltrich, Alemania). Está constituido por la unidad de control PAM 101, la unidad emisor-detector ED 101, y la fibra óptica F 101. El equipo comprende, además, las unidades PAM 103 y la fuente de luz FL 103. La unidad PAM 101 controla la intensidad y frecuencia de la luz modulada mediante pulsos de luz de 650 nm de $1 \mu\text{s}$ de duración. Los pulsos pueden ser de 1.6 kHz para la determinación de F_0 o de 100 kHz cuando se estudia la cinética de la señal de fluorescencia inducida por luz, ya que en este último caso se mejora la relación señal/ruido. El haz de luz pulsado atraviesa un filtro de paso corto (longitud de onda $< 680 \text{ nm}$) con el que se elimina la componente de cola de longitud de onda larga. Este haz llega hasta la hoja a través de la fibra óptica F 101; se crea, entonces, una señal de fluorescencia que, conducida nuevamente por la fibra óptica F 101, llega al fotodiodo detector de la unidad ED 101, que está protegido con un filtro de paso largo (longitud de onda $> 700 \text{ nm}$). Además, el sistema de preamplificación que contiene este módulo elimina selectivamente todas las señales, a excepción de la fluorescencia excitada, durante los pulsos de medida de $1 \mu\text{s}$, siendo otra vez amplificada selectivamente dicha señal en la unidad PAM 101.

La información generada fue procesada a través de un sistema informático acoplado a dicho equipo. Junto a los módulos descritos está la unidad PAM 103, que regula el tiempo y la intensidad de los pulsos de luz actínica procedentes de una lámpara Schott KL 1500/KL 1500 (Walz) que se encuentra en la unidad FL 103. Esta fuente se suele utilizar en la generación de pulsos saturantes de luz para la determinación de los valores máximos de fluorescencia (F_M).

3.4.2 - Determinación de los valores de F_0 y F_M .

Se determinaron la fluorescencia máxima (F_M) y la fluorescencia basal (F_0) en hojas adaptadas a la oscuridad durante 20 minutos. La determinación de la señal de fluorescencia F_0 fue llevada a cabo por el PAM 101 usando un rayo de luz modulada de frecuencia de 1.6 kHz y una intensidad de luz de 10 mW.m^{-2} , incapaz de inducir una transición electrónica. La fluorescencia máxima F_M fue determinada utilizando luz modulada con una frecuencia de 100 kHz y aplicando un pulso de luz actínica saturante de 20 W.m^{-2} , suficiente para reducir todo Q_A . Los valores de F_0 , F_M y parámetros cinéticos fueron tratados con un programa de ordenador suministrado por la casa Walz, denominado DA-100, versión 1.06a.

3.5 - Toma de muestras y preparación de extractos foliares

Las muestras de hojas y demás tejidos analizados se recolectaron a los tiempos determinados, y luego de registrar el peso fresco de las mismas se conservaron a -80°C hasta su utilización.

Los extractos foliares se prepararon homogeneizando el tejido vegetal congelado a una relación 1/4 (p/v) con tampón Tris-ClH 25 mM pH 7.5, Cl_2Mg 5 mM, 2-mercaptoetanol 5mM, EDTA. Na_2 0.5 mM, y centrifugando posteriormente a $11000\times g$ durante 15 min. En el sobrenadante se determinó el contenido de proteínas, se midieron las actividades enzimáticas, o se analizó el contenido de proteínas específicas mediante ELISA o Western-blotting.

3.6 - Determinación del contenido en clorofila

Se determinó el contenido en clorofila según el método de Arnon (1949). El tejido vegetal congelado fue homogeneizado en una relación 1/8 (p/v) con una mezcla acetona/agua (4/1). Se centrifugó a $11000\times g$ 5 min. El sobrenadante se pasó a una probeta graduada o a un matraz aforado, y en el precipitado se repitió la extracción dos veces más. Se reunieron los extractos, y se enrasó a un volumen aproximado a 1/100 (p/v) de tejido original / líquido extractante. Estas operaciones se realizaron en la penumbra para evitar la fotodegradación de la clorofila. Finalmente se leyó la absorbancia de la solución a 652 nm, y se calculó la concentración de clorofila considerando que una absorción específica de 34.5×10^3 corresponde a una concentración de 1g/ml de clorofila.

3.7 - Determinación del contenido de proteínas

El contenido de proteínas solubles totales se determinó siguiendo la metodología descrita por Bradford (1976). Se mezclaron 800 μ l de cada dilución de muestra y 200 μ l de solución colorante sin diluir (solución de Azul Coomassie G-250 en ácido fosfórico y metanol, BioRad). Como patrón se utilizaron soluciones de distinta concentración de albúmina sérica.

3.8 - Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

La electroforesis vertical en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, según Laemmli (1970), se llevó a cabo como control de pureza en los procesos de purificación de proteínas, y como primer paso en la técnica de Western-blotting. Se utilizaron dos concentraciones diferentes de acrilamida/bisacrilamida en el gel separador: 15% para las tiorredoxinas, y 12.5% para FBPassa y NADP-MDH. Para el gel concentrador se utilizó una concentración del 6%. Las fórmulas de preparación en cantidad necesaria para dos mini-geles (Mini-Protean II, BioRad) se expresan en la siguiente tabla:

	Gel separador 15 %	Gel separador 12.5 %	Gel concentrador 6 %
Acrilamida 30% / bis-acrilamida 0.8%	5 ml	4.17 ml	0.6 ml
Tris ClH 1.5 M pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	0.75 ml
Agua destilada	2.36 ml	3.18 ml	1.62 ml
SDS 10 %	100 μ l	100 μ l	30 μ l
Persulfato amónico 10 %	50 μ l	50 μ l	15 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l	3.6 μ l

El desarrollo electroforético se llevó a cabo con tampón Tris-ClH 0.025 M pH 8.3, glicina 0.192 M, SDS 0.1% (p/v), a un voltaje constante de 100 voltios hasta que el colorante marcador llegaba cerca del final del recorrido de la placa.

Como marcadores de peso molecular se utilizó una mezcla (Pharmacia) compuesta por las siguientes proteínas liofilizadas:

Proteína	Masa molecular
Fosforilasa b	94000 daltons
Albúmina	67000 “
Ovoalbúmina	43000 “
Anhidrasa carbónica	30000 “
Inhibidor de tripsina	20100 “
Lactoalbúmina	14400 “

100 µg de cada una de ellas se disolvió en 100 µl de tampón Tris-ClH 0.125 M pH 6.8, de los que se utilizaban 10 µl para cada gel. Después de añadirle tampón de muestra Tris-ClH 0.125 M pH 6.8, SDS 4 %, 2-mercaptoetanol 5 %, sacarosa 20 %, y azul de bromofenol 0.002 % en proporción 1/1 (v/v), tanto las muestras como los marcadores de peso molecular se calentaron en un baño de agua a 100°C durante 5 minutos.

Al finalizar la electroforesis los geles se tiñeron con una solución de azul Coomassie R-250 (Sigma) al 0.025 %, en una mezcla de metanol / ácido acético / agua destilada en proporción 45/10/45, con agitación suave durante 2 horas. Posteriormente se decoloraron en una solución de etanol / ácido acético / agua destilada en proporción 30/10/60.

3.9 - Expresión heteróloga de FBPasa y de Trx *m* de guisante en *E. coli*, y posterior purificación de la proteína obtenida.

El objetivo fue contar, en el caso de la FBPasa, de proteína en un grado de pureza adecuado para la generación de anticuerpos policlonales en conejos, y, en el caso de la Trx *m*, para utilizarla en la determinación de la actividad NADP-MDH dependiente de Trx *m* exógena. En nuestro laboratorio se contaba con una cantidad suficiente de anticuerpos policlonales anti-NADP-MDH, anti-Trx *f* y anti-Trx *m*, así como de proteína Trx *f* purificada para la determinación de actividad FBPasa dependiente de Trx *f* exógena.

De forma general los pasos a efectuar en la expresión de genes foráneos en células de *E. coli* son los siguientes:

- a - Inserción del gen en un vector de expresión, generalmente un plásmido que ha de contener los siguientes elementos:
 - Secuencias que codifiquen un marcador seleccionable, y que aseguren el mantenimiento del vector en la célula.

- Un promotor de transcripción controlable.
- Secuencias de control traduccional, como las del sitio de unión al ribosoma.
- La presencia de un polilinker que facilite la inserción del gen.

b - Una vez construido, el plásmido recombinante es introducido en una cepa adecuada de *E. coli* por transformación. La transferencia de DNA plasmídico al interior de *E. coli* (transformación) fue demostrada por Cohen et al. (1972) a partir de las observaciones de Mandel y Higa (1970), según las cuáles la exposición de *E. coli* a Cl_2Ca a una temperatura próxima a los 0°C favorecía la entrada de DNA del bacteriófago lambda (transfección). Este tratamiento con Cl_2Ca en frío origina un estado especial denominado “competencia”. El protocolo original ha sufrido pocas modificaciones.

Para llevar a cabo este paso es necesario previamente la preparación de células competentes. Se utilizaron células de *E. coli* de la cepa BL21(DE3), y los vectores pET 3d y pET 12a.

3.9.1 - Preparación de células competentes de *E. coli*

Se tomaron 10 μl de un cultivo en fase estacionaria de la cepa correspondiente de *E. coli*, y se diluyó 1000 veces en LB (medio Luria-Bertani). Se llevó a incubar a 37°C con agitación hasta alcanzar la fase exponencial temprana de crecimiento ($A_{600\text{nm}} = 0.4-0.6$). A partir de este momento se trabajó en frío, pues la supervivencia de las células competentes está limitada por la temperatura. A continuación se recogieron las células por centrifugación a $3000\times g$ durante 10 minutos y, resuspendiéndose en 30 ml de una solución de Cl_2Ca 60 mM en PIPES 10 mM pH 7 y glicerol al 15 %, se dejaron incubando en hielo 40 minutos. Se volvieron a recoger por centrifugación de 10 minutos a $2100\times g$ y de nuevo se dispersaron en 6 ml del tampón anterior. Se fraccionaron en alícuotas de 200 μl , las que se conservaron a -80°C hasta su utilización. Posteriormente se procedió a la transformación de éstas células competentes.

3.9.2 - Transformación de células competentes.

A una alícuota de 200 μl de células competentes se añadieron 0.1-1 μg del DNA plasmídico de transformación. Se dejó incubando en hielo durante 1 hora, sometiendo

posteriormente las células a un choque térmico de 42°C durante 2 minutos. Se volvió a colocar en hielo 5-10 minutos, y se adicionaron 800 µl de medio LB sin ampicilina. Una incubación a 37°C durante 30 minutos permitía la expresión de la resistencia a la ampicilina. Finalmente se sembraron de 20 a 200 µl del cultivo en placas selectivas de LB-agar con 100 µg/ml de ampicilina, y se dejaron crecer a 37°C durante toda la noche. Se pudo proceder, entonces, a la expresión heteróloga en *E.coli*.

3.9.3 - Expresión de plásmidos recombinantes

- a** - De una placa de Petri desarrollada como en 3.9.2, se picó una colonia aislada y se colocó en un tubo estéril con 3 ml de LB y 3 µl de ampicilina (100 mg/ml), incubando a 37°C aproximadamente 12 horas.
- b** - En un matraz Erlenmeyer de 500 ml de capacidad se colocaron 150 ml de LB, 150 µl de ampicilina (100 mg/ml) y 150 µl del cultivo obtenido según **a**. Se colocó el Erlenmeyer en agitación orbital a 37°C durante una noche. El resto, no utilizado, de la solución obtenida en **a**, se conservó para el aislamiento del plásmido mediante miniprep y posteriormente chequearlo mediante electroforesis en geles de agarosa.
- c** - La suspensión resultante se distribuye en matraces Erlenmeyer a razón de 30 ml por litro de LB, adicionando además 1 ml de ampicilina (100 mg/ml). Se incubó en agitación orbital a 37°C hasta que la absorbancia de la suspensión a 600 nm se situó entre 0.8 y 1, lo que llevaba aproximadamente 4 horas.
- d** - Alcanzada la absorbancia adecuada se añadió a la suspensión 500 µl de IPTG 0.1 M estéril, y se incubó a 37°C 6 horas.
- e** - La suspensión se centrifugó a 5000xg durante 15 minutos, y se descartó el sobrenadante. En el precipitado se encontraban las células, que se conservaron a -80°C hasta su lisis.
- f** - Previamente a la lisis las células se dispersan en tampón de resuspensión Tris-CIH 30 mM pH 7.9, Cl₂Mg 3 mM, ClNa 300 mM, 2-mercaptoetanol 1.4 mM.
- g** - La suspensión se pasó por prensa 2 veces a 800 psi.
- h** - Se centrifugó a 12000xg. Se conservó el sobrenadante para proceder a la purificación de la proteína.

3.9.4 - Purificación de FBPasa cloroplastídica

Se llevó a cabo utilizando los métodos desarrollados en este laboratorio por Lázaro *et al.* (1974) y Plá *et al.* (1981), con algunas modificaciones. Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4°C. El perfil de elución en los procesos cromatográficos se obtuvo midiendo la transmitancia a 280 nm en una célula de flujo continuo de 2 mm de paso óptico, donde se hubo ajustado previamente el máximo de transmitancia con el tampón de elución.

Se empleó el siguiente procedimiento:

- a - El sobrenadante obtenido en el punto anterior se calentó a 60°C durante 30 minutos, tras los cuales se enfrió rápidamente en hielo. A partir de ahora se trabaja a 4°C. Se centrifugó 15 minutos a 16300xg, y se recuperó el sobrenadante.
- b - Se agregó la cantidad suficiente de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ para obtener una solución al 35% de saturación. Se centrifugó 15 minutos a 16300xg y se conservó el sobrenadante. Se añadió a éste la cantidad necesaria de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ para alcanzar el 80 % de saturación, y de nuevo se centrifugó 15 minutos a 16300xg. Descartamos el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en tampón ácido acético/acetato de Na 0.05 N pH 5.5. Se dejó dializando toda la noche en el mismo tampón, en un volumen de 1 l por cada 10 ml de solución de proteína.
- c - La solución anterior se pasó por una columna de Sephadex G-100 (Pharmacia) de 4 x 60cm, previamente equilibrada con el tampón acético/acetato anterior, a un flujo de 0.5 ml/min, recogiendo fracciones de 10 ml. En cada fracción se midió la actividad.
- d - Las fracciones activas se reunieron y se pasaron por una columna de DEAE celulosa DE-52 (Whatman) de 1.7 x 27 cm, equilibrada con tampón acético/acetato, a un flujo de 1.5 ml/min. Al pH empleado (5.5) la FBPasa quedaba fijada a la columna. Después de lavar con el mismo tampón hasta recuperar el máximo de transmitancia en el registro proteico, la elución del material fijado se llevó a cabo aplicando un gradiente continuo de fuerza iónica entre 0 y 1 M de ClNa, preparado en el tampón anterior. La fracciones en el último pase fueron de 2.5 ml. Se recogieron las que presentaban actividad FBPasa.
- e - Para eliminar los últimos restos de impurezas la proteína se pasó por una columna de Sephacryl 1 (Pharmacia) equilibrada con el tampón acético/acetato anterior. Las fracciones con actividad se conservaron a -80°C.

El progreso de purificación se siguió midiendo la actividad enzimática y la concentración proteica después de cada paso.

3.9.5 - Purificación de Tiorredoxina *m*.

El procedimiento fue más simple que el usado para la FBPasa con el que se pueden mencionar las siguientes variaciones:

- a - El choque térmico se realizó a 85°C durante 10 minutos.
- b - La precipitación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ se realizó entre el 40 % y 85 % de saturación.
- c - La proteína homogénea se obtuvo mediante un solo pase por una columna de Sephadex G-50 (Pharmacia) de 4 x 60 cm, a un flujo de 1.5 ml/min. En cada fracción se midió la concentración de proteínas según Bradford (1976), y la capacidad moduladora determinando la activación de una solución purificada de FBPasa a pH 7.9. Cabe aclarar que la Trx *m* de guisante se ha comprobado que provoca la activación de la FBPasa de la misma especie (López Jaramillo *et al.* 1997). Las fracciones activas se conservaron a -80°C.

3.10 - Actividades enzimáticas

3.10.1 - Actividad FBPasa no dependiente de tiorredoxina endógena

En un par de cubetas de cuarzo de 1 ml de capacidad (4 mm de ancho de ventana y 1 cm de paso óptico), se adicionaron:

Tampón Tris-ClH 0.5 M pH 8.8	200 μl (100 mM)
EDTA.Na ₂ 10 mM	100 μl (1 mM)
Cl ₂ Mg 100 mM	100 μl (10 mM)
Fructosa-1.6-P ₂ 6 mM (*)	100 μl (0.6 mM)
NADP ⁺ 3 mM	100 μl (0.3 mM)
Glucosa-6-P deshidrogenasa (140 U/ml)	5 μl (0.7 unidades)
Fosfohexosa isomerasa (350 U/ml)	5 μl (1.75 unidades)
Agua destilada	290 μl
Extracto foliar	100 μl

(*) No se colocó en la cubeta correspondiente al blanco, en la cual se adicionaron 390 μl de agua destilada en lugar de los 290 μl del problema.

Las cubetas se colocaron en un espectrofotómetro (Perkin Elmer, modelo Lambda 5) con departamento de cubetas termostatzado a 28°C. Se siguió el curso de la reacción por registro continuo a 340 nm. La actividad enzimática se expresó en UI (una UI es la cantidad de enzima que provoca la reducción de 1 µmol de NADP⁺ por minuto; coeficiente de absorción molar del NADPH = 6220).

3.10.2 - Actividad FBPassa dependiente de tiorredoxina endógena

Se utilizó básicamente el método en dos pasos de Hertig y Wolosiuk (1980). En tubos Eppendorf de 1.5 ml de capacidad se colocó la siguiente mezcla de activación de la enzima:

Tampón Tris-ClH 0.5 M pH 7.9	20 µl (100 mM)
DTT 50 mM	5 µl (2.5 mM)
Fructosa-1.6-P ₂ 4 mM (*)	10 µl (0.4 mM)
Cl ₂ Ca 1 mM	5 µl (50 µM)
Extracto foliar	50 µl
Agua destilada	10 µl

(*) No en el tubo correspondiente al blanco, que llevó 20 µl de agua destilada en lugar de 10.

Se preincubó a 28°C durante 10 minutos, y se trasladó a una cubeta que contenía 0.9 ml de la siguiente mezcla:

Tampón Tris-ClH 0.5M pH 7.9	100 µl (100 mM)
Cl ₂ Mg 100 mM	10 µl (1 mM)
Fructosa-1.6-P ₂ 6 mM (*)	60 µl (0.4 mM)
EGTA 1 mM	20 µl (20 µM)
NADP ⁺ 3 mM	100 µl (0.3 mM)
Glucosa-6-P deshidrogenasa (140 U/ml)	5 µl (0.7 unidades)
Fosfohexosa isomerasa (350 U/ml)	5 µl (1.75 unidades)
Agua destilada	600 µl

(*) No en la cubeta del blanco, que llevó 660 µl en vez de 600.

La determinación del NADPH originado se realizó por registro continuo a 340 nm, como se indicó anteriormente en 3.10.1.

3.10.3 - Actividad FBPassa dependiente de tiorredoxina exógena

La existencia de un defecto de Trx endógena se intentó averiguar efectuando la misma determinación que en 3.10.2, pero agregando a la mezcla de activación Trx *f* exógena, de la siguiente forma:

Tampón Tris-ClH 0.5 M pH 7.9	20 μ l (100 mM)
DTT 50 mM	5 μ l (2.5 mM)
Fructosa-1.6-P ₂ 4 mM (*)	10 μ l (0.4 mM)
Cl ₂ Ca 1 mM	5 μ l (50 μ M)
Trx <i>f</i> (aproximadamente 5 μ g / 10 μ l)	10 μ l (5 μ g)
Extracto foliar	50 μ l

(*) No en la cubeta blanco, que llevará 10 μ l de agua destilada.

3.10.4 - Actividad NADP⁺-MDH dependiente de tiorredoxina endógena

Se ha empleado, modificado, el método en dos pasos de Fickenscher y Scheibe (1983). En un par de células espectrofotométricas de cuarzo, de 1 ml de capacidad, 4 mm de ancho de ventana, y 1 cm de paso óptico se colocó la mezcla de activación siguiente:

Tampón Tris-ClH 1 M pH 8.0	10 μ l (200 mM)
DTT 1.25 M	5 μ l (125 mM)
Extracto foliar	25 μ l
Agua destilada	10 μ l

Se preincubó 20 minutos a 28°C, y entonces se agregaron 950 μ l de la mezcla de reacción siguiente:

Tampón Tris-ClH 1 M pH 8.0	100 μ l
Oxalacético 10 mM (*)	100 μ l (1 mM)
NADPH 2 mM	100 μ l (0.2 mM)

EDTA.Na ₂ 12.5 mM	100 µl (1.25 mM)
Agua destilada	550 µl

(*) No en la cubeta blanco, en la cual se adicionaron 650 µl de agua destilada, en lugar de los 550 µl del problema.

Las cubetas se colocaron en el departamento termostatzado del espectrofotómetro y se siguió el curso de la reacción por registro continuo a 340 nm. La actividad enzimática se expresó en UI (una UI es la cantidad de enzima que provoca la oxidación de 1 µmol de NADPH por minuto; coeficiente de absorción molar del NADPH = 6220).

3.10.5 - Actividad NADP⁺-MDH dependiente de tiorredoxina exógena

La existencia de falta de Trx endógena se determinó efectuando la determinación anterior, pero agregando a la mezcla de activación Trx *m* exógena, de la forma siguiente:

Tampón Tris-ClH 1 M pH 8.0	10 µl (200 mM)
DTT 1.25 M	5 µl (125 mM)
Trx <i>m</i> (aproximadamente 5 µg / 10 µl)	10 µl
Extracto foliar	25 µl

El resto de la reacción sigue igual que en 3.10.4.

3.11 - Generación de anticuerpos policlonales

Se prepararon frente a FBPassa cloroplastídica de guisante. Anti-NADP-MDH, Trx *f* y Trx *m* no fue necesario pues había existencias suficientes en el laboratorio. Se utilizaron conejos de raza New Zealand, machos, de 3-4 kg de peso. Se inocularon 400 µg de proteína purificada, obtenida previamente mediante expresión heteróloga en *E. coli*, en cuatro dosis de 100 µg cada vez, separadas por intervalos de 14 días. La inoculación se realizó por vía subcutánea en el lomo del animal, disolviendo los 100 µg en 0.4 ml de tampón acético-acetato 50 mM pH 5.5, y mezclando con un volumen igual de adyuvante completo de Freund, en la primera dosis, y del adyuvante incompleto en las tres restantes. Las sangrías controles se realizaron por extracción de la vena marginal de la oreja, llevándose a cabo la primera antes de empezar la inmunización (suero no inmune control),

y otra al final de la misma para ver el título del suero. No fue necesario seguir la inmunización puesto que en la cuarta inoculación se consiguió el título adecuado determinado por ELISA. La sangría final se llevó a cabo por punción cardíaca. En todos los casos se dejó coagular la sangre a temperatura ambiente durante 5 horas, llevándose luego a 4°C durante toda la noche para la retracción del coágulo. Se centrifugó entonces dos veces a 750xg durante 20 minutos, recogiendo el suero. Para evitar posibles interferencias debidas al complemento, el suero obtenido se calentó a 56°C durante 15 minutos. No se consideró necesario enriquecer la fracción IgG del suero después de comprobar su especificidad mediante Western-blot.

3.12 - ELISA

Se llevó a cabo en placas "microtiter" de fondo plano, mediante la siguiente rutina:

- a** - Se fijó el antígeno (proteína) sobre los pocillos, depositando en cada uno de ellos 200 µl de una solución 1 µg/ml de antígeno en tampón de fijación $\text{CO}_3\text{Na}_2\text{-CO}_3\text{HNa}$ 50 mM, pH 9.6, que además contenía 0.02 % de N_3Na en diluciones crecientes 1/5. Se mantuvo la fijación por incubación a 37°C durante 3 horas, o toda una noche a 4°C.
- b** - Los pocillos se lavaron 3 veces con tampón PBST, que es el tampón PBS ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K-PO}_4\text{HNa}_2$ 20 mM pH 7.4, ClNa 154 mM) adicionado de 0.05 % (v/v) de Tween 20, utilizando 300 µl por pocillo cada vez, y dejando estar 3 minutos por lavado. En este punto las placas se guardaron a -20°C, o bien se continuó con **c**.
- c** - Posibles enlaces inespecíficos se bloquearon agregando a cada pocillo 300 µl de tampón PBSA (PBS con 0.1 % de albúmina sérica bovina). Se mantuvo 30 minutos a temperatura ambiente.
- d** - El PBSA de los pocillos se desechó, y se agregó a cada uno la solución de anticuerpos constituida por una dilución al 1/1000 del correspondiente suero en tampón PBSTA (PBST con 0.1 % de albúmina sérica bovina). Se incubó a 37°C durante 1 hora y se efectuaron los lavados como en **b**.
- e** - Se agregaron a cada pocillo 200 µl de anti-IgG (anti-conejo desarrollado en cabra) marcado con peroxidasa (Sigma), diluido al 1/1000 con tampón PBSTA, y se incubó a 37°C durante 1 hora. Efectuar lavados como en **b** y en **e**.
- f** - A cada pocillo se agregaron 200 µl de solución sustrato preparada

extemporáneamente, constituida por 0.04 % de o-fenilendiamina y 0.012 % de H₂O₂ (40 µl de perhidrol Merck) en tampón citrato-fosfato 0.1 M pH 5.0. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.

g - La reacción se detuvo adicionando a cada pocillo 100 µl de SO₄H₂ 4N, y se leyó la absorción a 492 nm en el lector Titertek Multiskan Plus.

3.13 – Western-blot

Una vez finalizada la electroforesis se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa (Millipore). El gel y la membrana se equilibraron durante 15 minutos a temperatura ambiente con tampón de transferencia (Tris-ClH 0.025 M, glicina 0.192 M, pH 8.3, metanol 20 %). Posteriormente se realizó la transferencia electroforética en el tampón anterior a 100 V durante 1 hora, en un equipo Mini-Trans Blot (BioRad). Terminada la transferencia la membrana se reveló inmediatamente, o se dejó secar y se guardó a 4°C hasta el momento de su utilización. Antes del inmunorrevelado la membrana se tiñó con Rojo Ponceau (Ponceau S al 0.4 % en ácido tricloroacético al 3 %) durante 10 min, y se decoloró el fondo con agua hasta que las bandas se vieran nítidamente. Se señalaron las posiciones correspondientes a los marcadores de peso molecular, o bien se recortó el trozo de membrana que los contenía, que se dejó secar y se guardó a resguardo de la luz. El resto de la membrana se terminó de desteñir para continuar con el revelado, de la siguiente forma:

- a - La membrana de nitrocelulosa se incubó en PBS con 5 % de leche en polvo desnatada, durante 2 horas a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°, para bloquear los sitios de enlace inespecíficos, y se lavó una vez con PBST para eliminar los restos de solución de bloqueo.
- b - Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación de vaivén con una dilución 1:1000 de anticuerpo en PBSTA (1 % albúmina), y se lavó 5 veces, 6 minutos cada vez, con PBST.
- c - Incubamos durante 2 horas a temperatura ambiente con una solución anti-IgG de conejo desarrollada en cabra marcada con peroxidasa a una dilución de 1/1000 en PBSTA (1 % albúmina).
- d - Se lavó 3 veces con PBST y 2 veces con PBS, durante 6 minutos cada vez.
- e - Finalmente, la membrana se reveló con la solución de revelado, constituido por 20 mg

de 4-cloro-1-naftol, 4 ml de 1-propanol, 20 ml de PBS y 20 μ l de H₂O₂ (perhidrol Merck) preparada extemporáneamente, durante un tiempo máximo de 50 minutos. La reacción se detuvo con agua destilada.

3.14 - Síntesis "in vivo" y determinación de la vida media de proteínas.

Se empleó la siguiente rutina:

- a - Se diluyeron 500 μ Ci de ³⁵S-metionina (a.e. > 1000 Ci/mmol, Amersham) en una solución al 2 % de Tween 80 (v:v), con la que se pincelaron las hojas de guisante. Se escogieron para esto las últimas hojas expandidas de plantas que tenían 20 días desde la siembra.
- b - Se recolectaron muestras a distintos tiempos, desde 1.5 horas hasta 27 horas, y se conservaron en tubos Eppendorf a -20°C.
- c - El material se homogeneizó en mortero en tampón PBS. Centrifugamos en microcentrífuga, y del sobrenadante se colocaron 3 μ l en una tira de papel Whatman 3 para medir la radiactividad total incorporada, y otros 5 μ l en otra tira de papel Whatman 3 para determinar las proteínas precipitadas con ácido tricloroacético.
- d - El resto del sobrenadante se colocó en un tubo al que se adicionó tampón PBS que contenía 50 mM metionina y Tritón X-100 al 10 % (v:v), en un volumen tal que la solución final quede al 2 % en Tritón.
- e - Se añadió el anticuerpo específico de la proteína que se pretendía analizar, e incubamos durante toda la noche a 4°C.
- f - La radiactividad incorporada en las proteínas precipitadas con TCA se determinó agregando a la segunda tira de papel una solución de TCA al 10 % conteniendo metionina 0.1 %, y se calentó al baño María durante 20 minutos. Las tiras se lavaron con TCA al 10 % frío, etanol y éter, y se dejó secar. Se colocaron en un vial de centelleo, se añadieron 15 ml de Aquasol y se midió la emisión en un contador de centelleo. Esto mismo se hizo con la primera tira para determinar la radiactividad total.
- g - Después de la incubación, al extracto que se había dejado en contacto con el anticuerpo se agregó Proteína-A Sepharosa en proporción de 0.5 mg por μ l de anticuerpo añadido originalmente. Se incubó una hora y media a temperatura ambiente

con agitación suave.

- h - Se centrifugó 1 minuto en microcentrífuga. En este punto se podía separar el sobrenadante para incorporarle un anticuerpo específico de otra proteína que se quisiera analizar, repitiendo los pasos anteriores. Se lavó el sedimento de la Proteína-A Sepharosa 3 veces con PBS, 10 mM metionina, 1 % Tritón, y 2 veces con PBS, 10 mM metionina, 0.1 % SDS. Después de cada lavado se centrifugaba en microcentrífuga 1 minuto, y se descartaba el sobrenadante. Tras el último lavado se añadieron 25 μ l de tampón de carga para proteínas, se calentó al baño María durante 5 minutos, y se centrifugó en microcentrífuga. Del sobrenadante se separaron 5 μ l, que se colocaron en un vial con líquido de centelleo para medir la radiactividad incorporada en la proteína bajo estudio.
- i - Para realizar una determinación más precisa de la radiactividad incorporada en la proteína que nos interesa, los restos de sobrenadantes de los diferentes muestreos se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida de forma habitual. Finalizada la misma, los geles se tiñeron, decoloraron, y secaron.
- j - Finalmente, los geles marcados radiactivamente se colocaron en el equipo Phosphoimager, y se dejó exponer el tiempo adecuado a la intensidad de la radiactividad incorporada. Con el soporte informático asociado al Phosphoimager se densitometraron las diferentes bandas obtenidas.

3.15 - Aislamiento de DNA

3.15.1 - Extracción de DNA genómico de tejidos vegetales

Se empleó la siguiente rutina:

- a - Colocamos aproximadamente 3 g de tejido foliar en un mortero enfriado previamente con nitrógeno líquido. Se añadió al mismo más nitrógeno líquido y se redujo el tejido a polvo fino con ayuda de un pistilo, adicionando más nitrógeno líquido si era necesario, para evitar descongelaciones
- b - Se agregaron 15 ml del siguiente tampón de extracción, previamente calentado a 95°C: 2x Tris-ClH 100 mM pH 8, EDTA 20 mM, ClNa 1.4 M, CTAB (bromuro de cetiltrimetil amonio) 2 % (p:v), PVP 1 %, se autoclavó y una vez enfriado se agregó un 2 % de 2-mercaptoetanol (v:v).

- c - La suspensión se pasó del mortero a un tubo de centrifuga de 50 ml resistente a solventes orgánicos, que se tapó e incubó durante 30 minutos a 56°C con agitado ocasional y suave. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- d - Se añadieron 15 ml de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v), y se mezcló para formar emulsión, centrifugándose a 8000xg durante 10 minutos a 20°C (por debajo de 15°C el CTAB precipita).
- e - La fase acuosa superior se transfirió a un tubo estéril de vidrio Corex y se agregó un volumen x10 (aproximadamente 1.5-2 ml) de CTAB al 10 % (p:v) en ClNa 0.7 M. Se repitió la extracción con 15 ml de la mezcla anterior de cloroformo:alcohol isoamílico, agitando suavemente y centrifugándose de nuevo en las condiciones anteriores.
- f - Se reunieron ambas fases acuosas y se añadió un volumen igual (aproximadamente 15 ml) de tampón de precipitación (Tris-ClH 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, CTAB 1 %). El precipitado se dejó sedimentar 30 minutos a temperatura ambiente, centrifugándose luego a 1500xg durante 15 minutos.
- g - El precipitado se resuspendió en tampón TE (Tris-ClH 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, ClNa 1 M) y se calentó a 65°C durante 5 minutos. Generalmente se obtuvo una elevada cantidad de DNA, por lo que se recogieron fracciones de lo que se iba disolviendo, y se agregaba más tampón para extracciones subsiguientes.
- h - Se volvió a precipitar el DNA con 2 volúmenes de etanol absoluto enfriado a -20°C, dejando sedimentar 30 minutos o, incluso, toda la noche si era necesario.
- i - Se centrifugó en microcentrífuga 2 minutos, y se lavó el precipitado 3 veces con etanol al 65 % primero, y con etanol del 85 % después. Los lavados tenían por objeto eliminar restos de CTAB y sales. Se secó al vacío sin dejar transcurrir demasiado tiempo, porque luego es muy difícil la resuspensión.
- j - Se resuspendió en aproximadamente 200 µl de TE, o de agua si la solución se iba a usar inmediatamente, llevándose a cabo la cuantificación y electroforesis en agarosa al 8% para comprobar la pureza del DNA obtenido.
- k - En el caso de que la solución de DNA tuviera restos de RNA o de proteínas, se realizó una incubación posterior con RNasa A y, luego, con proteinasa K.

3.15.2 - Aislamiento de DNA plasmídico.

La preparación de DNA plasmídico se realizó a partir de cultivos en fase estacionaria (habitualmente crecidos durante toda la noche en medio LB con ampicilina) de la cepa portadora. En función del volumen del cultivo se habla de miniprep (3 ml), midiprep (20-30 ml) o maxiprep (200-250 ml). En el presente trabajo sólo se realizaron minipreps, siguiendo el procedimiento de lisis alcalina descrito por Ish-Horowicz *et al.* (1981). Éste consiste básicamente en el tratamiento con una solución de NaOH y SDS, para lisar las células y desnaturalizar el DNA y las proteínas, y una posterior neutralización con acetato potásico (AcK) pH 4.8, que origina la precipitación del DNA cromosómico y proteínas. El DNA plasmídico, por su especial topología, se renaturaliza correctamente y queda soluble. Para mejorar la acción desnaturalizante de proteínas, a la solución de AcK se le añadía ácido fórmico hasta pH 5.5. Finalmente, con el DNA extraído se continuó la miniprep mediante extracciones con fenol-cloroformo y cloroformo-alcohol isoamílico. El procedimiento detallado fue el siguiente:

- a - Se centrifugan 3 ml de cultivo en fase estacionaria en microcentrífuga, y las células se resuspenden en 100 µl de tampón TE II (Tris-CIH 50 mM pH 7.6, EDTA 10 mM). Se adicionan entonces 200 µl de NaOH 0.2 N y SDS 1 %. Se agita y se incuba en hielo durante 5 minutos.
- b - El lisado se neutralizó añadiendo 150 µl de una solución de AcK 3 M y ácido fórmico 1.8 M, se mezcló bien y se dejó incubando en hielo durante 10 minutos. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf con 200 µl de isopropanol frío, se agitó y se dejó precipitar durante 5 minutos a -20°C.
- c - Se centrifugó 10 minutos, lavándose el precipitado con etanol al 70 % frío. Se resuspendió en 100 µl de TE (Tris-CIH 10 mM pH 8, EDTA 1 mM), se añadió RNasa hasta una concentración de 1 µg/ml y se incubó a 37°C durante 1 hora.
- d - Para eliminar las proteínas se adicionaron 200 µl de TE, y se fenolizó 2 veces con 200 µl de fenol-cloroformo, y 1 vez con 200 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v).
- e - Para precipitar el DNA se añadieron 150 µl de acetato amónico 7 M y 600 µl de etanol absoluto, dejándose a -20°C durante 20 minutos. Finalmente, el precipitado se

centrifugó, se lavó con etanol al 70 %, y se resuspendió en 50 µl de TE.

3.15.3 - Extracción de DNA de geles de agarosa.

En estos casos la electroforesis se realizó en agarosa de bajo punto de fusión (NuSieve GTG, FCF Corporation), al 1 % en tampón TAE con baja concentración de EDTA. Se siguió el procedimiento que se describe a continuación:

- a - Una vez identificada en el transiluminador la banda de interés en el gel teñido con bromuro de etidio, se corta y coloca en un tubo Eppendorf. Se agregó fenol tamponado (fenol llevado a pH 7 con Tris-ClH) y se agita por vortex, manteniéndose el tubo, luego, en nitrógeno líquido durante 3 minutos.
- b - Centrifugado a temperatura ambiente, se recoge el sobrenadante, al que se agrega 1 volumen de fenol-cloroformo 1:1 v/v. Se agita por vortex y centrifuga a temperatura ambiente durante 5 minutos. Recogido el sobrenadante, se agrega 1 volumen de isopropanol conteniendo un 10 % de acetato de Na 3 M, pH 5. Se coloca a -80°C durante 30 minutos o más.
- c - Se centrifuga a 10000xg a 4°C durante 15 minutos y, descartado el sobrenadante, el precipitado blanco de DNA se seca en vacío a temperatura ambiente, disolviéndose en 20 µl de agua.
- d - La concentración y pureza del DNA obtenido se analiza midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm y realizando una nueva electroforesis en agarosa normal al 1 %. Si dicho DNA se va enviar a secuenciar, se realiza un PCR para ver si origina el fragmento apropiado.

3.16 - Extracción de RNA total

En las extracciones de RNA total y de mRNA se utilizó material libre de contaminación con RNasas. Tanto el material plástico descartable (puntas de pipetas y tubos Eppendorf), como el de vidrio y porcelana, fue enjuagado con cloroformo y posteriormente autoclavado.

- a - Se colocan aproximadamente 500 mg de tejido foliar en un mortero enfriado previamente con nitrógeno líquido. El tejido se reduce a un polvo fino, adicionando

al mortero intermitentemente más nitrógeno líquido, si fuera necesario, para evitar descongelaciones

- b** - Se agregan al mortero 5 ml de solución desnaturalizante (tiocianato de guanidina 4 M, citrato de sodio 25 mM, N-lauril sarcosina 0.5 %, 2-mercaptoetanol 0.1 M), y se homogeneiza el tejido con ayuda de un pistilo.
- c** - Transferido el homogenado a un tubo de polipropileno se agrega 0.1 ml de acetato de sodio 2 M pH 4, mezclándose suavemente por inversión. Añadimos ahora 1 ml de fenol saturado en agua, se mezcla suavemente, y se agregan 0.2 ml de cloroformo:alcohol isoamílico 49:1 (v/v). Una vez mezclada suavemente, se incuba la suspensión 15 minutos a 4°C.
- d** - Previa centrifugación durante 20 minutos a 10000xg a 4°C, la fase acuosa superior se transfiere a un tubo limpio. Se precipita el RNA agregando 1 volumen (5 ml) de isopropanol. Las muestras se incuban a -20°C durante 30 minutos, se centrifugan 10 minutos a 10000xg a 4°C, descartándose el sobrenadante.
- e** - El pellet de RNA se arrastra con 1 ml de solución desnaturalizante, transfiriéndose la suspensión a un tubo Eppendorf de 2 ml. Se precipita el RNA con 1 ml de isopropanol manteniéndose durante 30 minutos a -20°C. Se centrifuga 10 minutos a 10000xg a 4°C, descartándose el sobrenadante.
- f** - El precipitado se resuspende en etanol del 75%, se mezcla por vortex, y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente para disolver las cantidades residuales de guanidina que contaminan el RNA. Se centrifuga 5 minutos a 10000xg a 4°C, y se elimina el sobrenadante. Se seca el precipitado de RNA por vacío durante 5 minutos.
- g** - El precipitado se disolvió en 200 µl de agua libre de RNAsas. Se incuba 15 minutos a 60°C, guardándose la solución de RNA a -80°C.

3.17 - Extracción de RNA mensajero

Se utilizó el kit de Boehringer Mannheim, con el que se aísla RNA mensajero poliadenilado utilizando oligo-dT biotina y partículas magnéticas de estreptavidina. Se siguieron las especificaciones del fabricante, con algunas modificaciones. Utilizamos el método de extracción con tiocianato de guanidina debido al alto contenido de RNasa de los tejidos vegetales (Wadsworth *et al* 1988, Venugopalan y Kapoor 1997). El protocolo fue

el siguiente:

- a** - Se colocaron 100 a 500 mg de tejido en un mortero enfriado previamente. Se añadió nitrógeno líquido y se redujo el tejido a un fino polvo. Sin dejar que se descongelara, se agregó tampón de lisis I (Tris-ClH 0.1 M pH 8, tiocianato de guanidina 4 M, DTT 1 % p:v, laurilsarcosina 0.5 % p:v) en una proporción de 400 µl de tampón por cada 100 mg de tejido. Se homogeneizó el tejido con el tampón, se pasó 4 veces por aguja y jeringa estériles, y se depositó el homogenado en tubos Eppendorf de 2 ml.
- b** - Centrifugada la suspensión durante 30 segundos a 11000xg, transferimos 400 µl del sobrenadante a otro tubo que contenía 1.1 ml de tampón de dilución (Tris-ClH 0.1 M, CILi 5 M, EDTA 0.5 M, y se ajusta finalmente a pH 8-8.5).
- c** - Se agregan 1.5 µl de oligo-dT biotina, y se dejan los tubos en mezcla frigorífica (CINa mezclado con hielo granizado), mientras se preparan las partículas magnéticas.
- d** - Alícuotas de 150 µl de suspensión de las mismas se dispusieron en sendos tubos, que se colocaron en el separador magnético, descartándose el líquido de conservación. Las partículas se lavaron una vez con tampón de lisis II (Tris-ClH 0.1 M pH 7.5, CILi 0.3 M, EDTA 10 mM, dodecil sulfato de Li 1 %, DTT 5 mM), y se volvieron a separar magnéticamente, desechándose las aguas de lavado.
- e** - A los tubos con las partículas se agregaron los extractos con oligo-dT biotina, mezclándose suavemente hasta dispersión total. Los tubos se mantuvieron en la mezcla frigorífica durante 5 minutos, seguido de 3 minutos más en el separador. Se descartó la solución sobrenadante, y las partículas se lavaron 3 veces con el tampón de lavado (Tris-ClH 10 M, CILi 0.2 M, EDTA 1 M), separando las partículas y descartando el líquido cada vez.
- f** - Las partículas se resuspendieron en 25 µl de agua libre de RNasas, calentándose la suspensión a 65°C durante 2 minutos. Se separaron las partículas magnéticamente, y la solución de mRNA se transfirió a un nuevo tubo, conservándose a -80°C hasta su uso.
- g** - Las partículas magnéticas se podían reutilizar dos veces más. Para ello, luego de eluida la solución de mRNA, se resuspendieron en 100 µl de agua libre de RNasas. Se dejaron estar 2 minutos a 65°C y, una vez separadas las partículas y descartado el sobrenadante, se resuspendieron en 150 µl del tampón de conservación (Tris-ClH 10

M pH 7.5, cloroacetamida 0.1 %, metilisotiazolone 0.01 %).

3.18 - RT-PCR

Se han desarrollado numerosas técnicas para medir la expresión de genes en células y tejidos. Se pueden mencionar entre las más usadas la transferencia, previa electroforesis en geles de poliacrilamida, del RNA a membranas de nylon o nitrocelulosa, y la hibridación con una sonda de cDNA marcada, seguida de revelado (Northern blot); la síntesis de DNA copia (cDNA) a partir de un molde de RNA mediante una transcriptasa reversa, acoplada a la amplificación por PCR del fragmento obtenido (RT-PCR); ensayos de protección frente a RNasas; hibridación *in situ*; “primer extension”; “dot blots”, etc. De todas ellas la técnica de RT-PCR es considerada la más sensible y versátil. Puede ser usada para determinar la presencia o ausencia de un transcrito, para estimar los niveles de expresión de un gen determinado e, incluso, para clonar DNA sin la necesidad de una librería de cDNA. Aunque adolece de una falta de precisión a la hora de calcular los niveles exactos de expresión de un gen, debido principalmente a la naturaleza exponencial de la amplificación, es muy apropiada para comparar las cantidades relativas de un mRNA específico en diferentes tejidos, o en un mismo tejido en distintas condiciones fisiológicas. Para llegar a este objetivo se necesita una cuidada puesta a punto de la técnica, que comienza con el diseño de los oligonucleótidos y finaliza con la determinación del programa más adecuado en el equipo de PCR.

Generalmente para la primera reacción, la síntesis de cDNA, se utilizan las transcriptasas reversas de AMV (avian myeloblastosis virus) o de MMLV (Moloney murine leukemia virus), y para la segunda, la amplificación por PCR, las DNA polimerasas de *Thermus aquaticus* (*Taq*) o de *Thermus flavus* (*Tfl*). La mayoría de los protocolos de RT-PCR en los que se usa AMV RT y *Taq polimerasa*, recomiendan la inactivación de la transcriptasa reversa luego del primer paso mediante dilución, con el objeto de eliminar los efectos inhibitorios de la primera sobre la segunda. En el presente trabajo se ha optado por la utilización del kit de Promega “Access RT-PCR System”, que incorpora AMV RT para el primer paso de síntesis de cDNA, y para la amplificación la DNA polimerasa de *Thermus flavus* (*Tfl*), sobre la que, aparentemente, la AMV RT no tiene efectos negativos. Este sistema incluye un único tampón optimizado para ambas reacciones, lo que permite realizar

la reacción completa de RT-PCR de una sola vez en un único tubo. El evitar la necesidad de diluciones redundante en un menor tiempo de mano de obra, y en la obtención de resultados con menor error experimental.

3.18.1 - Diseño de oligonucleótidos

La aplicabilidad de la técnica de RT-PCR tropieza con dificultades cuando se trata de genes de una longitud mayor de 1kb, tal como es el caso de los correspondientes a la FBPasa y a la NADP-MDH. En estas situaciones es apropiado utilizar oligonucleótidos de alrededor de 30 bases, complementarias a la secuencia que se quiera amplificar.

Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas son las siguientes:

Proteína	Extremo	Nombre	Secuencia
FBPasa	5'	FBP-N	-ATGGCTGTGAAGGAAGCAACTAGTGAGAC-
FBPasa	3'	FBP-C	-TTAAGCTAAGTACTTTTCAACCTTCTCCAC-
NADP-MDH	5'	MDH-N	-TCTGTTGCACCAAATCAAGTGCAGGTTCC-
NADP-MDH	3'	MDH-C	-CATTCGCCGGGGAGCATGGTGTGCCAGG-
<i>Trx f</i>	5'	Tf-N	-cacggccatggTAGGGAAAGTAACC-
<i>Trx f</i>	3'	Tf-C	-aaggatccCTAACTAGACCGAACAGTG-
<i>Trx m</i>	5'	Tm-N	-gctcatatgGCTGTAAATGAAGTTCA-
<i>Trx m</i>	3'	Tm-C	-ttggatccTCAAATATACTTTTCCAC-

En mayúsculas aparecen las bases complementarias a la secuencia original.

3.18.2 - Mezcla de reacción

Para FBPasa y NADP-MDH se utilizó la siguiente mezcla de reacción, para un volumen total de 25 µl:

Tampón de Reacción 5x	5 µl
dNTP (dATP,dCTP,dGTP,dTTP) 10 mM	0.5 µl
digoxigenina-11-dUTP 1 mM	0.25 µl
SO ₄ Mg 25 mM	1 µl
AMV RT (5 unidades/µl)	0.5 µl

<i>Tfl</i> DNA polimerasa	0.5 µl
H ₂ O libre de RNasas	10.25 µl
inhibidor de RNasas (40 unidades/µl)	1 µl
molde de mRNA (aproximadamente 50 ng/µl)	5 µl

Para las tiorredoxinas *f* y *m* se utilizó una menor cantidad de molde para lograr una respuesta cuantitativa apropiada. La mezcla de reacción fue la siguiente:

Tampón de Reacción 5x	5 µl
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 10 mM	0.5 µl
digoxigenina-11-dUTP 1 mM	0.25 µl
SO ₄ Mg 25 mM	1 µl
AMV RT (5 unidades/µl)	0.5 µl
<i>Tfl</i> DNA polimerasa	0.5 µl
H ₂ O libre de RNasas	15.25 µl
inhibidor de RNasas (40 unidades/µl)	1 µl
molde de mRNA (aproximadamente 50 ng/µl)	1 µl

La adición de digoxigenina en la mezcla de reacción, para que fuera incorporada durante la amplificación del fragmento de interés, evitó la necesidad de realizar hibridaciones con sondas marcadas para el revelado.

3.18.3 - Programa

Para FBPassa y NADP-MDH se utilizó el siguiente programa:

	Reacción	Temperatura	Tiempo
1 paso	Transcripción reversa	48°C	45 min
	Desnaturalización	94°C	2 min
40 ciclos	Desnaturalización	94°C	30 seg
	"Annealing"	58°C	2 min
	Polimerización	68°C	3 min
1 paso	Polimerización	68°C	10 min

En el caso de las tiorredoxinas se redujo el número de ciclos, y en cada uno de ellos

la duración de la polimerización fue también menor, al igual que la reacción final de polimerización. El programa utilizado fue el siguiente:

	Reacción	Temperatura	Tiempo
1 paso	Transcripción reversa	48°C	45 min
	Desnaturalización	94°C	2 min
25 ciclos	Desnaturalización	94°C	30 seg
	"Annealing"	58°C	2 min
	Polimerización	68°C	2 min
1 paso	Polimerización	68°C	7 min

3.19 - Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

Concluida la reacción de RT-PCR, se realizó la electroforesis en gel de agarosa 1.5 % en tampón TAE (40 mM Tris-acetato, 2 mM EDTA Na₂.2 H₂O, pH 8.5). En cada pocillo se depositó 1 µl de la solución de cDNA producto del RT-PCR y 5 µl del tampón de carga (azul de bromofenol 0.3 %, glicerol 30 %). La tensión aplicada fue de 10 volt/cm.

3.20 - Transferencia de ácidos nucleicos a membrana de nylon

Finalizada la electroforesis se realizó la transferencia del DNA a una membrana de nylon cargada positivamente (Boehringer) durante una noche, utilizando tampón SSC 20x (ClNa 3 M, citrato de Na₃.3 H₂O 0.3 M, pH 7.0). El gel se limpió durante 30 segundos en el tampón SSC, y se depositó sobre 3 tiras de papel Whatman 3, previamente humedecido. Con los extremos de las tiras sumergidos en el tampón, se colocó sobre el gel la membrana de nylon, también impregnada con tampón. Sobre la membrana se depositaron otras tres tiras de Whatman 3 humedecidas y, encima de éstas, una columna de 15 cm de papel absorbente. Finalmente, sobre el papel absorbente se colocó un peso aproximado de 2 kg. El tampón SSC ascendía haciendo pasar el DNA del gel a la membrana de nylon cargada positivamente, donde quedaba fijado.

3.21 - Revelado de la digoxigenina incorporada durante la reacción de RT-PCR

Para la visualización de las bandas de DNA se utilizó el kit de Boehringer de

detección de digoxigenina, por reacción colorimétrica de fosfatasa alcalina. Se empleó el siguiente protocolo, en relación a una membrana de nylon de 10x10cm:

- a - Se lavó la membrana 1 minuto en tampón 1 (ácido maleico 0.1 M, ClNa 0.15 M pH 7.5) adicionado con 0.3 % (v/v) de Tween 20.
- b - Se desechó el líquido de lavado, y se incubó la membrana durante 30 minutos con 100 ml de tampón 2 (solución de bloqueo del kit al 10 % p/v, en tampón 1).
- c - Se descartó el tampón 2, y se incubó la membrana en 20 ml de solución de conjugado anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina 150 mU/ml en tampón 2.
- d - Se desechó la solución y se lavó la membrana, 2 veces durante 15 minutos cada vez, con 100 ml de tampón 1, y una vez 2 minutos con tampón 3 (Tris-ClH 100 mM, ClNa 100 mM, Cl₂Mg 50 mM, pH 9.5).
- e - Se descartó el líquido de lavado, y se depositaron sobre la membrana 10 ml de solución de sustrato (200 µl de solución NBT/BCIP – nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-cloro3-indolil fosfaro - en 67 % de dimetil sulfóxido, por 10 ml de tampón 3). El color se desarrolla en oscuridad, sin agitación.
- f - Se detuvo la reacción sumergiendo la membrana en 50 ml de tampón 4 (Tris-ClH 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) durante 5 minutos.
- g - Finalmente la membrana se dejó secar al aire, y se procedió a la densitometría.

3.22 - Densitometría y cuantificación de las bandas resultantes

La densitometría se realizó empleando un densitómetro Shimadzu CS-9000. En algunos casos, alternativamente, se utilizó un escáner LG Scanworks 66a, y la imagen fue luego analizada mediante el programa informático QuantiScan version 1.25.

3.23 - Análisis estadísticos

Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el programa SPSS versión 7.5 para Windows y Statgraphics version 7.0. Las barras representadas en las figuras corresponden al error estándar.

4. Resultados



4.1 - Evolución del sistema modulador de la FBPasa y de la NADP-MDH durante la ontogenia de plantas de guisante crecidas en condiciones normales de luz y temperatura

4.1.1 - Parámetros de crecimiento

El crecimiento de las plantas de guisante se realizó en cámara botánica bajo condiciones controladas de luz ($200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-2}$) en fotoperiodo de 16 horas), temperatura (25/20°C día/noche) y humedad relativa (70 %). La siembra se realizó sobre vermiculita y, pasados 10 días, se llevó a cabo el trasplante a macetas con solución hidropónica. A partir de este momento se realizaron muestreos cada 10 días, siendo el último a los 50 días. En este momento las plantas se encontraban fructificadas, y se consideró que habían completado su ciclo ontogénico. Los tres primeros muestreos (10, 20 y 30 días) correspondieron al estado vegetativo, a los 40 días las plantas estaban florecidas, y a los 50, como se mencionó, fructificadas. Este patrón de desarrollo fue el mismo en todas las repeticiones efectuadas.

Puesto que el guisante desarrolla hojas compuestas (paripinnadas) los muestreos se realizaron eligiendo los folíolos de mayor desarrollo, que eran los peciolados. La hoja de guisante también presenta folíolos sésiles, de morfología diferente a los peciolados. Las determinaciones para establecer el perfil de expresión y actividad de los sistemas moduladores de la FBPasa y NADP-MDH se realizaron sobre folíolos peciolados; los folíolos sésiles sólo se recogieron y analizaron para compararlos con los anteriores en fase vegetativa de crecimiento (30 días de crecimiento en hidroponía). Por otro lado, es digno de mencionar que a partir de los 30 días de crecimiento en hidroponía empezaron a diferenciarse folíolos peciolados más externos, de morfología similar aunque de tamaño considerablemente inferior a los folíolos peciolados más cercanos al tallo, y que son los primeros en aparecer. Estos folíolos más externos no fueron considerados en los análisis.

En el primer muestreo, a los 10 días, las plantas presentaban 4 hojas desarrolladas, siendo la de folíolos de mayor tamaño la penúltima expandida. El peso fresco de los folíolos en este momento osciló entre 50 y 150 mg (Figura 4.1 a). En el segundo muestreo, 20 días, las hojas más desarrolladas eran las antepenúltimas expandidas. El número total de hojas alcanzaba a 8, y el peso promedio de los folíolos

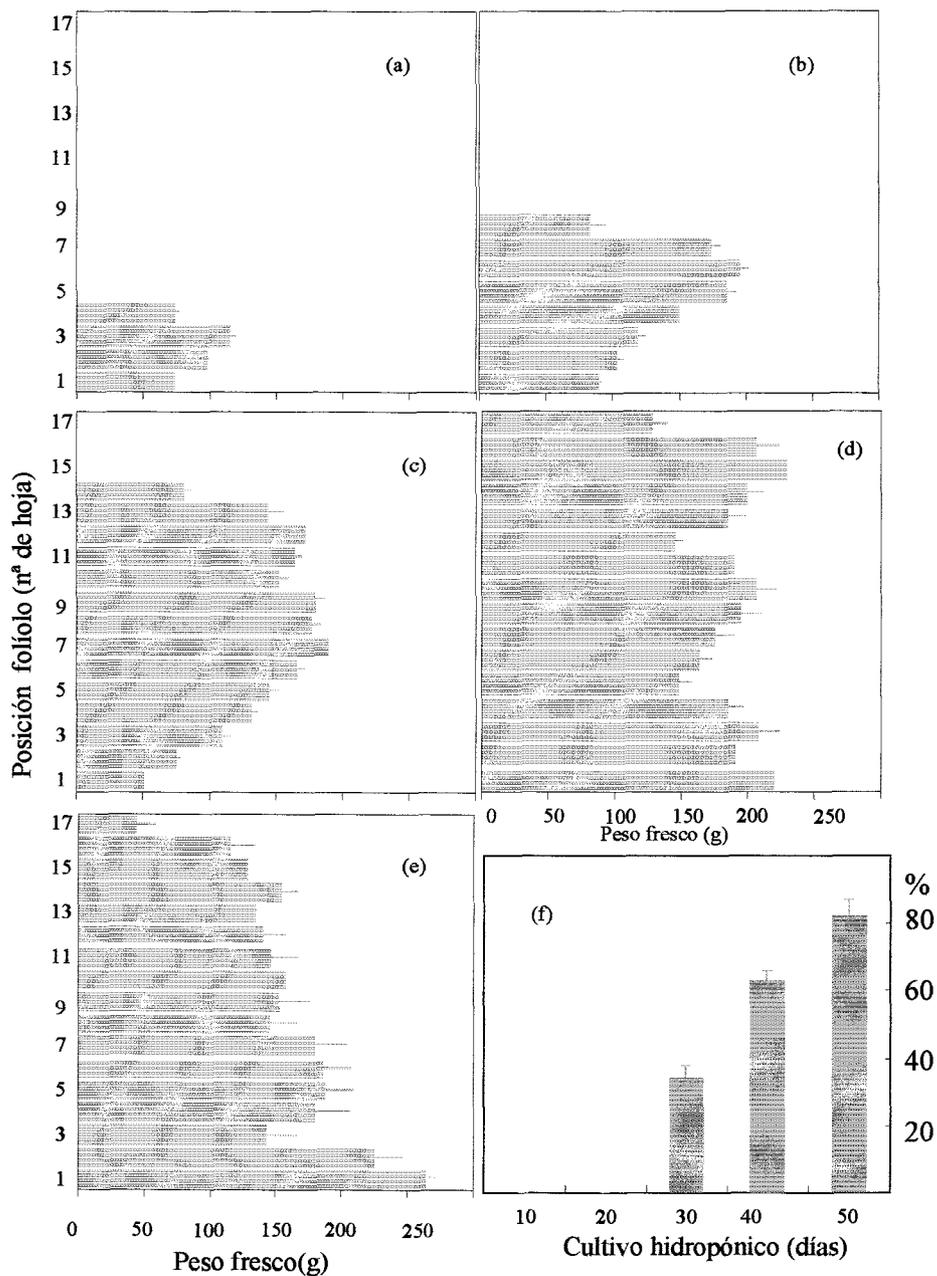


Figura 4.1 - Evolución del peso fresco y del número de folíolos durante la ontogenia en condiciones normales de crecimiento. Peso fresco de folíolos peciolados: (a) 10 días de crecimiento hidropónico; (b) 20 días; (c) 30 días; (d) 40 días; (e) 50 días. Porcentaje de hojas con más de 2 folíolos peciolados (f).

peciolados oscilaba entre 50 y 200 mg (Figura 4.1 b). En el tercer muestreo las plantas presentaron hasta 14 hojas expandidas, siendo las de mayor peso fresco las ubicadas en el tercio medio. El peso de los folíolos no varió sustancialmente con respecto al muestreo anterior, y se ubicó entre 50 y 200 mg (Figura 4.1 c); el mayor desarrollo foliar estaba dado por la diferenciación de un mayor número de folíolos peciolados, principalmente en las hojas superiores. En este momento el porcentaje de hojas que presentaron más de dos folíolos peciolados fue alrededor del 40 % (Figura 4.1 f). En el cuarto muestreo, 40 días, las plantas se encontraban en floración, estadio que solo duró unos pocos días, puesto que rápidamente comenzaban a desarrollarse los frutos. Salvo las hojas superiores, cuyo peso fue significativamente inferior, el peso fresco de los folíolos fue más o menos homogéneo en toda la planta, y osciló entre 100 y 250 mg (Figura 4.1 d). El menor peso fresco de los folíolos de las hojas superiores puede deberse a la diferenciación de un mayor número de éstos, hasta 6. En este muestreo alrededor del 60 % de las hojas poseían más de dos folíolos peciolados (Figura 4.1 f). Cabe mencionar que en ningún caso se tomaron en cuenta las hojas completamente senescentes de la parte inferior de las plantas. En este cuarto muestreo el número de hojas verdes alcanzó a 17, aunque el número total, verdes más senescentes, podía superar las 20. En el último muestreo, 50 días, se apreció una notable disminución del peso fresco en las hojas superiores, asociado a un aumento del porcentaje de las que presentaban más de dos folíolos peciolados, que fue alrededor del 80 %. Los folíolos más pesados, que superaban los 250 mg, fueron los de la parte más inferior de las plantas y, por lo tanto, los que se encontraban próximos a senescer.

4.1.2 - Clorofila

Los análisis se realizaron agrupando los folíolos, de acuerdo a su posición en la planta, en superiores, intermedios e inferiores. Teniendo en cuenta la totalidad de los folíolos a lo largo de la ontogenia, el contenido de clorofila se ubicó entre 1.5 y 3 mg por gramo de peso fresco (Figura 4.2). En general, el contenido de clorofila disminuyó desde las hojas superiores hacia las inferiores. En este análisis se descartaron las hojas con signos evidentes de senescencia.

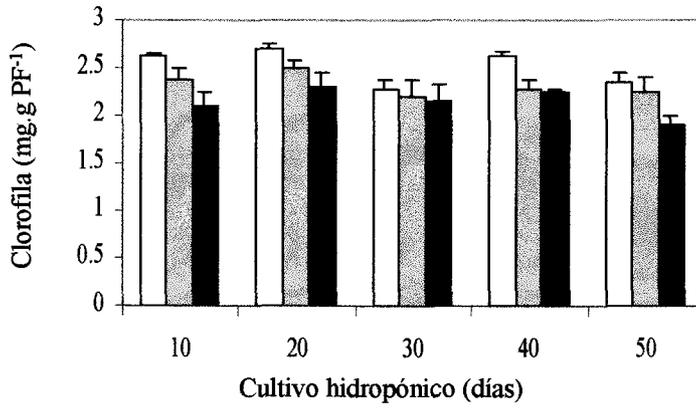


Figura 4.2 - Evolución del contenido en clorofila durante la ontogenia, en folíolos de hojas superiores (□), intermedias (▨) e inferiores (■).

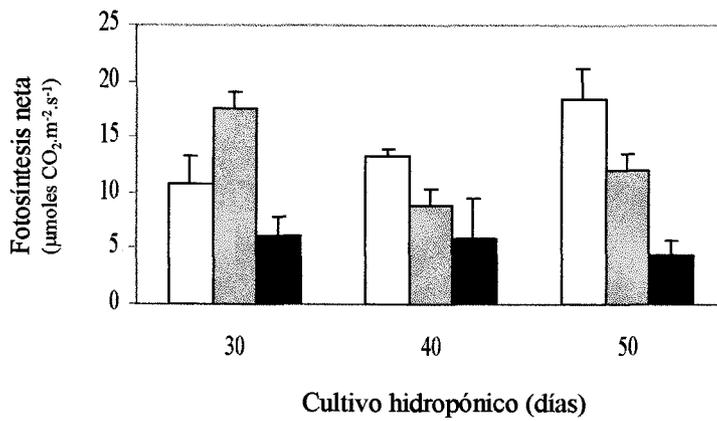


Figura 4.3 - Fotosíntesis neta en folíolos de hojas superiores (□), intermedias (▨) e inferiores (■), en estado vegetativo (30 días), floración (40 días) y fructificación (50 días).

4.1.3 - Fotosíntesis neta

La tasa de fotosíntesis neta, medida como consumo de CO₂, en un equipo IRGA, fue mayor en hojas superiores e intermedias con respecto a las inferiores (Figura 4.3). Aquéllas, más activas fotosintéticamente, presentaron valores entre 10 y 20 μmol de CO₂ · m⁻² · seg⁻¹, tanto en estado vegetativo (30 días de cultivo hidropónico) como en floración (40 días) y fructificación (50 días).

4.1.4 - Proteínas totales

En general se cumplió un perfil similar al del contenido en clorofila. Las hojas inferiores presentaron en todos los muestreos valores 2 a 3 veces inferiores al de hojas intermedias y superiores (Figura 4.4). No hubo en estadios finales diferencias entre hojas intermedias y superiores. Coincidiendo con la floración (40 días) se registró una caída en el contenido de proteínas, principalmente en hojas superiores. Esto pudo haberse debido a una mayor removilización hacia órganos reproductivos.

4.1.5 - Actividad FBPasa no dependiente de tiorredoxina (a pH 8.8)

Si los resultados se expresan por unidad de peso fresco las hojas superiores presentaron una mayor actividad con respecto a las intermedias e inferiores (Figura 4.5). Como sucedió con el contenido de proteínas totales, se registró una caída en los valores de hojas superiores de plantas en floración. En cambio, cuando los resultados se expresan por unidad de proteína, los valores de hojas superiores se acercaron a los de hojas intermedias e inferiores (Figura 4.6). En los dos primeros muestreos las hojas intermedias tuvieron valores inferiores. Posiblemente esto fuera debido a que el metabolismo en estas hojas esté desplazado hacia la actividad de otras enzimas.

4.1.6 - Actividad FBPasa dependiente de tiorredoxina endógena (a pH 7.9)

Al igual que con la actividad a pH 8.8 se registró, a lo largo de la ontogenia, una disminución en los valores de actividad a pH 7.9 desde las hojas superiores hacia las inferiores (Figura 4.7). En hojas superiores, además, se notó una disminución a medida que el cultivo avanzaba. Cuando los valores se expresan por unidad de proteína los

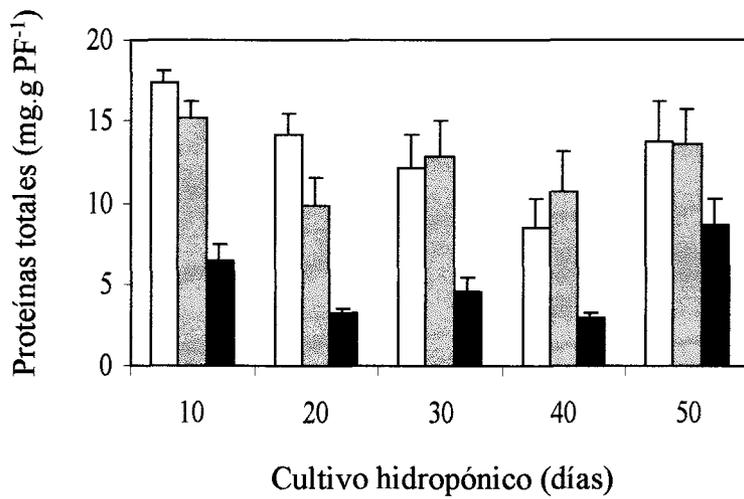


Figura 4.4 – Contenido de proteínas solubles totales durante la ontogenia en foliolos de hojas superiores (□), intermedias (▨) e inferiores (■).

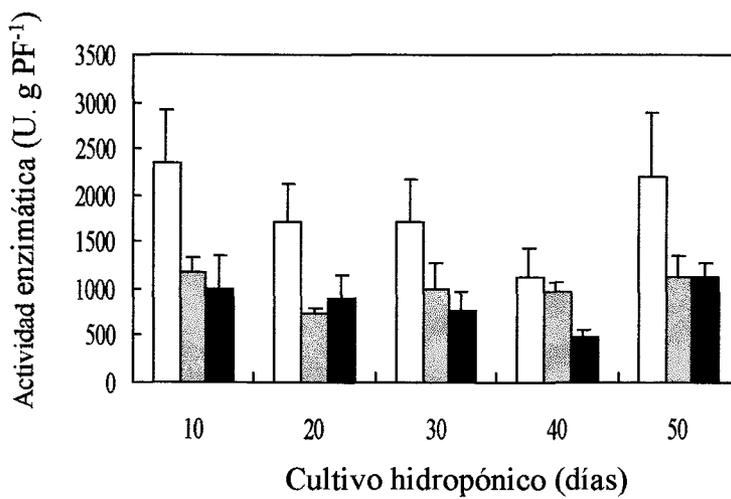


Figura 4.5 – Actividad FBPasa a pH 8.8 expresada por unidad de peso fresco durante la ontogenia en foliolos de hojas superiores (□), intermedias (▨) e inferiores (■)

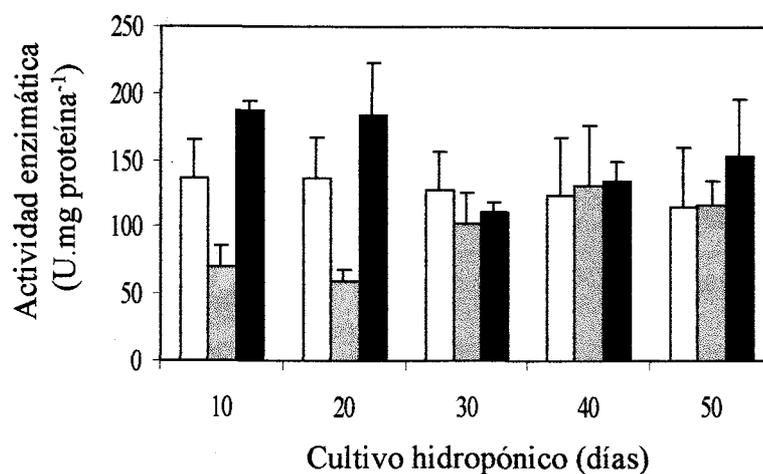


Figura 4.6 – Actividad FBPassa a pH 8.8, expresada por unidad de proteína, durante la ontogenia en foliolos de hojas superiores (□), intermedias (▨) e inferiores (■).

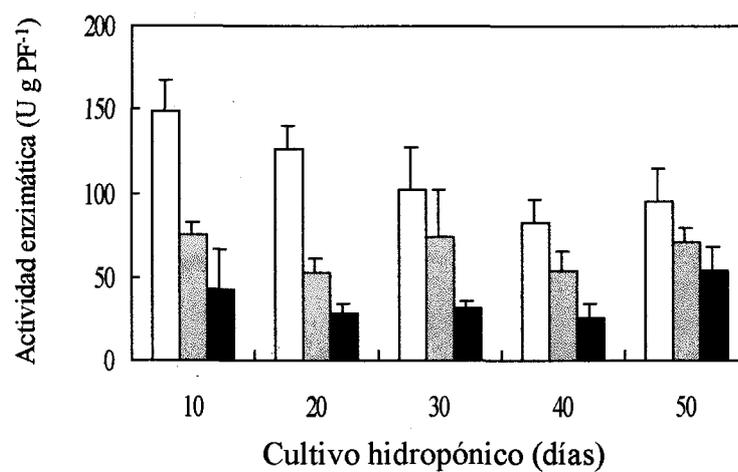


Figura 4.7 - Actividad FBPassa a pH 7.9, expresada por unidad de peso fresco, durante la ontogenia en foliolos de hojas superiores (□), intermedias (▨) e inferiores (■).

valores se hacen similares, aunque, tal como sucedió con la actividad a pH 8.8, los de hojas medias resultaron inferiores a los de superiores e inferiores en el primer muestreo (Figura 4.8).

4.1.7 - Actividad NADP-MDH dependiente de tiorredoxina endógena

Al igual que la actividad FBPasa, la actividad NADP-MDH expresada por unidad de peso fresco fue mayor en hojas superiores e intermedias, con respecto a las inferiores (Figura 4.9). Entre las primeras no hubo en general diferencias significativas. Este perfil se mantuvo, en general, cuando los datos se expresaran por unidad de proteína (Figura 4.10).

4.1.8 - Actividades FBPasa y NADP-MDH dependientes de tiorredoxina exógena

Con el objeto de analizar la posible existencia de una deficiencia en los niveles de tiorredoxina endógena, se realizó la medición de las actividades FBPasa y NADP-MDH agregando Trx *f* y Trx *m*, respectivamente. Se utilizaron folíolos de hojas superiores e intermedias por ser las que presentaban mayores contenidos de ambas enzimas determinados por ELISA. No se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre estos valores y los correspondientes a las actividades dependientes de tiorredoxina endógena (Figura 4.11).

4.1.9 - Niveles proteicos de FBPasa, NADP-MDH, Trx *f* y Trx *m*

Se procedió a la obtención de anticuerpo anti-FBPasa debido a que los correspondientes a las otras proteínas se encontraban en cantidad suficiente en el laboratorio. La determinación del título del anticuerpo producido se realizó mediante ELISA (Figura 4.12) y la especificidad mediante Western-blotting (Figura 4.13). Se consideró que el anticuerpo era apropiado para la determinación del contenido de FBPasa en los tejidos foliares, debido a la inexistencia de reacción cruzada con la FBPasa citosólica (Fonollá *et al.*, 1994).

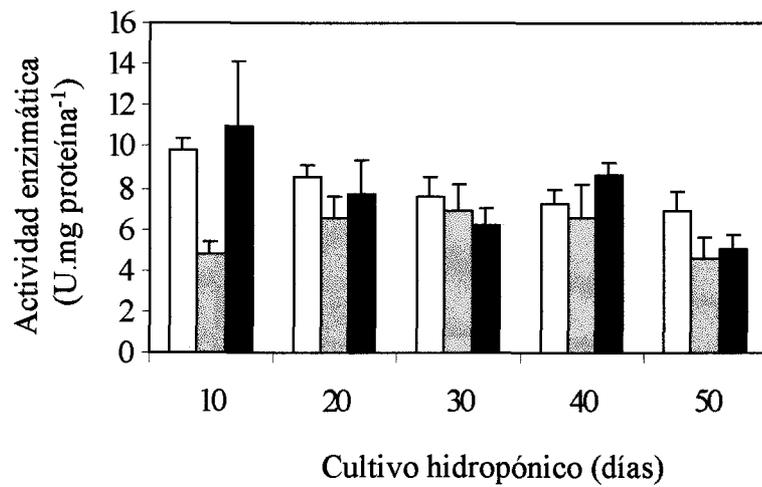


Figura 4.8 - Actividad FBPassa a pH 7.9 expresada por unidad de proteína, durante la ontogenia en folíolos de hojas superiores (□), intermedias (▨) e inferiores (■).

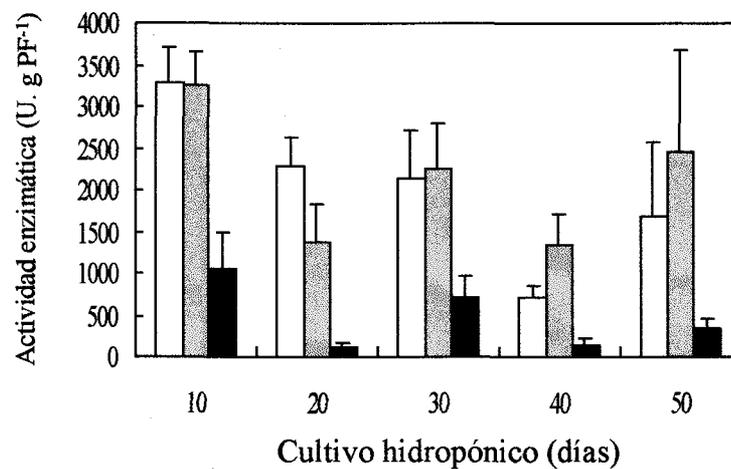


Figura 4.9 - Actividad NADP-MDH expresada por unidad de peso fresco, durante la ontogenia en folíolos de hojas superiores (□), intermedias (▨) e inferiores (■).

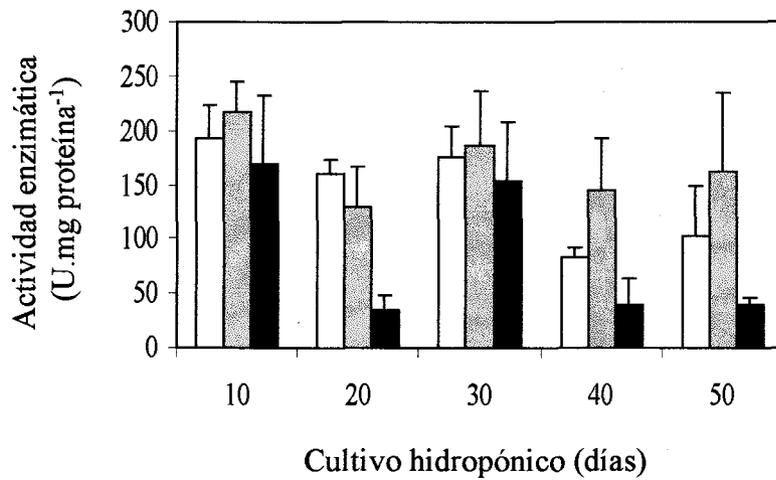


Figura 4.10 - Actividad NADP-MDH expresada por unidad de proteína, durante la ontogenia en folíolos de hojas superiores (□), intermedias (▨) e inferiores (■).

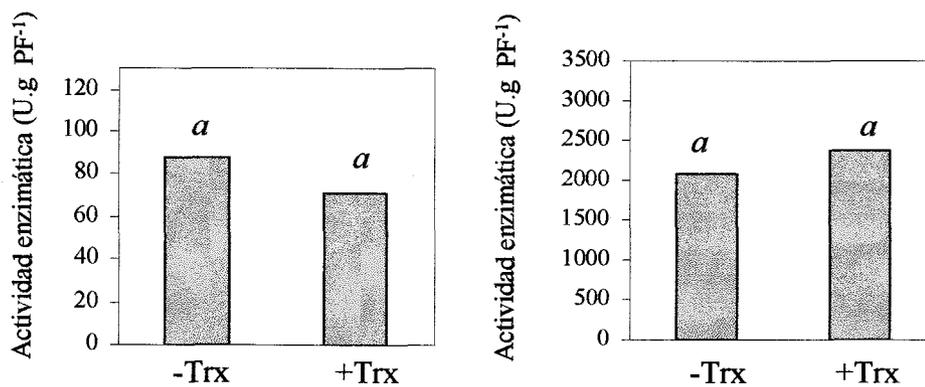


Figura 4.11 - Actividades FBPasa a pH 7.9 (a) y NADP-MDH (b) expresadas por unidad de proteína con (+Trx) y sin (-Trx) agregado de Trx *f* y Trx *m* exógenas, respectivamente. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p \geq 0.05$)

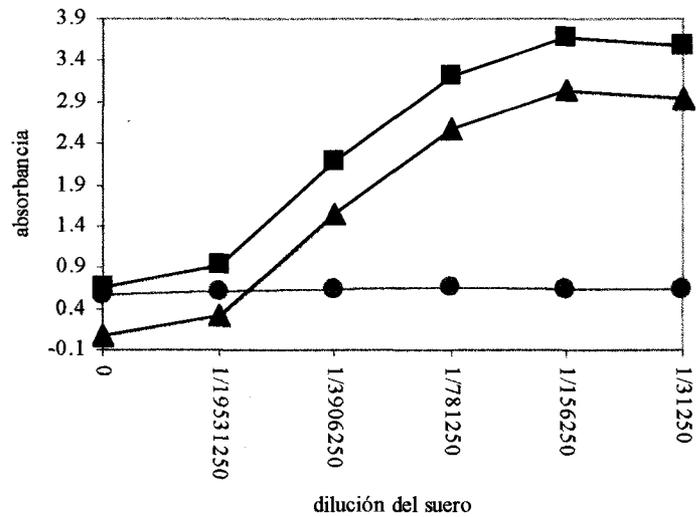


Figura 4.12 – Determinación del título del anticuerpo anti-FBPasa mediante ELISA. Suero preinmune(●),suero final (■),suero final–suero preinmune (▲).

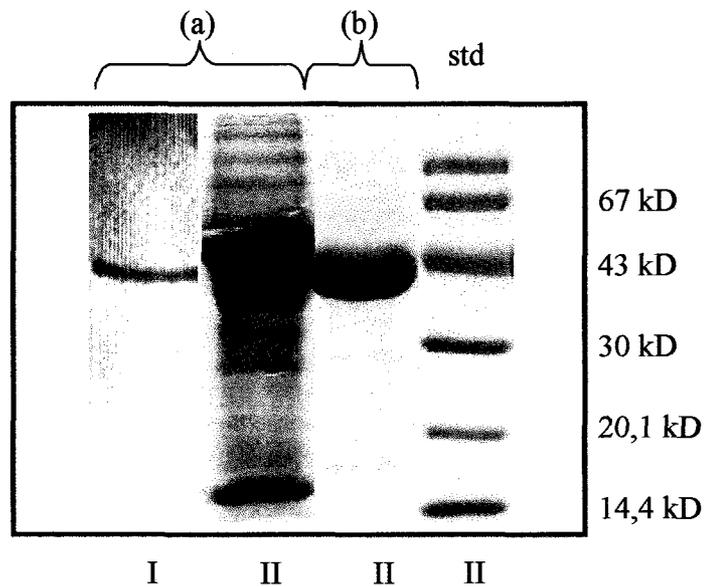


Figura 4.13 – Determinación de la especificidad del anticuerpo anti-FBPasa mediante Western-blotting. I) Western-blotting, revelado para peroxidasa con 4-cloro-1-naftol; II) electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, tinción con azul Coomasie R-250. (a) extracto foliar, (b) proteína expresada utilizada en las inoculaciones. Std: estándares de pesos moleculares

Utilizando el anticuerpo obtenido anti-FBPasa y los existentes anti-NADP-MDH, anti-Trx *f* y anti-Trx *m*, se procedió a la determinación de los niveles proteicos específicos mediante ELISA. En todos los casos los valores se expresan por unidad de peso fresco, y relativos al mayor valor de absorbancia alcanzado en cada análisis.

En el caso de la FBPasa los mayores valores se encontraron en estadios cercanos a la floración (40 días), y siempre fueron disminuyendo desde hojas superiores hacia las inferiores (Figura 4.14). Un perfil casi idéntico se cumplió con su modulador fisiológico Trx *f* (Figura 4.15). En cambio para la NADP-MDH (Figura 4.16) y su modulador, Trx *m*, los valores máximos se presentaron antes de la floración (Figura 4.17).

4.1.10 - Expresión transcripcional

4.1.10.1 – Estudios preliminares

Primeramente se evaluaron diferentes técnicas para analizar los contenidos de mRNA específicos para cada proteína. Se buscaba una técnica que fuera a la vez lo suficientemente sensible y eficaz para comparar diferentes muestras, y que también permitiera el manejo de un número elevado de las mismas. Como material de partida se prefirió emplear mRNA en lugar de RNA total, porque evitaba posibles contaminaciones con DNA genómico y permitía ajustar mejor las concentraciones de sustrato. La utilización de la técnica de Northern-blotting resultó inadecuada por el número elevado de muestras a analizar. Se optó en un primer momento por el Northern-ELISA, pero después de varias extracciones se vió que la cantidad de mRNA que se obtenía de las muestras foliares mediante la utilización de partículas magnéticas de estreptavidina resultaba insuficiente para el Northern-ELISA. Se necesitaba partir de un mayor peso fresco inicial, superior a los 100 mg recomendados por el fabricante, lo que redundaba en una menor pureza de la solución de mRNA obtenida. Se probó entonces la técnica de transcripción inversa del mRNA y posterior amplificación por PCR del cDNA obtenido (RT-PCR). Esta técnica es muy sensible en la detección de transcritos, pero requiere una considerable cantidad de pasos previos para hacerla suficientemente repetitiva y fiable. Cumplidos estos pasos el RT-PCR se torna una técnica que, aunque semicuantitativa, es muy útil para comparar niveles de expresión transcripcional en tejidos de diferentes órganos o estados fisiológicos.

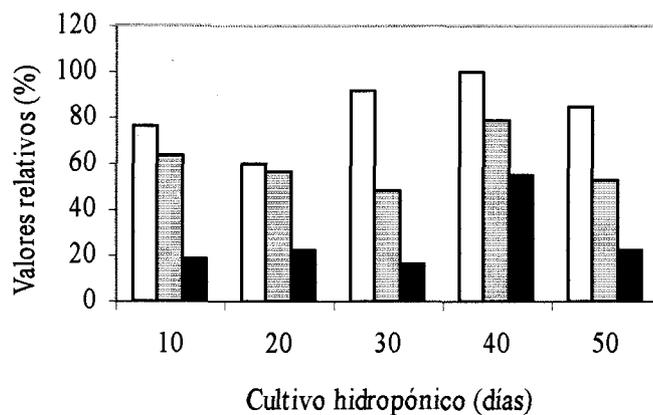


Figura 4.14 – Contenido de FBPa analizado mediante ELISA, en foliolos de hojas superiores (□), intermedias (▨) e inferiores (■). Valores expresados como porcentaje del mayor valor de absorbancia alcanzado, en función del peso fresco.

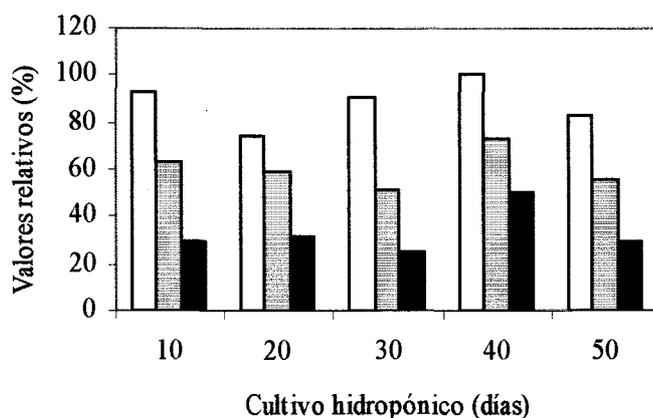


Figura 4.15 – Contenido de Trx f analizado mediante ELISA en foliolos de hojas superiores (□), intermedias (▨) e inferiores (■). Valores expresados como porcentaje del mayor valor de absorbancia alcanzado, en función del peso fresco.

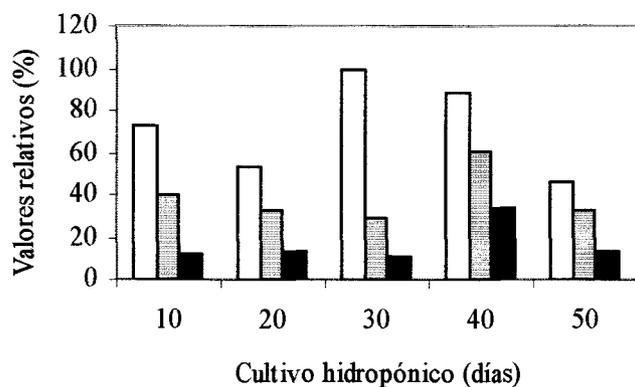


Figura 4.16 – Contenido de NADP-MDH analizado mediante ELISA, en folíolos de hojas superiores (□), intermedias (▨) e inferiores (■). Valores expresados como porcentaje del mayor valor de absorbancia alcanzado, en función del peso fresco.

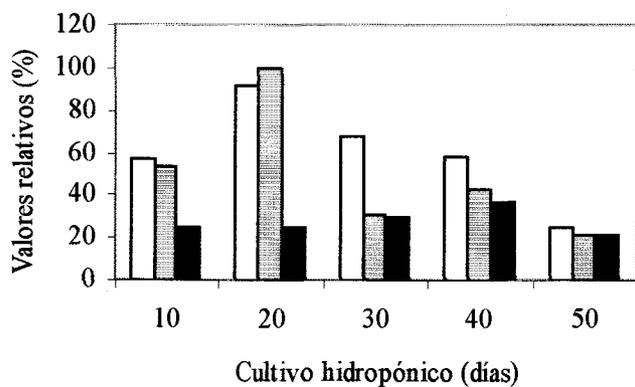


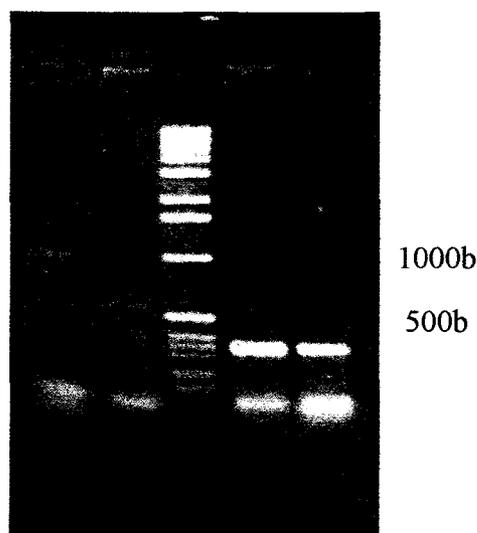
Figura 4.17 – Contenido de Trx *m* analizado mediante ELISA, en folíolos de hojas superiores (□), intermedias (▨) e inferiores (■). Valores expresados como porcentaje del mayor valor de absorbancia alcanzado, en función del peso fresco.

La puesta a punto comienza con el diseño de oligonucleótidos, que actuarán a la manera de “primers” o cebadores para la actividad de las polimerasas. En el laboratorio se contaba con diferentes oligonucleótidos que se utilizaban en las experiencias con plásmidos, cuyos nombres y características se describen en la Tabla 4.1. Estos oligonucleótidos fueron efectivos en el caso de las tiorredoxinas, pero no para FBPasa y NADP-MDH (Figura 4.18). Esto es así porque los fragmentos que se buscaba amplificar en el caso de las tiorredoxinas eran de menor tamaño. En el RT-PCR surgen problemas cuando el fragmento de interés supera las 1000 bases, como era el caso de la FBPasa y de la NADP-MDH. Estos inconvenientes se pueden evitar trabajando sobre tres aspectos: (a) variando el programa de amplificación, disminuyendo la temperatura y aumentando el tiempo de “annealing”, y/o aumentando el tiempo de polimerización; (b) empleando oligonucleótidos con mayor número de bases complementarias a la secuencia molde, siendo lo aconsejable alrededor de 30, y (c) utilizando oligonucleótidos complementarios a zonas intermedias de la secuencia de interés, que determinen la amplificación de fragmentos más cortos que la secuencia total. Si los fines son meramente comparativos, estos fragmentos más cortos son igualmente representativos de la secuencia completa. Los oligonucleótidos que estábamos empleando sólo poseían alrededor de 15 bases complementarias, y con ellos no se consiguió un programa que fuera lo suficientemente efectivo.

Se diseñaron nuevos oligonucleótidos con secuencias complementarias de alrededor de 30 bases para FBPasa y NADP-MDH (Tabla 4.2). Los nuevos fragmentos diseñados fueron adecuados para una amplificación fiable y repetitiva de los transcritos de FBPasa y NADP-MDH (Figura 4.19). El empleo de diferentes combinaciones de oligonucleótidos para secuencias más cortas del transcrito de la FBPasa (Tabla 4.3) también fue efectivo. Aunque con diferente rendimiento, se obtuvo la amplificación de los fragmentos esperados (Figura 4.20). Finalmente, se decidió seguir la puesta a punto del RT-PCR empleando los oligonucleótidos que determinaban la amplificación de las secuencias completas tanto de la FBPasa como de la NADP-MDH.

<u>NOMBRE</u>	<u>PROTEINA</u>	<u>EXTREMO</u>	<u>SECUENCIA</u>
FJ1	FBPasa	5'	-gatccatggCTGTGAAGGAA-
OF2	FBPasa	3'	-taggatccTTAAGCTAAGTACTT-
MDHp	NADP-MDH	5'	-cgtcatatgTCTGTTGCACCAAAT-
pHDM	NADP-MDH	3'	-ttgaattcttaCATTTCCGCCGGG-
Tf N	Trx <i>f</i>	5'	-cacggccatggTAGGGAAAGTAACC-
Tf C	Trx <i>f</i>	3'	-aaggatccCTAACTAGACCGAACAGTG-
Tm N	Trx <i>m</i>	5'	-gctcatatgGCTGTAAATGAAGTTCA-
Tm C	Trx <i>m</i>	3'	-tggatccTCAAATATACTTTTCCAC-

Tabla 4.1 – Secuencias de oligonucleótidos utilizados en las experiencias preliminares de RT-PCR. En mayúsculas aparecen las bases complementarias a la secuencia de interés



(a) (b) std (c) (d)

Figura 4.18 – Productos de RT-PCR utilizando FJ1 - OF2 (a); MDHp – pHDM (b); Tf N - Tf C (c) y Tm N – Tm C (d). Tinción con bromuro de etidio. std: marcadores de peso molecular.

<u>NOMBRE</u>	<u>PROTEINA</u>	<u>EXTREMO</u>	<u>SECUENCIA</u>
FBP-N	FBPasa	5'	-ATGGCTGTGAAGGAAGCAACTAGTGAGAC-
FBP-C	FBPasa	3'	-TTAAGCTAAGTACTTTCAACCTTCTCCAC-
MDH-N	NADP-MDH	5'	-TCTGTTGCACCAAAATCAAGTGCAGGTTCC-
MDH-C	NADP-MDH	3'	-CATTTGCGCCGGGAGCATGGTGTGCGCCAGG-

Tabla 4.2 – Características de los oligonucleótidos con secuencias de alrededor de 30 bases utilizados para el RT-PCR de los transcritos de FBPasa y NADP-MDH.

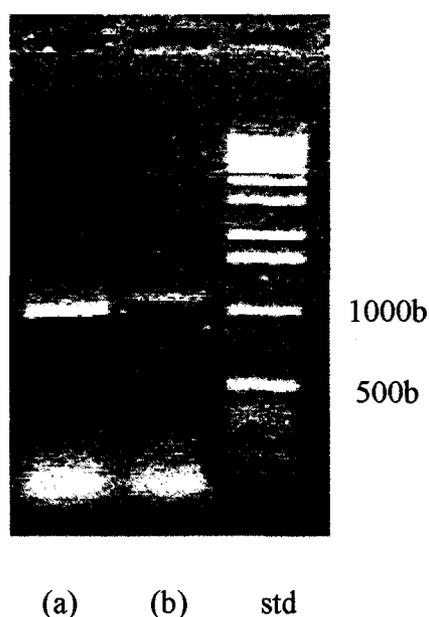


Figura 4.19 – Fragmentos obtenidos por RT-PCR de los transcritos de FBPasa (a) y NADP-MDH (b), utilizando oligonucleótidos de alrededor de 30 bases complementarias. Tinción con bromuro de etidio. std: marcadores de peso molecular.

<u>NOMBRE</u>	<u>PROTEINA</u>	<u>EXTREMO</u>	<u>SECUENCIA</u>
GIN	FBPasa	5'	-GCATTTTTGGGATTACAG-
GIC	FBPasa	3'	-GCCTGGTTGACACACATT-
DS	FBPasa	5'	-acgttGACACTCGTCATTGG-

Tabla 4.3 – Características de los oligonucleótidos empleados en la amplificación de fragmentos incompletos del transcrito de FBPasa. En mayúsculas aparecen las bases complementarias a la secuencia de interés.

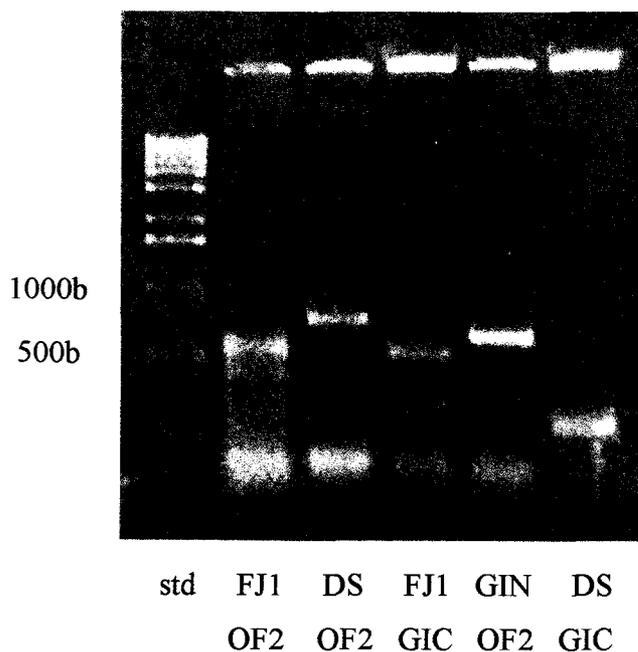


Figura 4.20 – Amplificación por RT-PCR de secuencias parciales del transcrito de FBPasa. Tinción con bromuro de etidio. std: marcadores de peso molecular.

4.1.10.2 - Optimización del RT-PCR

Los ensayos descritos fueron desarrollados utilizando el mismo programa (Figura 4.21). Es necesario tener en cuenta que si el RT-PCR se va a utilizar para comparar semicuantitativamente los niveles de mRNA de una misma proteína en diferentes tejidos o situaciones fisiológicas, se debe ajustar el programa de manera que se puedan detectar diferencias, y que éstas se repitan si la determinación se realiza en las mismas condiciones. Para lograr el programa adecuado se pueden hacer pruebas variando, por un lado, la concentración de la secuencia molde y, por otro, el número de ciclos en la etapa de PCR. En el caso de las tiorredoxinas se comenzó trabajando con una concentración de molde, en general recomendada, de 50 ng y variando la cantidad de ciclos. Tanto para la *Trx f* (Figura 4.22) como para la *Trx m* (Figura 4.23) el número de ciclos adecuado se ubicó entre 23 y 26, siendo el resto del programa el usado previamente (Figura 4.21). En esta zona era en la que se obtenía una respuesta cuantitativa. Se decidió, entonces, utilizar en el futuro 25 ciclos en la etapa de PCR.

Una vez encontrado el número de ciclos adecuado se pasó a analizar la cantidad de mRNA inicial (Figuras 4.24 y 4.25). Tanto en el caso de la *Trx f* como de la *Trx m* se apreció una cierta inhibición para elevadas cantidades de molde inicial (100 ng), lo que podría deberse a las impurezas presentes en la solución de mRNA; por ejemplo, restos de tiocianato de guanidina, o de proteínas procedentes de la extracción con partículas de estreptavidina. Lo apropiado parecía trabajar con cantidades inferiores a 25 ng. Se eligió como cantidad apropiada 20 ng de mRNA total.

Se siguió un esquema similar en la optimización del RT-PCR para FBPasa, pero en este caso el programa contempló desde el principio un tiempo más prolongado para el paso de polimerización en la etapa de PCR (Figura 4.26). Aunque ya con 30 ciclos se apreciaban productos de amplificación de la secuencia completa del transcrito para FBPasa (Figura 4.27), se prefirió seguir trabajando en adelante con 40 ciclos. Se asumió que el número de ciclos apropiado para NADP-MDH tendría que ser similar al usado para FBPasa, debido a la similitud de extensión de la secuencia que se pretendía amplificar. Se procedió entonces al análisis de la cantidad de mRNA inicial para ambas proteínas (Figura 4.28).

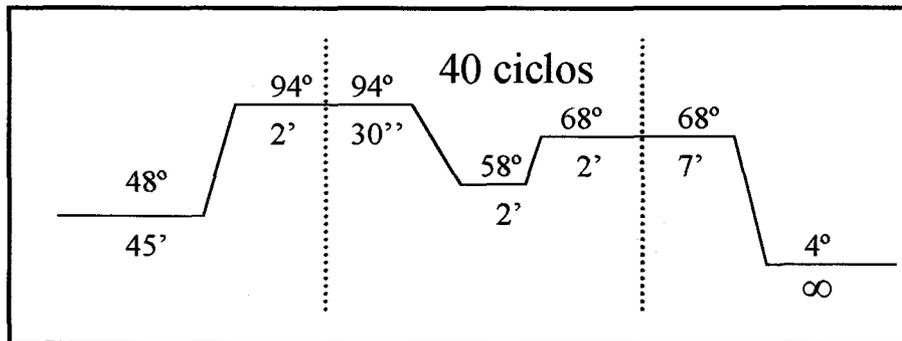


Figura 4.21 – Programa de RT-PCR utilizado en los ensayos iniciales.

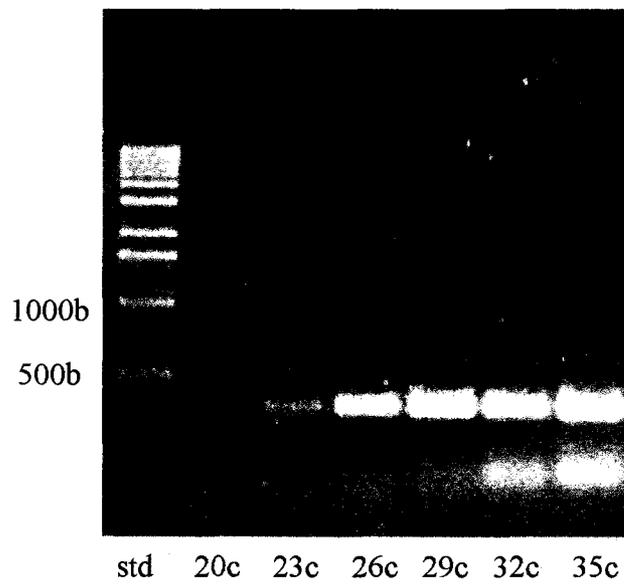


Figura 4.22 – Determinación del número de ciclos adecuado en la amplificación por RT-PCR del transcrito de *Trxf*. std: marcadores de peso molecular.

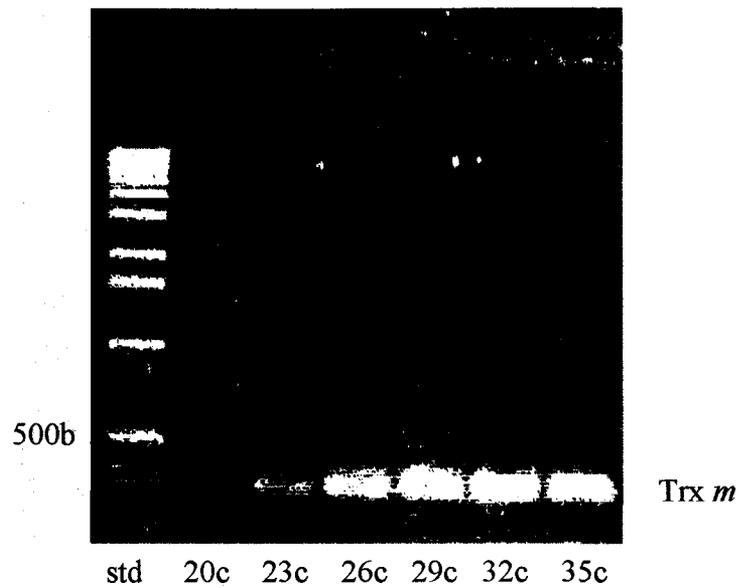


Figura 4.23 - Determinación del número de ciclos adecuado en la amplificación por RT-PCR del transcrito de *Trx m*. std: marcadores de peso molecular.

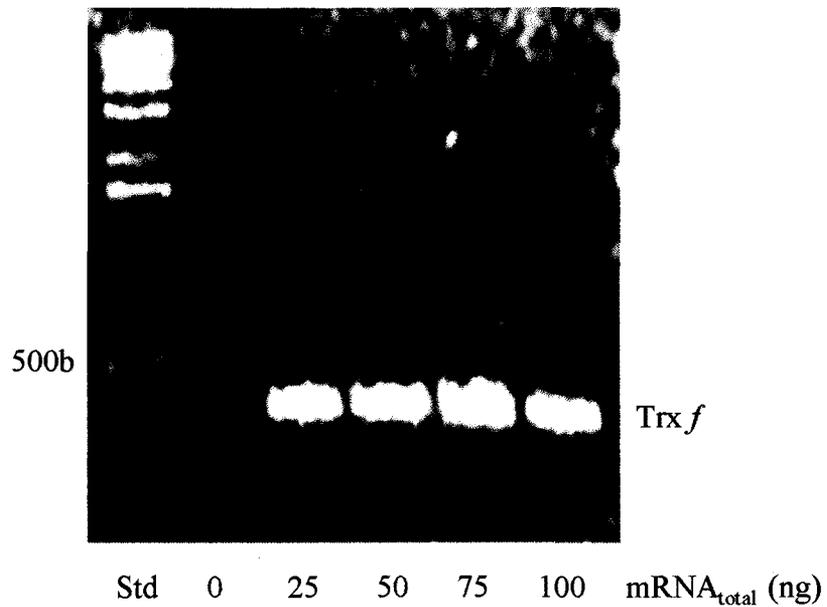


Figura 4.24 – Determinación de la cantidad de molde inicial apropiado en la amplificación por RT-PCR del transcrito de *Trx f*. std: marcadores de peso molecular.

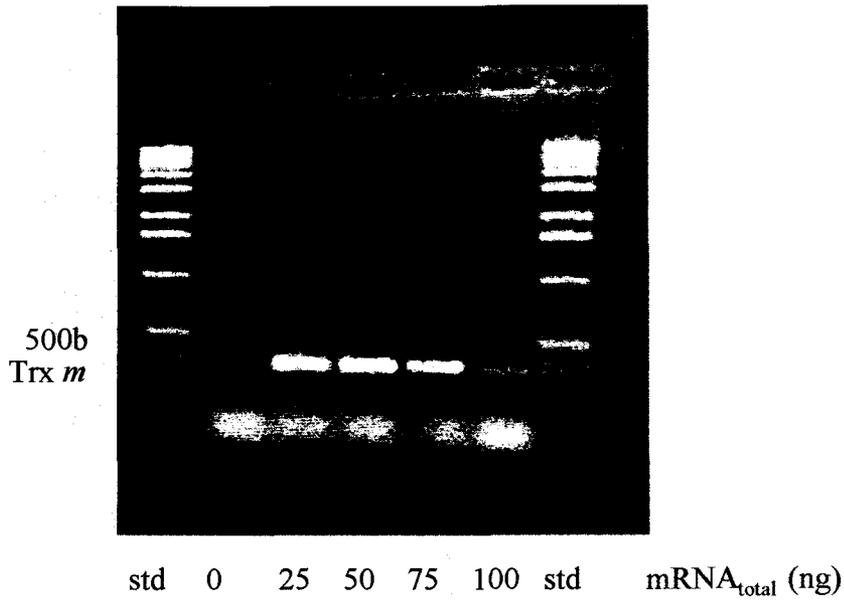


Figura 4.25 – Determinación de la cantidad de molde inicial apropiado en la amplificación por RT-PCR del transcrito de *Trx m*. std: marcadores de peso molecular.

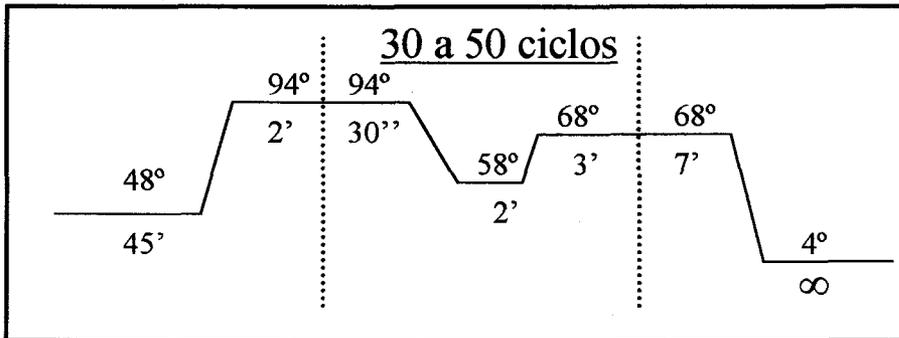


Figura 4.26 – Programa empleado en la optimización del RT-PCR para FBPasa.

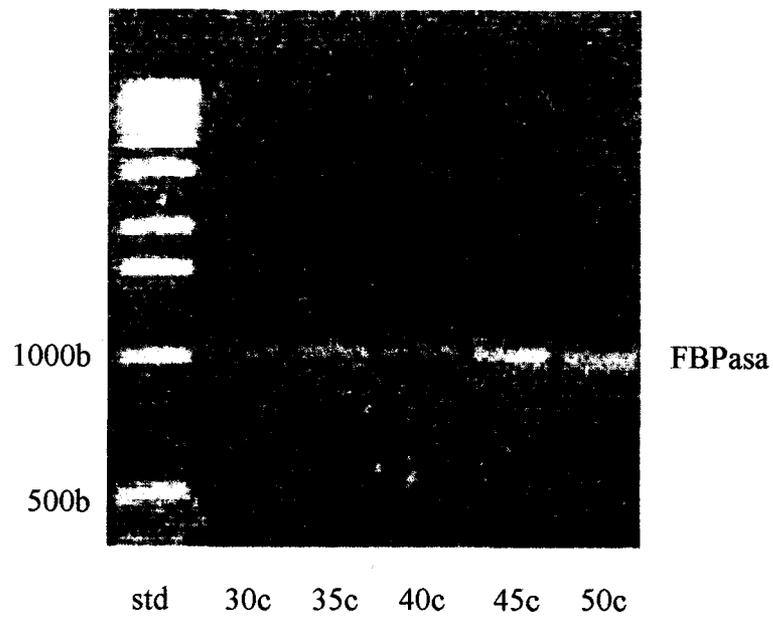


Figura 4.27 - Determinación del número de ciclos adecuado en la amplificación por RT-PCR del transcrito de FBPasa. std: marcadores de peso molecular.

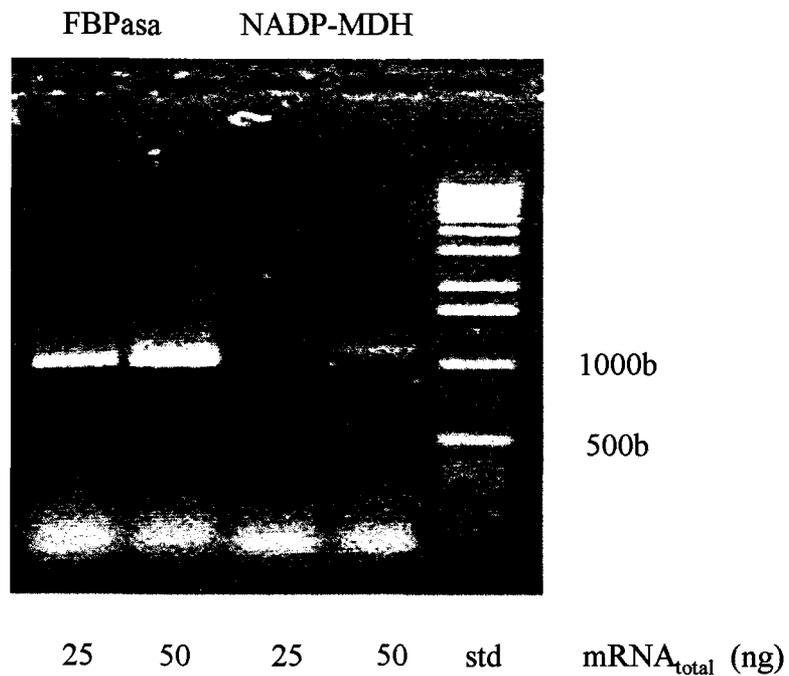


Figura 4.28 – Determinación de la cantidad de molde inicial apropiado en la amplificación por RT-PCR de los transcritos de FBPasa y NADP-MDH. std: marcadores de peso molecular.

Sobre la base de todos estos estudios preliminares se probó la eficacia del RT-PCR optimizado para comparar niveles de transcritos de *Trx f* y *Trx m* en folíolos de hojas superiores, intermedias e inferiores durante la ontogenia, previa extracción del mRNA (Figuras 4.29 y 4.30). Los resultados fueron satisfactorios.

Por último restaba encontrar una forma de medir los niveles de expresión transcripcional, semicuantitativamente, adecuada a las características propias del método de RT-PCR. En la bibliografía encontramos el uso frecuente de la hibridación con sondas específicas marcadas de los fragmentos obtenidos por RT-PCR, después de una electroforesis en agarosa y posterior transferencia a membrana (Southern-blotting). A esto seguiría el revelado de la marca mediante un método adecuado y, finalmente, una densitometría de las correspondientes bandas. Se probó como alternativa el incorporar la marca, en este caso digoxigenina-dUTP, durante la etapa de PCR en el mismo fragmento producido. Esta rutina permitía ahorrar el paso de hibridación. Esta técnica resultó efectiva (Figuras 4.31 y 4.32). Bandas que no se aprecian en la tinción con bromuro de etidio eran perfectamente apreciables y, por lo tanto, cuantificables; tal era el caso de la *Trx m* (Figuras 4.30 y 4.32).

4.1.10.3 - Niveles de transcritos de FBPasa, NADP-MDH, *Trx f* y *Trx m* durante la ontogenia

El análisis de los contenidos de mRNA por unidad de peso fresco en el caso de la FBPasa muestra un perfil similar al de la proteína específica determinada por ELISA. Los valores más altos se encontraron en floración y fructificación (Figura 4.33). Al igual que ocurre el contenido de proteína para NADP-MDH, los valores máximos se presentaron en estadios previos a la floración (Figura 4.34). En el caso de las tiorredoxinas (Figuras 4.35 y 4.36) se dio un aumento de los niveles de transcritos desde estadios tempranos hasta la floración-fructificación. Esto coincidió de alguna manera, aunque menos en el caso de la *Trx m*, con los perfiles de proteína y con los encontrados para los transcritos de FBPasa y NADP-MDH.

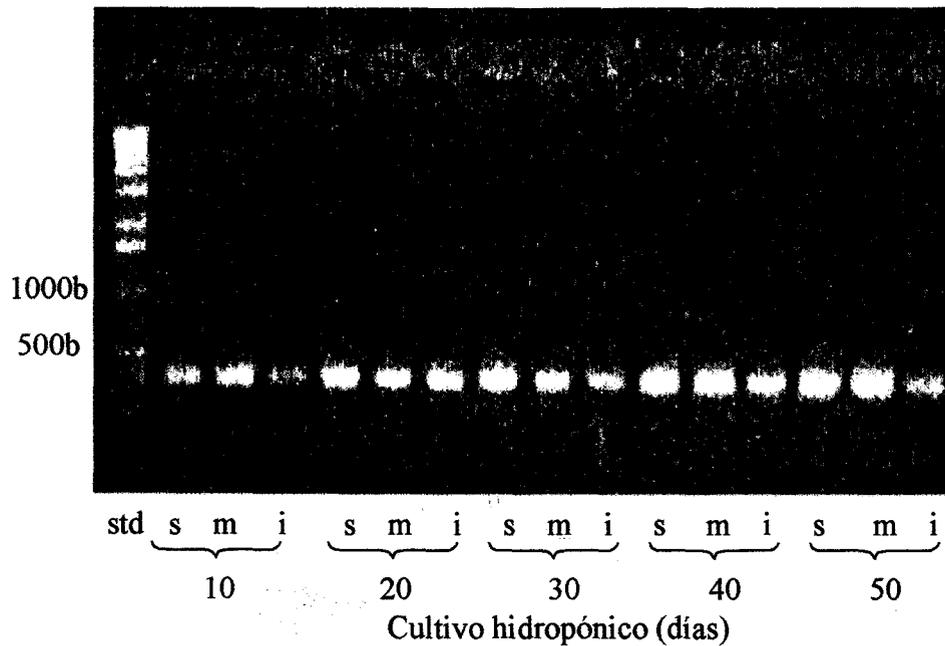


Figura 4.29 – RT-PCR para *Trx f* en folíolos de hojas superiores (s), intermedias (m) e inferiores (i) durante la ontogenia en cultivo hidropónico. std: marcadores de peso molecular.

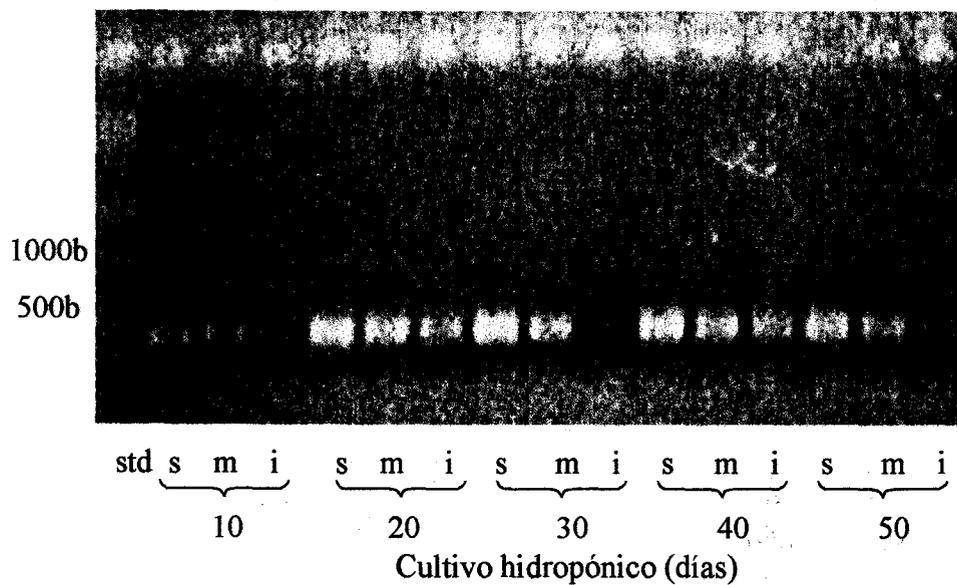


Figura 4.30 – RT-PCR para *Trx m* en folíolos de hojas superiores (s), intermedias (m) e inferiores (i) durante la ontogenia en cultivo hidropónico. std: marcadores de peso molecular.

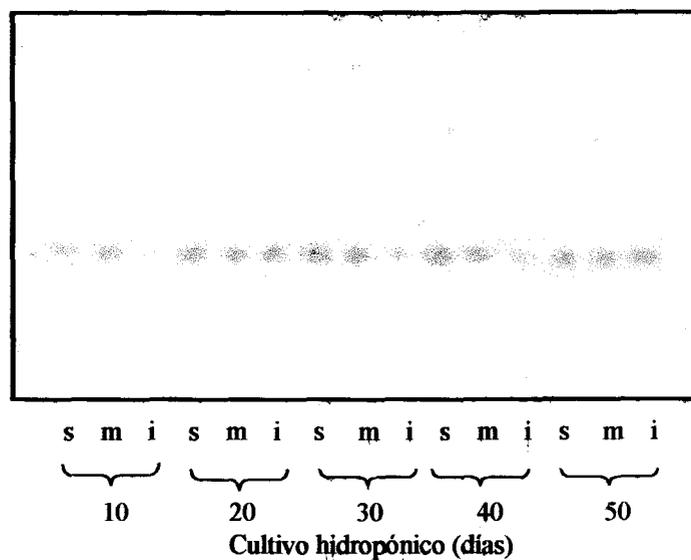


Figura 4.31 – Revelado de los fragmentos marcados con digoxigenina, productos de la amplificación del transcrito para *Trx f* en folíolos de hojas superiores (s), intermedias (m) e inferiores (i), durante la ontogenia en cultivo hidropónico.

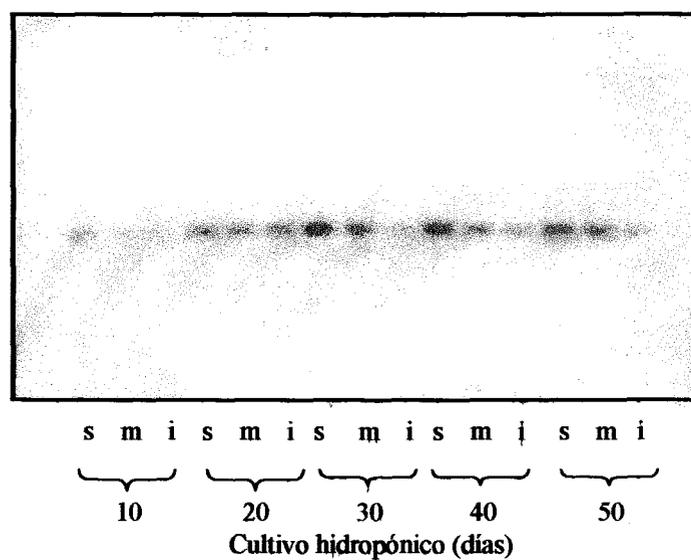


Figura 4.32 – Revelado de los fragmentos marcados con digoxigenina, productos de la amplificación del transcrito para *Trx m* en folíolos de hojas superiores (s), intermedias (m) e inferiores (i), durante la ontogenia en cultivo hidropónico.

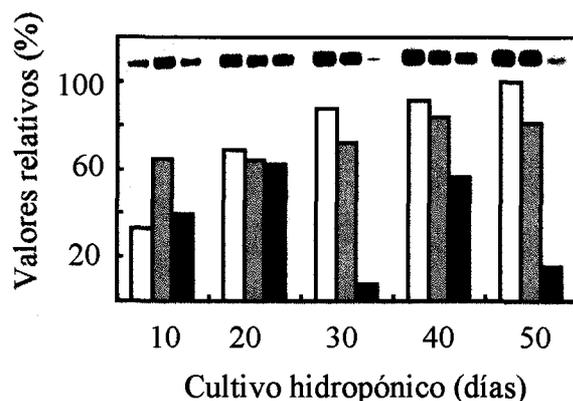


Figura 4.33 – Niveles de mRNA para FBPasa analizados mediante RT-PCR, durante la ontogenia, en folíolos de hojas superiores (□), intermedias (▨) e inferiores (■). Datos relativos al mayor valor, expresados en función de peso fresco. Las manchas sobre las barras corresponden al revelado para fosfatasa alcalina de los fragmentos de DNA marcados con digoxigenina, obtenidos por RT-PCR de los correspondientes mRNA.

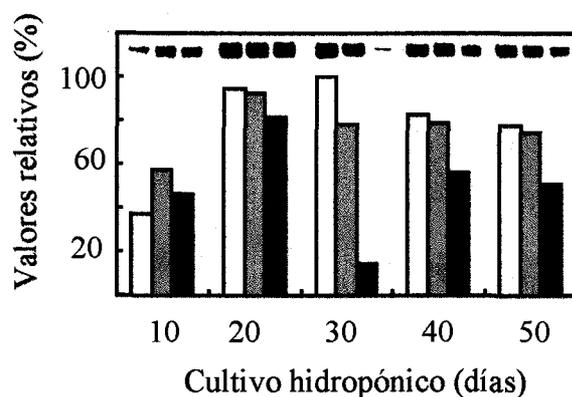


Figura 4.34 – Niveles de mRNA para NADP-MDH analizados mediante RT-PCR, durante la ontogenia, en folíolos de hojas superiores (□), intermedias (▨) e inferiores (■). Datos relativos al mayor valor, expresados en función de peso fresco. Las manchas sobre las barras corresponden al revelado para fosfatasa alcalina de los fragmentos de DNA marcados con digoxigenina, obtenidos por RT-PCR de los correspondientes mRNA.

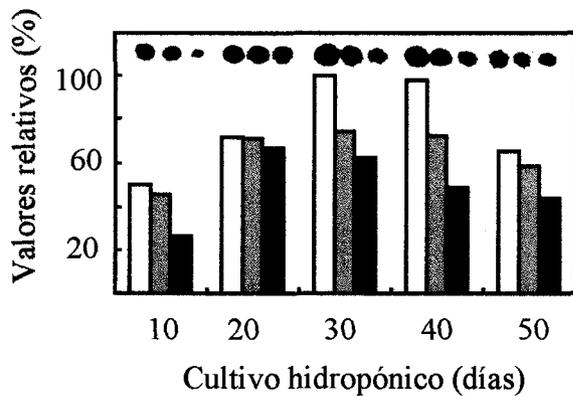


Figura 4.35 – Niveles de mRNA para *Trx f* analizados mediante RT-PCR, durante la ontogenia, en folíolos de hojas superiores (□); intermedias (▨) e inferiores (■). Datos relativos al mayor valor, expresados en función de peso fresco. Las manchas sobre las barras corresponden al revelado para fosfatasa alcalina de los fragmentos de DNA marcados con digoxigenina, obtenidos por RT-PCR de los correspondientes mRNA.

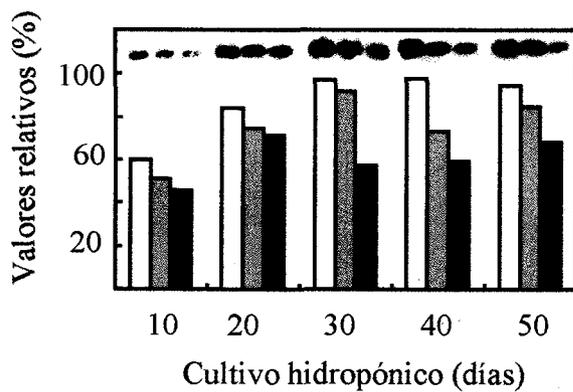


Figura 4.36 – Niveles de mRNA para *Trx m* analizados mediante RT-PCR, durante la ontogenia, en folíolos de hojas superiores (□); intermedias (▨) e inferiores (■). Datos relativos al mayor valor, expresados en función de peso fresco. Las manchas sobre las barras corresponden al revelado para fosfatasa alcalina de los fragmentos de DNA marcados con digoxigenina, obtenidos por RT-PCR de los correspondientes mRNA.

4.1.11 - Expresión transcripcional en hojas etioladas e iluminadas

Se analizaron los niveles de mRNA de FBPasa, Trx *f* y Trx *m* en folíolos obtenidos de plantas mantenidas en oscuridad desde el momento de la siembra hasta los 10 días de crecimiento. A partir de entonces se las iluminó con $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR, recogiendo material foliar a las 0, 2, 10, 24 y 48 horas. En ese instante las plantas se volvieron a colocar en oscuridad, efectuándose el muestreo a las 4 y 24 horas posteriores. Se aprecia una clara respuesta positiva a la luz de los tres transcritos analizados. Esta fue más marcada en el caso de la FBPasa (Figura 4.37). El máximo de expresión se dio a las 24 horas, para disminuir levemente a las 48 horas de iluminación, y caer a valores cercanos a cero en ausencia de luz, ya a las 4 horas de oscuridad. El transcrito para Trx *f* fue más estable (Figura 4.38); ya existía cierto nivel de expresión en plantas etioladas, pero éste aumentó marcadamente al ser iluminadas. A diferencia de la FBPasa, con la oscuridad no se produjo descenso alguno en los niveles de transcritos; por el contrario, éstos se mantuvieron estables hasta las 24 horas de oscuridad, final del periodo de análisis. La expresión del transcrito de Trx *m* presentó algunas particularidades diferentes al de los dos mencionados (Figura 4.39). Aunque al igual que ocurría con la Trx *f* se encontraba presente en hojas etioladas, con la exposición a la luz los niveles aumentaron más rápidamente que en el caso de ésta y de la FBPasa. Como en ambas el máximo de transcrito de Trx *m* se presentó a las 24 horas de iluminación; la oscuridad provocó una disminución muy marcada en los niveles del mismo, comportamiento más parecido al de FBPasa que al de Trx *f*.

4.1.12 - Amplificación de secuencias parciales de FBPasa

Se realizó paralelamente un RT-PCR utilizando una combinación de oligonucleótidos que permitían la amplificación de sólo una parte de la secuencia total de FBPasa, dando similares resultados que la amplificación de la secuencia completa (Figura 4.40, comparar con los resultados de la Figura 4.33).

4.1.13 - Amplificación de secuencias genómicas

La presencia de intrones en las secuencias genómicas de FBPasa (Figura 4.41) y

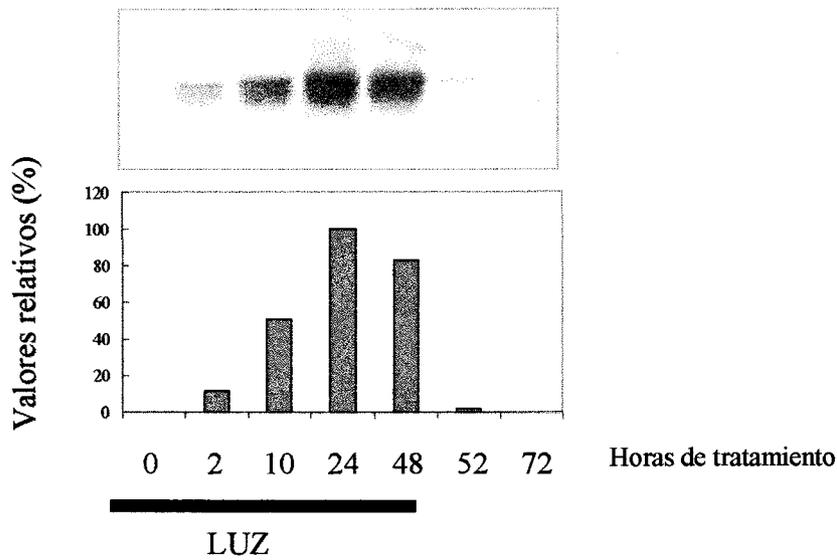


Figura 4.37 - Niveles de transcrito para FBPa en respuesta a la iluminación y a oscuridad. El tiempo 0 corresponde a plántulas etioladas. Las manchas sobre las barras corresponden al revelado para fosfatasa alcalina de los fragmentos de DNA marcados con digoxigenina, obtenidos por RT-PCR de los correspondientes mRNA.

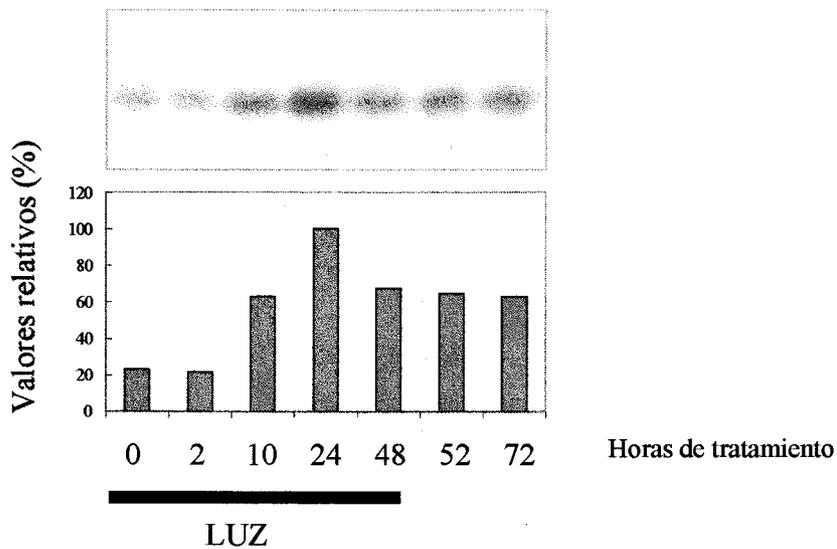


Figura 4.38 - Niveles de transcrito para *Trx f* en respuesta a la iluminación y a oscuridad. El tiempo 0 corresponde a plántulas etioladas. Las manchas sobre las barras corresponden al revelado para fosfatasa alcalina de los fragmentos de DNA marcados con digoxigenina, obtenidos por RT-PCR de los correspondientes mRNA.

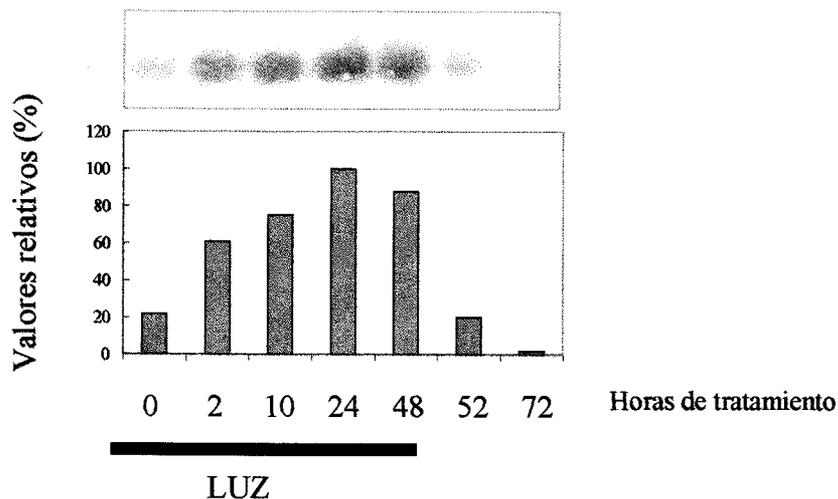


Figura 4.39 - Niveles de transcritos para *Trx m* en respuesta a la iluminación y oscuridad. El tiempo 0 corresponde a plántulas etioladas. Las manchas sobre las barras corresponden al revelado para fosfatasa alcalina de los fragmentos de DNA marcados con digoxigenina, obtenidos por RT-PCR de los correspondientes mRNA.

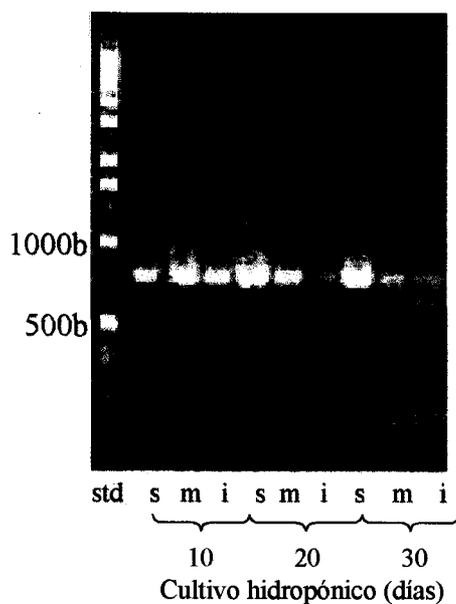


Figura 4.40 - RT-PCR para FBPasa utilizando los oligonucleótidos GIN y FBP-C. Niveles de mRNA durante 30 días de crecimiento hidropónico (fase vegetativa), en folíolos de hojas superiores (s), intermedias (m) e inferiores (i).

Trx *f* (Figura 4.42) determinó la amplificación de secuencias más largas que las obtenidas utilizando mRNA como molde. De esta forma se pudo comprobar que los preparados de mRNA total se encontraban, salvo en el caso de la Trx *m*, libres de contaminación por DNA genómico. En el caso de la Trx *m*, el oligonucleótico complementario al extremo 5', Tm-N, reconocía una secuencia que estaba interrumpida por un intrón en el DNA genómico (Sahrawy *et al.*, 1995), por lo que evitaba de esta forma la posible amplificación de secuencias genómicas.

4.2 – Expresión de FBPasa, NADP-MDH y tiorredoxinas *f* y *m* en diferentes órganos de la planta de guisante

4.2.1 - Comparación entre folíolos sésiles y peciolados

Los análisis se realizaron en plantas de 30 días de crecimiento desde la siembra, de ellos 20 en cultivo hidropónico. Se seleccionaron folíolos sésiles y peciolados de los tercios superior, intermedio e inferior de la planta. Al igual que en los análisis de ontogenia, la actividad FBPasa no dependiente y dependiente de tiorredoxina endógena, así como la actividad NADP-MDH, disminuyeron desde las hojas superiores hacia las inferiores, tanto en folíolos sésiles como peciolados. El análisis estadístico permitió comprobar esta tendencia, al igual que una mayor actividad en los folíolos sésiles con respecto a los peciolados cuando los resultados se expresan por unidad de peso fresco (Figura 4.43). El contenido de proteínas también disminuyó hacia las hojas inferiores, pero no fue diferente entre folíolos sésiles y peciolados (Figura 4.44). Por lo tanto, las diferencias encontradas en la expresión por peso fresco se mantuvieron al expresar los resultados por unidad de proteínas (Figura 4.45).

Cuando las plantas se encontraban en fructificación se midió la tasa de fotosíntesis neta, y se encontró que los folíolos peciolados presentaban tasas muy superiores a los sésiles. Estas diferencias se hacían menores en las hojas inferiores (Figura 4.46).

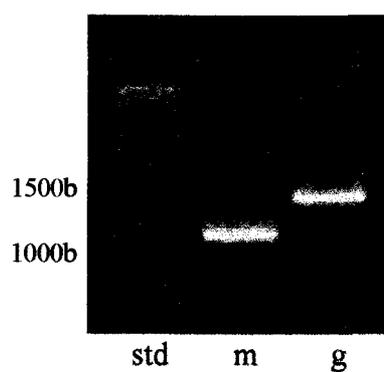


Figura 4.41 – Amplificación por RT-PCR de mRNA para FBPasa de (m), y por PCR de DNA genómico (g). std: marcadores de peso molecular.

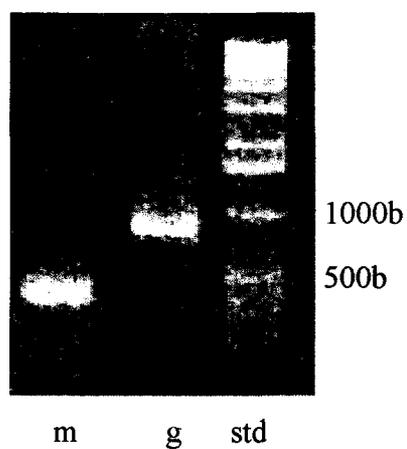


Figura 4.42 – Amplificación por RT-PCR de mRNA para Trx *f* de (m) y por PCR de DNA genómico (g). std: marcadores de peso molecular.

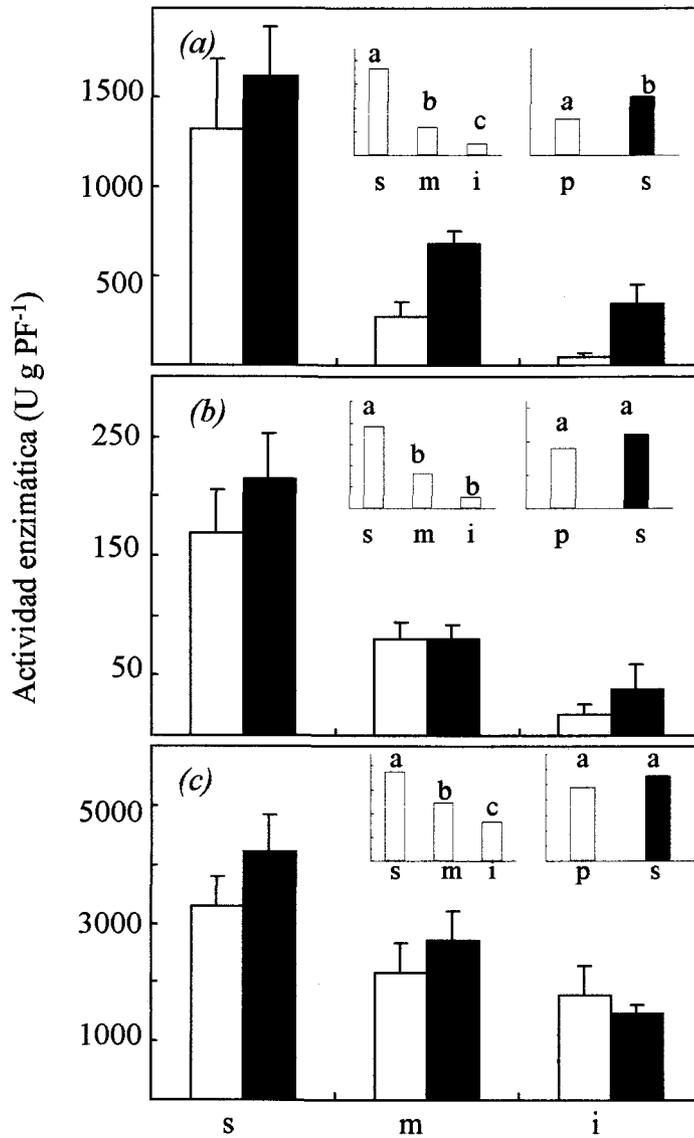


Figura 4.43 – Actividad FBPasa a pH 8.8 (a), a pH 7.9 (b), y actividad NADP-MDH (c), en foliolos peciolados (□) y sésiles (■) de hojas superiores (s), intermedias (m) e inferiores (i). En las figuras interiores se muestran las medias de cada factor. Resultados expresados por unidad de peso fresco. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \geq 0.05$).

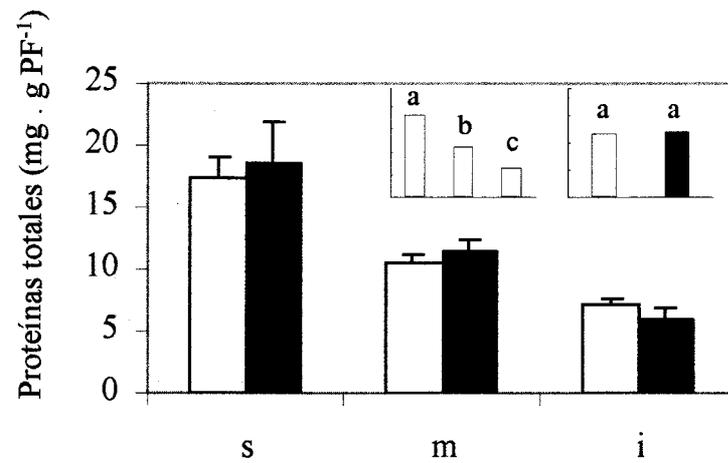


Figura 4.44 – Contenido de proteínas solubles totales en foliolos peciolados (□) y sésiles (■) de hojas superiores (s), intermedias (m) e inferiores (i). En las figuras interiores se muestran las medias de cada factor. Resultados expresados por unidad de proteína. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \geq 0.05$).

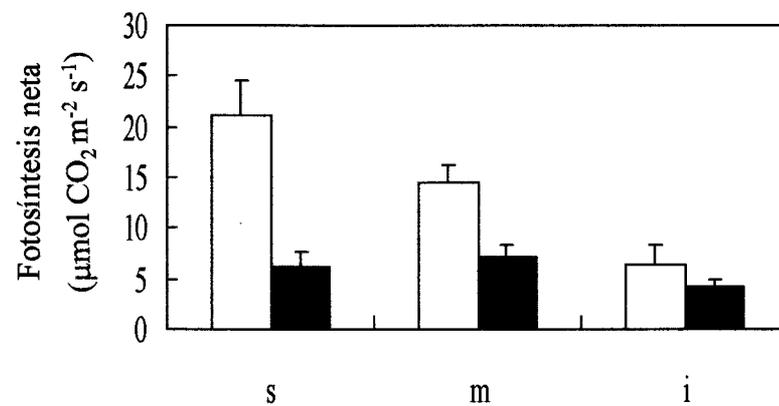


Figura 4.46 – Fotosíntesis neta en foliolos peciolados (□) y sésiles (■) de hojas superiores (s), intermedias (m) e inferiores (i) de plantas con 50 días de crecimiento hidropónico.

4.2.2 - Expresión transcripcional

Los niveles de mRNA para FBPasa, NADP-MDH, Trx *f* y Trx *m* se analizaron mediante RT-PCR en hojas (folíolos peciolados y sésiles), frutos (vainas y granos inmaduros), tallos y raíces.

La tinción con bromuro de etidio (Figura 4.47) de los productos de la amplificación por RT-PCR muestra claramente el elevado nivel de expresión transcripcional para las cuatro proteínas en órganos fotosintéticos. Es de resaltar la nula expresión transcripcional en raíces de FBPasa, NADP-MDH y Trx *m*, y también en granos de FBPasa y NADP-MDH. Cabe aclarar que los granos inmaduros analizados se encontraban verdes, por lo que se podía asumir que tenían una cierta actividad fotosintética.

Al realizar la transferencia y el desarrollo de las bandas con antidigoxigenina conjugada con fosfatasa alcalina, se pudo verificar la baja expresión transcripcional en raíces en el caso de la FBPasa, NADP-MDH y Trx *m*, en niveles muy inferiores al de hojas, vainas y tallos (Figura 4.48).

Resultó sorprendente el elevado nivel de expresión en raíces del transcrito para Trx *f*, a diferencia, especialmente, de la Trx *m*, una proteína de paralelas funciones fisiológicas que aquélla (Figura 4.47 c y d). Salvo en el caso de las semillas el contenido de mRNA total fue bastante similar en los distintos órganos (Figura 4.49). Por lo tanto, los bajos niveles encontrados en raíces no se debieron a un menor contenido de mRNA total por unidad de peso fresco.

Para evaluar si los fragmentos obtenidos correspondían fehacientemente a la copia y amplificación del transcrito de Trx *f*, se analizaron nuevamente los niveles de expresión, pero utilizando esta vez los oligonucleótidos complementarios a los extremos 5' y 3' de la secuencia completa; es decir, incluyendo al péptido de tránsito (Tabla 4.4). Cabe aclarar que la Trx *f* es una proteína cloroplastídica de codificación nuclear, y que la secuencia precursora contiene un péptido de tránsito relacionado con el transporte de esta proteína al cloroplasto. Los niveles de expresión detectados en las raíces fueron igualmente altos, como cuando se utilizaron oligonucleótidos para amplificar sólo la secuencia del transcrito correspondiente a la proteína madura cloroplastídica (Figura 4.50).

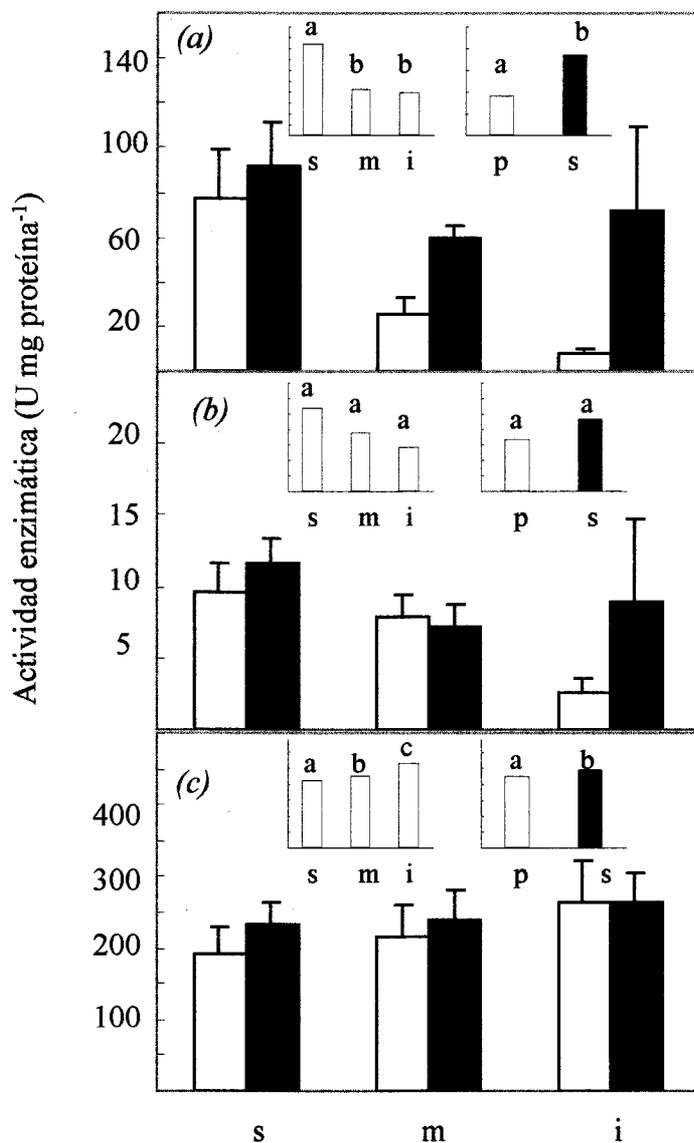


Figura 4.45 – Actividad FBPasa a pH 8.8 (a), a pH 7.9 (b), y actividad NADP-MDH (c), en foliolos peciolados (□) y sésiles (■) de hojas superiores (s), intermedias (m) e inferiores (i). En las figuras interiores se muestran las medias de cada factor. Resultados expresados por unidad de proteína. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \geq 0.05$).

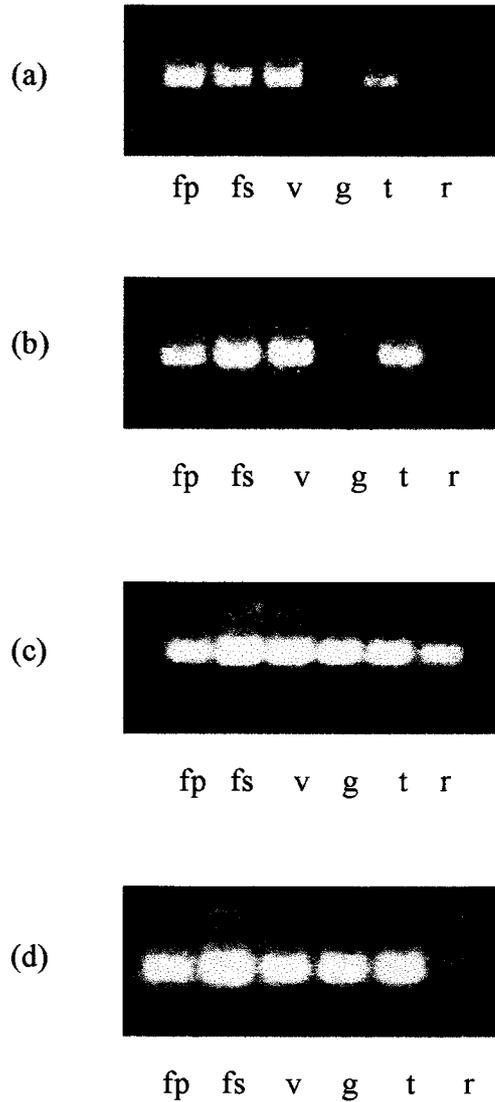


Figura 4.47 – Tinción con bromuro de etidio de los productos de RT-PCR para FBPasa (a), NADP-MDH (b), Trx f (c) y Trx m (d) a partir de mRNA obtenido de folíolos peciolados (fp), folíolos sésiles (fs), vainas (v), granos (g), tallos (t) y raíces (r) de plantas con 50 días de crecimiento hidróponico.

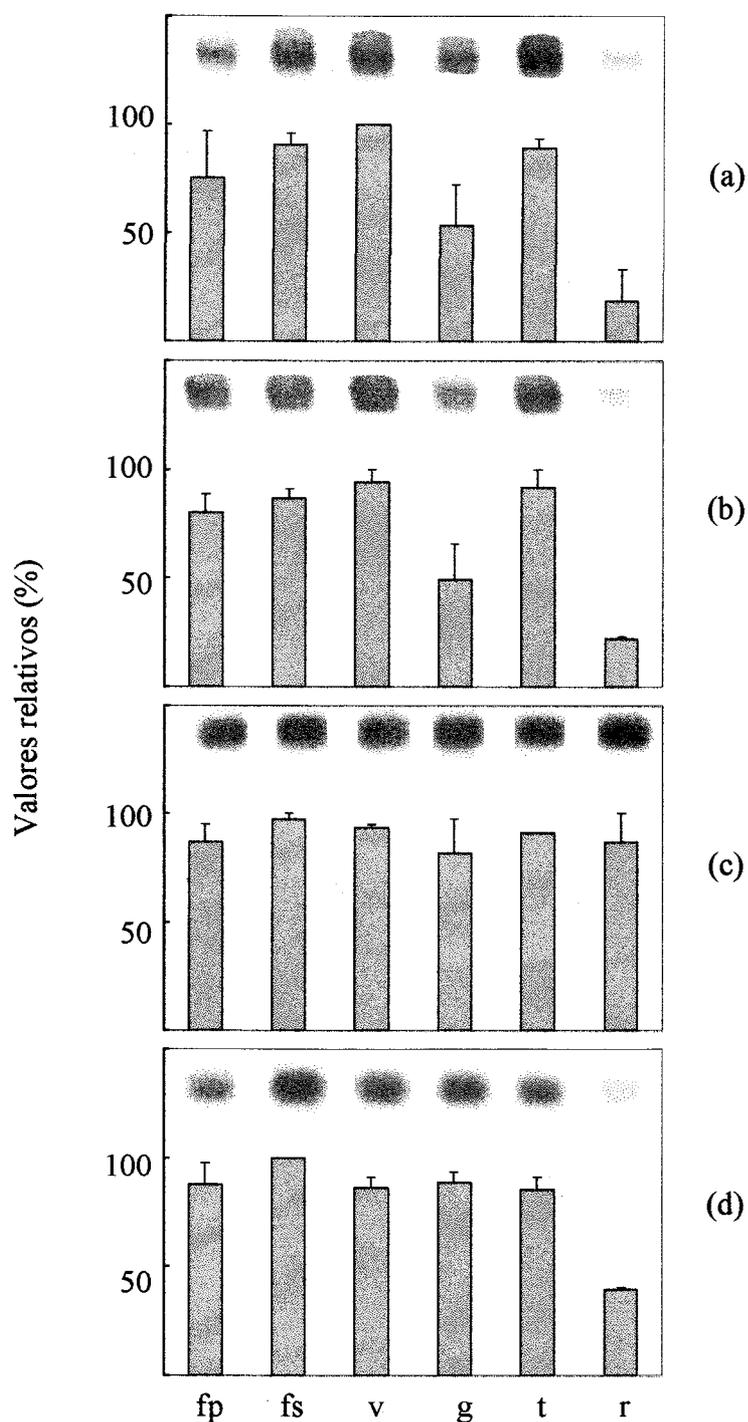


Figura 4.48 – Niveles de expresión de mRNA para FBPasa (a), NADP-MDH (b), Trx f (c) y Trx m (d) mediante RT-PCR, en función del peso fresco, en folíolos peciolados (fp), folíolos sésiles (fs), vainas (v), granos (g), tallos (t) y raíces (r). Los valores corresponden a la cuantificación por densitometría de las bandas reveladas con antidigoxigenina conjugada con fosfatasa alcalina, y son relativos al mayor valor alcanzado. En la parte superior se muestran las bandas de amplificación de DNA, previa tinción con el sistema de fosfatasa alcalina.

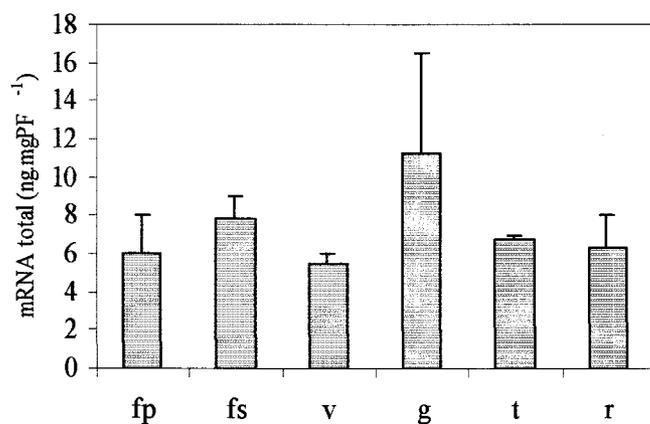


Figura 4.49 – Niveles de mRNA extraído de folíolos peciolados (fp), folíolos sésiles (fs), vainas (v), granos inmaduros (g), tallos (t) y raíces (r).

<u>NOMBRE</u>	<u>PROTEINA</u>	<u>EXTREMO</u>	<u>SECUENCIA</u>
Td 1	Trx _f	5°	-ttccatggCTCTAAATCTCTGC-
Tf C	Trx _f	3°	-aaggatccCTAACTAGACCGAACAGTG-

Tabla 4.4 – Oligonucleótidos utilizados para la amplificación por RT-PCR de la secuencia precursora de la Trx f. Aparecen en mayúsculas las bases complementarias a la secuencia del transcrito.

Las partículas magnéticas de estreptavidina pueden ser reutilizadas para la extracción de mRNA. Esto podía acarrear contaminaciones cruzadas. Para tener la seguridad de que lo que se expresaba en raíces era el transcrito de la *Trx f*, se repitió la extracción de mRNA utilizando partículas nuevas. Nuevamente el RT-PCR mostró niveles elevados de expresión transcripcional de *Trx f* en raíces (Figura 4.51).

Con uno de los productos de amplificación por RT-PCR, correspondiente a la proteína madura, se realizó una electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión (Nusieve, FMC). Luego de la tinción con bromuro de etidio se colocó el gel en el transiluminador ultravioleta y se separó la banda correspondiente del gel. Se limpió y purificó el cDNA incluido en el gel, y se probó que fuera capaz de amplificar por PCR un fragmento codificante para *Trx f* por PCR (Figura 4.52). Se secuenció dicho fragmento, y la secuencia resultante se comparó con las de diferentes tiorredoxinas, entre ellas algunas de tiorredoxinas h de otras especies, toda vez que la de guisante no está descrita. Las tiorredoxinas h son citosólicas, y su presencia en raíz es esperable. La secuencia obtenida resultó ser idéntica al 100% a la de *Trx f* de guisante.

4.2.3 - Niveles proteicos

El contenido de proteínas totales por unidad de peso fresco fue mayor en hojas y granos con respecto a vainas, tallos y raíces (Figura 4.53).

Analizadas por ELISA las cuatro proteínas objeto de estudio (FBPasa, NADP-MDH, *Trx f* y *Trx m*), los mayores niveles se presentaron en las hojas (Figura 4.54). A diferencia de lo que sucedió con respecto a los transcritos, se observó un elevado nivel de estas proteínas en el grano. Si los resultados se expresan por unidad de proteína los valores en grano descienden debido al elevado contenido de proteínas totales de estos órganos (Figura 4.55). Aunque en las raíces los contenidos son muy bajos, se registró la presencia de las cuatro proteínas cloroplastídicas analizadas.

Para un análisis con mayor profundidad se realizaron electroforesis y transferencias a membranas de nitrocelulosa para la posterior detección de cada proteína mediante anticuerpos policlonales específicos (western-blotting). En el caso de la FBPasa se apreció claramente que la cantidad en hojas fue muy superior a la de los otros tejidos, no existiendo en raíz evidencia de la presencia de esta enzima (Figura 4.56).

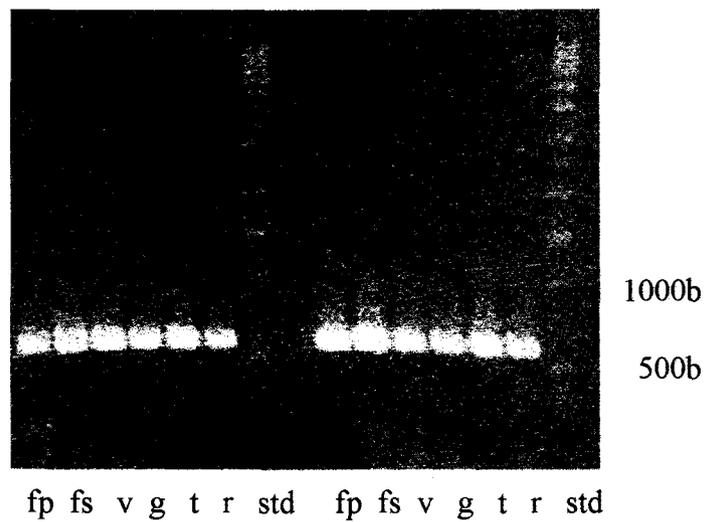


Figura 4.50 – Tinción con bromuro de etidio de los productos de RT-PCR utilizando los oligonucleótidos complementarios a los extremos 5' y 3' de la secuencia codificante de la proteína precursora de *Trx f*, en foliolos peciolados (fp), foliolos sésiles (fs), vainas (v), granos inmaduros (g), tallos (t) y raíces (r). Se muestran dos repeticiones independientes. Los resultados están expresados en función a un igual peso fresco inicial. std: marcadores de peso molecular.

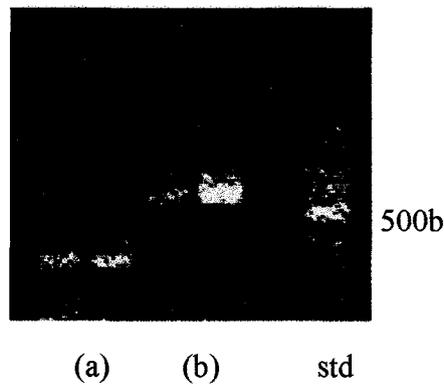


Figura 4.51 - Tinción con bromuro de etidio de los productos de RT-PCR utilizando mRNA extraído de raíces, con estraptavidina acoplada a partículas magnéticas no reutilizadas, usando los oligonucleótidos complementarios a los extremos 5' y 3' de la secuencia codificante de la proteína precursora de *Trx f* (a), y de la secuencia de la proteína madura (b). Se muestran dos repeticiones independientes. std: marcadores de peso molecular.

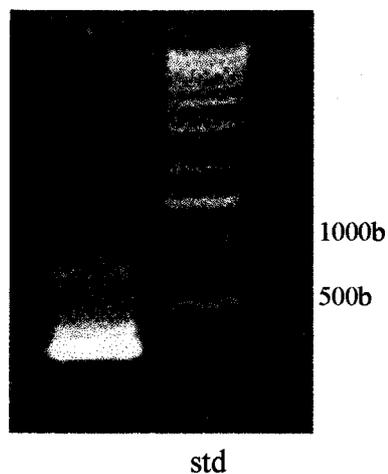


Figura 4.52 – Tinción con bromuro de etidio del fragmento obtenido por PCR utilizando los oligonucleótidos para la secuencia madura de Trx f y como molde la secuencia purificada y obtenida por RT-PCR a partir de mRNA de raíces.

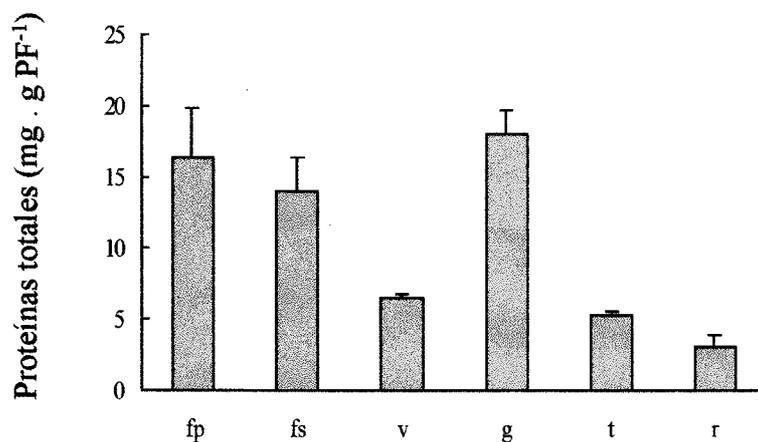


Figura 4.53 – Contenido de proteínas totales expresado por unidad de peso fresco, en folíolos peciolados (fp), folíolos sésiles (fs), vainas (v), granos (g), tallos (t) y raíces (r).

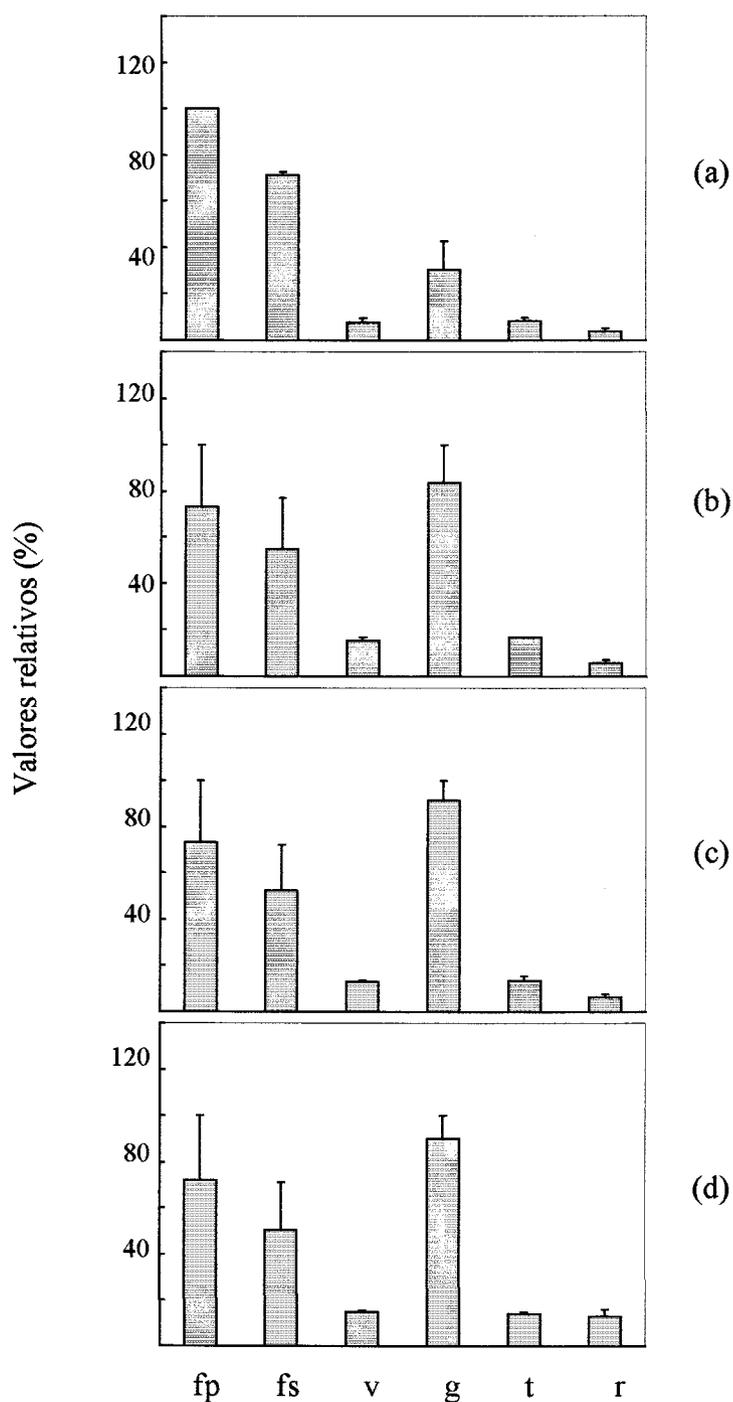


Figura 4.54 – Niveles de proteínas FBPasa (a), NADP-MDH (b), Trx *f* (c) y Trx *m* (d) determinados mediante ELISA, y expresados por unidad de peso fresco. Foliolos peciolados (fp), foliolos sésiles (fs), vainas (v), granos (g), tallos (t) y raíces (r). Valores relativos al mayor valor.

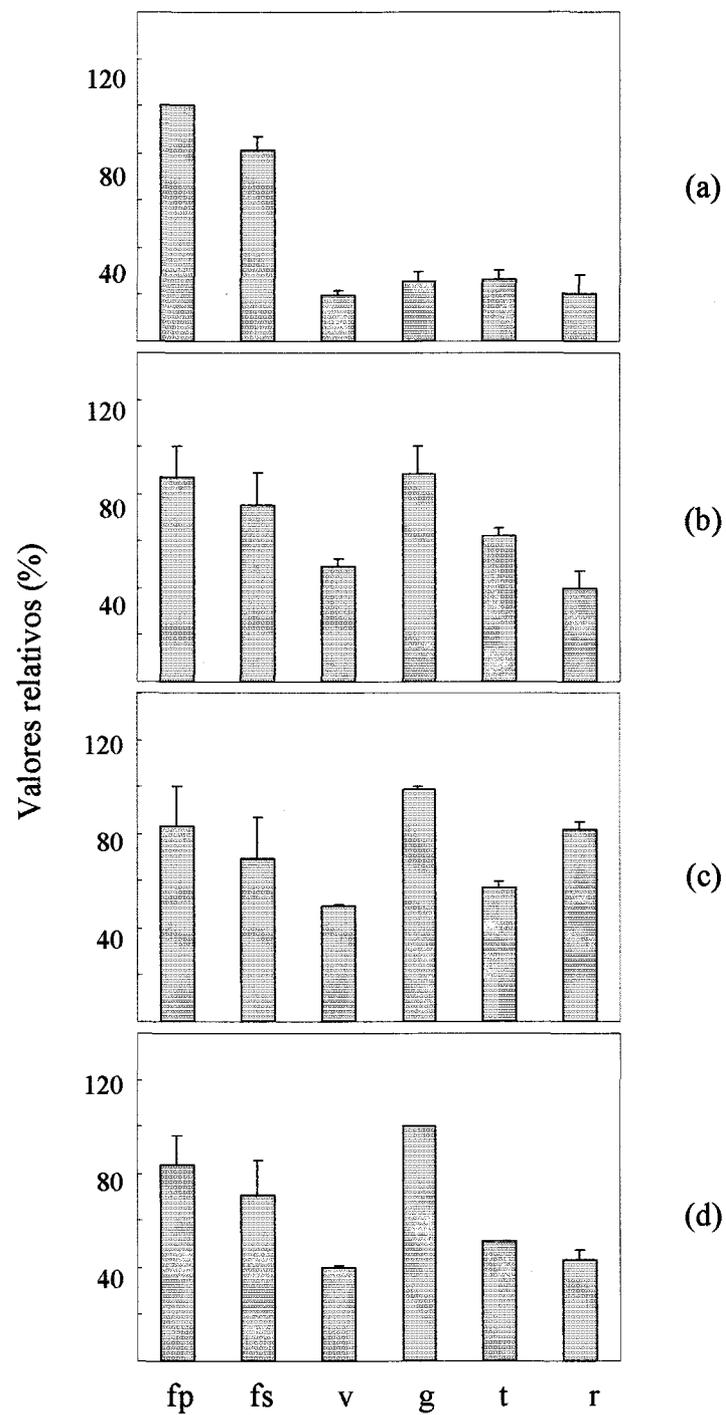


Figura 4.55 – Niveles de proteínas FBPasa (a), NADP-MDH (b), Trx *f* (c) y Trx *m* (d) determinados mediante ELISA, y expresados por unidad de proteína. Foliolos peciolados (fp), foliolos sésiles (fs), vainas (v), granos (g), tallos (t) y raíces (r). Valores relativos al mayor valor.

Con respecto a la NADP-MDH (Figura 4.57), tampoco hay vestigios en raíces, siendo la expresión en hojas, vainas y tallos, bastante similar al nivel de proteínas totales. Hubo evidencia de expresión traduccional de Trx *f* (Figura 4.58) en todos los órganos, incluso en raíces, aunque los niveles encontrados fueron muy bajos en éstas. Algo similar sucedió con la Trx *m* (Figura 4.59), donde los niveles en grano también fueron bajos. En la determinación mediante ELISA de los niveles de Trxs *f* y *m* los niveles encontrados en granos fueron más elevados que los detectados mediante Western-blotting. No obstante, en este último caso se desarrollaron otras bandas de mayor peso molecular que el de la Trx correspondiente. Esto podría deberse a la tendencia que tienen las Trxs a formar agregados, o también a la presencia en el grano de alguna o algunas proteínas con dominios similares a las de los Trxs, y reconocibles por los anticuerpos utilizados.

4.2.4 - Actividades enzimáticas

La actividad FBPasa medida a pH 8.8 fue muy superior en hojas con respecto a los demás tejidos, para valores expresados tanto por unidad de peso fresco como respecto al contenido de proteínas totales (Figura 4.60). Cabe aclarar que la actividad a pH 8.8 se realiza en condiciones muy alejadas de las presentes en el tejido vegetal, por lo que solamente refleja una especie de actividad potencial o, a lo sumo, niveles de concentración de la proteína. Sin embargo, la actividad FBPasa medida a pH 7.9, que refleja más fielmente la actividad fisiológica real presente en el tejido, fue mayor en granos, expresada en función del peso fresco, y en vainas, por unidad de proteína (Figura 4.61). Sospechando que la actividad FBPasa a pH 7.9 pudiera estar involucrando la actividad de la FBPasa citosólica, se midió la actividad a pH 7.5. A estos valores de pH la actividad presente se debe casi exclusivamente a la FBPasa citosólica (Figura 4.62). Si bien a pH 7.5 la actividad fue similar en hojas y granos inmaduros, ésto no alcanzaría a explicar el mayor nivel de actividad encontrado a pH 7.9 en el grano que en la hoja. Cabe aclarar que en la determinación a pH 7.9 la actividad de la FBPasa citosólica se vería fuertemente inhibida por la alta concentración del sustrato (F-1,6-P). Otra alternativa es que la baja actividad foliar a pH 7.9 podría deberse a una deficiencia de Trx *f* en el tejido. Seguidamente se midió, por lo tanto, la

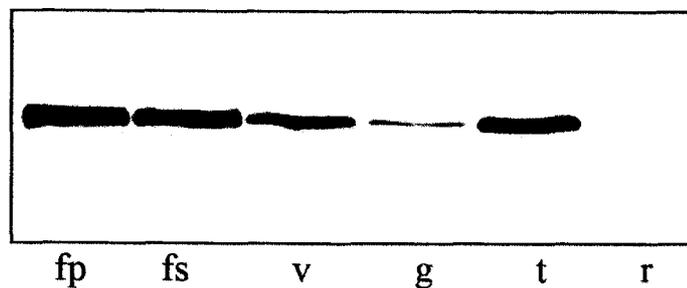


Figura 4.56 – Western-blotting para FBPasa en foliolos peciolados (fp), foliolos sésiles (fs), vainas (v), granos (g), tallos (t) y raíces (r). En cada calle se depositó igual cantidad de proteína total.

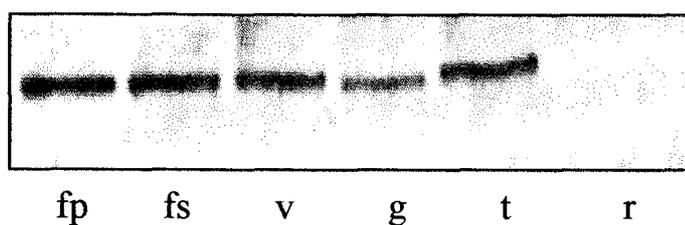


Figura 4.57 – Western-blotting para NADP-MDH en foliolos peciolados (fp), foliolos sésiles (fs), vainas (v), granos (g), tallos (t) y raíces (r).. En cada calle se depositó igual cantidad de proteína total.

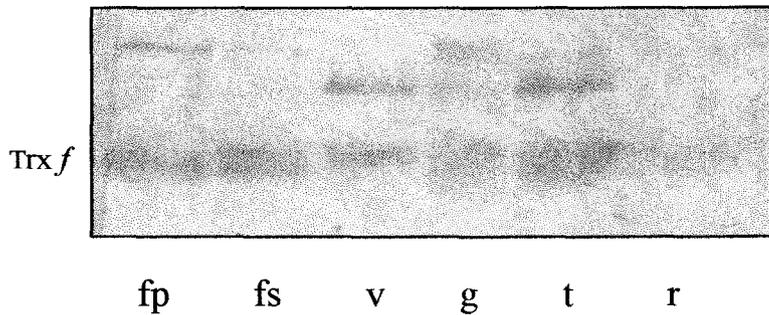


Figura 4.58 – Western-blotting para Trx *f* en foliolos peciolados (fp), foliolos sésiles (fs), vainas (v), granos (g), tallos (t) y raíces (r).. En cada calle se depositó igual cantidad de proteína total.

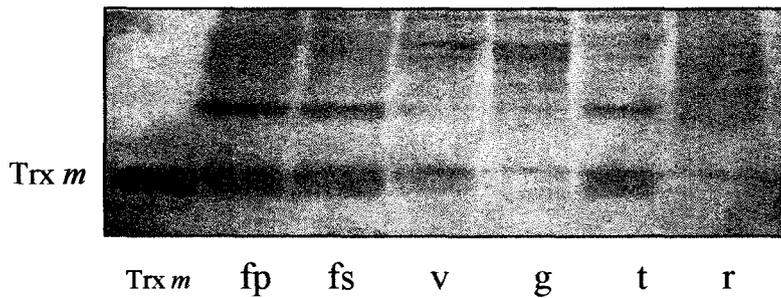


Figura 5.59 – Western-blotting para Trx *m* en foliolos peciolados (fp), foliolos sésiles (fs), vainas (v), granos (g), tallos (t) y raíces (r). . En cada calle se depositó igual cantidad de proteína total.

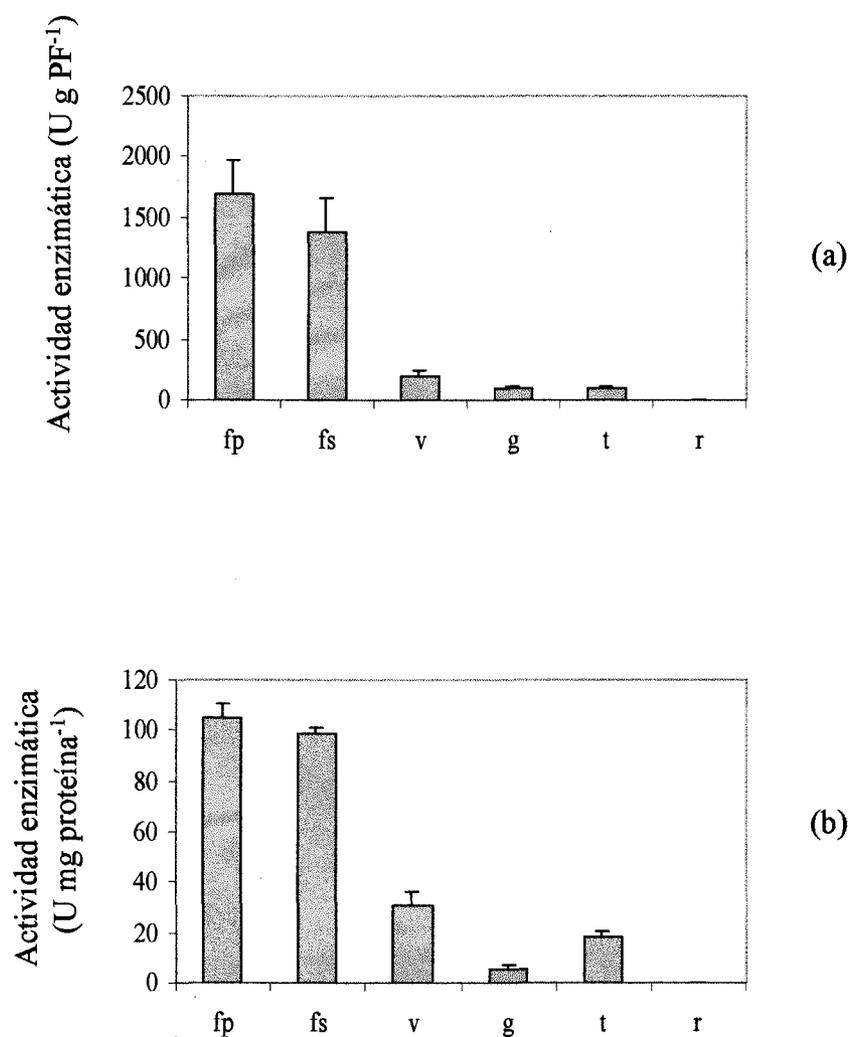


Figura 4.60 – Actividad FBPasa no dependiente de Trx (pH 8.8) en foliolos peciolados (fp), foliolos sésiles (fs), vainas (v), granos (g), tallos (t) y raíces (r). (a) por unidad de peso fresco, (b) por unidad de proteína total.

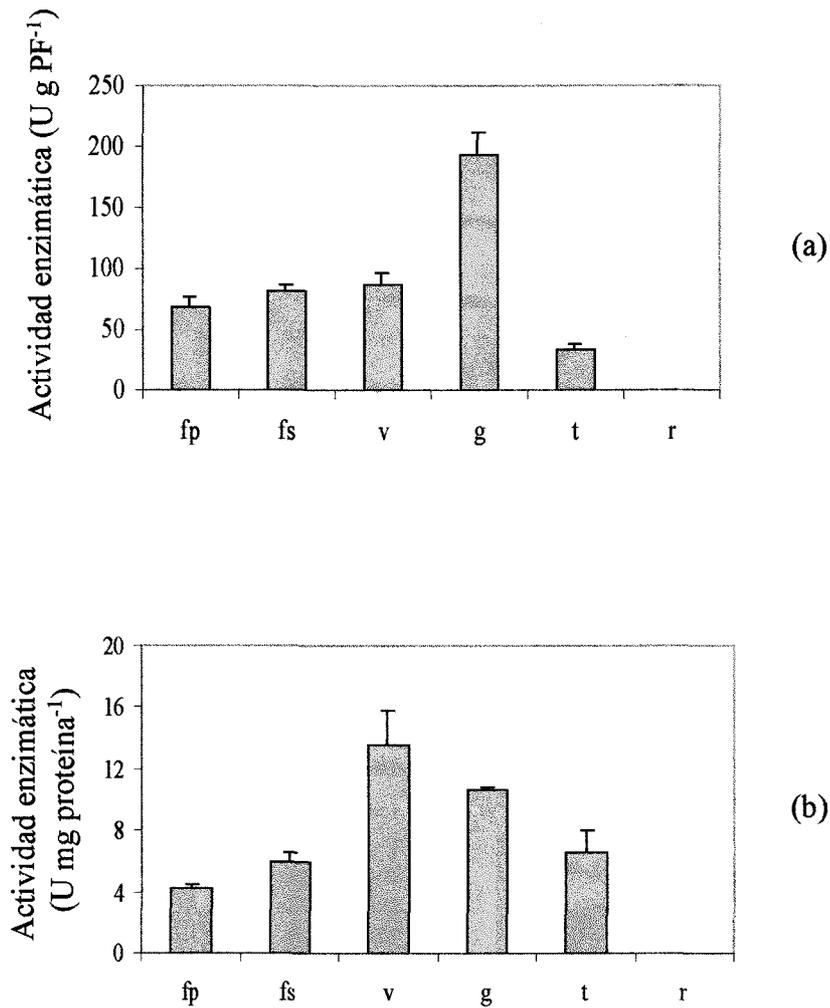


Figura 4.61 – Actividad FBPassa dependiente de Trx endógena (pH 7.9) en foliolo peciolados (fp), foliolo sésiles (fs), vainas (v), granos (g), tallos (t) y raíces (r). (a) por unidad de peso fresco, (b) por unidad de proteína total.

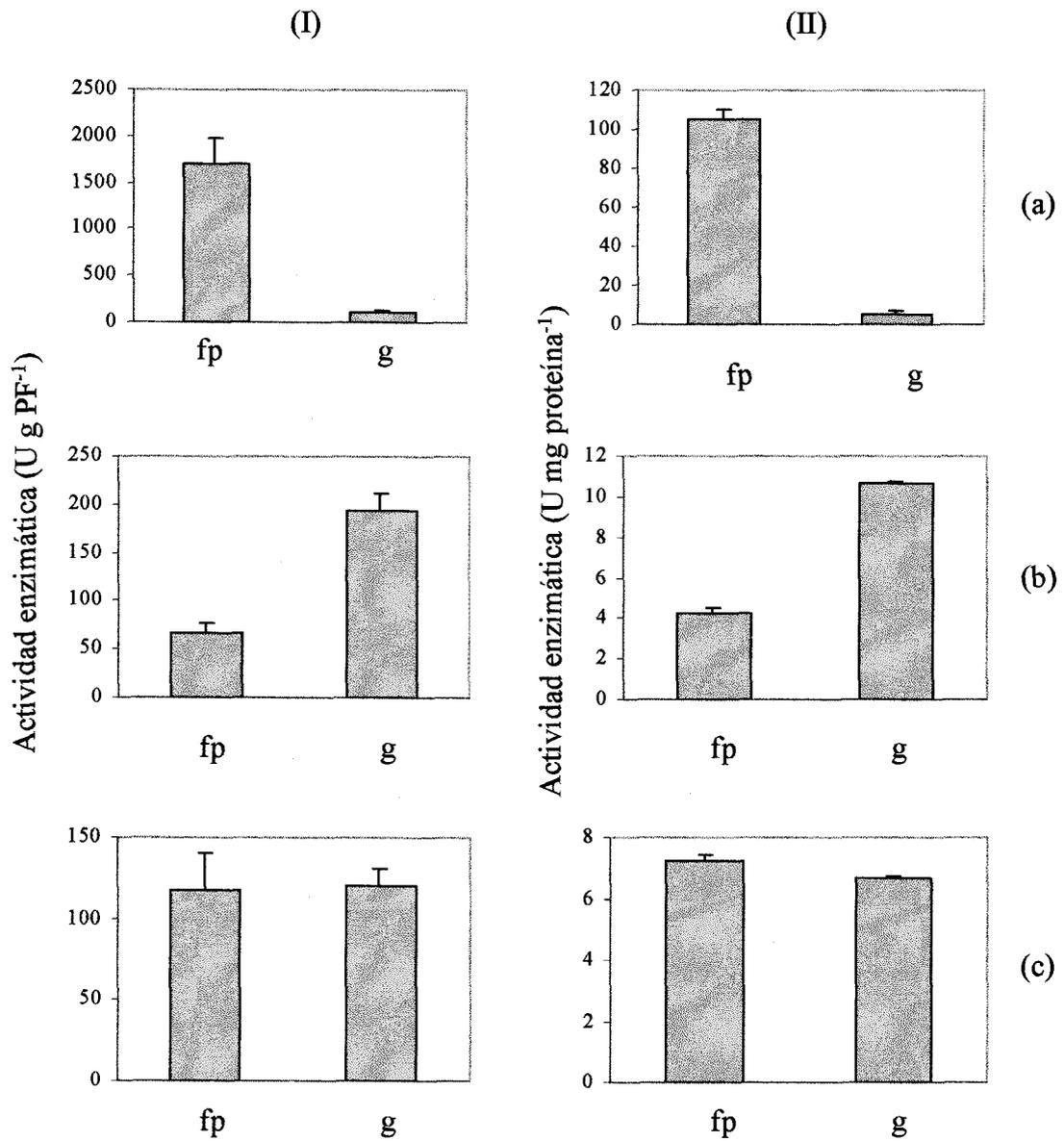


Figura 4.62 – Actividad FBPassa a pH 8.8 (a), pH 7.9 (b) y pH 7.5 (c) expresada por unidad de peso fresco (I) y de proteína (II), en hojas (fp) y granos inmaduros (g).

actividad FBPasa dependiente de tiorredoxina exógena, pero no se registró incremento alguno de actividad. La actividad NADP-MDH presentó valores más elevados en hojas y vainas por unidad de peso fresco y en vainas, hojas y tallos con respecto al contenido de proteínas totales (Figura 4.63).

4.3 – Evolución del sistema modulador de la FBPasa y de la NADP-MDH en condiciones de estrés lumínico.

4.3.1 - Tratamientos de 96 h bajo luz continua, y en condiciones de luz saturante

Los primeros tratamientos de estrés lumínico se realizaron utilizando plantas que tenían 20 días desde su siembra en vermiculita y 10 de cultivo hidropónico. Un grupo de plantas se dejó, durante el periodo de cultivo hidropónico, en las condiciones control descritas en Materiales y Métodos, otro grupo se colocó bajo luz continua de una intensidad de $500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (luz continua) y un tercero a $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ en fotoperiodo de 14 h (luz saturante). Los tratamientos se extendieron por 4 días. Los muestreos se realizaron cada 24 h, paralelamente a la medición de fluorescencia variable y de fotosíntesis neta. El descenso en la relación F_v/F_m evidenció claros efectos fotoinhibitorios sobre las plantas en ambas condiciones de iluminación. Estos se empezaron a detectar a las 48 h en plantas bajo luz continua, y a las 72 h en las tratadas con luz saturante. Otro signo de fotoinhibición lo fue también el aumento de la fluorescencia basal (Figura 4.64).

Las plantas bajo luz continua presentaron una marcada disminución en la fotosíntesis neta, ya a las 24 h de tratamiento, comparadas con las plantas control. Estos valores se mantienen hasta las 72 h, para mostrar una cierta recuperación a las 96 h. Las plantas bajo luz saturante presentaron una caída de alrededor de un 20 % con respecto a las control, y se mantuvieron en estos niveles hasta el final del experimento (Figura 4.65).

Utilizando muestras extraídas a los mismos tiempos en los que se efectuaron las mediciones de fluorescencia y fotosíntesis neta, se determinaron los contenidos (proteína) en FBPasa, NADP-MDH, Trx *f* y Trx *m* (Figura 4.66), y los niveles de

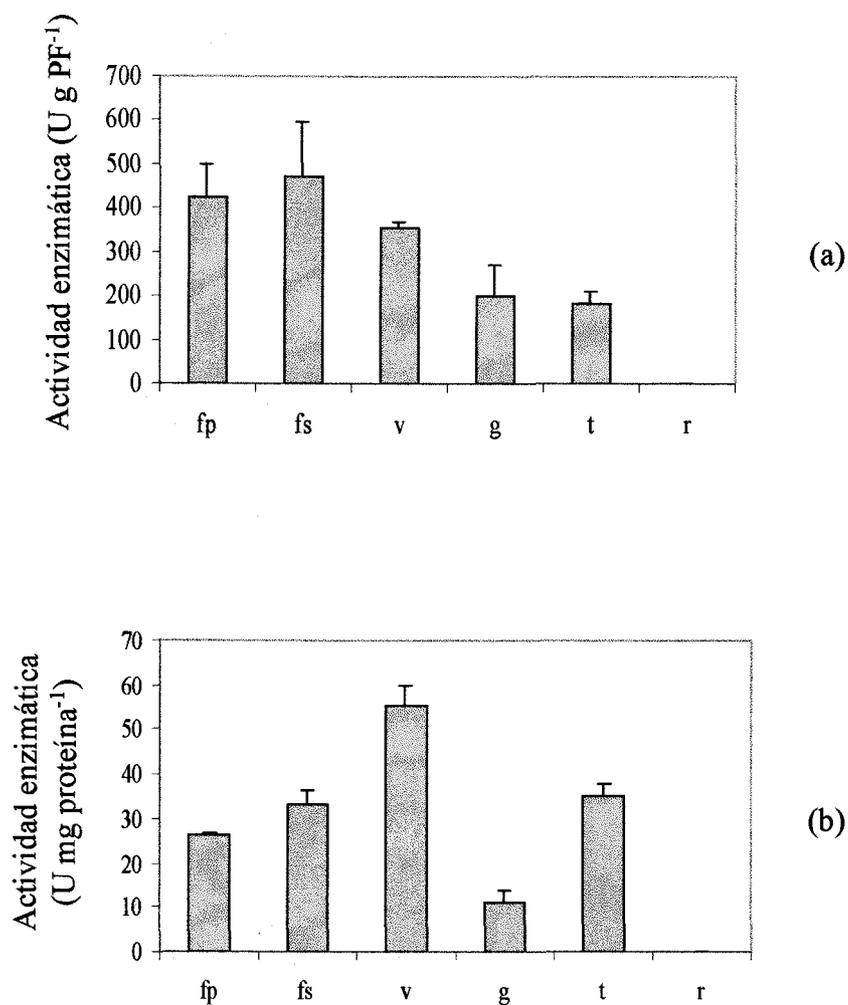


Figura 4.63 – Actividad NADP-MDH en foliolo peciolado (fp), foliolo sésil (fs), vaina (v), grano (g), tallo (t) y raíz (r). (a) por unidad de peso fresco; (b) por unidad de proteína total.

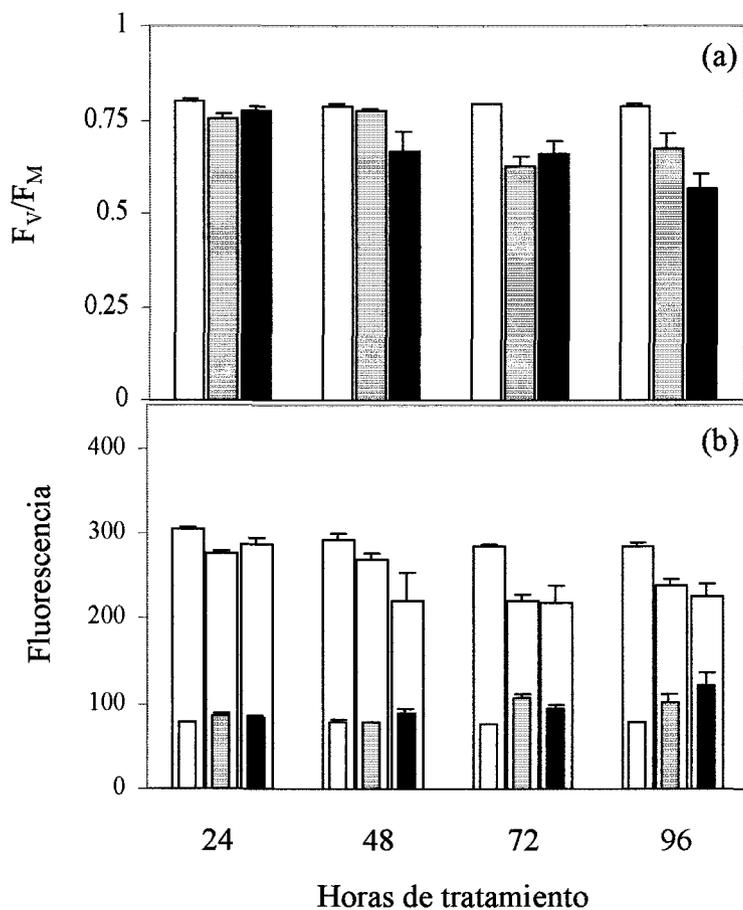


Figura 4.64 - Valores de F_V/F_M (a) y de fluorescencia máxima y basal (b) en hojas de plantas expuestas durante 96 h a luz normal (□), luz saturante de $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (▨), ó continua de $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (■). Las barras altas en (b) corresponden a la fluorescencia máxima F_M .

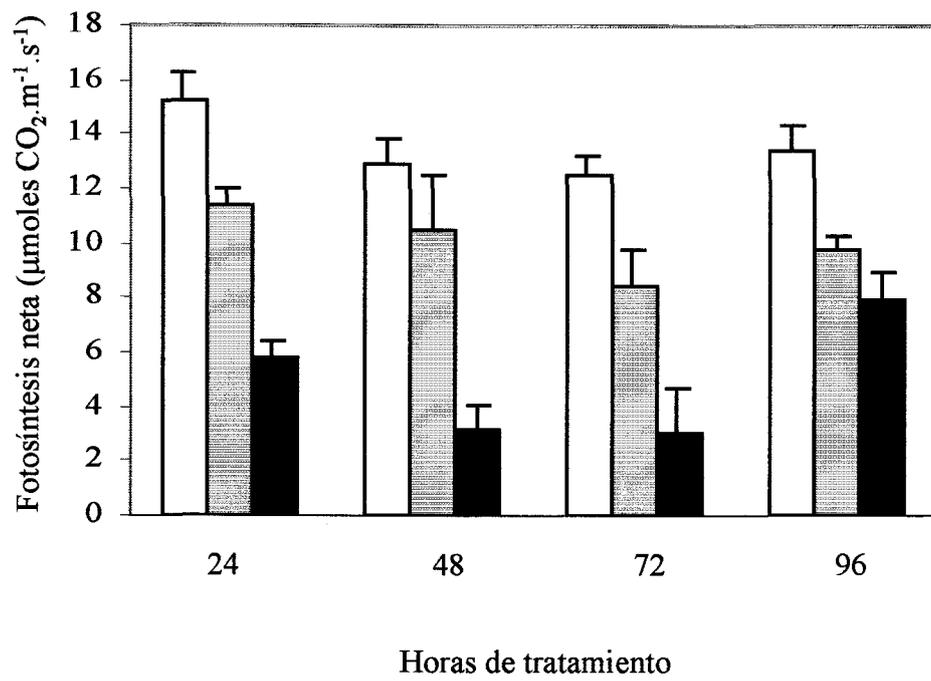


Figura 4.65 - Fotosíntesis neta en hojas de plantas expuestas durante 96 h a luz normal (\square), luz saturante de $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (▨), ó continua de $500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (\blacksquare)

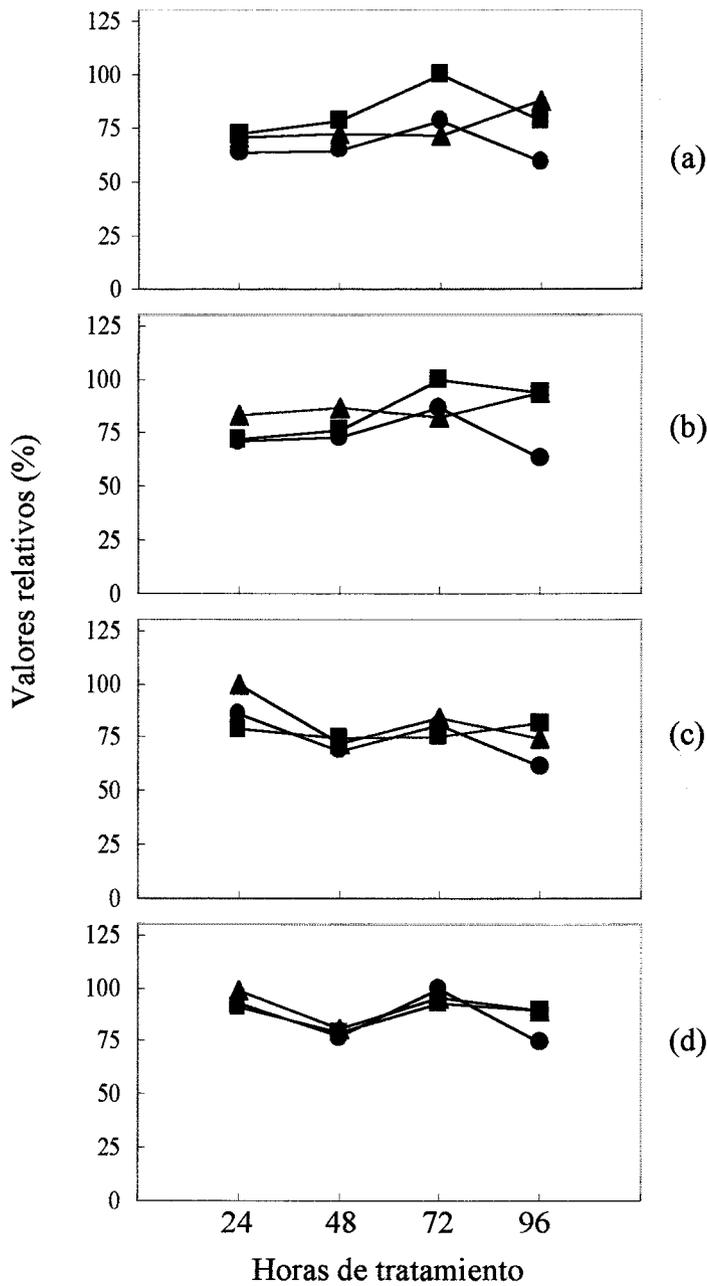


Figura 4.66 - Contenidos de proteína FBPasa (a), NADP-MDH (b), Trx *f* (c) y Trx *m* (d), determinados mediante ELISA en hojas de plantas expuestas durante 96 h a luz normal (●), luz saturante de 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (■), ó continua de 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (▲). Valores relativos al mayor.

mRNA para ambas tiorredoxinas (Figura 4.67). El objetivo era analizar la expresión de las enzimas FBPasa y NADP-MDH y, al mismo tiempo, tratar de detectar si se producía un aumento de las tiorredoxinas como respuesta a las condiciones de estrés. Ni los niveles de proteínas ni de los transcritos mostraron claras tendencias hacia el aumento o disminución. Se decidió, entonces, aumentar las condiciones de saturación sometiendo a las plantas a una irradiación de $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Se realizaron mediciones de fluorescencia, y determinaciones de proteínas específicas por ELISA cada 2.5 h, hasta llegar a las 10 h, a fin de analizar los posibles cambios producidos en los primeros momentos de alta iluminación. Las hojas se vieron claramente fotoinhibidas como se pudo apreciar mediante la determinación de la relación F_V/F_M (Figura 4.68). El contenido de proteínas totales de las hojas estresadas fue, en general, superior al de las control (Figura 4.69). Esto podría deberse a un mayor ritmo metabólico producido en los primeros instantes como respuesta al aumento en la irradiación, o como un ajuste a las condiciones de estrés impuestas. El comportamiento seguido por la FBPasa, NADP-MDH, Trx *f* y Trx *m* se expone en la Figura 4.70.

4.3.2 - Tratamientos de 30 días bajo luz continua ó saturante

Paralelamente se observó que plantas que siguieron en cultivo hidropónico en las condiciones antes descritas de luz continua ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) ó luz saturante ($2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) lograban adaptarse a las condiciones de estrés, llegando a florecer y fructificar. Aunque se manifestaban ciertas diferencias anatómicas con respecto a las plantas control, como mayor tamaño foliar, menor altura y tallos más engrosados (Figura 4.71), después de 10 días de tratamiento los valores de F_V/F_M de las plantas bajo estrés se acercaban a los de las control (Figura 4.72), aunque la fotosíntesis neta seguía siendo baja (Figura 4.73), posiblemente debido a la acumulación de almidón en los cloroplastos, fenómeno que se visualizaba claramente en la preparación de los extractos. Otro fenómeno que se producía en las plantas bajo continua o alta iluminación era el acortamiento del ciclo vegetativo, de tal forma que a los 30 d de crecimiento hidropónico ya se encontraban fructificadas.

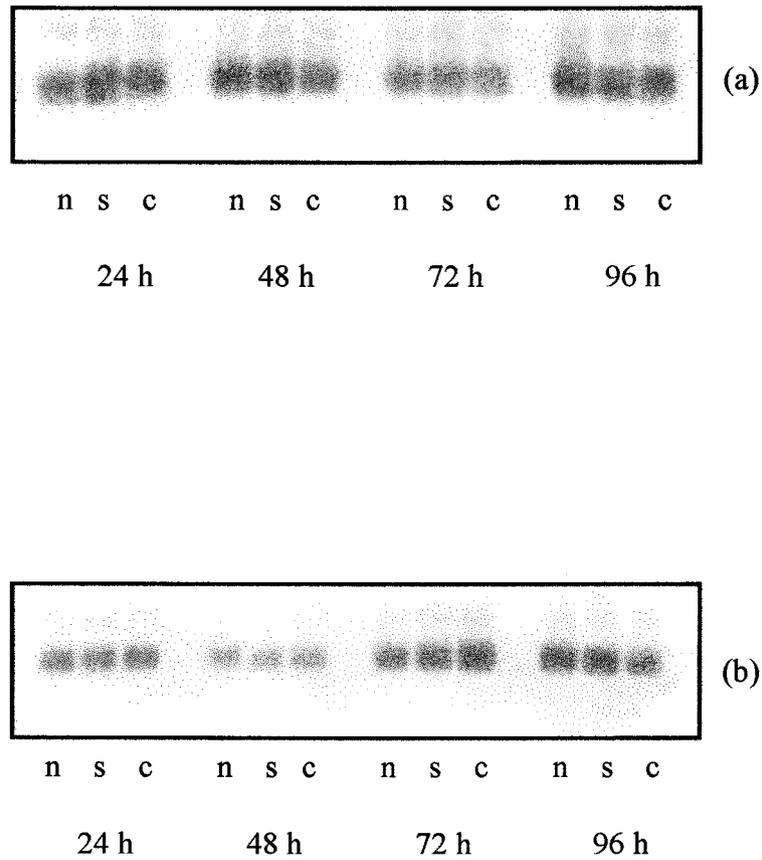


Figura 4.67 - Niveles de transcritos de *Trx f* (a) y *Trx m* (b) determinados mediante RT-PCR (desarrollado utilizando anti-digoxigenina conjugada con fosfatasa alcalina), en hojas de plantas expuestas durante 96 h a luz normal (n), luz saturante de $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (s), ó continua de $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (c).

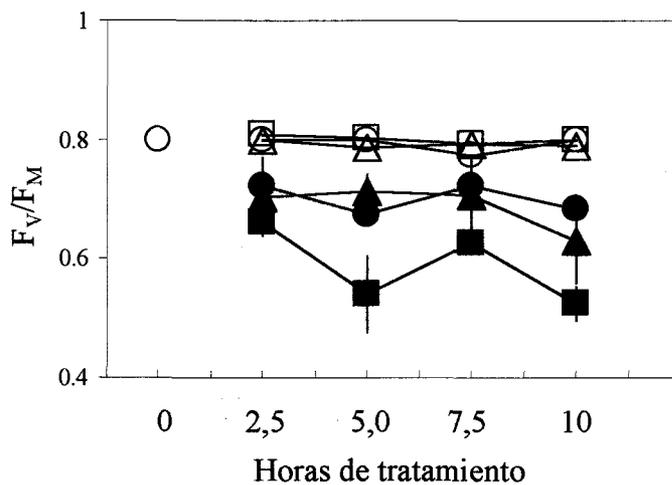


Figura 4.68 - Relación F_v/F_M en hojas superiores (○●), intermedias (□■) e inferiores (△▲), de plantas expuestas durante 10 h a condiciones normales (símbolos abiertos), ó bajo luz saturante de $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (símbolos cerrados).

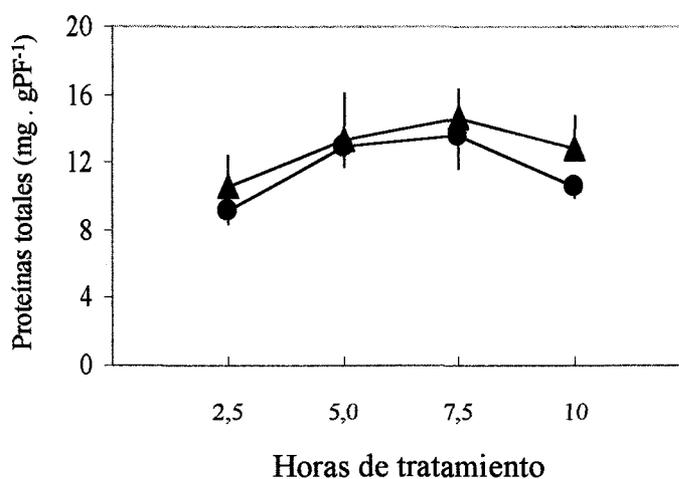


Figura 4.69 - Contenidos de proteínas totales en hojas de plantas expuestas durante 10 h a luz normal (●), ó luz saturante de $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (▲). Valores expresados con respecto a peso fresco.

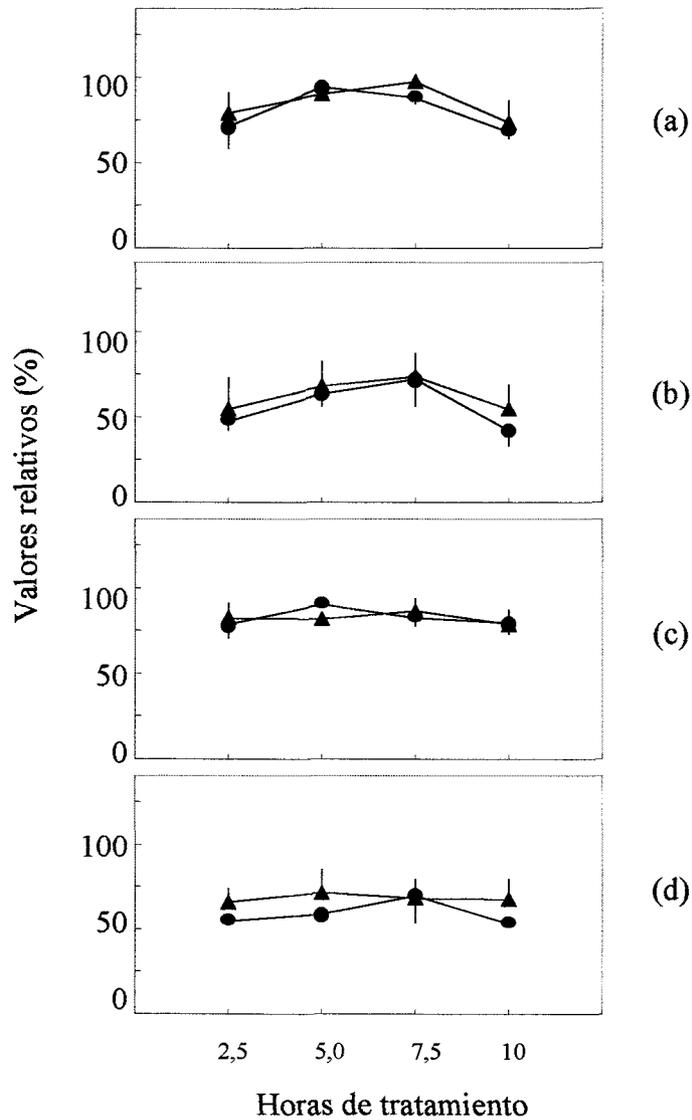


Figura 4.70 - Contenidos de proteína FBPasa (a), NADP-MDH (b), Trx *f* (c) y Trx *m* (d) determinados mediante ELISA en hojas de plantas expuestas durante 10 h a luz normal (●) ó luz saturante de 2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (▲). Valores relativos al mayor expresados con respecto a peso fresco.

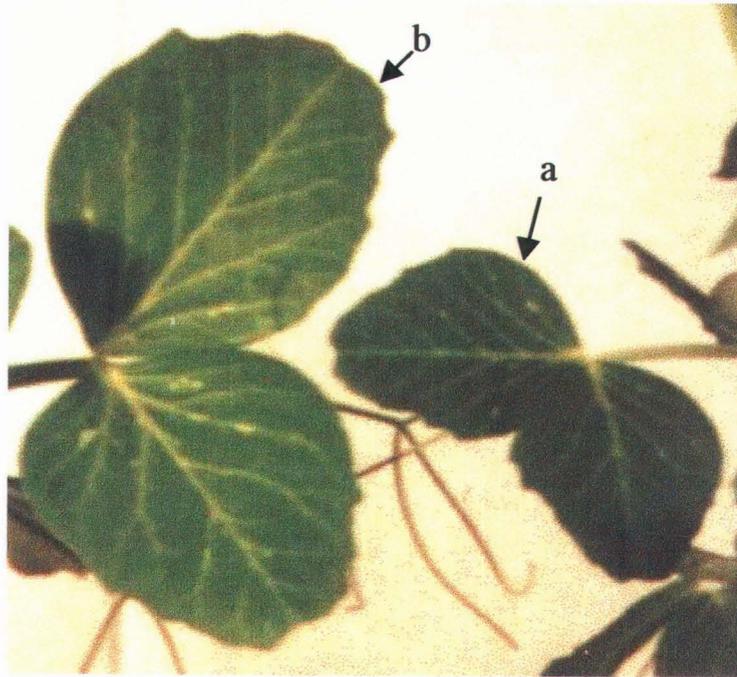


Figura 4.71 - Tamaño de folíolos de plantas con 20 días de crecimiento hidropónico bajo condiciones normales (a) y con luz continua (b).

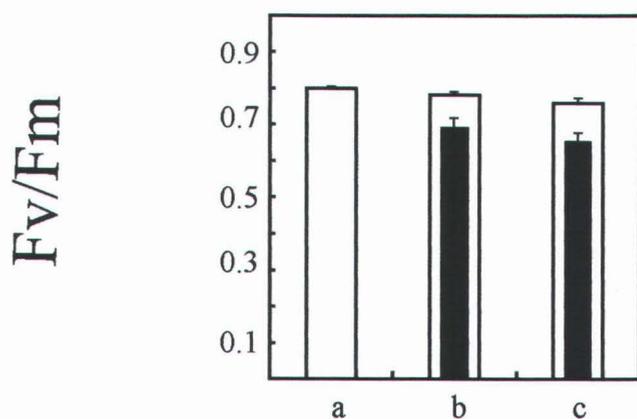


Figura 4.72 - Relación F_v/F_M en hojas de plantas expuestas durante 10 días a luz normal (a), luz continua de $500 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ (b), ó luz saturante de $2000 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ (c). Valor alcanzado a los 10 días de tratamiento (□), y el menor presentado durante este periodo (■), a las 72 h en el caso de luz continua, y a las 10 h en el de luz saturante.

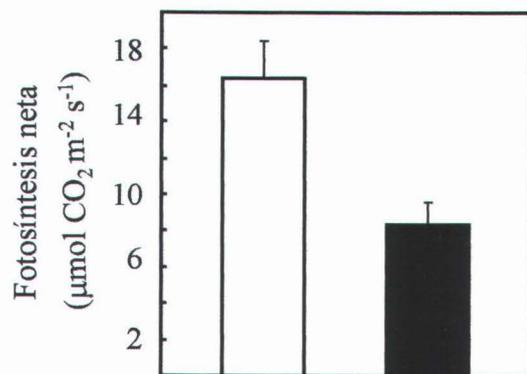


Figura 4.73 - Fotosíntesis neta en hojas de plantas expuestas durante 10 días a luz normal (□) ó luz saturante de $2000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (■). Valor alcanzado a los 10 días de tratamiento.

Se pasó, entonces, a analizar la evolución de los contenidos (proteína) en FBPasa, NADP-MDH, Trx *f* y Trx *m*, y de sus correspondientes transcritos, en plantas sometidas a condiciones de estrés lumínico durante su ontogenia, finalizando los muestreos, como era usual, cuando las plantas fructificaron.

Semillas de guisante se germinaron en las condiciones descritas en Materiales y Métodos y, después de 10 días de incubación, las plántulas se colocaron en cultivo hidropónico. Las plantas control siguieron en las mismas condiciones de iluminación. A las restantes se les impusieron dos tratamientos de estrés lumínico: luz saturante ($2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ en fotoperiodo de 16 h) y luz continua ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Los tratamientos se mantuvieron hasta fructificación, unos 30 días de cultivo hidropónico, realizándose muestreos a los 10, 20 y 30 días. Se recolectaron las tres hojas superiores, las últimas expandidas, por separado, que se denominaron s, m e i, comenzando por la superior. Cabe aclarar que sólo en el primer muestreo estas hojas estuvieron ubicadas en los tercios superior, intermedio e inferior de la planta, pues al cabo de 30 d todas estas hojas pertenecieron al tercio superior de la misma.

4.3.2.1 - Niveles proteicos

Los perfiles de proteínas solubles totales en ambos tratamientos de estrés lumínico fueron muy similares (Figura 4.74). A los 10 días de tratamiento en las hojas superiores (s) hubo un nivel ligeramente superior en las hojas control que en las tratadas. Sin embargo, en las hojas más viejas (m y i) y, por lo tanto, expuestas más tiempo a las condiciones estresantes, o bien no existieron diferencias entre control y tratadas (luz continua, Figura 4.74 a), o bien los niveles en hojas tratadas fueron ligeramente superiores (luz saturante, Figura 4.74 d). A los 20 y 30 días de estrés la tendencia se modificó. A los 20 días de estrés (Figura 4.74 b y e) los niveles de proteínas solubles fueron, aunque pocas veces significativos, inferiores en las plantas tratadas que en las control, pero si el estrés se prolongaba hasta los 30 días (Figuras 4.74 c y f) estas diferencias fueron ya muy significativas. Este menor contenido de proteínas solubles presente en hojas estresadas podría estar indicando una más acentuada proteólisis.

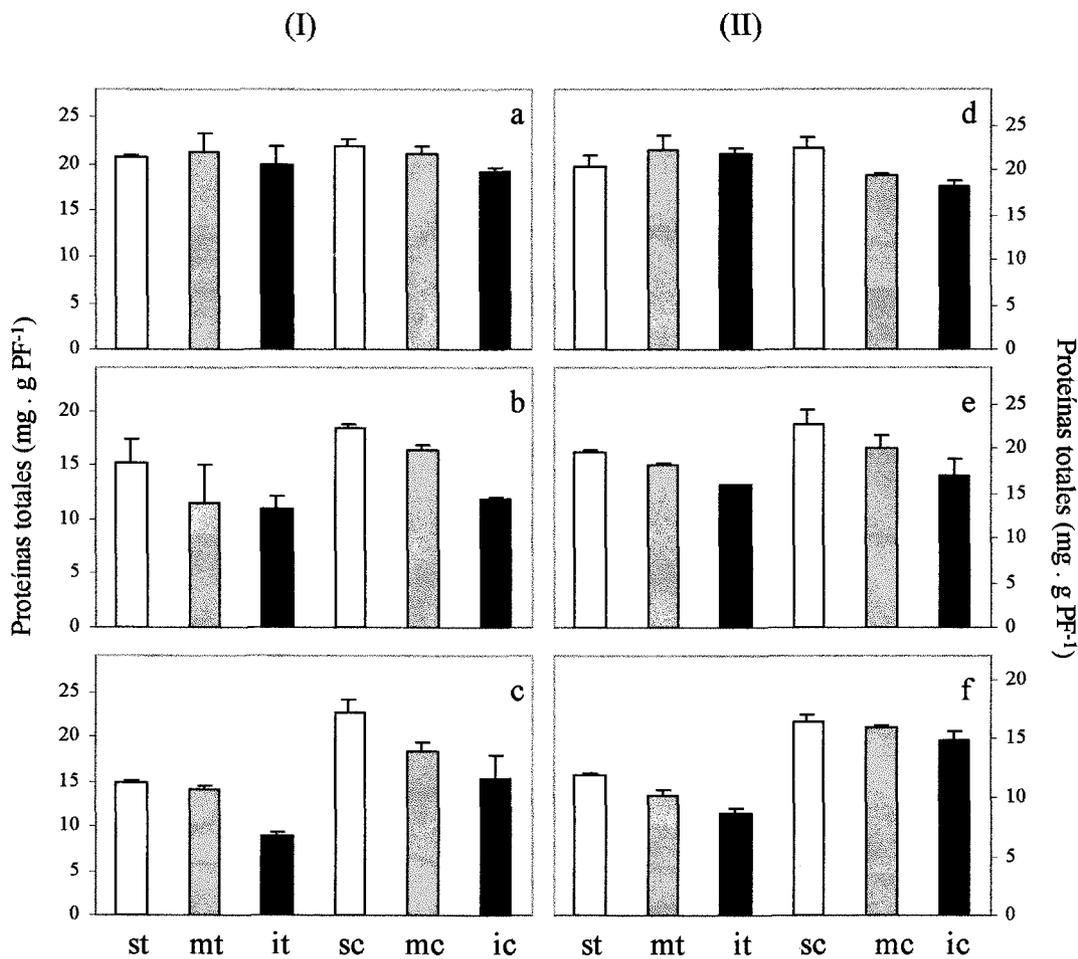


Figura 4.74 - Contenido de proteínas totales en folíolos de hojas superiores, intermedias e inferiores de plantas crecidas en condiciones normales (sc, mc, ic) y bajo estrés lumínico (st, mt, it) de luz continua (I) ó saturante (II), durante 10 (a,d), 20 (b,e) ó 30 (c,f) días de tratamiento. Datos expresados por unidad de peso fresco.

Los niveles de proteína FBPassa (Figura 4.75), analizados con anticuerpos específicos, siguieron, con ligeras excepciones, los perfiles de las proteínas totales. Las diferencias entre plantas tratadas y control son más definidas en los tratamientos de luz saturante (posiblemente los más agresivos), donde en algunos casos el contenido en plantas tratadas fue un 50 % del de plantas control. Esta tendencia se repitió, aunque con ligeras variaciones, en la proteína NADP-MDH (Figura 4.76). En el caso de las tiorredoxinas (Figuras 4.77 y 4.78), aunque en general se repitió la tendencia de que las plantas control presentaban mayores niveles que las estresadas, las diferencias no son tan grandes como en el caso de FBPassa y NADP-MDH, lo que podría estar indicando o una mayor tasa de síntesis, o una menor degradación de las Trxs, en plantas estresadas con respecto a las proteínas moduladas por ellas, FBPassa y NADP-MDH. No obstante, en general es clara la tendencia de que plantas sometidas a estrés lumínico presenten menores niveles, tanto de proteínas totales, como de FBPassa, MDH, Trx *f* y Trx *m*.

4.3.2.2 - Niveles de transcritos

Los contenidos de mRNA para FBPassa (Figura 4.79), NADP-MDH (Figura 4.80), Trx *f* (Figura 4.81) y Trx *m* (Figura 4.82), presentaron tendencias muy diferentes con respecto a sus respectivas proteínas. Las tendencias son más definidas en las hojas más viejas (m, i) que en las recién expandidas, ya que posiblemente, como se ha mencionado anteriormente, éstas no hayan estado sometidas el suficiente tiempo a estrés como para desencadenar los mecanismos de adaptación. A los 10 días de estrés los niveles de mRNA en las hojas viejas fueron muy superiores en las plantas estresadas que en las control. La tendencia de las plantas que crecen en condiciones adecuadas de presentar menores contenidos de mRNA a medida que las hojas son más inferiores, en el caso de las plantas bajo estrés, se vio muchas veces revertida. Esto hizo que las diferencias entre tratadas y control fueran mayores en las hojas más viejas (i). A los 20 días estas diferencias todavía se mantuvieron. Pero cuando el estrés se prolongó hasta 30 días, no se evidenció claramente la misma tendencia. En general, los niveles de mRNA de las plantas tratadas fueron similares, y en algunos casos inferiores, a los de las control. Existieron algunas excepciones, como en los tratamientos de luz saturante para NADP-MDH y Trx *f*.

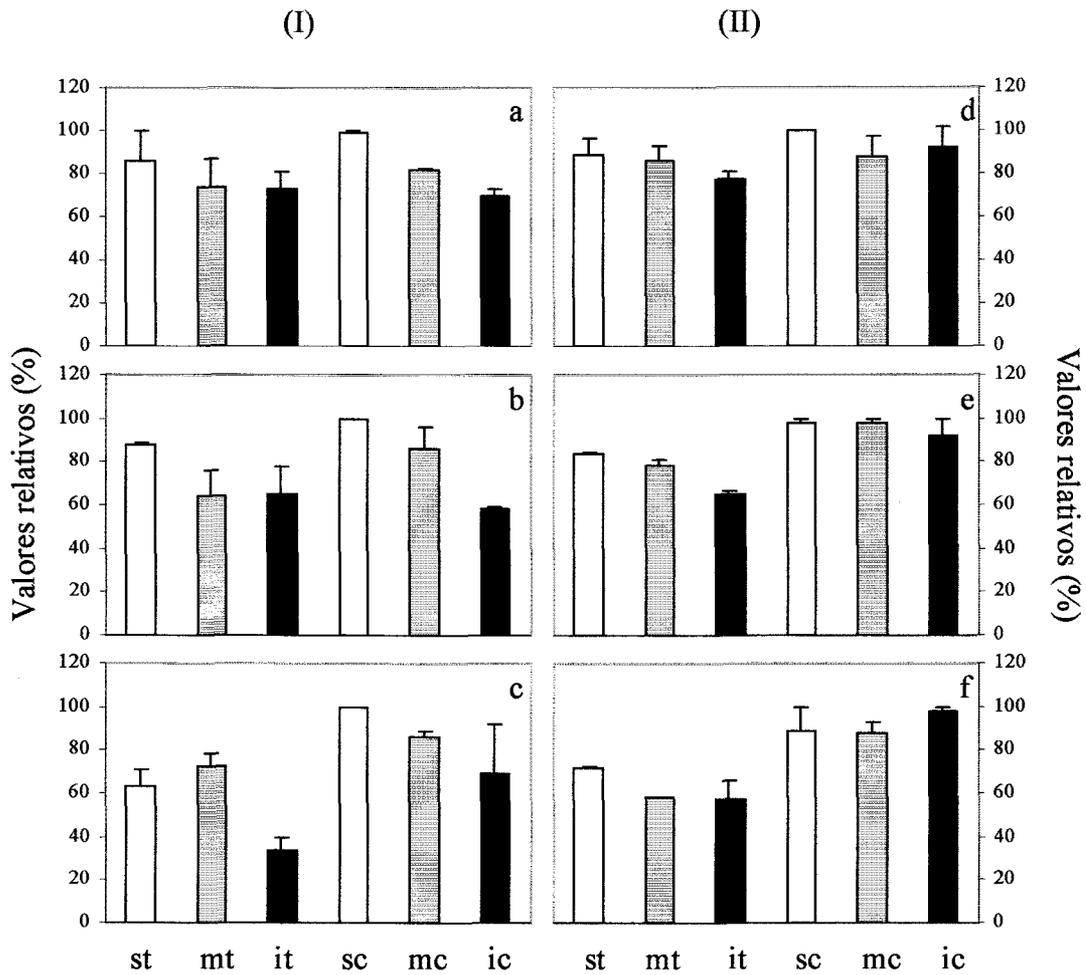


Figura 4.75 - Contenido de proteína FBPasa de folíolos de hojas superiores, intermedias e inferiores de plantas crecidas en condiciones normales (sc, mc, ic), y bajo estrés lumínico (st, mt, it) de luz continua (I) ó saturante (II), durante 10 (a,d), 20 (b,e) ó 30 (c,f) días de tratamiento. Datos expresados por unidad de peso fresco y relativos al mayor valor.

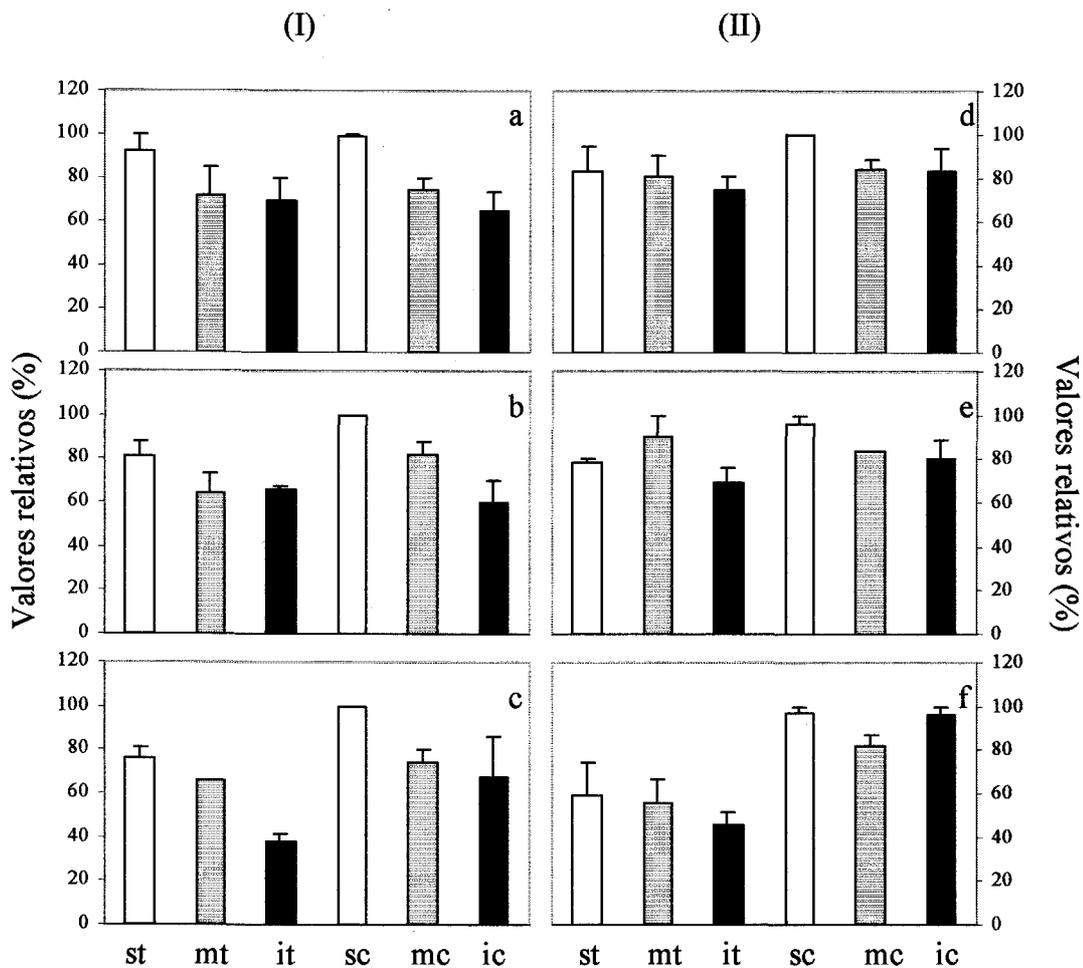


Figura 4.76 - Contenido de proteína NADP-MDH de folíolos de hojas superiores, intermedias e inferiores de plantas crecidas en condiciones normales (sc, mc, ic), y bajo estrés lumínico (st, mt, it) de luz continua (I) ó saturante (II), durante 10 (a,d), 20 (b,e) ó 30 (c,f) días de tratamiento. Datos expresados por unidad de peso fresco y relativos al mayor valor.

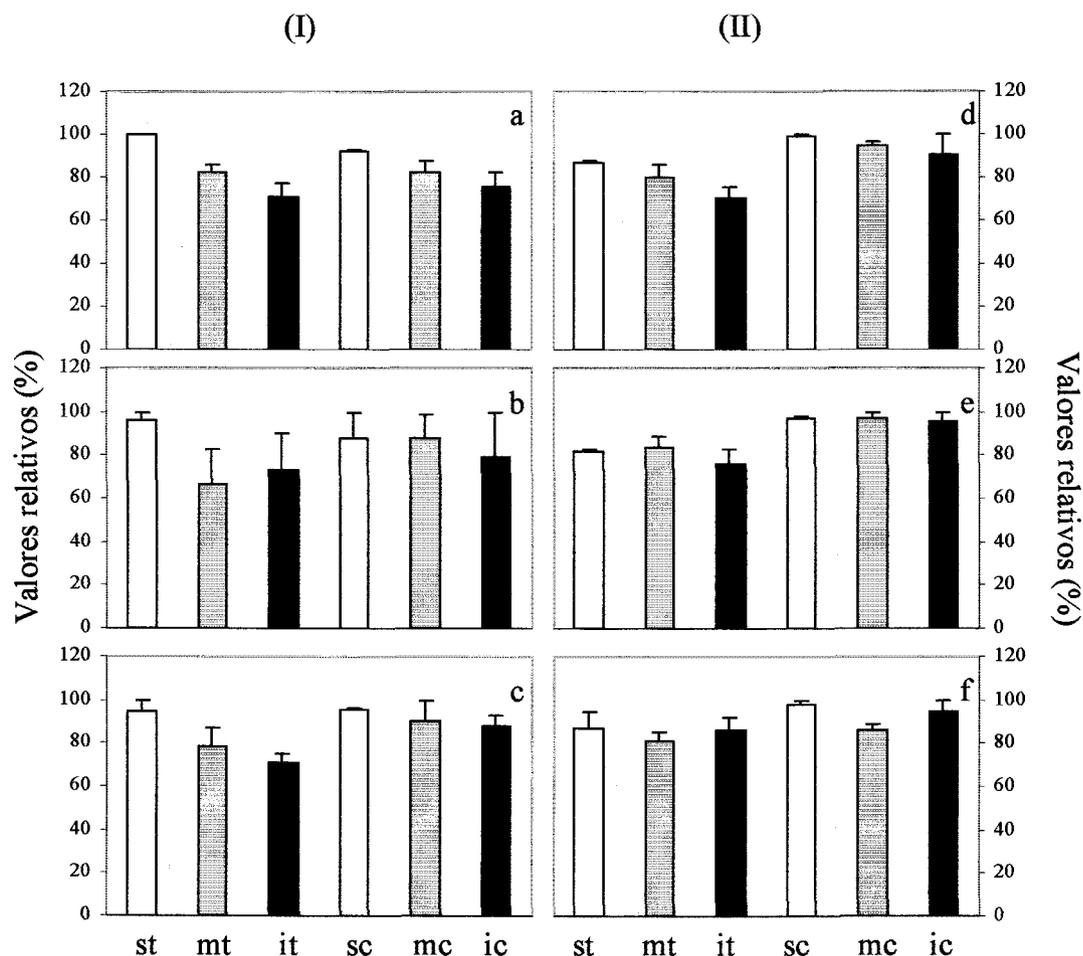


Figura 4.77 - Contenido de proteína Trx *f* de folíolos de hojas superiores, intermedias e inferiores de plantas crecidas en condiciones normales (sc, mc, ic), y bajo estrés lumínico (st, mt, it) de luz continua (I) ó saturante (II), durante 10 (a,d), 20 (b,e) ó 30 (c,f) días de tratamiento. Datos expresados por unidad de peso fresco y relativos al mayor valor.

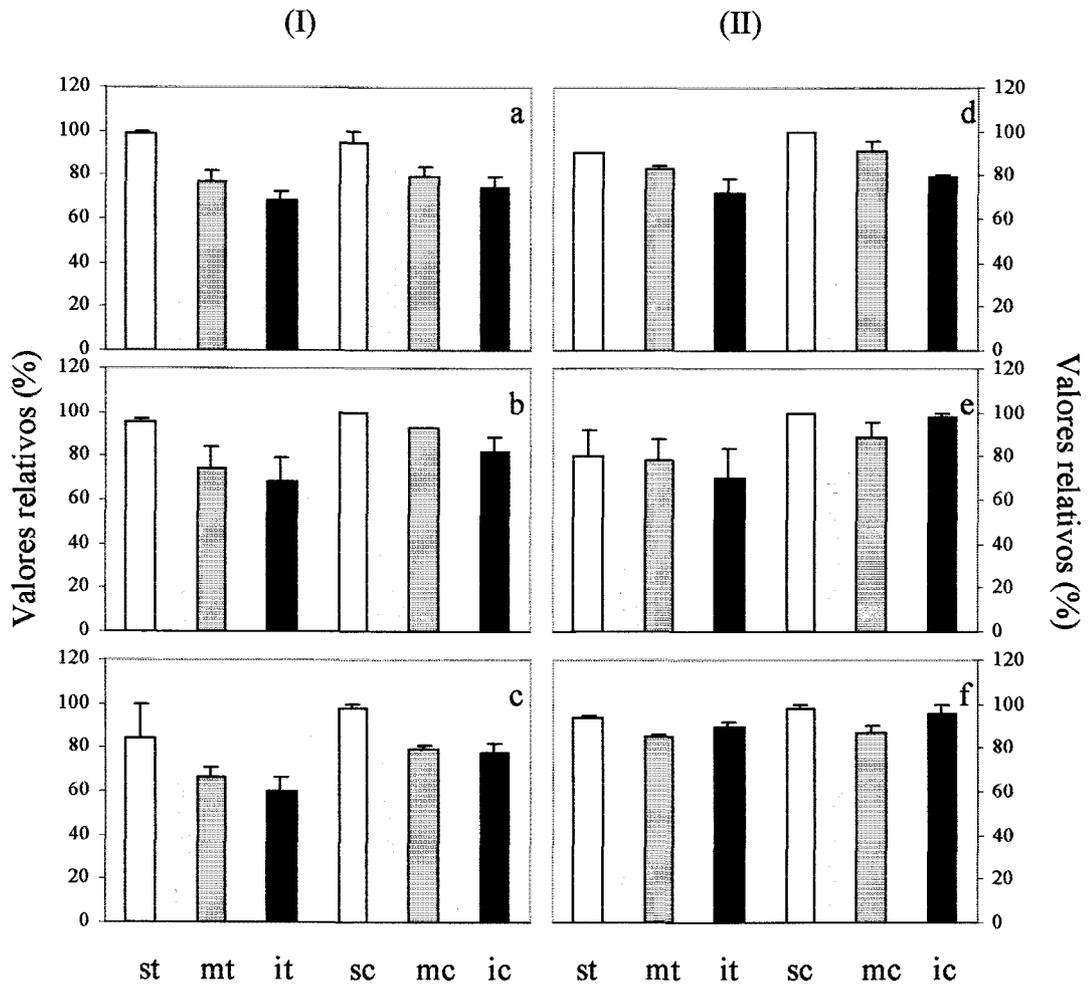


Figura 4.78 - Contenido de proteína Trx *m* de folíolos de hojas superiores, intermedias e inferiores de plantas crecidas en condiciones normales (sc, mc, ic), y bajo estrés lumínico (st, mt, it) de luz continua (I) ó saturante (II), durante 10 (a,d), 20 (b,e) ó 30 (c,f) días de tratamiento. Datos expresados por unidad de peso fresco y relativos al mayor valor.

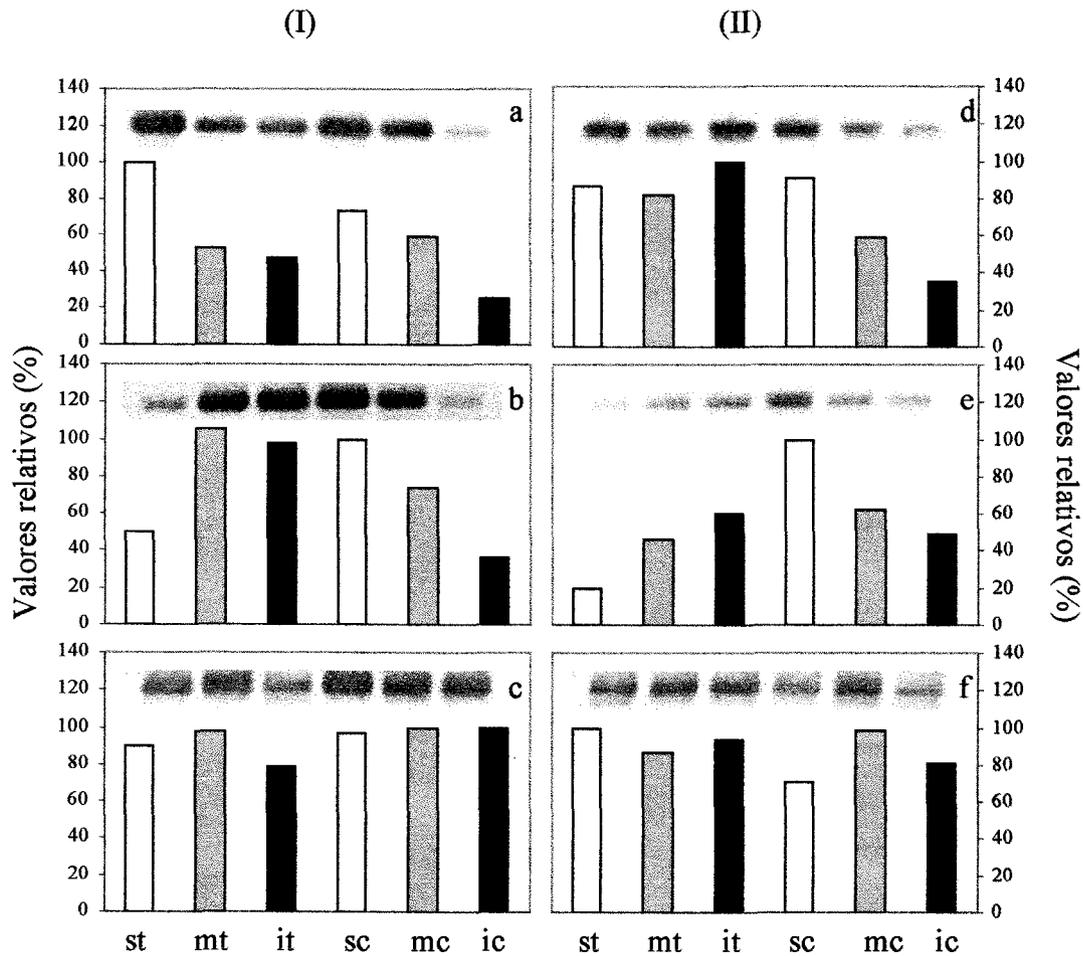


Figura 4.79 - Niveles de transcritos de FBPasa en folíolos de hojas superiores, intermedias e inferiores, de plantas crecidas en condiciones normales (sc, mc, ic) y bajo estrés lumínico (st, mt, it) de luz continua (I) ó saturante (II), durante 10 (a,d), 20 (b,e) ó 30 (c,f) días de tratamiento. Datos expresados por unidad de peso fresco.

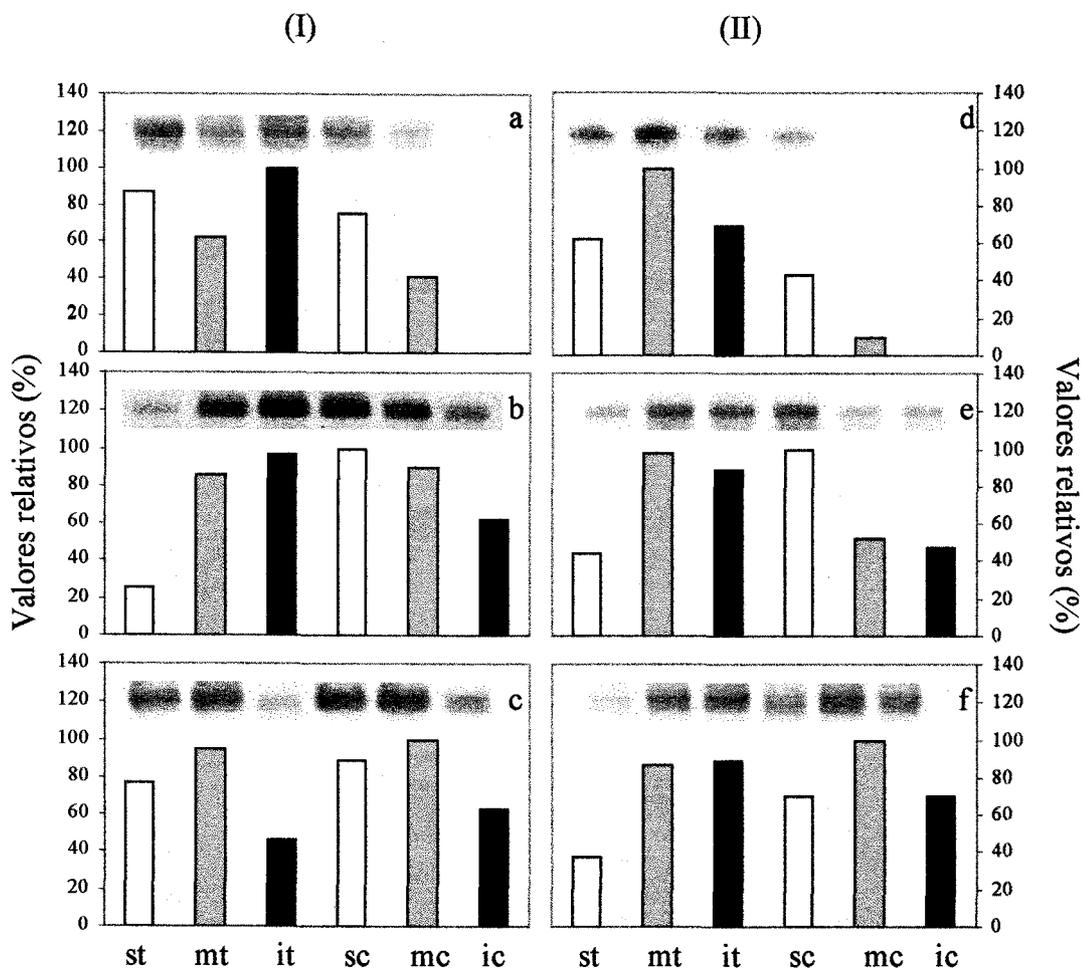


Figura 4.80 - Niveles de transcritos de NADP-MDH en folíolos de hojas superiores, intermedias e inferiores, de plantas crecidas en condiciones normales (sc, mc, ic) y bajo estrés lumínico (st, mt, it) de luz continua (I) ó saturante (II), durante 10 (a,d), 20 (b,e) ó 30 (c,f) días de tratamiento. Datos expresados por unidad de peso fresco.

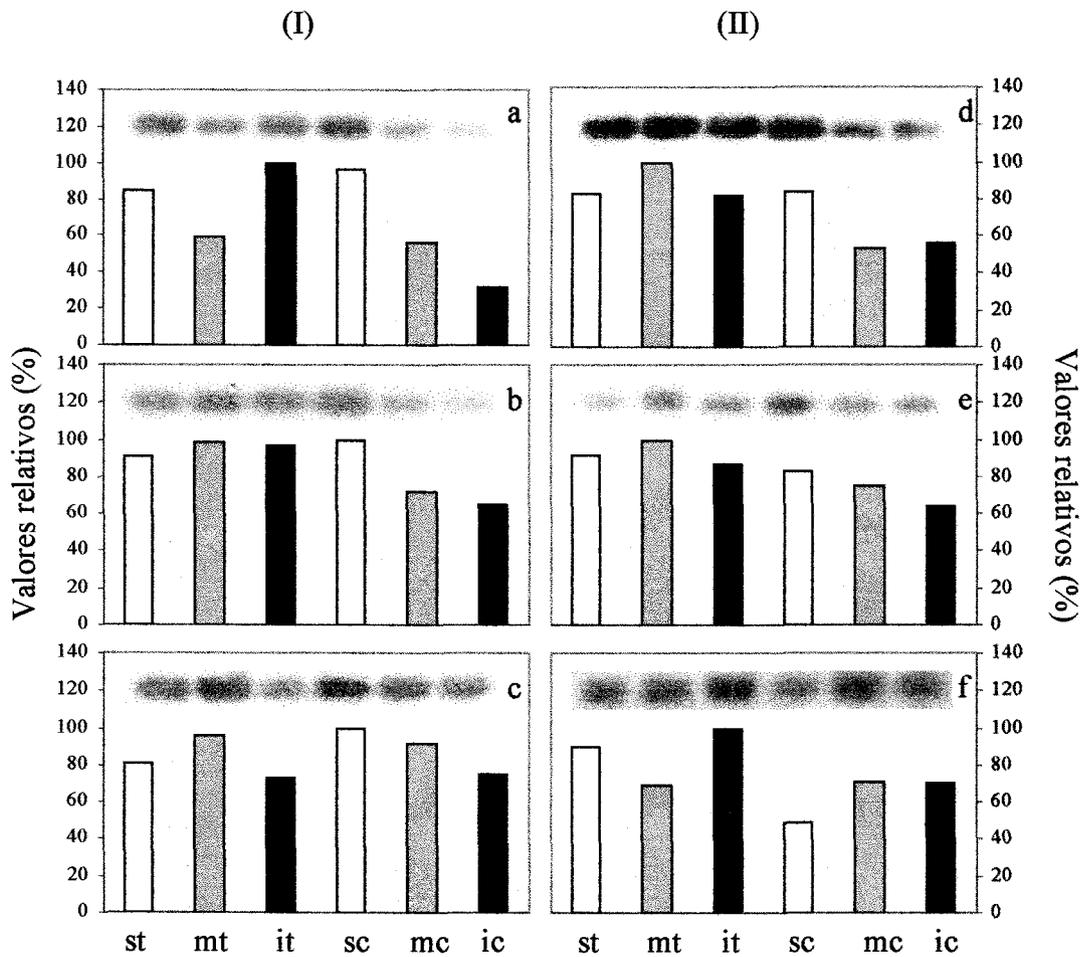


Figura 4.81 - Niveles de transcritos de *Trx f* en folíolos de hojas superiores, intermedias e inferiores, de plantas crecidas en condiciones normales (sc, mc, ic) y bajo estrés lumínico (st, mt, it) de luz continua (I) ó saturante (II), durante 10 (a,d), 20 (b,e) ó 30 (c,f) días de tratamiento. Datos expresados por unidad de peso fresco.

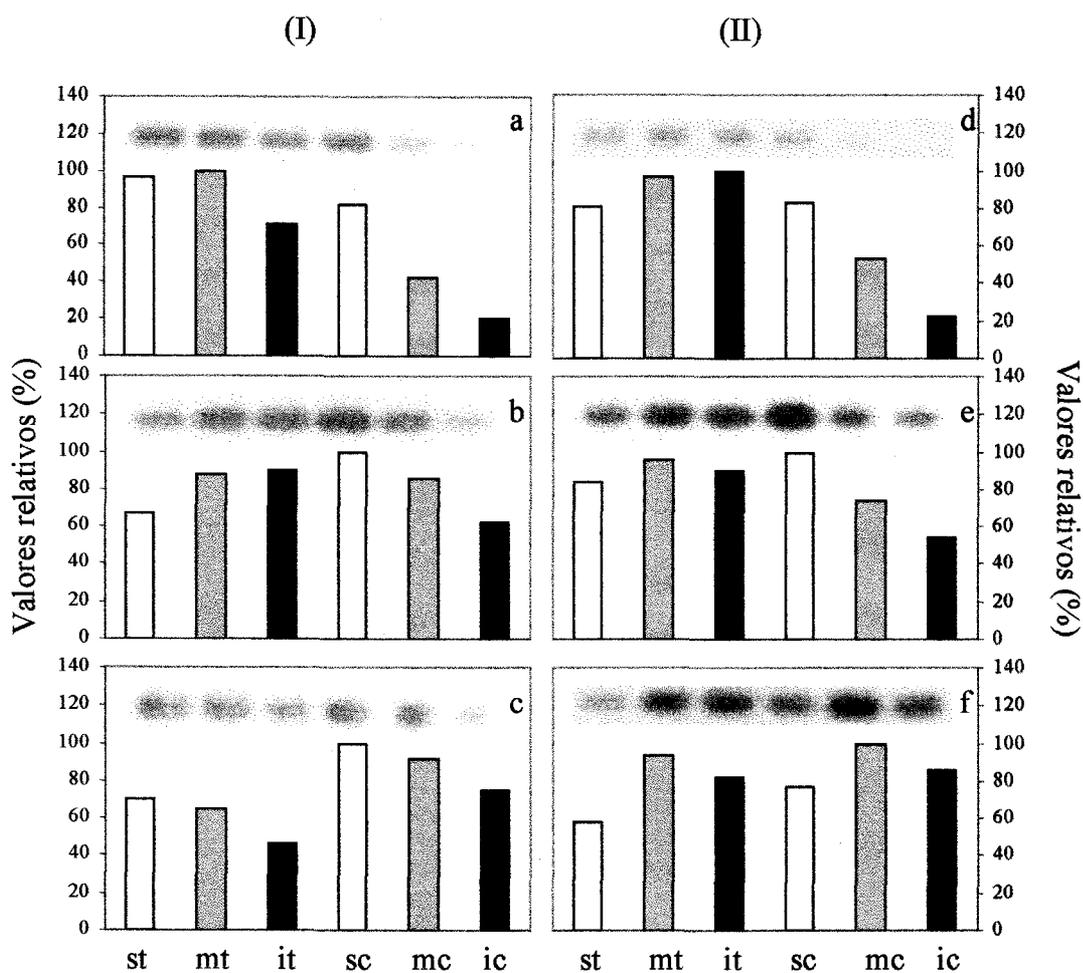


Figura 4.82 - Niveles de transcritos de *Trx m* en folíolos de hojas superiores, intermedias e inferiores, de plantas crecidas en condiciones normales (sc, mc, ic) y bajo estrés lumínico (st, mt, it) de luz continua (I) ó saturante (II), durante 10 (a,d), 20 (b,e) ó 30 (c,f) días de tratamiento. Datos expresados por unidad de peso fresco.

Los resultados de los contenidos de proteínas, como se indicó, podrían estar evidenciando una mayor proteólisis en plantas sometidas a estrés. Esta menor vida media de las proteínas estaría de alguna manera obligando a las células a un mayor ritmo de expresión, provocando aumentos en la tasa de síntesis de los correspondientes mRNAs. Esto estaría explicando los similares contenidos de proteínas, y los mucho mayores de mRNA, en las plantas sometidas por 10 días a estrés. Pero cuando estas condiciones desfavorables se prolongan por más tiempo, las células ven sobrepasada su capacidad de poder mantener unos niveles apropiados de mRNA, que permitan una velocidad de síntesis de proteínas suficientemente alta para poder compensar la mayor degradación de éstas.

Otra explicación podría basarse en que los procesos de transcripción y traducción estuvieran regulados por diferentes mecanismos. Por un lado, los mayores niveles de mRNA en las plantas tratadas podrían deberse a una mayor transcripción en respuesta a una mayor irradiancia. Pero esto puede no estar asociado a una mayor tasa de traducción. Ello significa que parte del mRNA sintetizado no es leído. Con un periodo más prolongado de estrés, las menores diferencias de contenido de mRNA entre las plantas tratadas y las control podría deberse a la alteración de procesos bioquímicos provocados por el estrés, a los que podría estar asociada una mayor proteólisis.

Para poner a prueba ambas afirmaciones, se pasó a determinar la vida media de las proteínas en plantas control y en plantas provenientes de tratamientos de 10 días bajo luz saturante.

4.3.2.3 - Determinación de la vida media de proteínas

En el estudio de la vida media de las proteínas FBPasa, NADP-MDH, Trx *f* y Trx *m* se puede destacar que la incorporación de radiactividad en estas proteínas fue muy inferior en las plantas bajo estrés que en las control (Tabla 4.5), demostrando un menor ritmo de síntesis de proteínas en las primeras con respecto a las segundas. Además, en el caso de las plantas control la radiactividad incorporada a las proteínas solubles totales siguió en aumento hasta el final del periodo de análisis y, en cambio, en las hojas estresadas, luego de alcanzar un máximo, los valores sufrieron una marcada disminución (Figura 4.83). Esto estaría indicando una mayor proteólisis en las plantas estresadas. No obstante, no se evidenció una enor vida media de las proteínas bajo

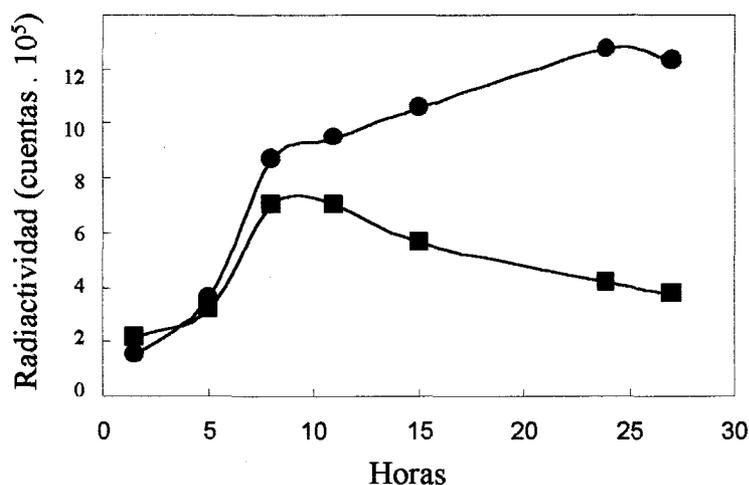


Figura 4.83 - Radiactividad incorporada a las proteínas solubles totales en hojas provenientes de plantas control (●) y de plantas expuestas a estrés lumínico (■). Después de 10 días de tratamiento las hojas eran pinceladas con ³⁵S-metionina y dejadas en luz continua, extrayéndose muestras a diferentes intervalos de tiempo. Las abscisas corresponden a las horas transcurridas a partir de la incorporación de la ³⁵S-metionina.

PROTEINA	VIDA MEDIA (horas)		MAXIMO (horas)		MAXIMO (cpm)	
	<i>CONTROL</i>	<i>ESTRÉS</i>	<i>CONTROL</i>	<i>ESTRÉS</i>	<i>CONTROL</i>	<i>ESTRÉS</i>
FBPasa	4.0	4.0	8	8	11000	3500
NADP-MDH	4.5	4.0	8	8	9000	5500
Trx _f	3.5	3.8	8	8	7000	800
Trx _m	3.0	3.0	11	11	4500	600

Tabla 4.5 - Vida media de FBPasa, NADP-MDH, Trx_f y Trx_m en hojas provenientes de plantas control y de plantas expuestas a estrés lumínico, calculada como el tiempo que tarda en descender la radiactividad incorporada, después de alcanzado el valor máximo, a la mitad del mismo. Se muestran también las horas a las que se alcanzó el máximo, y el valor de éste (cpm).

estudio en las plantas estresadas, comparadas con las control (Tabla 4.5), lo que indica que estas proteínas serían de las menos afectadas por el estrés.

4.4 – Evolución del sistema modulador de la FBPasa y de la NADP-MDH en condiciones de estrés lumínico asociado a estrés térmico.

4.4.1 - Estrés lumínico asociado a altas o bajas temperaturas en tratamientos de 10 días

Para analizar la respuesta de las plantas a condiciones de estrés lumínico asociado a estrés térmico se diseñaron experimentos en que las mismas eran mantenidas durante un periodo de 10 días en presencia de baja ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ PAR) o alta ($2500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ PAR) irradiancia, simultaneadas con temperaturas normales ($25/20^\circ\text{C}$ día/noche), altas ($35/30^\circ\text{C}$ día/noche) o bajas ($15/10^\circ\text{C}$ día/noche), en fotoperiodo de 16 h. En estas condiciones las plantas presentaron marcadas diferencias en crecimiento. Existió un efecto positivo de la elevada irradiancia, y negativos tanto de las altas como de las bajas temperaturas (Figura 4.84). Todos los estudios se realizaron utilizando la penúltima hoja expandida, debido a que, siendo de las más jóvenes, había soportado el estrés durante todo el periodo de tratamiento (Figura 4.85).

4.4.1.1 - Expresión transcripcional

Como era de esperar, la expresión transcripcional de FBPasa y NADP-MDH aparece inhibida en plantas de guisante mantenidas durante 10 días en baja irradiancia, tanto en plantas crecidas a temperatura normales o altas (Figuras 4.86 y 4.87). Por el contrario, cuando las plantas fueron mantenidas a baja temperatura, los niveles de mRNA específicos aumentaron marcadamente, con los mayores valores en condiciones de baja irradiancia. El perfil de los mRNAs específicos para Trxs *f* y *m* (Figuras 4.88 y 4.89) no fue tan marcadamente contrastante como el de sus proteínas dianas. Un efecto positivo de la luz a bajas temperaturas es también observado en las primeras, pero el efecto no fue tan evidente como en las segundas. Como se puede apreciar, los resultados fueron muy similares tanto si la determinación se realiza empleando un mismo peso

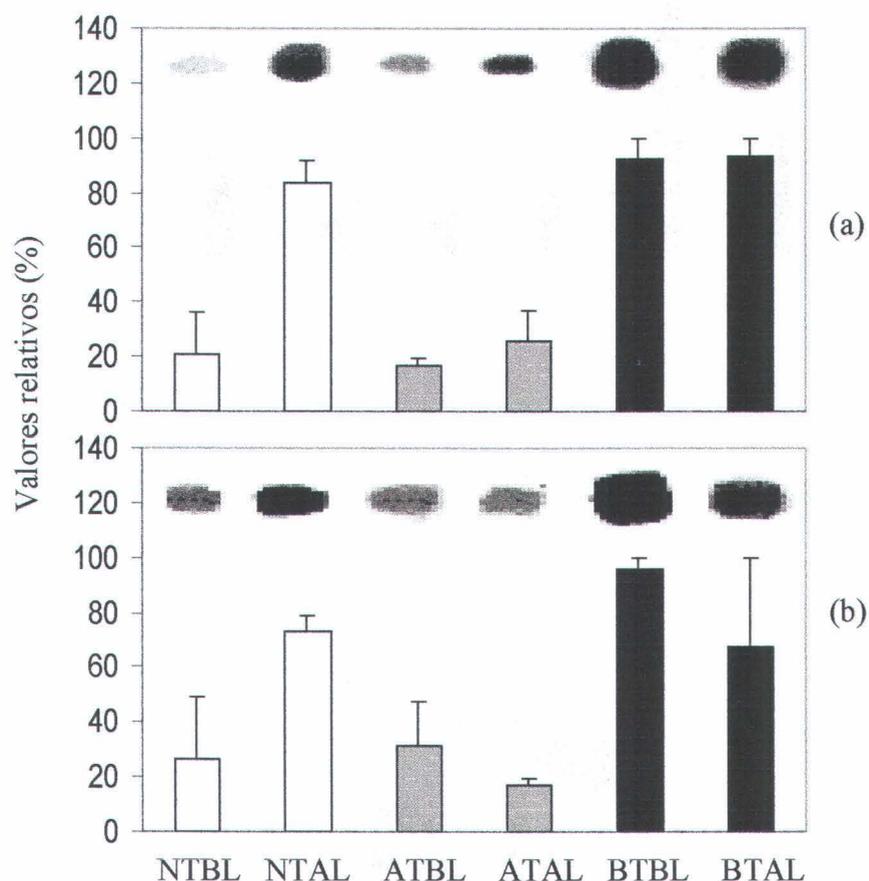


Figura 4.86 - Niveles de mRNA de FBPase determinados mediante RT-PCR, expresados por unidad de peso fresco (a) y por unidad de mRNA total (b), en hojas de plantas sometidas a distintas combinaciones de luz y temperatura. NTBL: temperatura normal, baja luz; NTAL: temperatura normal, alta luz; ATBL: alta temperatura, baja luz; ATAL: alta temperatura, alta luz; BTBL: baja temperatura, baja luz; BTAL: baja temperatura, alta luz. Las manchas de la parte superior corresponden a los cDNAs obtenidos por RT-PCR del mRNA para la FBPase. Valores dados en % con respecto al mayor.

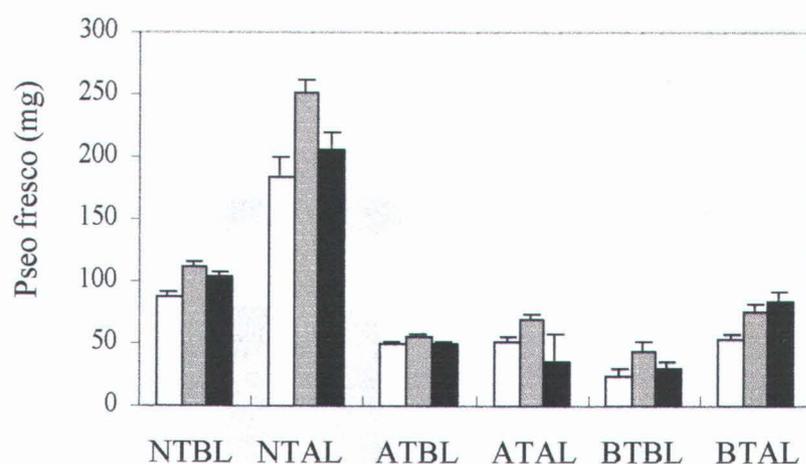


Figura 4.84 - Peso fresco de foliolos peciolados de última (□), penúltima (▒) y antepenúltima (■) hoja expandida de plantas sometidas a distintas combinaciones de luz y temperatura. NTBL: temperatura normal, baja luz; NTAL: temperatura normal, alta luz; ATBL: alta temperatura, baja luz; ATAL: alta temperatura, alta luz; BTBL: baja temperatura, baja luz; BTAL: baja temperatura, alta luz.

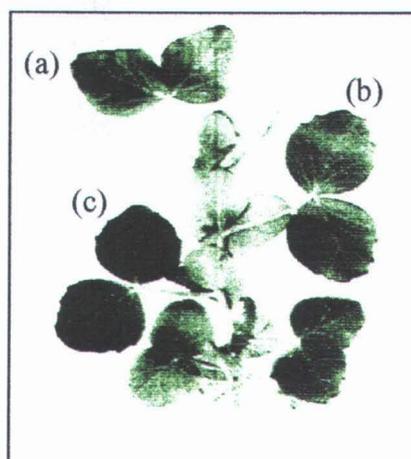


Figura 4.85 - Parte aérea de una planta de guisante de 10 días de crecimiento hidropónico (20 d desde la siembra) en condiciones normales de luz y temperatura. (a): última hoja expandida; (b): penúltima hoja expandida; (c) antepenúltima hoja expandida.

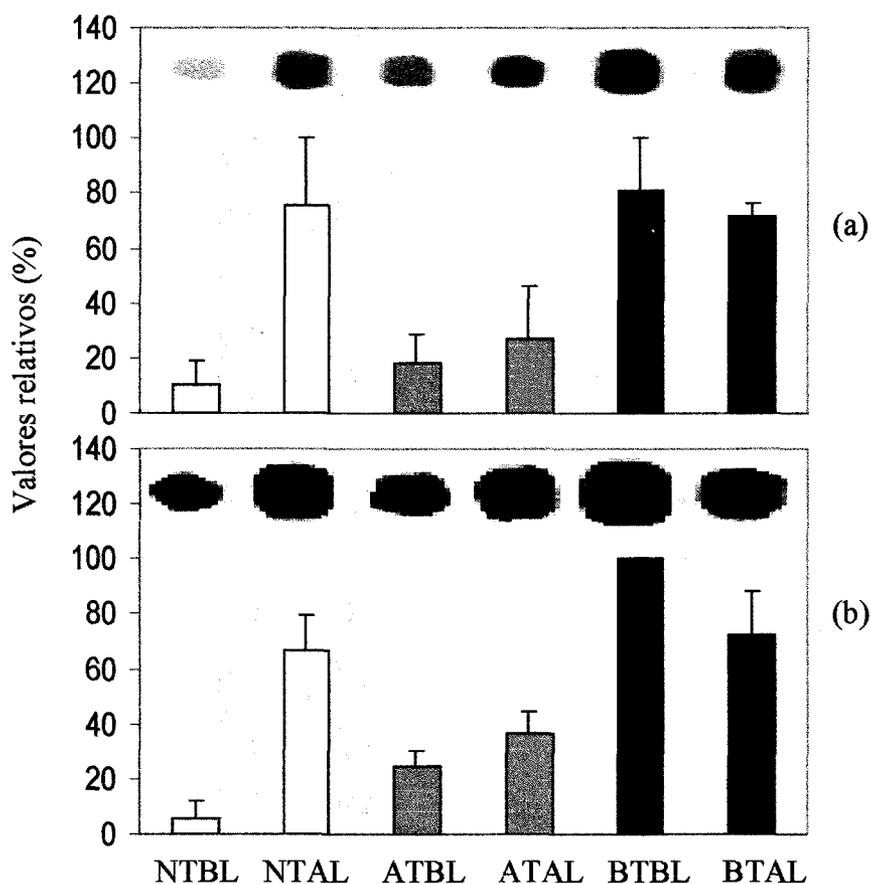


Figura 4.87 - Niveles de mRNA de NADP-MDH determinados mediante RT-PCR, expresados por unidad de peso fresco (a) y por unidad de mRNA total (b), en hojas de plantas sometidas a distintas combinaciones de luz y temperatura. NTBL: temperatura normal, baja luz; NTAL: temperatura normal, alta luz; ATBL: alta temperatura, baja luz; ATAL: alta temperatura, alta luz; BTBL: baja temperatura, baja luz; BTAL: baja temperatura, alta luz. Las manchas de la parte superior corresponden a los cDNAs obtenidos por RT-PCR del mRNA para la NADP-MDH. Valores dados en % con respecto al mayor.

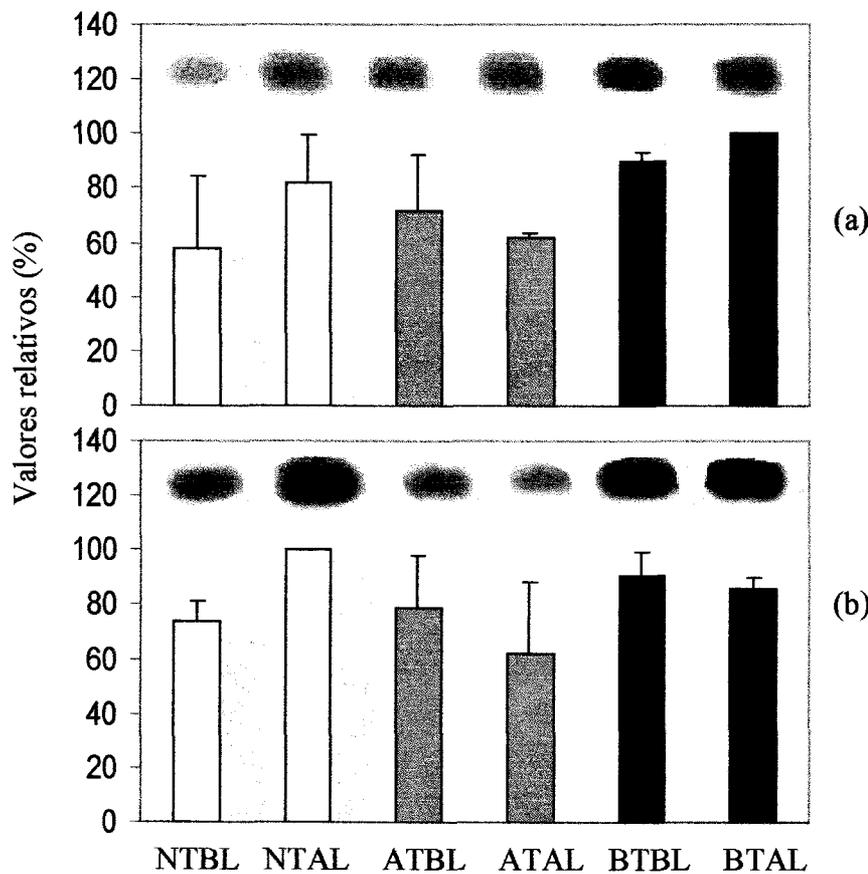


Figura 4.88 - Niveles de mRNA de *Trx f* determinados mediante RT-PCR, expresados por unidad de peso fresco (a) y por unidad de mRNA total (b), en hojas de plantas sometidas a distintas combinaciones de luz y temperatura. NTBL: temperatura normal, baja luz; NTAL: temperatura normal, alta luz; ATBL: alta temperatura, baja luz; ATAL: alta temperatura, alta luz; BTBL: baja temperatura, baja luz; BTAL: baja temperatura, alta luz. Las manchas de la parte superior corresponden a los cDNAs obtenidos por RT-PCR del mRNA para la *Trx f*. Valores dados en % con respecto al mayor.

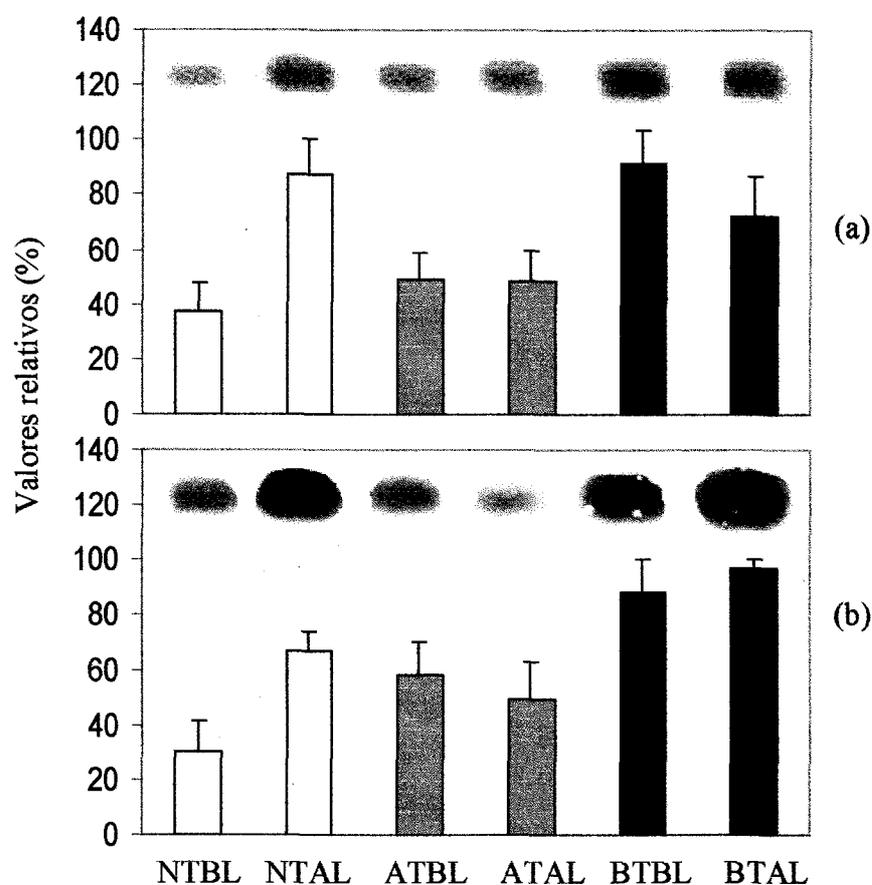


Figura 4.89 - Niveles de mRNA de *Trx m* determinados mediante RT-PCR, expresados por unidad de peso fresco (a) y por unidad de mRNA total (b), en hojas de plantas sometidas a distintas combinaciones de luz y temperatura. NTBL: temperatura normal, baja luz; NTAL: temperatura normal, alta luz; ATBL: alta temperatura, baja luz; ATAL: alta temperatura, alta luz; BTBL: baja temperatura, baja luz; BTAL: baja temperatura, alta luz. Las manchas de la parte superior corresponden a los cDNAs obtenidos por RT-PCR del mRNA para la *Trx m*. Valores dados en % con respecto al mayor.

fresco de material de partida, como si se lleva a cabo depositando en el tubo de RT-PCR una misma cantidad de mRNA.

4.4.1.2 - Niveles proteicos

Cuando los efectos de la irradiancia y de la temperatura en la expresión de Trxs *f* y *m*, y de FBPasa y NADP-MDH, son analizados al nivel de proteínas, son pocas las diferencias significativas, tanto cuando el contenido de proteína específica es expresado sobre la base de peso fresco, como cuando lo es por unidad de proteína total (Figuras 4.90-4.93). El único hecho que quizás merece algo de énfasis es, tal como ocurre con el mRNA, la respuesta positiva de la planta a las bajas temperaturas bajo condiciones de baja irradiancia, especialmente si los resultados son expresados en base a proteínas totales.

4.4.1.3 - Clorofila y proteínas solubles totales

Fue muy claro el efecto negativo de la elevada irradiancia sobre el contenido de clorofila, independientemente de la temperatura a la que estuvieran expuestas las plantas (Figura 4.94). No obstante, no fue posible determinar tendencia alguna con respecto al contenido de proteínas solubles totales. Aunque pueda parecer lógico que la luz y temperaturas elevadas podrían tener un efecto positivo, los contenidos se mantuvieron en valores normales en todos los tratamientos (Figura 4.95)

4.4.1.4 - Actividades enzimáticas

Las tendencias observadas en los niveles de mRNA y proteínas no tuvieron su paralelismo con las de las actividades FBPasa y NADP-MADH (Figuras 4.96-4.98). La primera, sorprendentemente, muestra los mayores valores en plantas que crecen bajo altas temperaturas y baja irradiancia, cuando la actividad fue medida bajo condiciones reductoras (pH 7.9, en presencia de DTT).

Debería deducirse, sobre la base de estos resultados, que existe un aumento en la capacidad transcripcional de las plantas en condiciones de bajas temperaturas. Este hecho no puede ser considerado específico de las proteínas bajo estudio, debido a que cuando los resultados son expresados sobre la base de peso fresco o relativos al contenido de mRNA total el perfil es similar. A pesar del efecto negativo de la luz sobre

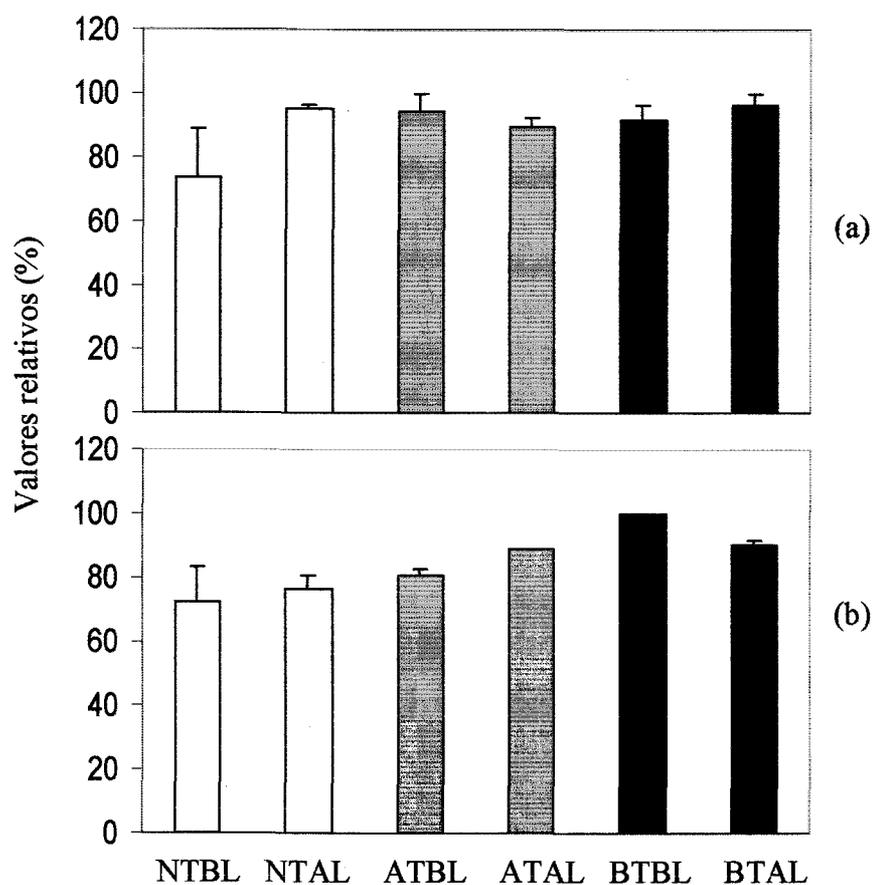


Figura 4.90 - FBPasa (proteína) determinada mediante ELISA, expresada por unidad de peso fresco (a) y por unidad de proteína (b) en hojas de plantas sometidas a distintas combinaciones de luz y temperatura. NTBL: temperatura normal, baja luz; NTAL: temperatura normal, alta luz; ATBL: alta temperatura, baja luz; ATAL: alta temperatura, alta luz; BTBL: baja temperatura, baja luz; BTAL: baja temperatura, alta luz. Valores dados en % con respecto al mayor

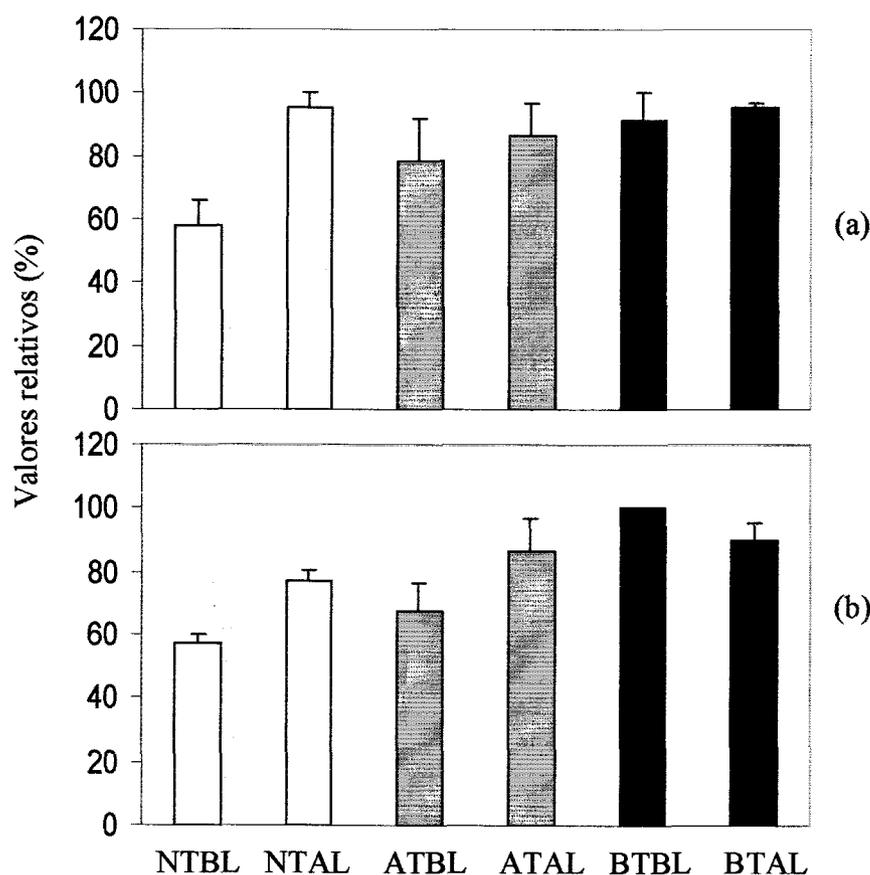


Figura 4.91 - NADP-MDH (proteína) determinada mediante ELISA, expresada por unidad de peso fresco (a) y por unidad de proteína (b) en hojas de plantas sometidas a distintas combinaciones de luz y temperatura. NTBL: temperatura normal, baja luz; NTAL: temperatura normal, alta luz; ATBL: alta temperatura, baja luz; ATAL: alta temperatura, alta luz; BTBL: baja temperatura, baja luz; BTAL: baja temperatura, alta luz. Valores dados en % con respecto al mayor

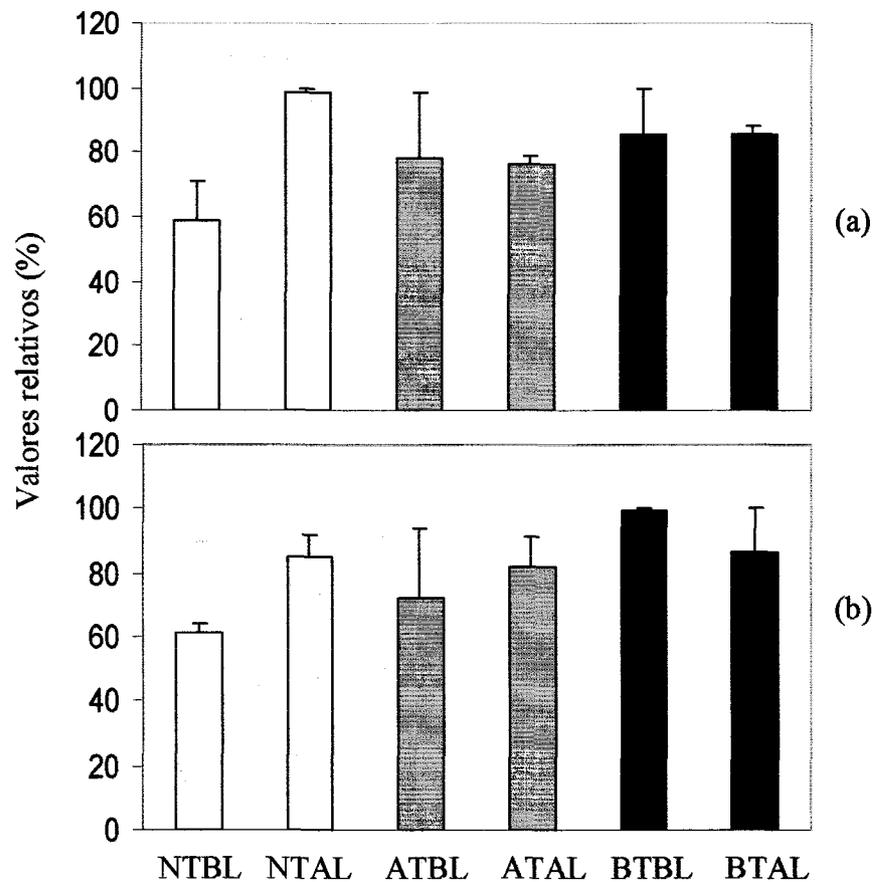


Figura 4.92 - Trx *f* (proteína) determinada mediante ELISA, expresada por unidad de peso fresco (a) y por unidad de proteína (b) en hojas de plantas sometidas a distintas combinaciones de luz y temperatura. NTBL: temperatura normal, baja luz; NTAL: temperatura normal, alta luz; ATBL: alta temperatura, baja luz; ATAL: alta temperatura, alta luz; BTBL: baja temperatura, baja luz; BTAL: baja temperatura, alta luz. Valores dados en % con respecto al mayor

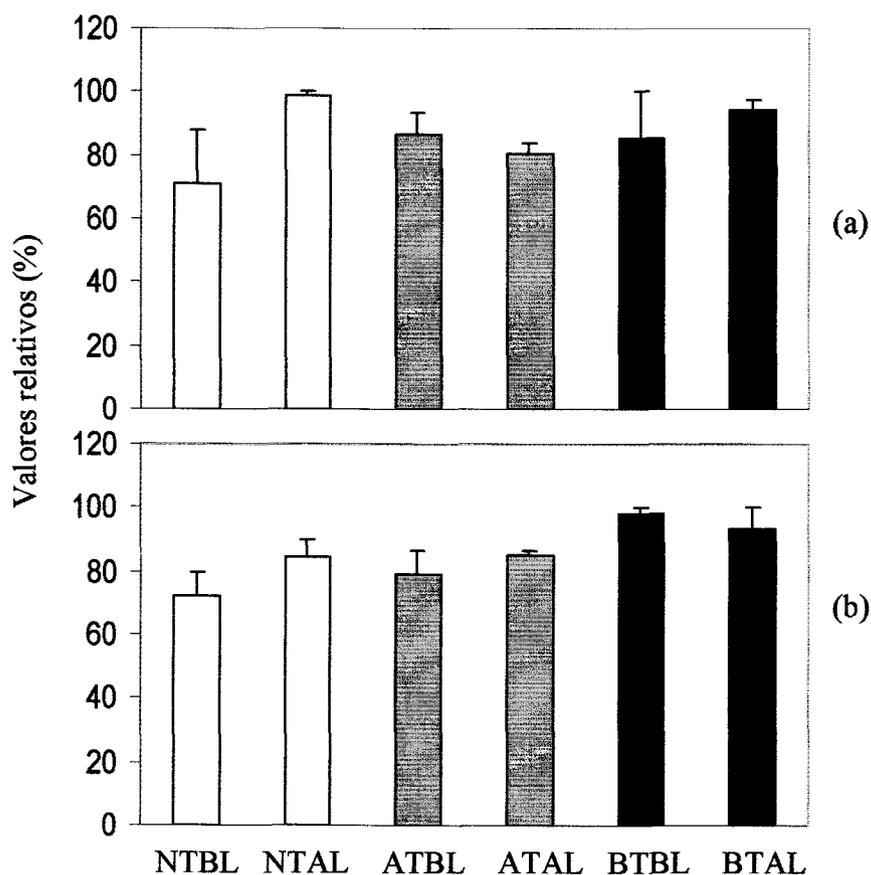


Figura 4.93 - Trx *m* (proteína) determinada mediante ELISA, expresada por unidad de peso fresco (a) y por unidad de proteína (b) en hojas de plantas sometidas a distintas combinaciones de luz y temperatura. NTBL: temperatura normal, baja luz; NTAL: temperatura normal, alta luz; ATBL: alta temperatura, baja luz; ATAL: alta temperatura, alta luz; BTBL: baja temperatura, baja luz; BTAL: baja temperatura, alta luz. Valores dados en % con respecto al mayor

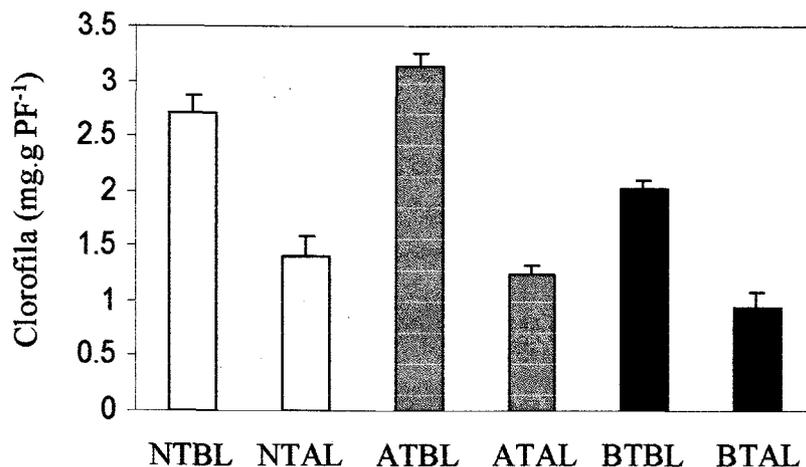


Figura 4.94 - Contenido en clorofila por unidad de peso fresco en hojas de plantas sometidas a distintas combinaciones de luz y temperatura. NTBL: temperatura normal, baja luz; NTAL: temperatura normal, alta luz; ATBL: alta temperatura, baja luz; ATAL: alta temperatura, alta luz; BTBL: baja temperatura, baja luz; BTAL: baja temperatura, alta luz.

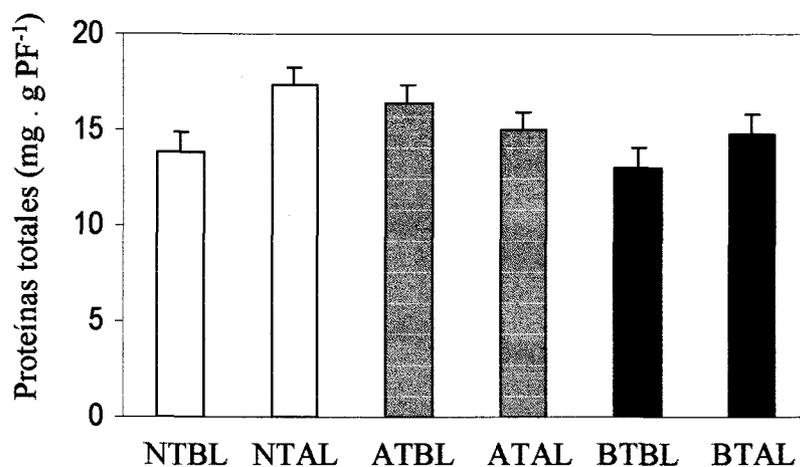


Figura 4.95 - Contenido de proteínas solubles por unidad de peso fresco en hojas de plantas sometidas a distintas combinaciones de luz y temperatura. NTBL: temperatura normal, baja luz; NTAL: temperatura normal, alta luz; ATBL: alta temperatura, baja luz; ATAL: alta temperatura, alta luz; BTBL: baja temperatura, baja luz; BTAL: baja temperatura, alta luz.

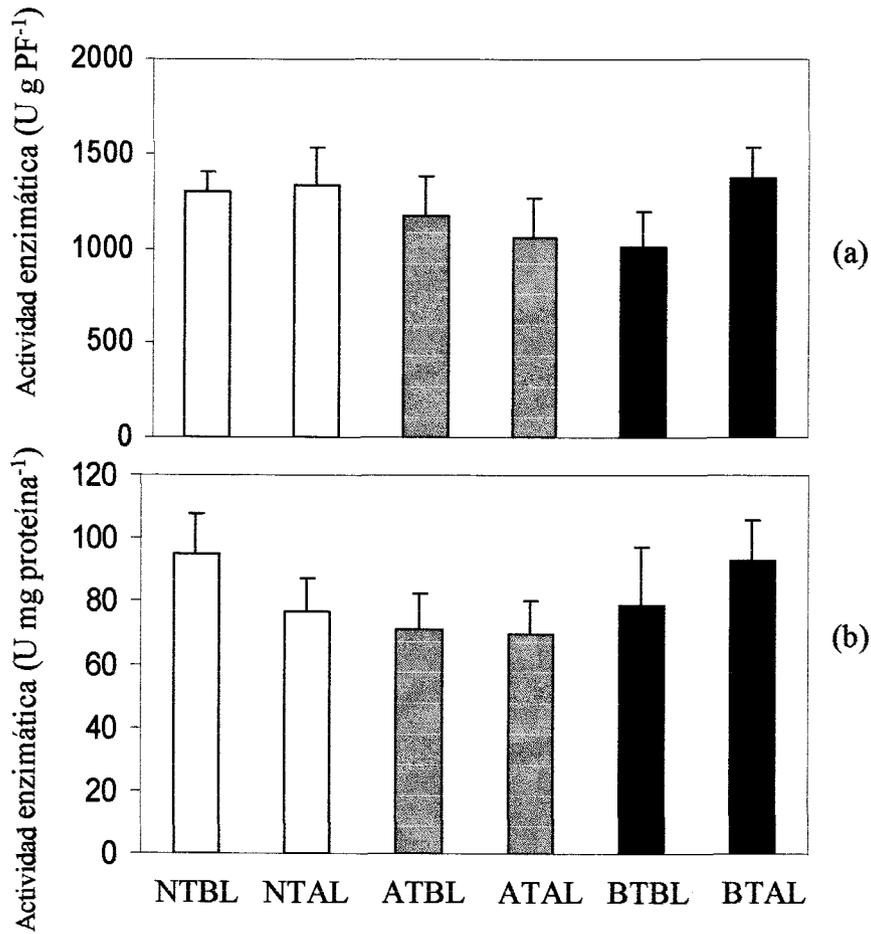


Figura 4.96 - Actividad FBPasa a pH 8.8 expresada por unidad de peso fresco (a) y por unidad de proteína (b), en hojas de plantas sometidas a distintas combinaciones de luz y temperatura. NTBL: temperatura normal, baja luz; NTAL: temperatura normal, alta luz; ATBL: alta temperatura, baja luz; ATAL: alta temperatura, alta luz; BTBL: baja temperatura, baja luz; BTAL: baja temperatura, alta luz.

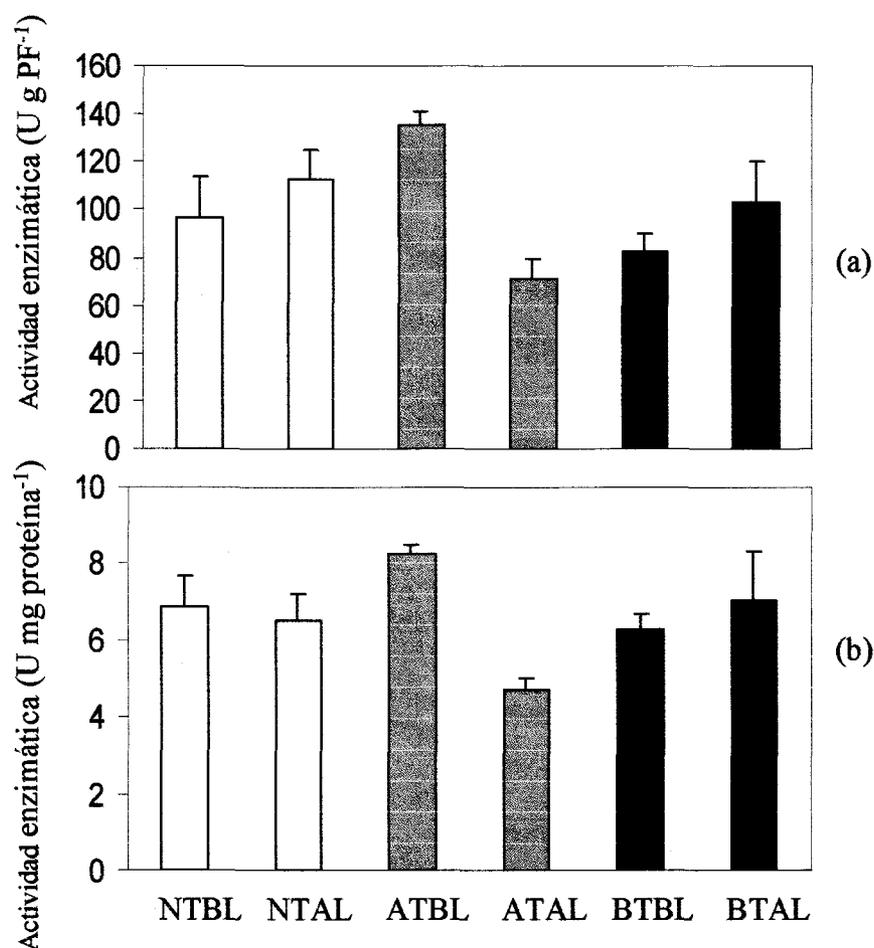


Figura 4.97 - Actividad FBPassa a pH 7.9 expresada por unidad de peso fresco (a) y por unidad de proteína (b), en hojas de plantas sometidas a distintas combinaciones de luz y temperatura. NTBL: temperatura normal, baja luz; NTAL: temperatura normal, alta luz; ATBL: alta temperatura, baja luz; ATAL: alta temperatura, alta luz; BTBL: baja temperatura, baja luz; BTAL: baja temperatura, alta luz.

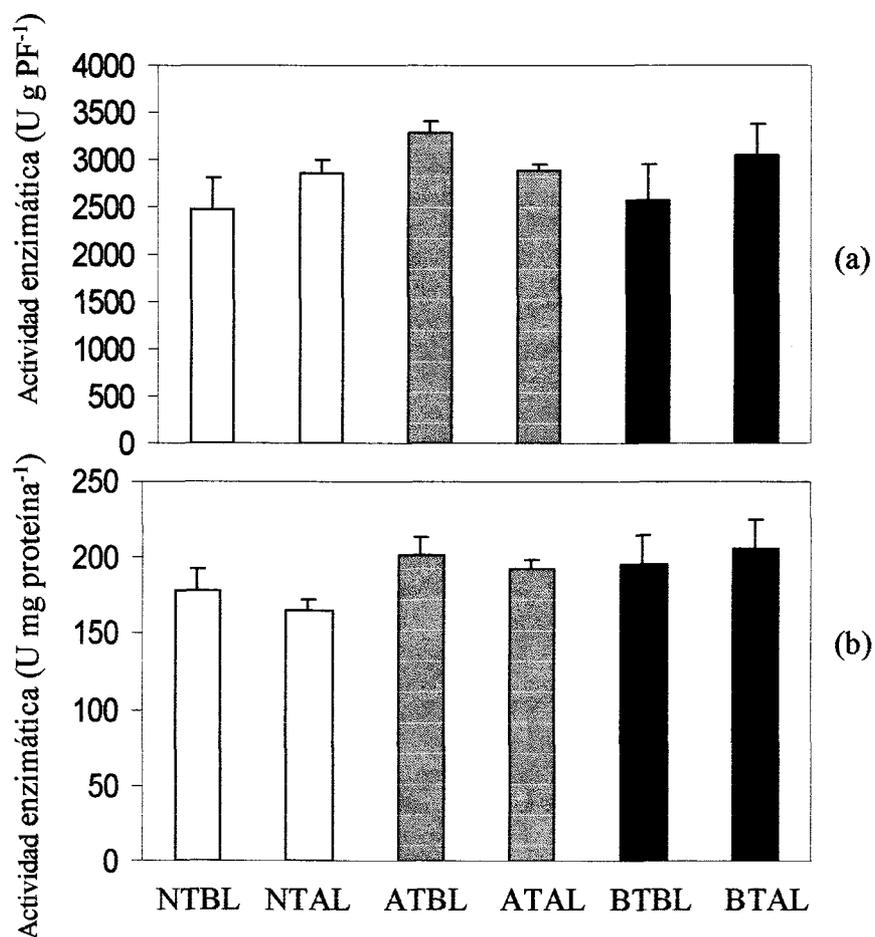


Figura 4.98 - Actividad NADP-MDH expresada por unidad de peso fresco (a) y por unidad de proteína (b), en hojas de plantas sometidas a distintas combinaciones de luz y temperatura. NTBL: temperatura normal, baja luz; NTAL: temperatura normal, alta luz; ATBL: alta temperatura, baja luz; ATAL: alta temperatura, alta luz; BTBL: baja temperatura, baja luz; BTAL: baja temperatura, alta luz.

el contenido en clorofila (Figura 4.94), la alta irradiancia parece tener un efecto positivo sobre la transcripción de mRNA.

4.4.1.5 - Análisis microscópico

La Figura 4.99 A muestra células del mesófilo de plantas de guisantes crecidas en condiciones normales de luz y temperatura. Es de notar que los gránulos de almidón se presentan grandes y refringentes, probablemente debido a que las muestras fueron preparadas a partir de hojas superiores con una elevada tasa metabólica, de plantas de 10 días de crecimiento hidropónico. Por el contrario, cuando las plantas fueron continuamente iluminadas con $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR, las células también aparecen con grandes gránulos de almidón, pero con membranas rotas y estructuras desorganizadas (Figura 4.99 B). Lo mismo ocurrió con plantas crecidas bajo luz saturante ($2500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR), las cuales presentaron elementos estructurales deformados y gránulos de almidón desorganizados, seguramente como consecuencia del proceso clorótico y de la acumulación de almidón (Figura 4.99 C). Es de notar que el efecto de la baja temperatura y de la baja iluminación es sinérgico, e induce la elevada respuesta transcripcional de la planta. La falta de una clara respuesta a nivel traduccional podría ser debido a las suaves condiciones estresantes usadas en los presentes experimentos.

4.4.2 - Tratamientos de alta irradiancia asociada a bajas temperaturas aplicados en forma continua durante 48 horas.

En el apartado anterior se analizaron las respuestas de las plantas a condiciones de estrés lumínico y térmico prolongados. Se emplearon temperaturas moderadamente altas o bajas, y se vio que estas últimas podrían ejercer un efecto positivo en la expresión a nivel transcripcional. En estos experimentos las plantas lograban cierto tipo de adaptación y, aunque con un menor crecimiento, lograban de alguna forma sobreponerse a las condiciones adversas del ambiente. Se planearon, entonces, experimentos donde las condiciones de elevada irradiancia se asociaron a bajas temperaturas, más limitantes metabólicamente. Plantas de 10 días y mantenidas en vermiculita en condiciones normales de luz y temperatura, fueron transplantadas a cultivo hidropónico y expuestas a luz continua de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR a temperatura

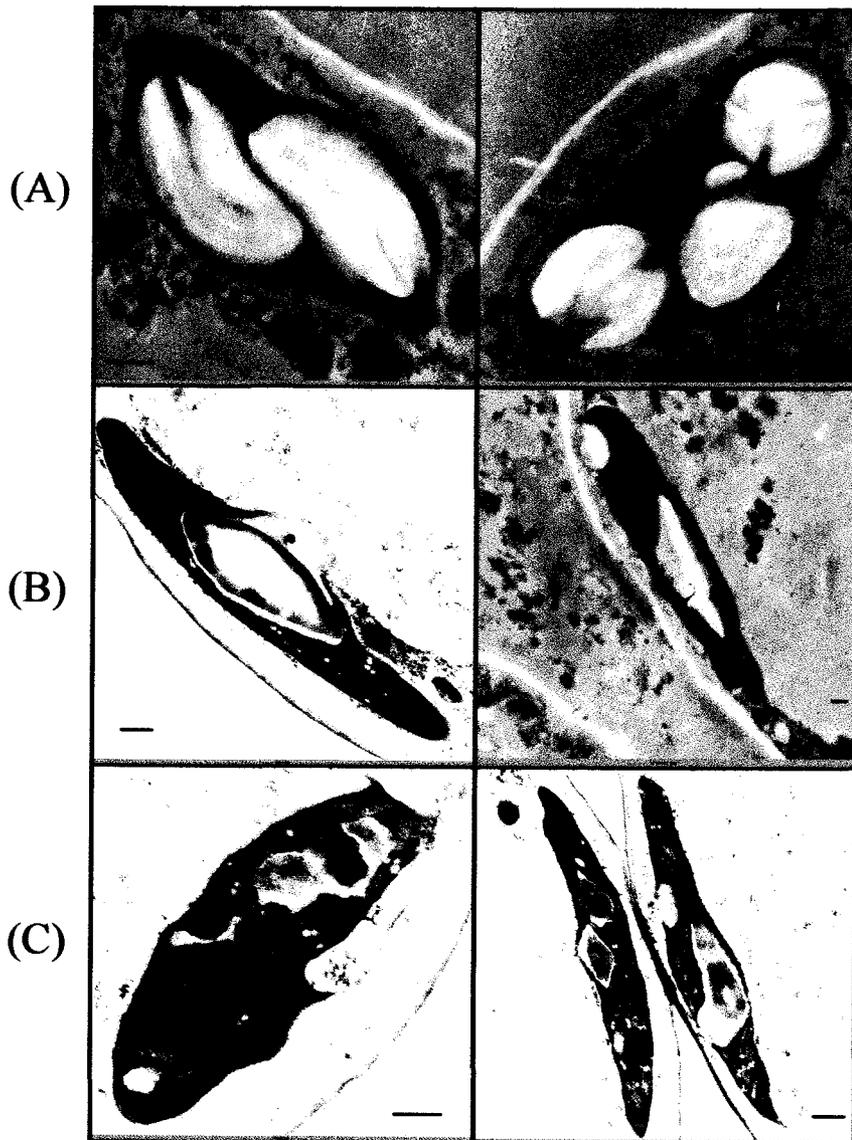


Figura 4.99 - Micrografía electrónica de secciones ultrafinas de células mesofílicas de hojas superiores provenientes de plantas de 10 días en crecimiento hidropónico bajo condiciones normales ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR, 25/20°C día/noche) (A), y bajo estrés lumínico: luz continua ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR) (B), y en fotoperiodo de 16 h con luz de $2500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR (C). Las secciones fueron embebidas en resina Unicryl, y observada a x8000 de magnificación. Las barras representan 1 μm .

normal (25°C) (control), y a luz continua de 2500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR a temperatura normal, o a luz continua de 2500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR a baja temperatura (8°C).

4.4.2.1 - Proteínas totales y actividades enzimáticas

Los niveles de proteínas totales en las hojas de las plantas sometidas a estrés presentaron un perfil casi idéntico al de las plantas control (Figura 4.100). Sólo se aprecia una leve disminución a las 48 h de tratamiento en los folíolos expuestos a alta luz y baja temperatura. Con respecto a la actividad FBPasa no existieron diferencias significativas entre los tratamientos de estrés y el control cuando los resultados se expresan por unidad de proteína. Pero cuando los mismos se consideran sobre la base de peso fresco, es de notar la disminución de la actividad FBPasa a pH 8.8 (Figura 4.101). Tanto ésta como la determinada a pH 7.9 disminuyó a medida que se prolongó el tratamiento, aunque en este último caso no existen diferencias entre tratadas y control, cualquiera sean las condiciones de cultivo (Figura 4.102). Cabe aclarar que las plantas mantenidas bajo irradiación normal, aunque continua y temperatura de 25 °C se las considera controles a efectos comparativos; no obstante, estas plantas bajo iluminación continuada por 48 h podrían comenzar a sufrir también condiciones adversas. Esto explicaría de alguna manera la disminución de la actividad FBPasa en función del tiempo. Este fenómeno no se presentó en el caso de la actividad NADP-MDH, que fue bastante estable, no evidenciándose tampoco diferencias entre control y tratadas (Figura 4.103).

4.4.2.2 – Expresión a niveles traduccional y transcripcional.

En cambio, cuando el nivel de proteínas se estudió mediante ELISA, se observaron respuestas claramente significativas en el contenido de FBPasa (Figura 4.104) y de NADP-MDH (Figura 4.105). Los niveles de estas proteínas en las plantas expuestas a elevada irradiancia, a temperatura normal, fueron cada vez más superiores a medida que se prolongaba el tratamiento. En cambio las tratadas con elevada irradiancia y bajas temperaturas presentaron contenidos significativamente inferiores a partir de las 10 h de tratamiento. El efecto sobre el contenido de Trxs fue menos evidente. En el caso de la Trx *f* (Figura 4.106) sólo los niveles, expresados por peso fresco, fueron inferiores a las 24 y 48 h a bajas temperaturas, mientras que los de Trx *m* (Figura 4.107) fueron

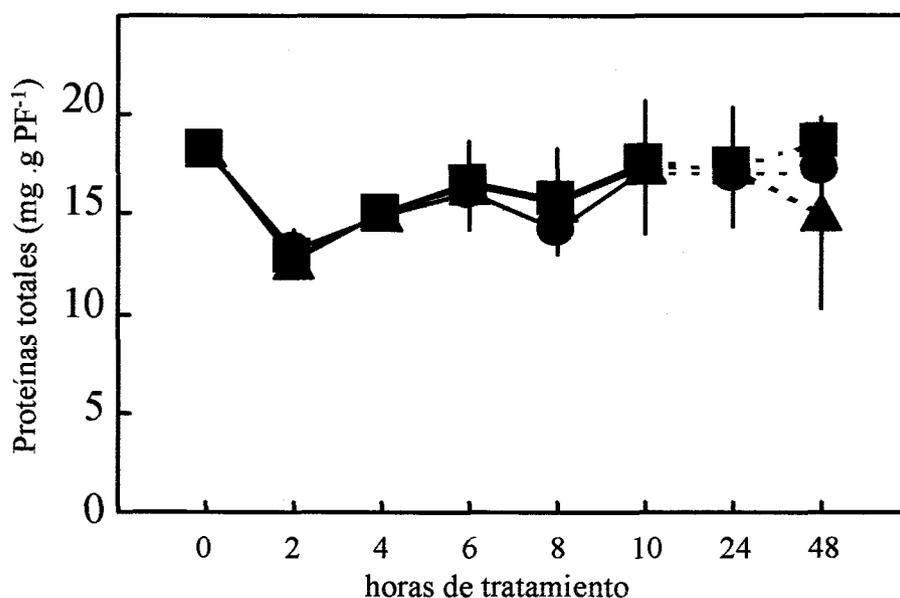


Figura 4.100 - Contenido de proteínas solubles totales expresado por unidad de peso fresco, en hojas de plantas sometidas durante 48 h a las siguientes condiciones de crecimiento: irradiación continua de intensidad normal ($200 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y temperatura normal (25°C) (●), irradiación continua de intensidad alta ($2500 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y temperatura normal (■), e irradiación continua de alta intensidad ($2500 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y temperatura baja (8°C) (▲).

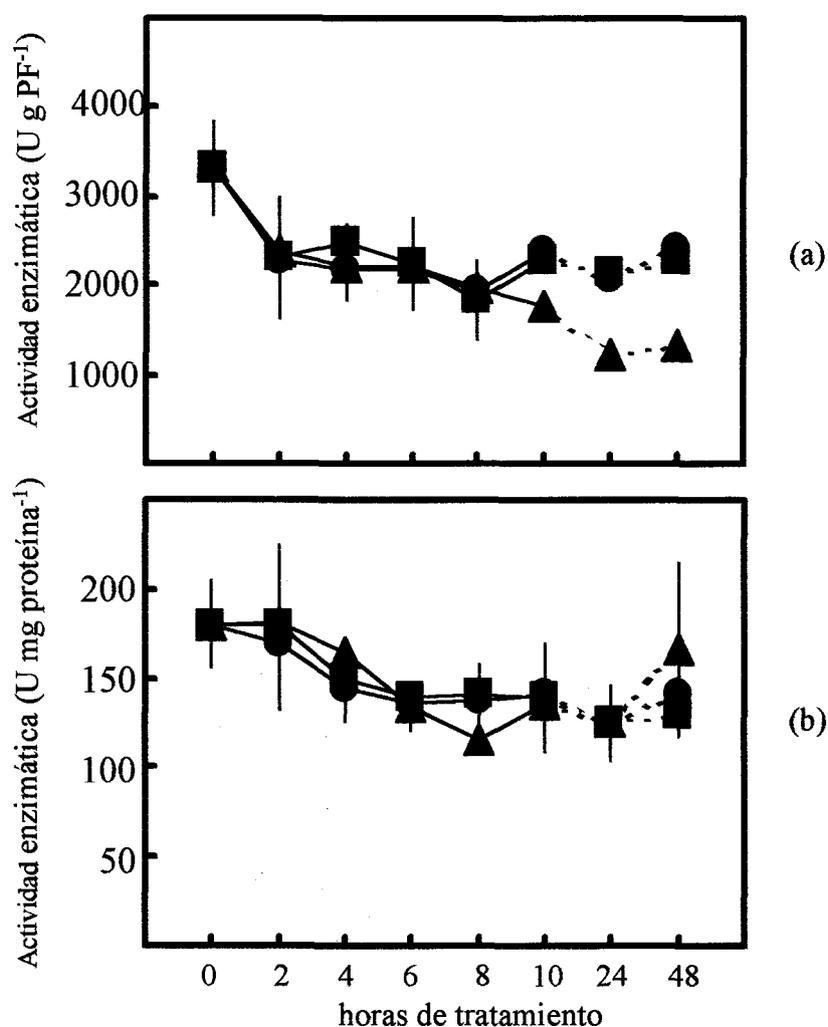


Figura 4.101 - Actividad FBPassa a pH 8.8 expresada por unidad de peso fresco (a) y por unidad de proteína (b), en hojas de plantas sometidas durante 48 h a las siguientes condiciones de crecimiento: irradiación continua de intensidad normal ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y temperatura normal (25°C) (●), irradiación continua de intensidad alta ($2500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y temperatura normal (■), e irradiación continua de alta intensidad ($2500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y temperatura baja (8°C) (▲).

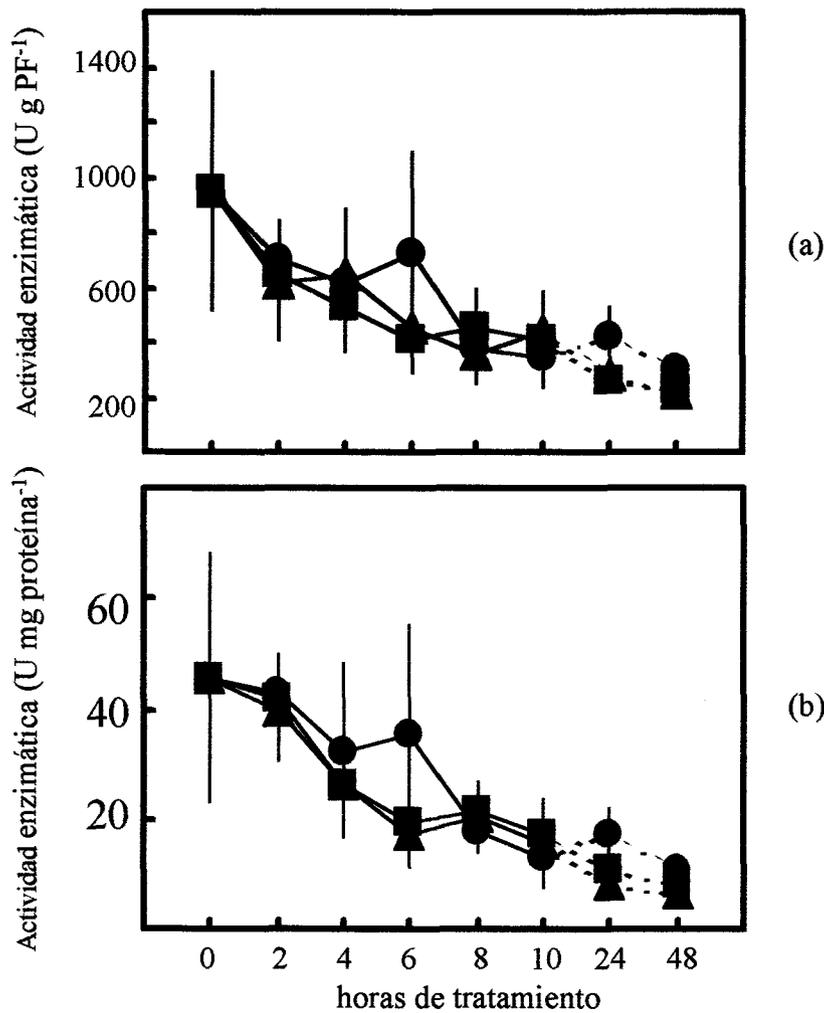


Figura 4.102 - Actividad FBPasa a pH 7.9 expresada por unidad de peso fresco (a) y por unidad de proteína (b), en hojas de plantas sometidas durante 48 h a las siguientes condiciones de crecimiento: irradiación continua de intensidad normal ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y temperatura normal (25°C) (●), irradiación continua de intensidad alta ($2500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y temperatura normal (■), e irradiación continua de alta intensidad ($2500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y temperatura baja (8°C) (▲).

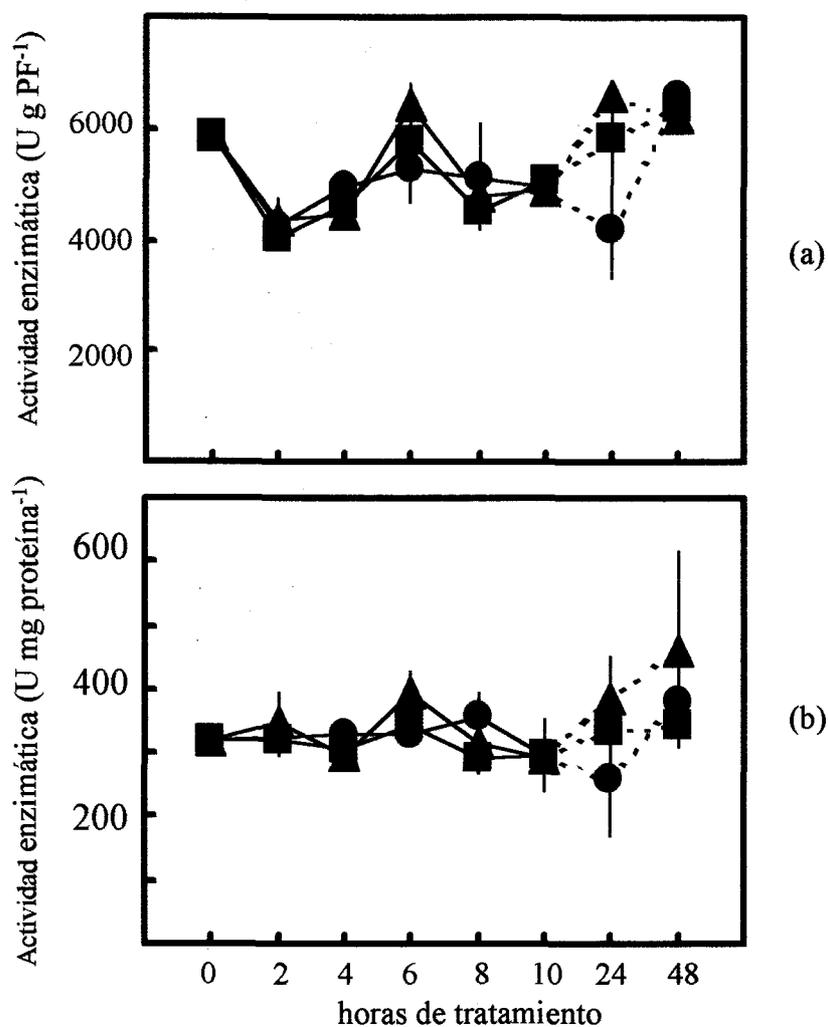


Figura 4.103 - Actividad NADP-MDH expresada por unidad de peso fresco (a) y por unidad de proteína (b), en hojas de plantas sometidas durante 48 h a las siguientes condiciones de crecimiento: irradiación continua de intensidad normal ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y temperatura normal (25°C) (●), irradiación continua de alta intensidad ($2500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y temperatura normal (■), e irradiación continua de alta intensidad ($2500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y temperatura baja (8°C) (▲).

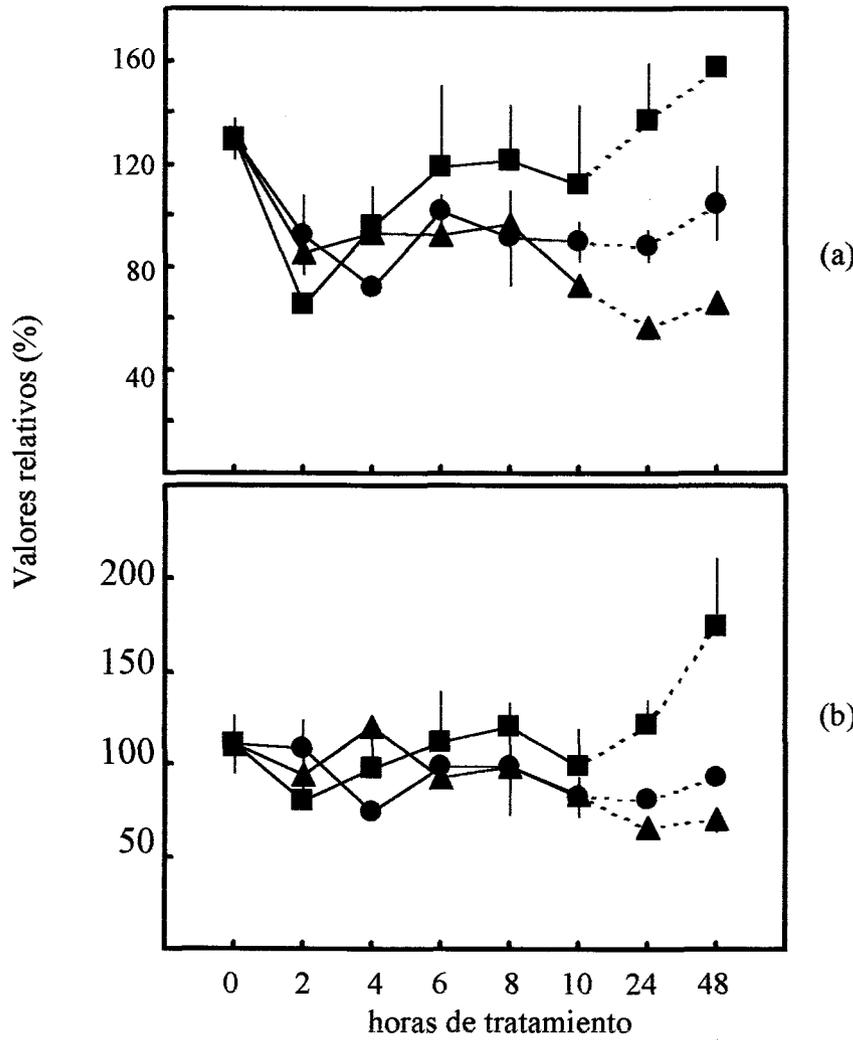


Figura 4.104 - Niveles proteicos de FBPasa (ELISA), expresados por unidad de peso fresco (a) y por unidad de proteína (b), en hojas de plantas sometidas durante 48 h a las siguientes condiciones de crecimiento: irradiación continua de intensidad normal ($200 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y temperatura normal (25°C) (●), irradiación continua de alta intensidad ($2500 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y temperatura normal (■), e irradiación continua de alta intensidad ($2500 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y temperatura baja (8°C) (▲). El valor de referencia (100 %) corresponde al promedio de las todas las lecturas de absorbancia de cada repetición.

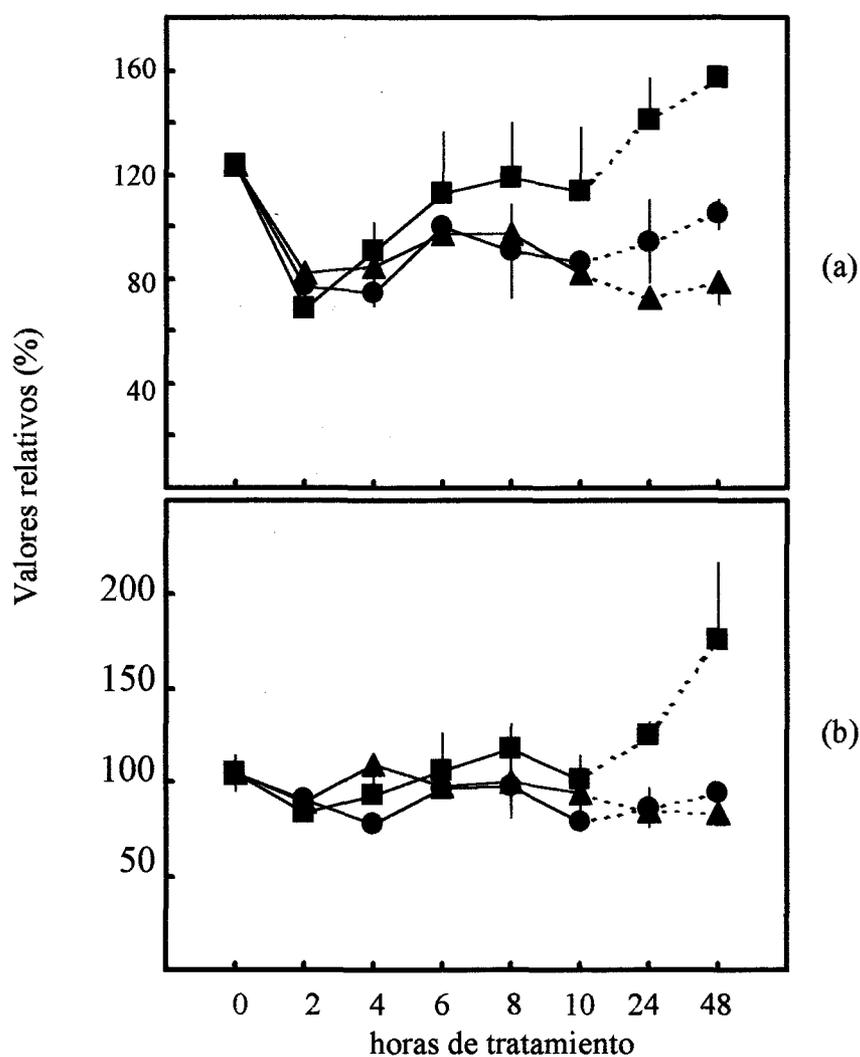


Figura 4.105 - Niveles proteicos de NADP-MDH (ELISA), expresada por unidad de peso fresco (a) y por unidad de proteína (b), en hojas de plantas sometidas durante 48 h a las siguientes condiciones de crecimiento: irradiación continua de intensidad normal ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y temperatura normal (25°C) (●), irradiación continua de alta intensidad ($2500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y temperatura normal (■), e irradiación continua de alta intensidad ($2500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y temperatura baja (8°C) (▲). El valor de referencia (100 %) corresponde al promedio de las todas las lecturas de absorbancia de cada repetición.

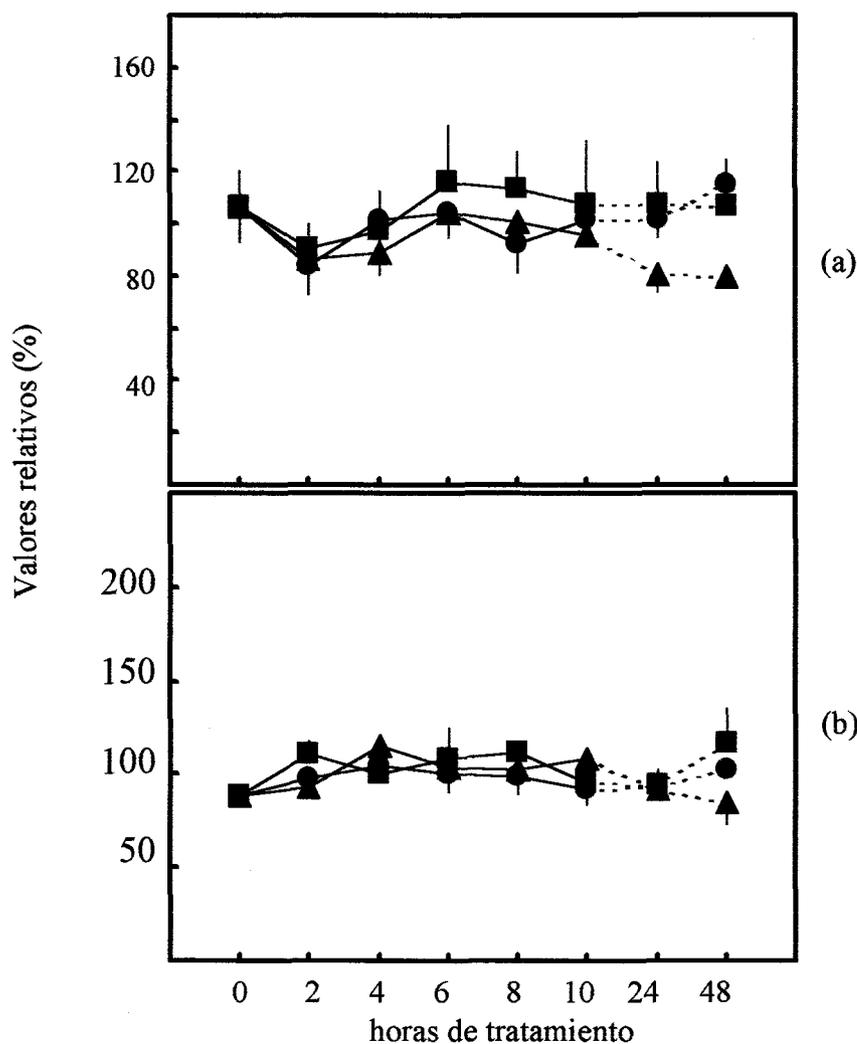


Figura 4.106 - Niveles proteicos de *Trx f* (ELISA), expresada por unidad de peso fresco (a) y por unidad de proteína (b), en hojas de plantas sometidas durante 48 h a las siguientes condiciones de crecimiento: irradiación continua de intensidad normal ($200 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y temperatura normal (25°C) (●), irradiación continua de alta intensidad ($2500 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y temperatura normal (■), e irradiación continua de alta intensidad ($2500 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y temperatura baja (8°C) (▲). El valor de referencia (100 %) corresponde al promedio de las todas las lecturas de absorbancia de cada repetición.

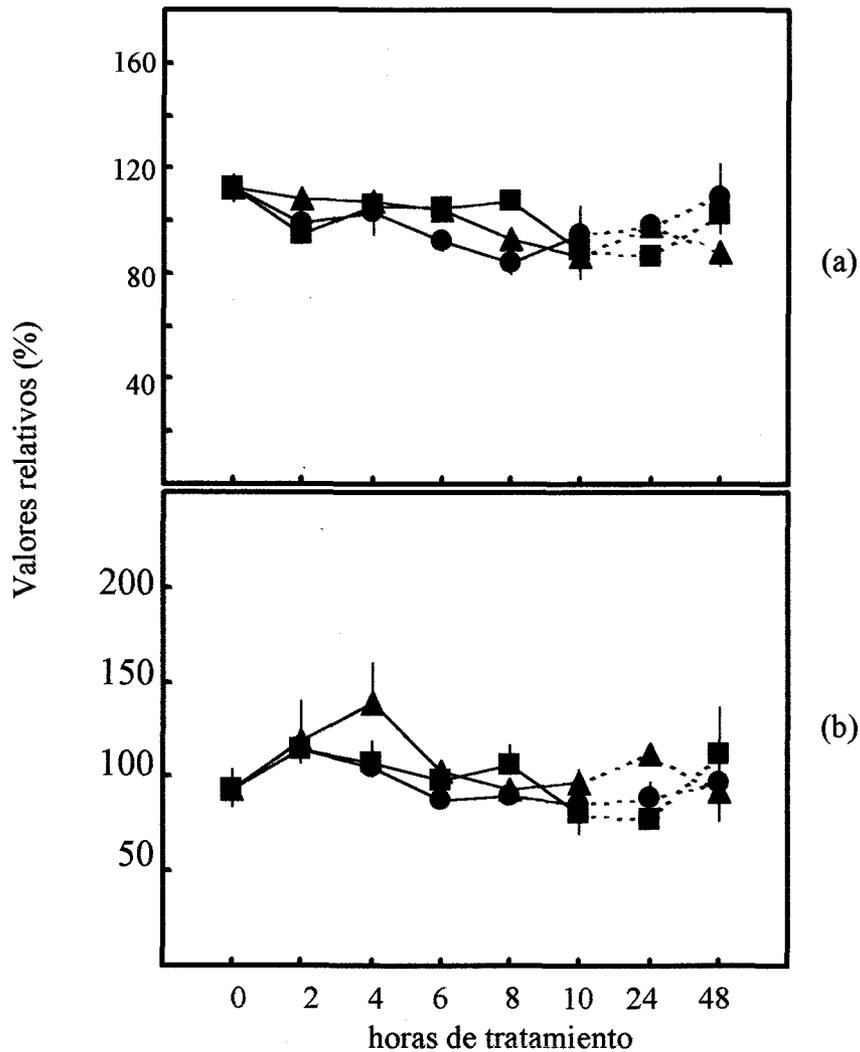


Figura 4.107 - Niveles proteicos de Trx *m* (ELISA), expresada por unidad de peso fresco (a) y por unidad de proteína (b), en hojas de plantas sometidas durante 48 h a las siguientes condiciones de crecimiento: irradiación continua de intensidad normal ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y temperatura normal (25°C) (●), irradiación continua de alta intensidad ($2500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y temperatura normal (■), e irradiación continua de alta intensidad ($2500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y temperatura baja (8°C) (▲). El valor de referencia (100 %) corresponde al promedio de las todas las lecturas de absorbancia de cada repetición.

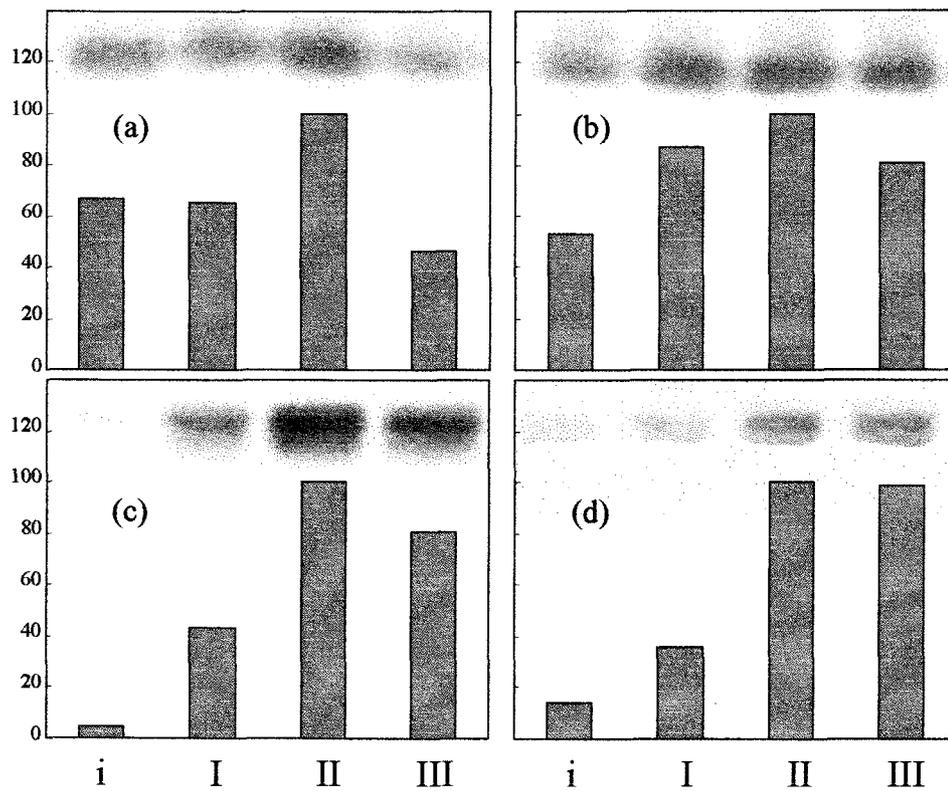
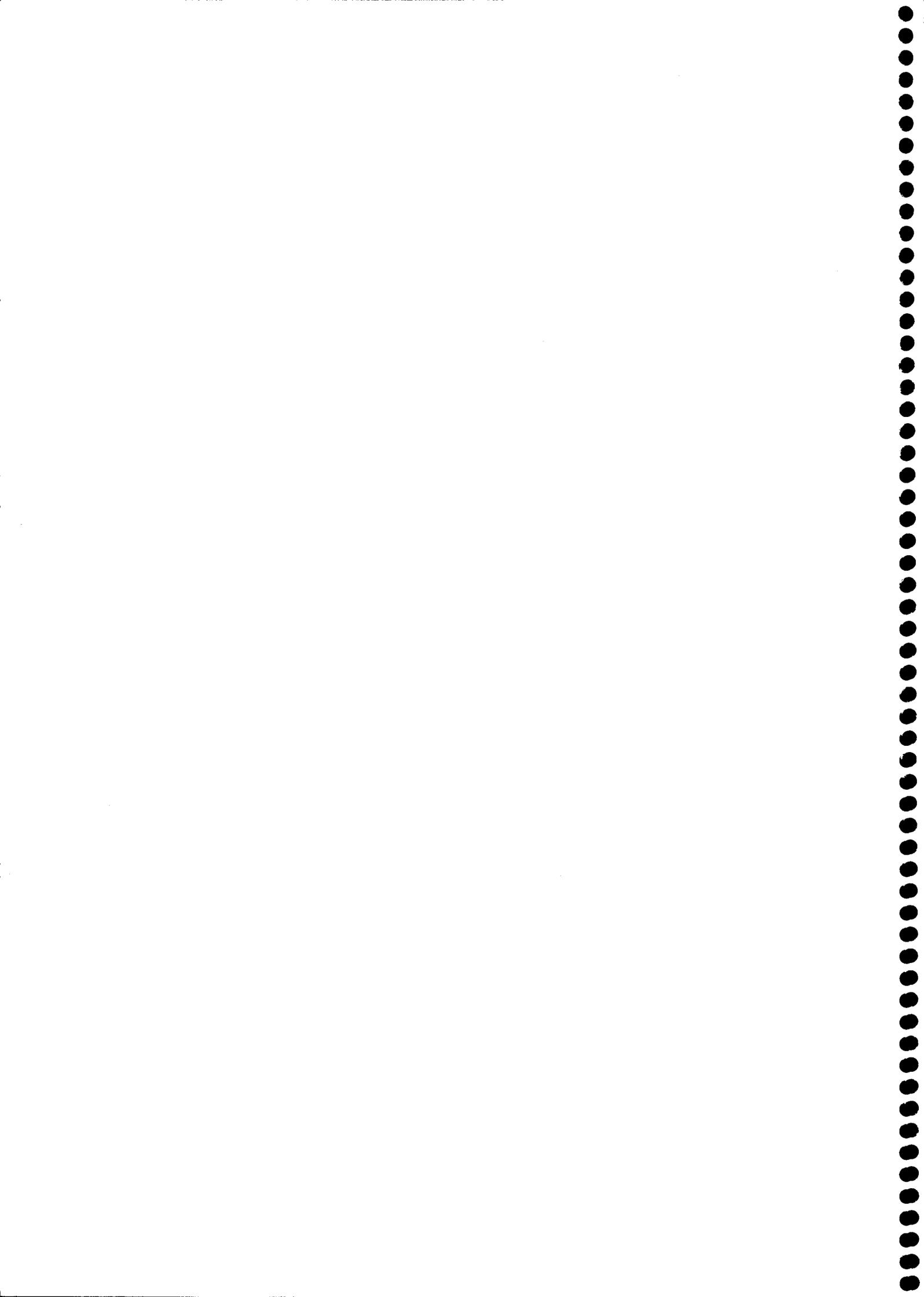
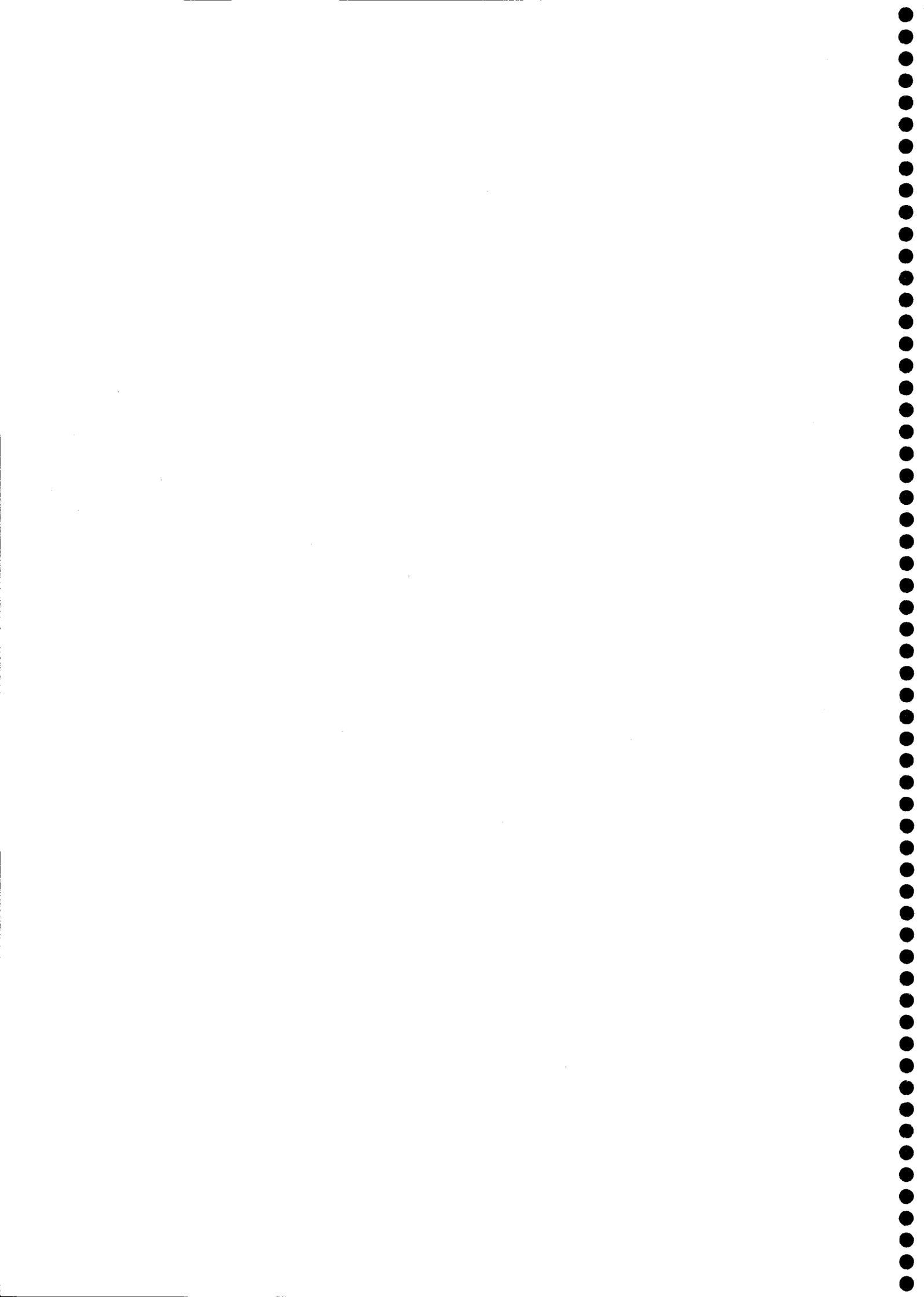


Figura 4.108 - Niveles de mRNA para FBPasa (a), NADP-MDH (b), *Trx f* (c), y *Trx m* (d), en hojas de plantas sometidas durante 10 h a las siguientes condiciones de crecimiento: irradiación continua de intensidad normal ($200 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y temperatura normal (25°C) (I), irradiación continua de alta intensidad ($2500 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y temperatura normal (II), e irradiación continua de alta intensidad ($2500 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y temperatura baja (8°C) (III). Se indican también los niveles del control al inicio de los tratamientos (i). Valores relativos al mayor y expresados en función del peso fresco.

muy similares entre el control y los tratamientos de estrés. Los niveles de transcritos se analizaron al comienzo de los tratamientos y a las 10 h de estrés (Figura 4.108), cuando se habían comenzado a detectar diferencias entre los niveles de proteínas. Se pudo apreciar un efecto positivo de las altas irradiancias en la expresión de mRNA para las cuatro proteínas bajo estudio, y en los casos de Trx *m*, FBPasa y NADP-MDH, también de las altas irradiancias asociadas a bajas temperaturas.



5. Discusión



5.1 – Evolución del sistema modulador de FBPasa y de NADP-MDH durante la ontogenia, y en diferentes órganos de plantas de guisante bajo condiciones normales de crecimiento.

Cuando una hoja es iluminada, sus cloroplastos sufren una serie de transformaciones físico-químicas y estructurales tendentes a aumentar la eficiencia de utilización de la luz para la reducción del CO₂ captado de la atmósfera. No es de extrañar, entonces, que las enzimas involucradas, directa o indirectamente, en la reducción del carbono inorgánico para transformarlo en carbono orgánico, se vean favorecidas por las condiciones fisiológicas inducidas por la luz. Así, la FBPasa, una enzima hidrolítica del ciclo de Calvin, es activada al pH alcalino, incremento de la concentración de Mg²⁺, y elevado poder reductor generados en el cloroplasto iluminado.

Desde un punto de vista evolutivo, la regulación redox dependiente de la luz aparece junto con la fotosíntesis oxigénica, como una especie de defensa contra el estrés oxidativo potencial generado por las altas concentraciones de oxígeno producidas como consecuencia de una activa fotosíntesis (Ruelland y Miginiac-Masnow, 1999). Otra función fisiológica de la regulación redox dependiente de la luz es evitar la generación de ciclos fútiles que podrían ocurrir en el cloroplasto, donde reacciones anabólicas y catabólicas coexisten en el mismo compartimento. En este sentido resulta muy demostrativa la diferente respuesta a la regulación por el sistema ferredoxina-tiorredoxina que presentan las enzimas FBPasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). En presencia de una elevada irradiancia, donde todos los sistemas de captación de energía y de reducción del carbono funcionan al máximo, los equivalentes de reducción pasan del PS II a la ferredoxina, y de ésta, por acción de la ferredoxina-tiorredoxina reductasa a la tiorredoxina. La tiorredoxina reducida transfiere sus equivalente de reducción a la FBPasa, generándose en ésta grupos tioles a partir de puentes disulfuro, obteniéndose la activación de la misma. Este mecanismo evita que el carbono reducido contenido en las moléculas de triosas fosfato se vuelva a oxidar, al no poder transferirse estos compuestos al citosol. Esto es frecuente en condiciones naturales durante una parte importante del día, y es dependiente de una gran cantidad de procesos, entre ellos, el ritmo de síntesis de sacarosa que, a su vez, está influido por la velocidad de transporte de la misma por el floema.

El paso de triosas-fosfato del cloroplasto al citosol se realiza a expensas de un intercambio con iones fosfato. En el citosol la síntesis de sacarosa a partir de triosas-fosfato genera otros tantos grupos fosfato. Un elevado ritmo de síntesis de sacarosa implica un aumento en la concentración de fosfato citosólico, lo que a su vez facilita el pase de triosas-fosfato al espacio citoplasmático. Condiciones donde la síntesis de sacarosa esté operando a un ritmo menor que la generación de triosas-fosfato en el cloroplasto, determinarán el aumento de la concentración de estas últimas en la organela. Esta situación coincide, en general, con una alta iluminación y, por lo tanto, un elevado poder reductor en el cloroplasto. Que en estas condiciones la FBPasa esté activada, permite el desvío del carbono reducido, contenido en las triosas-fosfato, hacia la síntesis de almidón (Figura 1.3). Por otra parte, la G6PDH estaría inhibida, impidiéndose que la glucosa-6-fosfato formada a partir de la isomerización de la fructosa-6-fostato (producto de la reacción catalizada por la FBPasa) se oxide a 6-P-gluconato, que después se catabolizaría según la vía de las pentosas-fosfato. Esta vía es útil en la oscuridad como mecanismo de producción de poder reductor en forma de NADPH, supliendo el que no se genera por fotosíntesis, así como forma de origen de pentosas-fosfato para la síntesis de nucleótidos. Pero si fuera operativa en presencia de luz determinaría la pérdida de parte del carbono reducido en la fotosíntesis. La inhibición de la G6PDH por el elevado poder reductor vía el sistema ferredoxina-tiorredoxina, en presencia de luz, tiene así un significado fisiológico de importancia.

Estudios previos han demostrado la regulación por la luz a nivel transcripcional de muchas proteínas cloroplastídicas de codificación nuclear. Este es el caso de la fosforibuloquinasa, gliceraldehído-3-P deshidrogenasa, sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa y FBPasa, enzimas pertenecientes al ciclo de Calvin (Raines *et al.*, 1991; Sahrawy *et al.*, 1990 a y b), así como de la enzima relacionada NADP-MDH (Crétin *et al.*, 1988). Con respecto a las tiorredoxinas, se ha encontrado en nuestro laboratorio una síntesis de Trx *f* inducida por la luz, que fue detectable después de 3 h de iluminación en plántulas etioladas de espinaca, con valores máximos después de 50 h de luz, y con una vida media de 7 h (Carrasco *et al.*, 1992). Estos resultados fueron confirmados en el presente trabajo utilizando la técnica del RT-PCR, comprobándose además la expresión transcripcional dependiente de luz de la Trx *m*, no descrita hasta el momento. No obstante, la mayor sensibilidad de ésta técnica comparada con la tradicional de

Northern-blotting, permitió detectar cierto nivel de transcritos para las Trxs en hojas etioladas. Además de un control por la luz de estas proteínas cloroplastídicas, existe una regulación dependiente del desarrollo, responsable adicional de la fase de pausa después de una prolongada oscuridad, y de la diferente expresión transcripcional entre células jóvenes y maduras dentro del mismo órgano (Raines *et al.*, 1991). Secuencias corriente arriba de la zona de DNA codificante, y de aquella otra que alberga las regiones promotoras, se las considera involucradas en la expresión transcripcional específica de órgano o tejido en el control del desarrollo (Kuhlemeier *et al.*, 1987).

Hasta ahora la mayoría de los trabajos tendentes a explicar los mecanismos de regulación dependientes de la luz, se centraron en analizar las variaciones de las actividades de las diferentes enzimas, dejándose bien establecido que la expresión de algunas de ellas, a los niveles transcripcional y traduccional, es un proceso fotoinducido. Pero estos trabajos se realizaban habitualmente sobre tejidos que pasaban de oscuridad a luz, sin hacer mayores consideraciones del tipo de tejido o del estado fisiológico del mismo. No existen, en general, descripciones sobre la expresión de proteínas reguladas por luz durante la ontogenia de la planta. En el presente trabajo, en una primera etapa, se analizaron los niveles de expresión de proteínas involucradas en mecanismos de regulación rédox, en función de la edad de plantas de guisante, y en diferentes órganos de la misma. Con relación al primero de estos aspectos, se apreció como tendencia general que el nivel de transcritos (mRNA) para Trx *f*, Trx *m*, FBPasa y NADP-MDH aumentaba con la edad de la planta, apareciendo los mayores valores en la época de floración. Este fenómeno está relacionado con el grado de madurez alcanzado por el tejido foliar y a que las plantas, durante los estadios previos a la floración, por ser máxima la demanda de fotosintato, necesitan ser más eficientes en el aprovechamiento del poder reductor generado en la fotosíntesis.

Perfiles similares fueron encontrados cuando los productos de la traducción del mRNA (proteínas) fueron determinados por ELISA. En ambos casos (mRNA y proteína) los resultados más claros fueron obtenidos en hojas superiores e intermedias. Los bajos valores encontrados en las hojas inferiores podrían explicarse, por un lado, en la mayor edad de éstas con respecto a las hojas de posiciones más superiores y, por otro, en la menor iluminación de las mismas. El primero de los argumentos se explica por el hecho de que, si bien los muestreos no se efectuaron en hojas con signos evidentes de

senescencia, los mecanismos a nivel celular en dichas hojas estarían más relacionadas con el envejecimiento que con una actividad fotosintética normal. Cuando en una hoja se desencadena la senescencia, deja de ser exportadora de fotosintetizado. Por otro lado, se ponen en marcha los procesos de removilización, primero de reservas, y luego de estructuras. En estas condiciones el almidón contenido en el cloroplasto tiende a degradarse. En el capítulo de resultados correspondiente a estrés lumínico se pueden apreciar cloroplastos con signos evidentes de senescencia (Figura 4. 99). En éstos los gránulos de almidón aparecen erosionados, y es abundante la presencia de cuerpos grasos derivados de la degradación de los lípidos de membrana. Por todo ello resulta normal que en estas hojas la síntesis “de novo” de FBPasa, y los mecanismos que inducen su activación, estén inhibidos. Por otra parte, la posibilidad de que estas hojas sufran una deficiencia de luz está explicada por el hecho de que, sobre estar más alejadas de la fuente lumínica, se encuentran sombreadas por las hojas superiores. El hecho de que los perfiles de proteínas respondan en forma similar a los de mRNA específicos, está en concordancia con la idea general de que la síntesis de proteínas cloroplastídicas de codificación nuclear, inducida por la luz, está regulada a nivel transcripcional (Freyssinet y Buetow, 1984).

Un comportamiento diferente se manifiesta cuando las proteínas son determinadas en función de su actividad biológica. La actividad FBPasa tuvo su valor más bajo justamente en floración, medida a pH 8.8 bajo condiciones no reductoras, como a pH 7.9 en presencia de DTT. Esto es especialmente relevante en las hojas superiores, las cuales, obviamente, muestran de forma más inmediata los cambios metabólicos en respuesta a las necesidades de la planta. Una posible explicación de estos resultados es que en floración y fructificación, las plantas necesitan exportar azúcares desde las hojas hacia los órganos reproductivos en desarrollo. Esto ocurre mediante un incremento de la síntesis de sacarosa, la cual tiene lugar en el citosol de la célula fotosintética utilizando las triosas-fosfato exportadas desde el cloroplasto. Es bien conocido que el contenido en triosas-fosfato y fructosa-6-P del cloroplasto está controlado por la actividad FBPasa (Kossmann *et al.*, 1994), que determina un aumento de triosas-fosfato cuando la actividad de la enzima decrece. En hojas intermedias, y más notablemente en las basales, la actividad FBPasa disminuye marcadamente en relación con la actividad de las hojas superiores, tal como es de esperar de órganos senescentes o

próximos a senescer. Camp *et al.*, (1984) encontraron que la actividad FBPasa en hojas de trigo declina continuamente a lo largo de la senescencia. Sin embargo, los autores aclaran que esta disminución en la actividad no es debida a una pérdida de la capacidad de activación de la enzima por la luz, sino a una pérdida de proteína enzimática. Esto último estaría en concordancia con los resultados obtenidos, a nivel de proteína, ya discutidos.

El perfil de actividad de la NADP-MDH mostró un comportamiento similar al de la FBPasa, con el valor más bajo para las hojas superiores en pre-floración. Esto debe estar relacionado con un activo metabolismo citosólico bajo condiciones de elevado ritmo de síntesis de sacarosa, donde la NADP-MDH puede actuar como una válvula de malato para el aumento del nivel de NAD(P)H en el citosol. Kromer *et al.*, (1988) mostraron que la fosforilación oxidativa mitocondrial era esencial para proporcionar al citosol el ATP necesario, como fuente de UTP, indispensable para la síntesis de sacarosa. Estos perfiles sufren modificaciones cuando los análisis se realizan variando los niveles de iluminación y de temperatura, tal como se discutirá más adelante. También en el caso de la NADP-MDH no existió una concordancia entre los niveles de proteína y actividad. Estudios realizados en especies C₄ del género *Flaveria* (Trevanion *et al.*, 1997), así como en tabaco (Faske *et al.*, 1997) transgénico que sobreexpresaba o subexpresaba NADP-MDH, mostraron que un descenso en el nivel proteico era compensado por un aumento en el nivel de actividad, indicando que la regulación redox provee una forma rápida de ajustar la actividad enzimática a las necesidades de la planta. De esta forma en el caso de la NADP-MDH, y posiblemente en el de la FBPasa, la caída en los valores de actividad, no correspondientes con los niveles de proteína, pueden deberse a circunstancias operantes a corto plazo. Cabe aclarar que los muestreos se realizaron promediando el periodo de iluminación, y que para la planta sea puede ser importante mantener un elevado nivel de proteína al resguardo de que las condiciones fisiológicas cambien y sea necesario, entonces, derivar hacia la síntesis de almidón una gran parte del carbono fijado.

Al abordar el análisis de los niveles de expresión y actividad de las proteínas bajo estudio en diferentes tejidos de plantas de guisante, surge como primer aspecto destacable el diferente comportamiento de folíolos peciolados y folíolos sésiles. De

acuerdo a lo ya expuesto para los datos de ontogenia, las actividades FBPasa y NADP-MDH disminuyeron desde las hojas superiores hacia las basales. Además, los folíolos sésiles, en general, presentaron una mayor actividad FBPasa que los peciolados. Esto parece indicar una diferente función para ambos tipos de folíolos, de acuerdo a su posición ortóstica en la planta. Debido a su abierta, más iluminada situación, los folíolos peciolados podrían estar dedicados a mantener el ritmo de síntesis y exportación de sacarosa adecuados a las necesidades de la planta en una situación dada. En cambio, los sésiles, más ocultos, parecerían estar involucrados en reservar almidón destinado al posterior desarrollo de yemas laterales. Estos primeros análisis se realizaron en plantas en fase vegetativa, con un desarrollo foliar moderado, una situación en que se puede asumir que la luz no era limitante para los folíolos sésiles.

El panorama cambia sustancialmente cuando se comparan las actividades de folíolos peciolados y sésiles en fructificación. Como se puede apreciar en la figura 4.60, la actividad FBPasa a pH 8.8 tuvo un perfil diferente al enunciado para el estado vegetativo. En este sentido se pueden tener en cuenta dos factores. En fructificación las plantas estaban movilizandore reservas hacia los granos en desarrollo, por lo que es de sospechar una mayor demanda de triosas-fosfato por parte del citosol de las células fotosintetizadoras. Es probable que la demanda de triosas-fosfato fuera primeramente asumida por los folíolos sésiles por el hecho de encontrarse más próximos a los órganos de conducción (floema) que los folíolos peciolados. Y como se mencionó anteriormente, la actividad FBPasa está inhibida a mayor demanda de triosas-fosfato por parte del citosol. Por otra parte, lo enunciado estaría de acuerdo con la forma en que se produce la descarga floemática de azúcares, y el transporte a través del floema. El flujo osmótico basal, responsable del mismo, opera gradualmente, célula a célula. Como regla general la demanda de azúcares por parte de los tejidos en crecimiento es soportada en primera instancia por las reservas de los órganos más cercanos a éstos, y una vez que ésta es agotada se pasa a depender de órganos más alejados. Es de destacar, además, que en el caso del guisante los folíolos peciolados entran en senescencia antes que los sésiles, lo que descarta la opción de que la menor actividad FBPasa sea debida a un envejecimiento prematuro de estos últimos. Un aspecto que sí es importante tener en cuenta es que en fructificación, debido al desarrollo de la planta, es muy probable que la luz que llegue a los folíolos sésiles sea limitante. Esto está en concordancia con la

menor tasa de fotosíntesis neta (IRGA) encontrada en folíolos sésiles con respecto a los peciolados. De todas formas la actividad FBPasa a pH 8.8 está más relacionada con el nivel de proteína (FBPasa), y expresa un tipo de actividad potencial, mientras que la actividad a pH 7.9 es un indicio más aproximado de las condiciones fisiológicas actuantes en el tejido foliar. Y en este último caso los folíolos sésiles mostraron un nivel no similar, sino mayor, de actividad que los peciolados, en concordancia con los datos extraídos en fase vegetativa.

La opinión general es que las proteínas cloroplásticas codificadas en el núcleo sólo son transcripcionalmente expresadas en tejidos fotosintéticos (Raines *et al.*, 1989). Sin embargo, Lloyd *et al.*, (1991) encontraron expresión de FBPasa en plantas transgénicas de tabaco que poseían un gen de FBPasa de trigo, no sólo en tejidos fotosintéticos, sino también en regiones meristemáticas de tallos, raíces y yemas laterales. Los autores sostienen que la FBPasa fotosintética podría ser activa en los protoplastidios de células meristemáticas. Es poco claro que la FBPasa cloroplástica juegue un papel fisiológico en tejidos no fotosintéticos, debido a que esta enzima debe ser activada por la luz con la intervención del sistema ferredoxina-tiorredoxina, vía la cadena fotosintética de transporte de electrones (Buchanan, 1992; Scheibe, 1990). En el presente trabajo las *Trxs f* y *m*, y sus proteínas diana FBPasa y NADP-MDH, tuvieron expresión transcripcional tanto en órganos fotosintéticos como no fotosintéticos de plantas de 50 d de cultivo hidropónico, normalmente iluminadas (fotoperiodo de 16 h). No obstante, el contenido de mRNAs específicos para FBPasa y NADP-MDH fue muy bajo en órganos no fotosintéticos (raíces y granos), y lo mismo ocurrió con el de *Trx m* en raíces. Por el contrario, la *Trx f* fue altamente expresada en órganos no fotosintéticos. La elevada expresión de *Trx m* en el grano, y no en raíces, podría estar relacionada con la naturaleza fotosintética de las semillas verdes inmaduras.

Cuando el RT-PCR se realizó en presencia de oligonucleótidos sintéticos complementarios al extremo 3' de la proteína madura y el 5' de la forma precursora (es decir, incluyendo la secuencia del péptido de tránsito), la expresión de mRNA mostró un perfil similar respecto a la especificidad de órganos. Para chequear si la secuencia obtenida por RT-PCR a partir de mRNA de raíces correspondía efectivamente a la de *Trx f*, una muestra del DNA amplificado fue purificada por electroforesis en agarosa, extraída del gel y secuenciada. La homología resultó ser del 100% respecto a la

secuencia de Trx *f* de guisante publicada con anterioridad (Lepiniec *et al.*, 1992), lo cual confirma indudablemente que el transcrito presente en raíces corresponde a la Trx *f*. Mientras que los resultados encontrados en raíces de guisante muestran un bajo nivel de expresión transcripcional de la FBPasa cloroplastídica, para el transcrito de Trx *f* los niveles son elevados. Sin embargo, cuando la expresión de Trx *f* fue analizada a nivel traduccional mediante Western-Blotting, la proteína fue altamente expresada en los órganos fotosintéticos, incluyendo granos inmaduros, y pobremente expresada en raíces. Esto parece indicar un papel potencial para la Trx *f* en procesos diferentes al de modulación de la FBPasa. Este potencial está enmascarado en raíces con crecimiento normal, pero el elevado contenido de su correspondiente mRNA podría dar lugar a una eficiente expresión traduccional en situaciones de estrés, mediante una regulación post-transcripcional de la misma.

Una muy baja expresión traduccional, si es que existe, fue también observada en raíces para Trx *m*, FBPasa y NADP-MDH, cuando fueron determinadas por ELISA, así como por determinación de actividad enzimática. Es de notar que el contenido de NADP-MDH, tanto como el de Trxs *f* y *m*, fue alto en granos inmaduros. Este no fue el caso de la proteína FBPasa. Sin embargo, la alta actividad específica de esta enzima, además del elevado contenido de su modulador Trx *f*, hacía aumentar la actividad FBPasa en granos mucho más que en hojas. La comparativamente baja actividad FBPasa en hojas de plantas fructificadas podría estar relacionada con la necesidad de exportación de triosas-fosfato al citosol para la síntesis de sacarosa. Por el contrario, la demanda de azúcares de las semillas, como forma de reserva para la germinación futura, provoca un aumento de la actividad FBPasa, necesaria para la formación de almidón. De cualquier forma, el activo metabolismo de ambos órganos, hojas y semillas, se manifiesta en su contenido en proteína, alto en comparación al de otros órganos de la planta.

Respecto al papel fisiológico de las tiorredoxinas en órganos fotosintéticos y no fotosintéticos, se ha registrado la presencia en semillas, así como también en plántulas etioladas y verdes de cebada, de Trx *f* y Trx *m*, además de una putativa Trx tipo-*h*, nombrada Trx *cf* por los autores (Crawford *et al.*, 1981). Similarmente, una Trx tipo-*m* se ha descrito en sorgo, judía y raíces de espinaca (Jacquot *et al.*, 1978). Recientemente se ha encontrado un elevado nivel de Trx *h* en floema (Schobert *et al.*, 1998), no sólo de

proteína sino también del mRNA correspondiente (Sasaki *et al.*, 1998). No obstante, al momento no hay una noción exacta de los diferentes tipos de Trxs que existen en el reino vegetal, y de la función fisiológica de cada una de ellas, fuera de los mecanismos de regulación rédox, dependientes de la luz, ya enunciados. Quizás la evidencia más contundente de la función fisiológica de las Trxs fue encontrada en cianobacterias, que son incapaces de crecer autotróficamente cuando tienen bloqueado el gen codificante para Trxs (Muller y Buchanan, 1989). Evidencias de esta clase no fueron encontradas en plantas superiores hasta el momento (Ruelland y Miginiac-Maslow, 1999).

5.2 – Niveles de expresión de tiorredoxinas *f* y *m*, y de sus proteínas diana FBPasa y NADP-MDH, en condiciones de estrés lumínico y de estrés lumínico asociado a estrés térmico.

La absorción de la luz y conversión de energía de excitación en energía química tiene lugar en el PS II y el PS I de la membrana tilacoidal. La energización fotónica del PS II genera específicamente un oxidante fuerte capaz de oxidar al agua. La habilidad del PS II para extraer electrones y protones del agua fue indudablemente un evento significativo en la evolución de la vida sobre la tierra (Melis, 1999). Paralelamente, la gradual acumulación de oxígeno en la atmósfera favoreció la instauración de la fosforilación oxidativa. Desde un punto de vista bioquímico, el PS II es una agua-plastoquinona oxido-reductasa. Esta enzima especializada comprende un holocomplejo consistente en 25-35 proteínas periféricas y transmembranales (Barber, 1989), de las que muchas funcionan como complejos clorofila-proteína captadores de luz. El centro funcional del holocomplejo contiene el llamado heterodímero D1/D2 32/34 kDa, el cual soporta el centro de captación de la luz, el sistema de oxidación del agua, y las reacciones de transferencia de electrones a la plastoquinona. Esta función altamente especializada del PS II tiene lugar en un microambiente saturado de oxígeno, donde los fotones, en forma de energía de excitación, arriban a una tasa de más de 10000 por segundo. La formación transitoria de oxidantes fuertes, la abundancia de oxígeno, y el arribo de energía de excitación a altas tasas pueden conducir al daño foto-oxidativo (Anderson *et al.*, 1998). De hecho, tal daño producido por la luz ocurre frecuentemente dentro del centro de reacción del PS II. Esto causa una inhibición irreversible en la

función de la clorofila (P680) del centro de reacción, con la degradación de la proteína D1 y bloqueo de la fotosíntesis.

Los mecanismos que previenen la sobre-excitación del PS II en plantas pueden ser clasificados de acuerdo al nivel de organización (Long *et al.*, 1994) en: (a) factores externos, que disminuyen físicamente la absorción de la luz (por ejemplo, el movimiento para-heliotrópico de las hojas), y (b) factores internos, que aumentan la disipación de la energía de activación a través de procesos distintos del metabolismo fotosintético del carbono, nitrógeno o azufre. Dentro de este último nivel funcionan, básicamente, tres mecanismos: i) inactivación del PS II por deepoxidación de la zeaxantina; ii) regeneración de la proteína D1; iii) inducción de la actividad de sistemas protectores frente a especies activas de oxígeno. Cuando la luz absorbida excede la capacidad de utilización fotoquímica, se produce en plantas superiores y algas verdes el llamado ciclo de la xantofila, que consiste en la conversión de violaxantina deepóxido a zeaxantina libre de epóxido, vía anteroxantina monoepóxido (Demmig-Adams, 1990). Es este proceso es poco probable que las Trxs tengan intervención; por lo menos hasta el momento no fue registrada. En cambio, se piensa que éstas pueden cooperar en la tolerancia a la fotoinhibición participando en los mecanismos de regeneración de la proteína D1, y en los de protección frente a especies activas de oxígeno, posibles funciones que se discutirán a continuación.

A lo largo de la evolución los organismos fotosintéticos han desarrollado un mecanismo de reparación del PS II, que restaura el estado funcional del mismo. Este mecanismo es muy importante desde el punto de vista de la productividad, y se ha estimado que en su ausencia el rendimiento fotosintético podría disminuir a menos del 5 % (Melis, 1999). En pocas palabras, el mecanismo de daño y reparación se puede resumir en: a) disgregación parcial del holocomplejo del PS II; b) exposición del centro de reacción fotodañado al estroma del cloroplasto; c) degradación de la proteína D1 fotodañada; d) síntesis *de novo* de la proteína D1 e inserción en la membrana tilacoidal; y e) reensamblado del holocomplejo PS II, seguido de la activación del proceso de transporte electrónico a través de la reconstrucción del heterodímero D1/D2. Cuando la magnitud del daño excede la capacidad de reparación, se desencadena el proceso conocido como fotoinhibición de la fotosíntesis. Existen evidencias que apuntan al estado de oxido-reducción de la plastoquinona (Q_A), aceptor secundario de electrones

del PS II, como el parámetro que controla el daño foto-oxidativo del mismo. Cuando Q_A está reducido, la energía de excitación del PS II es disipada vía una reacción de recombinación de carga. Tal disipación, no asimilatoria, de la excitación genera oxígeno singlete, el cual podría actuar modificando covalentemente la clorofila del centro de reacción. En condiciones estacionarias, el estado reducido de Q_A aumenta linealmente con la irradiancia, por lo que la probabilidad de daño foto-oxidativo se incrementa de la misma forma. Por lo tanto, cuando Q_A está oxidado la posibilidad de daño sería baja, y cuando está reducido, por el contrario, alta.

Por otra parte, existe evidencia experimental que la proteína D1 es una fosfoproteína (Michel y Bennet, 1987), y que cuando se encuentra en la forma fosforilada no parece ser, según estudios *in vitro*, sustrato para la degradación fotoinducida (Andersson *et al.*, 1994). Actualmente están surgiendo evidencias de que la fosforilación de las proteínas D1/D2 del centro de reacción del PS II, que hasta el momento se consideraba modulada por el estado rédox de la plastoquinona, también es fuertemente influenciada por el estado rédox de agrupaciones tioles (Allen y Nilsson, 1997). Se ha encontrado una estimulación de la fosforilación de hasta dos veces en condiciones tiol-reductoras moderadas, manteniéndose ese nivel aún en condiciones reductoras más drásticas. Algunos autores proponen la intervención en este mecanismo del sistema ferredoxina-tiorredoxina (Carlberg *et al.*, 1999).

Como se ha mencionado, los eventos inducidos por la energía procedente de la luz del sol conducen a la formación de estados excitados de la clorofila, y de compuestos reducidos con muy bajo potencial rédox. La elevada concentración de oxígeno que se produce en el cloroplasto iluminado hace, entonces, que la transferencia de energía de excitación desde estos compuestos pueda tomar vías no favorables a la planta, como es la formación de especies parcialmente reducidas de oxígeno (oxígeno singlete, radical hidroxilo, superóxido, peróxido de hidrógeno). Se ha discutido mucho los efectos del daño provocado por la luz sobre el PS II, pero algunos de estas especies activas de oxígeno son también altamente reactivas y deletéreas para muchos sistemas enzimáticos, y para la integridad de estructuras cloroplastídicas. Este proceso es especialmente importante bajo condiciones de estrés (alta luz, elevada o baja temperatura, déficit hídrico), y para hacer frente ello las plantas han desarrollado diferentes mecanismos de eliminación de estos compuestos (Asada, 1996).

El primer producto de la reducción del oxígeno dentro del cloroplasto es el radical superóxido O_2^- , el cual es rápidamente desproporcionado en O_2 y H_2O_2 por las superóxido dismutasas cloroplastídicas. El peróxido de hidrógeno es reducido por una ascorbato peroxidasa, con la concomitante formación del radical inestable monodehidroascorbato, primero, y de dehidroascorbato, después (Foyer y Mullineaux 1998). Este proceso es bastante importante bajo condiciones de estrés (fuerte iluminación, altas o bajas temperaturas, metales pesados, etc), de modo que la elevada reserva de ascorbato en el cloroplasto (10-30 mM) puede desaparecer en pocos minutos (Law *et al.*, 1983). Para resolver este problema las plantas han desarrollado un eficiente sistema de regeneración del ascorbato, vía una poderosa reductasa dependiente de glutatión. Además, y debido a la alta concentración de glutatión en el estroma cloroplastídico (casi 5 mM) (Alscher, 1989), el dehidroascorbato puede también sufrir una reducción no-enzimática por el glutatión reducido al pH alcalino (cerca de 8.0) del cloroplasto iluminado. A causa del eficiente mecanismo no-enzimático para la regeneración del ascorbato, Morell *et al.*, (1997) sostienen que el dehidroascorbato no puede alcanzar altas concentraciones dentro del cloroplasto y, en consecuencia, el papel de la dehidroascorbato reductasa dependiente de glutatión estaría minimizado. La opinión de estos autores es que si el dehidroascorbato pudiera alcanzar tales altas concentraciones dentro del cloroplasto, la Trx contenida en esta organela estaría completamente oxidada y, por lo tanto, los mecanismos de activación de algunas enzimas reguladoras del ciclo de Calvin y procesos relacionados estarían bloqueados (Buchanan, 1992; Scheibe, 1990). Más aún, sostienen que la NADP-MDH es inhibida en un 50% por una concentración 50 μ M de dehidroascorbato.

Junto con la dehidroascorbato reductasa dependiente de glutatión, algunas otras tiol-transferasas han mostrado tener actividad dehidroascorbato reductasa. Este es el caso de las glutarredoxinas, proteínas de bajo peso molecular (aproximadamente 10 kDa) que, aunque escasamente homólogas con las tiorredoxinas, muestran un plegamiento similar y poseen un centro activo (-C-P-Y-C-) altamente relacionado con el de las Trxs. Dos secuencias codificantes de glutarredoxinas han sido aisladas en arroz (Minakuchi *et al.*, 1994), con una función relacionada a la detoxificación de especies activas de oxígeno.

Además del papel, mencionado anteriormente, de las Trxs en la reducción de ribonucleótidos y la activación de enzimas, están también involucradas en la estabilización de proteínas de reserva en semillas, y en la movilización de éstas durante la germinación y desarrollo de la plántula (Gobin *et al.*, 1997). La elevada concentración de Trx *h* encontrada en el floema de plantas de arroz (Ishiwatari *et al.*, 1995), ha sugerido un papel de la misma en mantener funcionales algunas proteínas esenciales al metabolismo de las células conductoras del floema, tales como la ATPasa y proteínas transportadoras de azúcares, en condiciones de estrés oxidativo. Rey *et al.*, (1998) encontraron en plantas de patata con déficit hídrico un aumento de la concentración del transcrito para una proteína de 32 kDa, que presenta una secuencia -C-G-P-C- y una estructura tipo tiorredoxina. Finalmente, el descubrimiento en plantas de una 2-cys-peroxirredoxina, una peroxidasa cloroplastídica de codificación nuclear, inducible por oxidantes generados en situaciones de estrés (Baier y Dietz, 1997), hacen probable un papel de las Trxs como agentes antioxidantes en condiciones estresantes.

Este papel resulta, además, plausible desde una perspectiva termodinámica si tenemos en cuenta que las Trxs tienen un potencial de óxido-reducción lo suficientemente bajo -aproximadamente -290 mV para la Trx *f* de guisante, y -300 mV para la Trx *m* de espinaca y maíz (Hirasawa *et al.*, 1999; Rebeille y Hatch, 1986) - como para inducir una veloz disipación de radicales de oxígeno o, alternativamente, llevar a cabo una eficiente restauración de las formas reducidas de otros componentes antioxidantes del cloroplasto (los E_o' del glutatión y ascorbato son -250 mV y +58 mV, respectivamente). Por el contrario, una circunstancia desfavorable es la baja concentración de Trxs dentro del cloroplasto (100-160 μ M en guisante) (Scheibe, 1981), en comparación con la 10-30 mM de ascorbato (Ivanov, 1998) y de 5 mM de glutatión (Alscher, 1989), ambos más apropiados desde el punto de vista de la economía del nitrógeno en la planta. De todas formas, como ocurre con el transporte de glutatión (Herschbach *et al.*, 1998), el floema es la vía mediante la cual las Trxs serían exportadas a otros órganos de la planta (Ishiwatari *et al.*, 1995). Por otra parte, Kuge y Jones (1994) encontraron que el activador YAP1 promueve la expresión de un gen codificante para Trx en *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones de estrés oxidativo.

En conclusión, de todo lo expuesto se deduce que las tiorredoxinas podrían funcionar como agentes protectores básicamente en tres aspectos: a) contra el daño al

PS II y la subsiguiente fotoinhibición, favoreciendo la forma fosforilada de la proteína D1; b) como agentes antioxidantes, disipando las especies reactivas de oxígeno o restaurando el estado reducido de los agentes protectores; y c) manteniendo el estado redox del floema. Para analizar la participación de las Trx y, paralelamente, estudiar la evolución de sus proteínas diana, en el presente trabajo se analizaron los niveles de expresión transcripcional y traduccional de las mismas en condiciones de estrés lumínico.

Una primera constatación que es necesario hacer en estas circunstancias es dejar bien establecido que los tratamientos impuestos generan el estado de estrés deseado. Como se ha descrito en Materiales y Métodos una forma de visualizar el grado de deterioro del PS II, y por lo tanto del nivel de fotoinhibición, es medir la relación F_V/F_M . En nuestro caso, aunque fueron más evidentes en los tratamientos de luz saturante, ambos tratamientos de estrés lumínico (luz saturante en fotoperiodo de 16 h, o luz continua a niveles subsaturantes) produjeron un claro efecto fotoinhibitorio, como se deduce de la disminución (15-20 % de caída) en la relación F_V/F_M a las 72 h de tratamiento de luz continua, o después de 10 h bajo irradiancia saturante. Esta caída se comprobó aún con intensidades no muy severas ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR). Habría que considerar que las plantas expuestas a $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PAR) durante 16 h de fotoperiodo, estaban recibiendo durante todo ese tiempo el equivalente a una radiación solar máxima (Powles, 1984). La medida de la tasa de fotosíntesis neta es también una práctica habitual para estimar fotoinhibición, aunque dicho parámetro no informa sobre el estado de la maquinaria fotosintética, pues puede venir modificado por factores vinculados a la asimilación del carbono, no necesariamente relacionados con el daño por estrés. En este caso también se observó una disminución en la fotosíntesis neta (IRGA). Sin embargo, los valores de F_V/F_M recobran la normalidad después de 10 d de irradiancia en ambas condiciones de estrés. Una tendencia similar de recuperación se observó en la fotosíntesis neta, aunque los valores normales nunca fueron alcanzados; después de 10 d bajo luz saturante la tasa de asimilación de carbono en hojas apicales no fue más del 50 % de la medida en plantas que estaban en condiciones normales de iluminación, aunque en este caso pueda deberse a una acumulación de almidón en el cloroplasto.

Si bien estas determinaciones permitieron comprobar que las plantas estaban estresadas, los análisis bioquímicos realizados sobre la evolución de las Trxs *f* y *m* y sus proteínas diana, efectuados durante las primeras horas de estrés lumínico, no permitieron encontrar diferencias marcadas entre plantas estresadas y plantas control. Sólomente cuando las condiciones de estrés se extremaron, con intensidades de 2500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PAR) en forma continua, y especialmente en los tratamientos asociados a bajas temperaturas, se pudieron detectar diferencias significativas. Hay que puntualizar que las plantas sujetas a ambos tratamientos de estrés (luz saturante y luz continua) tuvieron un desarrollo ontogénico normal, llegando a florecer y a fructificar, aunque con algunas diferencias morfológicas respecto a las plantas control, como un mayor desarrollo foliar y un menor contenido en clorofila. Esto parece indicar una aclimatación de las plantas a las condiciones estresantes de luz impuestas.

Cuando los análisis se efectuaron en plantas que llevaban 10 d de tratamiento, tiempo que permitía suponer que se encontraban adaptadas a estas condiciones, las concentraciones de Trxs *f* y *m*, FBPasa y NADP-MDH, eran del mismo orden de magnitud, o levemente inferiores, que las de plantas control. Esta diferencia se fue haciendo cada vez mayor a medida que se prolongaban las condiciones de estrés, hasta 20 y 30 d. Giersch y Robinson (1987) señalaron también una disminución de las actividades Rubisco y FBPasa después de tratamientos fotoinhibitorios en plantas de espinaca. En todos los casos el nivel de proteínas decreció desde las hojas superiores a las inferiores.

La situación es diferente cuando la capacidad biosintética de estas proteínas es analizada a nivel transcripcional. Los resultados más sorprendentes se dieron a los 10 d en plantas crecidas bajo estrés lumínico, donde la concentración de transcritos fue mayor con respecto al control en hojas intermedias e inferiores. Esto es particularmente notable respecto a Trx *m* y NADP-MDH. El hecho de que estas diferencias no se vean reflejadas a nivel proteico parece indicar algún tipo de regulación adicional a nivel post-transcripcional. En trabajos previos (Sahrawy *et al.*, 1990 a y b; Carrasco *et al.*, 1992) hemos encontrado una regulación transcripcional en la síntesis de FBPasa y Trx *f*. Sin embargo, una regulación a nivel traduccional (Fromm *et al.*, 1985) o post-traduccional (Cuming y Bennet, 1981) también ha sido descrita en la modulación de la síntesis proteica. Por otra parte, la síntesis de proteínas cloroplastídicas de codificación nuclear

está siempre sujeta a una regulación post-transcripcional a nivel de su procesado y tránsito al interior del cloroplasto, un proceso también dependiente de la luz (Carrasco *et al.*, 1992). Contrariamente a lo que ocurre en plantas que crecen en condiciones normales, la concentración de mRNA en plantas estresadas muestra una tendencia general a aumentar desde las hojas superiores a las inferiores. Esto incrementa las diferencias, antes mencionadas, entre hojas normales y estresadas de una misma posición. En cualquier caso, se debe tener en cuenta que las hojas inferiores estuvieron sometidas a una intensidad lumínica estresante por un periodo más prolongado de tiempo que las hojas de posiciones superiores.

Estos resultados se apartan de la hipótesis general de que los genes inducibles por la luz están subregulados (o inhibidos) en condiciones de estrés lumínico, mientras que se asimilan al comportamiento de otras proteínas como catalasas, peroxidasas, superóxido dismutasas, y las denominadas genéricamente ELIPs (early light inducible proteins) que aparecen, por el contrario, sobrerreguladas (Asada, 1994; Adamska y Kloppstech, 1994; Kloppstech, 1997). Pötter y Kloppstech (1993) encontraron una disminución de la expresión transcripcional de proteínas inducibles por la luz, como la apoproteína de los complejos de antena clorofila-proteína, y de la subunidad menor de la Rubisco, aunque las intensidades de luz utilizadas por estos autores fueron muy superiores a las de los tratamientos realizados en el presente trabajo. Nuestros resultados reafirman el papel de la luz en la regulación de proteínas cloroplastídicas, y refuerzan la idea de que las Trxs pueden ejercer en las plantas un rol protector frente a condiciones de estrés oxidativo.

En conclusión, hojas basales e intermedias de plantas sometidas a estrés lumínico parecen mostrar una alta capacidad para la biosíntesis de transcritos de Trxs, especialmente de Trx *m*. El hecho de que esto no esté reflejado a nivel proteico podría deberse a una regulación post-transcripcional de la síntesis de Trxs, pero también a una rápida degradación de la proteína por factores dependientes de la luz. Los experimentos de traducción *in vitro* demostraron que la vida media de las proteínas bajo estudio fue similar en hojas procedentes de plantas sometidas a estrés, que en plantas control. Por el contrario, una mayor proteólisis en conjunto pudo constatarse a partir de la caída de la radiactividad incorporada a las proteínas solubles totales. La mayor concentración de transcritos, no correspondida con los niveles de proteína específica, podría deberse a un

diferente nivel de regulación de la expresión transcripcional con respecto a la expresión traduccional. Esto estaría indicando respecto a las Trxs *f* y *m* y sus proteínas diana, una degradación debida al estrés menor que la de otras proteínas foliares.

Analizando todos los datos en conjunto se puede concluir que los niveles de transcritos responden, en general, positivamente al aumento de la intensidad lumínica, siempre que la planta logre aclimatarse. Sólo cuando las condiciones de estrés se hicieron más severas, elevando el nivel de irradiación, aumentando el tiempo de exposición, o asociando el estrés lumínico a condiciones de estrés térmico, se vio afectada la síntesis de los mRNAs específicos de las proteínas bajo estudio. En estas condiciones la capacidad de aclimatación posiblemente fuera superada. Por otra parte, la traducción de dichos transcritos no dependería, entonces, exclusivamente de la intensidad de luz, sino que podrían influir otros factores como, por ejemplo, el estado rédox de la célula fotosintética.

El análisis microscópico de células del mesófilo de hojas control mostró la presencia de gránulos de almidón grandes y refringentes, mientras que en las plantas procedentes de tratamientos bajo estrés, luz continua o saturante, las células también presentan grandes gránulos de almidón, pero con membranas rotas y estructuras desorganizadas, y con abundantes cuerpos lipídicos, indicando una degradación de membranas. Probablemente ésto se deba a los procesos de fotodegradación inducidos por el estrés y a una elevada acumulación de almidón, que determinan que las hojas entren en senescencia antes que aquéllas de plantas control.

Como fue definido por Falk *et al.*, (1996), la respuesta al estrés es un tipo especial de aclimatación caracterizada por ajustes bioquímicos transitorios inducidos por cambios inmediatos en factores ambientales, los cuales pueden conducir al daño, senescencia y, finalmente, a la muerte de la planta. La capacidad de las plantas para aclimatarse está genéticamente controlada, y depende de la plasticidad en la regulación y expresión de genes específicos. En este sentido la respuesta al estrés es un proceso dependiente de la especie (o variedad). Aunque los eventos primarios de la fotosíntesis son poco sensibles a un amplio rango de temperaturas (Mathis y Rutherford, 1987), los subsiguientes procesos relativos a la asimilación del carbono sí lo son. Esto puede apreciarse en la caída del 75 % de la tasa de asimilación de CO₂ en condiciones de luz

no limitante en plantas de espinaca y tomate, cuando la temperatura de crecimiento fue modificada desde 30°C a 4°C. Es asumido que ésto se debe a una represión en las constantes termodinámicas (Sassenrath y Ort, 1990). Por el contrario, alta irradiación, sola o asociada con sequía o temperaturas extremas, puede conducir a fotoinhibición y subsiguientes desbalances metabólicos, los cuales, como se mencionó arriba, son los principales causantes de la generación de especies activas de oxígeno.

Como era previsible, la expresión transcripcional de FBPasa y NADP-MDH aparece inhibida en plantas mantenidas 10 d bajo baja irradiancia (16 h de fotoperiodo a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), tanto en plantas crecidas en condiciones normales (25/20°C día/noche) como a altas (35/30°C día/noche) temperaturas. Por el contrario, cuando las plantas crecieron a bajas temperaturas (15/10°C día/noche) el nivel de mRNA específico aumentó marcadamente, siendo los mayores valores los obtenidos en condiciones de baja irradiancia. Berry y Björman (1980) encontraron que la aclimatación de las plantas a bajas temperaturas está acompañada por un aumento en el ritmo del metabolismo del carbono. Los autores sostienen que ésto es consecuencia de una mayor tasa de carboxilación, que podría ser debida a una disminución de la fotorespiración. Más aún, Gray *et al.*, (1994) sostienen que plantas de espinaca se tornan resistentes a la fotoinhibición cuando crecen a bajas temperaturas. También el mismo efecto se comprobó en trigo y centeno (Gray *et al.*, 1996). Según estos autores plantas que crecen a 5°C y moderada iluminación aumentan su tolerancia a la fotoinhibición, ya que en esas condiciones el PS II se encuentra sometido a una elevada presión de excitación, comparable a la que presentan plantas expuestas a $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a temperatura ambiente (20°C). Concluyen que la tolerancia a la fotoinhibición inducida por el frío no sería una respuesta *per se* a las bajas temperaturas, sino que reflejaría un aumento de la capacidad fotosintética en respuesta a la elevada presión de excitación del fotosistema II, la cual sí es modulada directamente por la luz y la temperatura.

Nuestros resultados concuerdan con esta afirmación. Los tratamientos de frío a moderadas irradiancias tuvieron, en general, la misma respuesta en las plantas que los efectuados con temperatura normal y elevada iluminación. La potencial participación de las Trxs en la reparación del PS II y, posiblemente, de las enzimas FBPasa y NADP-MDH en la eficiencia de utilización del carbono, explicarían el aumento de sus niveles en respuesta a las bajas temperaturas. Por el contrario, Martino-Catt y Ort (1992)

mencionan una inhibición de la fotosíntesis en plantas de tomate creciendo a bajas temperaturas en oscuridad, probablemente como consecuencia de una alteración del control circadiano de la transcripción de ciertas proteínas reguladoras del cloroplasto, inducida por las bajas temperaturas. Las variaciones de los mRNAs específicos para Trxs *f* y *m* no fueron tan contrastantes como los de sus proteínas diana. Un efecto positivo de la luz y las bajas temperaturas fue también observado en ambas Trxs, pero no de forma tan marcada como en las enzimas diana.

Cuando los efectos de la irradiación y la temperatura sobre la expresión de Trxs *f* y *m*, y sobre sus dianas FBPasa y NADP-MDH, son analizados a nivel proteico, las diferencias significativas son escasas, tanto cuando el contenido de proteínas se calcula sobre la base de peso fresco como por unidad de proteína total. El único hecho que quizás merezca énfasis es, como ocurre con el nivel de mRNA, la respuesta positiva de la planta a bajas temperaturas y baja irradiación, cuando los resultados son expresados por unidad de proteína total. Esta tendencia no es observada en las actividades FBPasa y NADP-MDH, la primera exhibiendo, sorprendentemente, los mayores valores en plantas crecidas a alta temperatura y alta luz, cuando la actividad fue medida bajo condiciones reductoras (pH 7.9 en presencia de DTT). Estos resultados están en desacuerdo con Stitt *et al.*, (1987), que encontraron un alto contenido de almidón en cloroplastos de plántulas de espinaca y trigo crecidas a bajas temperaturas. Esto podría ser debido a una mayor actividad FBPasa, pero también a una menor disponibilidad de Pi en el estroma, un hecho asociado con plantas que crecen a bajas temperaturas (Stitt *et al.*, 1987). En este sentido puede ser razonable pensar que las bajas temperaturas pueden actuar a nivel del translocador de Pi más que sobre las bisfosfatasa cloroplásticas.

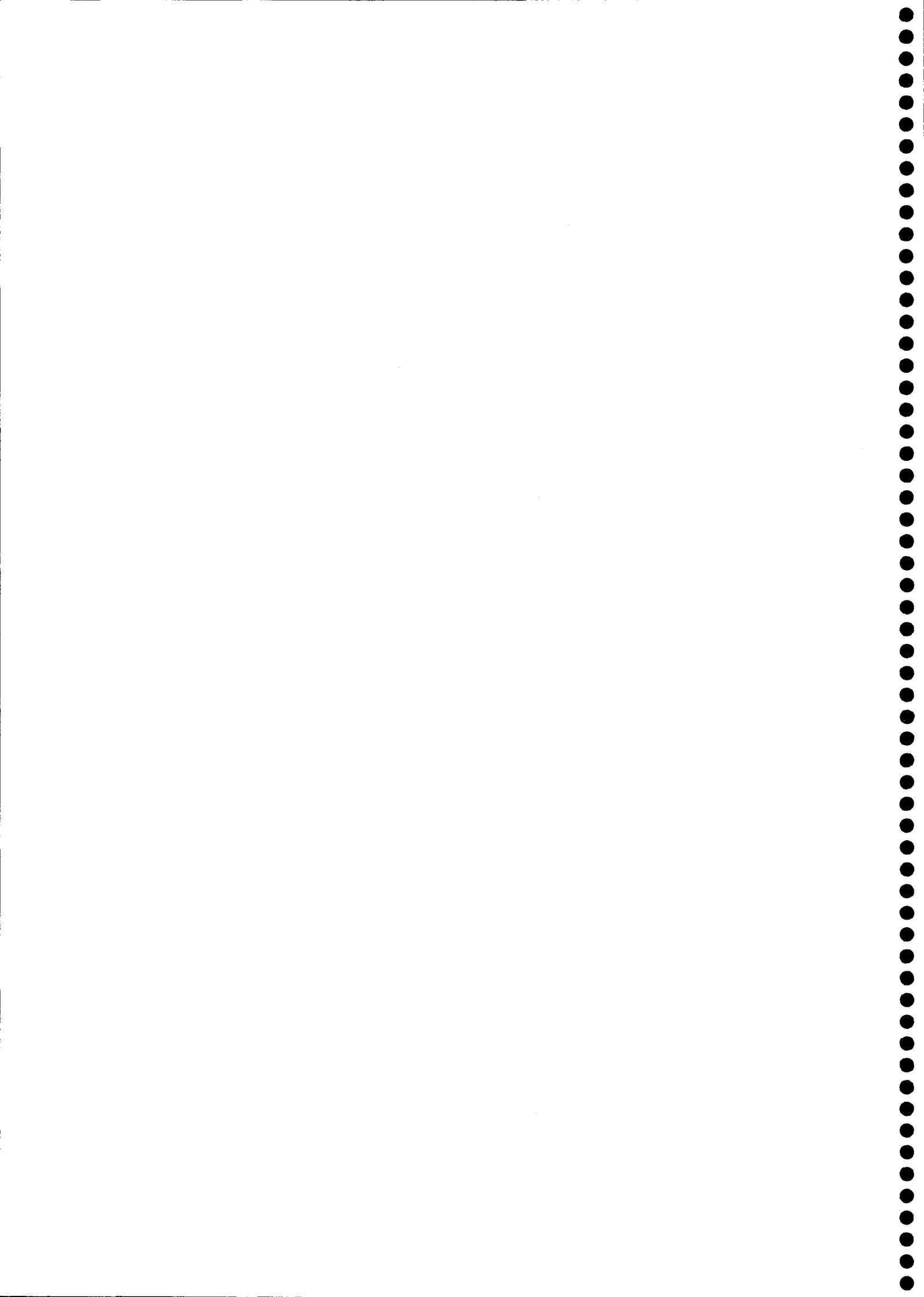
En el caso de la NADP-MDH se trata de una enzima que a la vez es regulada por reducción y por la relación $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, característica que la convierte en un buen sensor del estado redox del estroma (Foyer, 1993). Debido a que esta enzima es inhibida por una alta relación $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, la salida de equivalentes de reducción del cloroplasto, vía válvula del malato, opera solamente cuando la maquinaria fotosintética trabaja a saturación (Scheibe, 1987). Grace y Logan (1996) encontraron un inesperado alto nivel de reducción en el estroma de plantas de *Vinca major* y *Schefflera arboricola* (especies adaptadas a altas iluminaciones), cuando eran sometidas a elevadas irradiancias durante períodos prolongados de tiempo. A esta conclusión llegaron a partir

de la medición de la actividad NADP-MDH. Estudios realizados en espinaca y guisante mostraron que la actividad NADP-MDH *in vivo* raramente supera el 30 % de su potencialidad máxima, aún bajo luz saturante (Scheibe y Stitt, 1988; Harbinson *et al.*, 1990). Esto apoya la hipótesis de que la regulación fotoprotectora del PS II previene la sobrerreducción de las reservas de NADP⁺ (Foyer, 1993). Sin embargo, cuando la fotosíntesis está siendo forzada, por ejemplo, a bajas temperaturas (Scheibe y Stitt, 1988) o baja concentración de CO₂ (Harbinson *et al.*, 1990), la actividad NADP-MDH sube dramáticamente, indicando que la regulación de la actividad del PS II no siempre es efectiva para prevenir las condiciones de sobrerreducción del estroma (Grace y Logan, 1996).

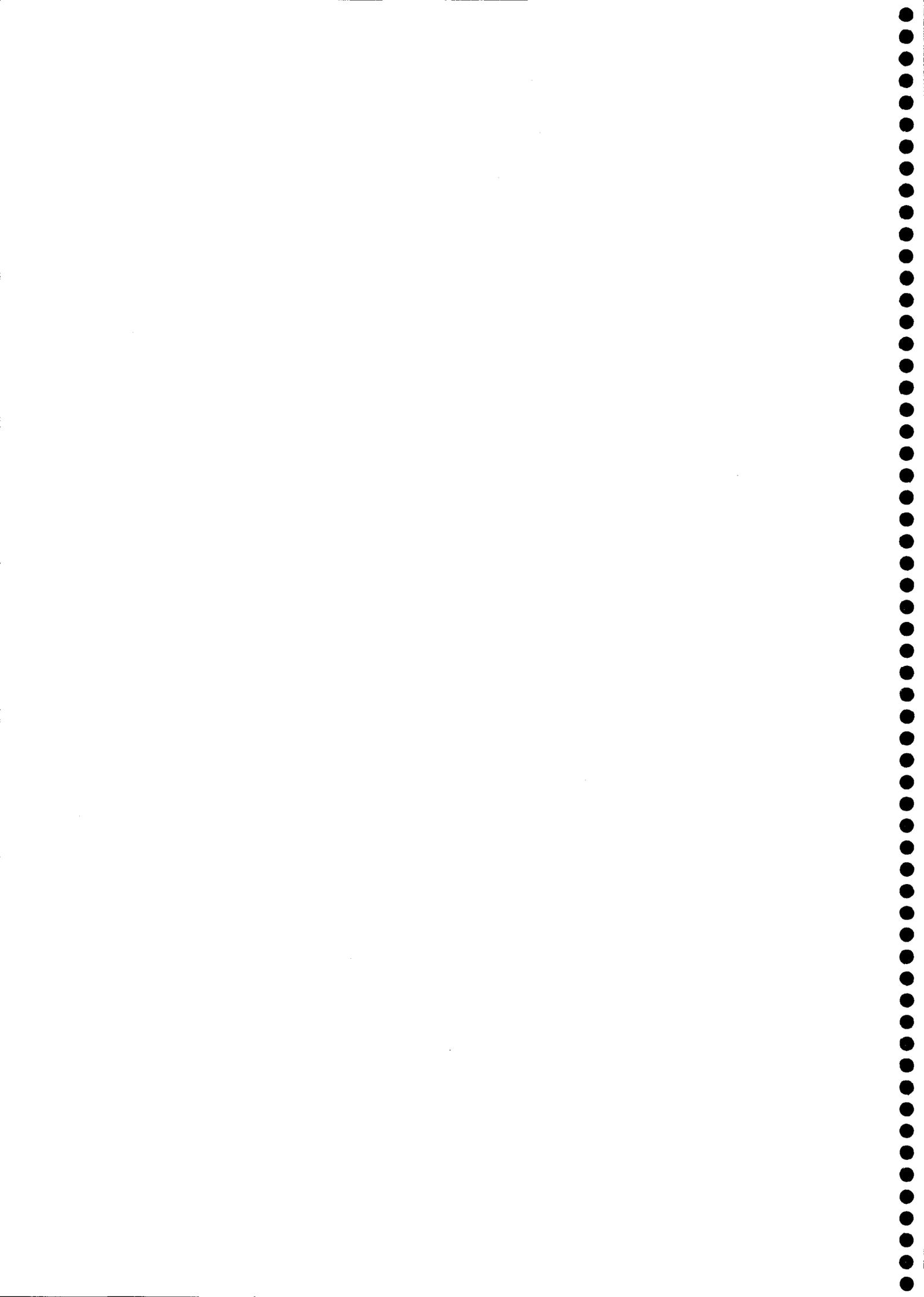
En el presente trabajo sólo se han encontrado aumentos en la actividad NADP-MDH como respuesta a altas y bajas temperaturas, independientemente de la intensidad de luz. No obstante, sobre la base de nuestros resultados se puede deducir que hay un incremento en la capacidad transcripcional de las plantas que crecen a bajas temperaturas. Este hecho no puede ser considerado específico de las proteínas bajo estudio, debido a que si los resultados se expresan por peso fresco o por unidad de mRNA total el aumento es similar. Es notable el carácter sinérgico de las bajas temperaturas y bajas irradiancias, condiciones que inducen las mayores respuestas transcripcionales en la planta. La ausencia de una clara respuesta a nivel traduccional podría deberse a las suaves condiciones de estrés usadas en los experimentos realizados con plantas que se encontraban, posiblemente, aclimatadas después de 10 d de tratamiento. En cambio, cuando las condiciones de estrés lumínico, y de éste asociado a estrés térmico, se hicieron más severas - aplicando en forma continua los tratamientos durante 48 h, o imponiendo temperaturas más bajas que las anteriores (8°C frente a 15°C) -, sí se encontró una respuesta a nivel traduccional e, incluso, en el caso de la FBPasa, en los niveles de actividad. La elevada intensidad lumínica provocó un aumento en los niveles proteicos, especialmente notable en el caso de la FBPasa. Por el contrario, iguales intensidades de luz, pero asociadas a bajas temperaturas, determinaron una disminución en los contenidos de proteínas, siendo también más evidente en el caso de la FBPasa. Es de destacar las oscilaciones en los valores durante las primeras horas de tratamiento, posiblemente debidas al ritmo circadiano de síntesis; sin embargo, a

partir de las 10 h las diferencias se tornan significativas. En las condiciones del ensayo, las plantas manifestaban a las 48 h de tratamiento síntomas evidentes de senescencia.

Estos resultados apoyan lo antes mencionado de que las proteínas bajo estudio, involucradas en la regulación rédox de la fotosíntesis, serían mantenidas en niveles normales o superiores (en respuesta a una mayor intensidad lumínica) hasta el límite de la capacidad del cloroplasto para hacer frente a las condiciones de estrés. Una vez que esta capacidad fuera superada, como en los casos extremos de los tratamientos en forma continua a altas irradiancias asociadas a bajas temperaturas, o en los tratamientos de altas irradiancias y altas temperaturas, se produce una caída, ya sea por una menor síntesis o por una mayor degradación de estas proteínas.



6. Conclusiones



1. Durante la ontogenia de plantas de guisante las variaciones en los niveles foliares de transcritos para FBPasa, NADP-MDH, Trx *f* y Trx *m* se correspondieron con los de proteínas, registrándose en floración los valores máximos, con un contenido siempre superior en las hojas más altas. Esto indica una regulación actuante principalmente a nivel transcripcional. En cambio, en floración fue cuando se encontraron los valores más bajos de actividades enzimáticas, lo que estaría de acuerdo con la función exportadora de fotosintato que cumple la hoja en esa fase de desarrollo.

2. La expresión a niveles transcripcional y traduccional de las proteínas bajo estudio se restringió, generalmente, a los órganos fotosintéticos. Sin embargo, se registró un elevado contenido de mRNA para Trx *f* en raíces, no correspondido por los niveles de proteína, por lo que existiría una regulación post-transcripcional de la expresión de la misma en este órgano.

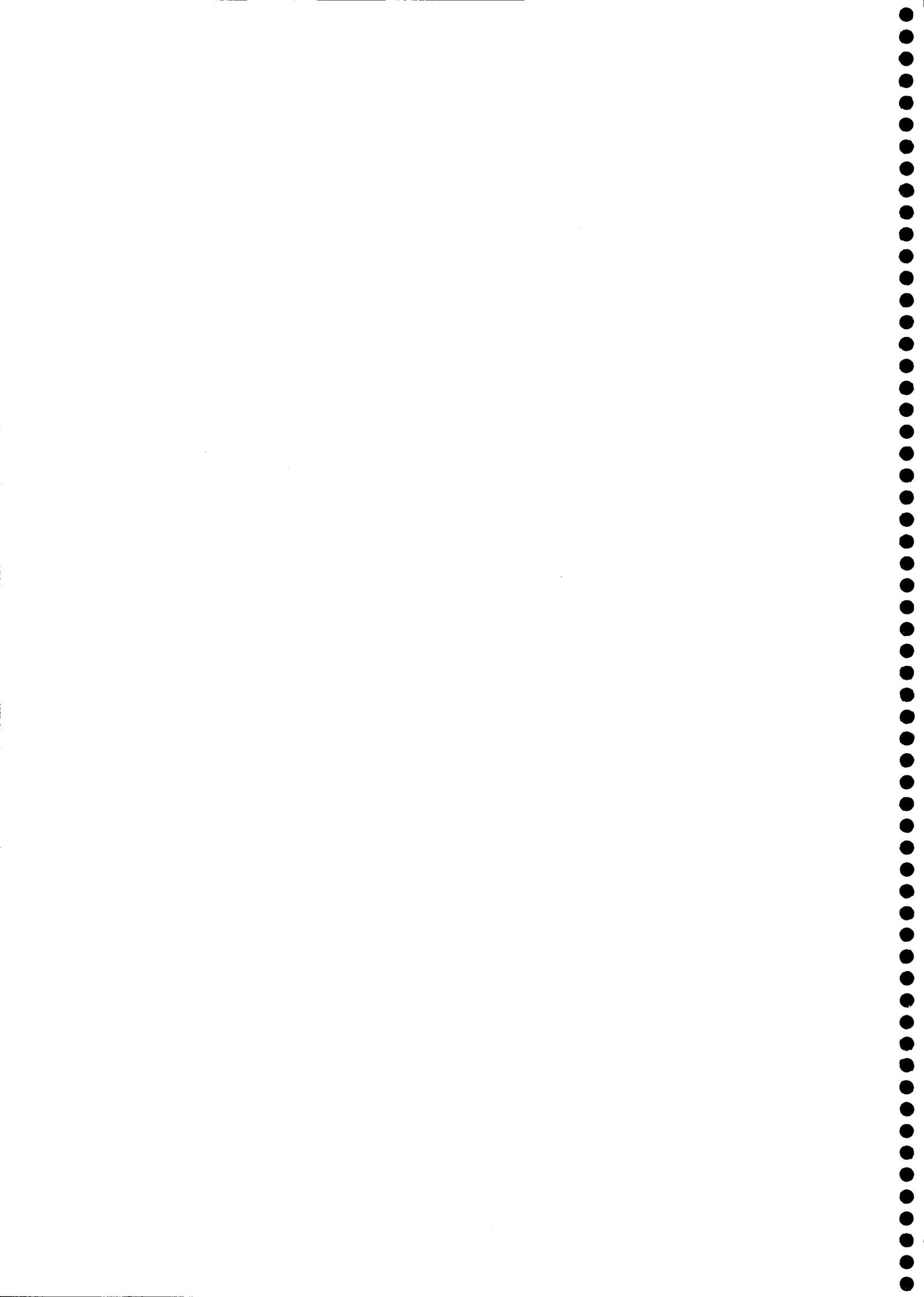
3. El estrés lumínico aplicado en cortos periodos de tiempo, si bien causó variaciones en los niveles de fluorescencia y de fotosíntesis neta, no provocó respuestas en la expresión de las proteínas bajo estudio, a menos que estas condiciones se hicieran más severas, o se prolongara el tiempo de exposición. En este último caso las plantas logran aclimatarse, y en ellas los niveles de transcritos, a diferencia de las plantas control, fueron mayores en las hojas inferiores, que estuvieron expuestas por más tiempo a las condiciones experimentales. Estos resultados no fueron correspondidos a nivel de expresión traduccional, lo que estaría indicando una regulación post-transcripcional de la expresión de éstas proteínas en condiciones de estrés. Todo ello apunta a que si las condiciones no son lo suficientemente severas como para que los mecanismos de defensa no sean superados, la expresión transcripcional responde principalmente al factor luz, mientras que la expresión a nivel traduccional respondería además a otros factores, como podrían ser el estado rédox del cloroplasto o la concentración de determinados metabolitos.

4. En los ensayos de estrés lumínico asociado a estrés térmico los efectos más negativos se produjeron, en general, en los tratamientos con altas irradiaciones asociadas a elevadas temperaturas. Por el contrario, las bajas temperaturas tuvieron un

efecto positivo sobre los niveles de transcritos y, aunque no tan aparentes, también en los de las correspondientes proteínas. Cuando elevadas irradiaciones se asocian a temperaturas muy bajas (8°C), los efectos fueron negativos a nivel de expresión traduccional y de actividad enzimática.

5. Con independencia del estado fisiológico en que se encuentre la planta, el grado de expresión transcripcional y traduccional de FBPasa, NADP-MDH, Trx *f* y Trx *m*, obedece a mecanismos paralelos de regulación y, posiblemente, dichas proteínas actúen como factores de expresión de unas respecto de otras. En relación a la participación de las Trxs *f* y *m* en mecanismos de defensa anti-estrés, ello estaría más relacionado con el proceso de aclimatación que con una respuesta inmediata a condiciones ambientales desfavorables

7. Bibliografía



Aalen, R.B., Opsahl-Ferstad, H.G., Linnestad, C. y Olsen, O.A. 1994. Transcripts encoding an oleosin and a dormancy-related protein are present in both the aleurone layer and the embryo of developing barley (*Hordeum vulgare* L.) seeds. *Plant J.*, **5**: 385-396.

Adamska, I. y Klopstech, K. The role of early light-induced proteins (ELIPs) during light stress. En: *Photoinhibition of Photosynthesis, from Molecular Mechanisms to the Field* (Baker, N.R. y Boyer, J.R. eds.) pp. 205-219. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK.

Akamba, L.M. y Anderson, L.E. 1981. Light modulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase by photosynthetic electron flow in pea chloroplasts. *Plant Physiol.*, **67**: 197-200.

Allen, J.F. y Nilsson, A. 1997. Redox signalling and the structural basis of regulation of photosynthesis by protein phosphorylation. *Physiol. Plant.*, **100**: 863-868.

Alscher, R.G. 1989. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiol. Plant.*, **77**: 457-464

Anderson, J.M y Osmond, C.B. 1987. Shade-sun responses: compromises between acclimation and photoinhibition. En: *Photoinhibition* (Kyle, D.J., Osmond, C.B. y Arntzen, C.J. eds.), pp. 1-18. Elsevier, Amsterdam.

Anderson, L.E. y Duggan, J.K. 1976. Light modulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Partial characterization of the light inactivation system and its effect on the properties on the chloroplastic and cytoplasmic forms of the enzyme. *Plant Physiol.*, **58**: 135-139.

Andersson, B. y Barber, J. 1996. Mechanism of photodamage and protein degradation during photoinhibition of photosystem II. En: *Photosynthesis and the Environment*

(Baker, N.R. ed), pp. 123-150. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Andersson, B., Ponticos, M., Barber, J., Koivuniemi, A., Aro, E.M., Hagman, A., Salter, A.H., Dan-Hui, Y. y Lindahl, M. 1994. Light-induced proteolysis of photosystem II reaction centre and light-harvesting complex II proteins in isolated preparations. En: *Photoinhibition of Photosynthesis, from Molecular Mechanisms to the Field* (Baker, N.R. y Boyer, J.R. eds.) pp. 129-142. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK.

Anderson, J.M., Park, Y.I. y Soon, W.S. 1998. Unifying model for the photoinactivation of photosystem II *in vivo* under steady-state photosynthesis. *Photosynth. Res.*, **56**: 1-3.

Apel, K. y Kloppstech, K. 1978. The plastid membranes of barley (*Hordeum vulgare*): Light induced appearance of mRNA coding for the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a/b protein. *Eur. J. Biochem.*, **85**: 581-588.

Aragnol, D., Pradel, J. y Cecchini, J.P. 1985. Effect of ligand binding and of pH change on the accesibility of thiol residues of fructose-1,6-bisphosphatase from spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **829**: 275-281.

Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, **24**: 1-15.

Asada, K. 1994. Mechanisms for scavenging reactive molecules generated in chloroplasts under light stress. En: *Photoinhibition of Photosynthesis, from Molecular Mechanisms to the Field* (Baker, N.R. y Boyer, J.R. eds.) pp. 129-142. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK.

Asada, K. 1996. Radical production and scavenging in the chloroplasts. En: *Photosynthesis and the Environment* (Baker, N.R. ed), pp. 123-150. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Babiychuk, E., Kushnir, S., Van Montagu, M. y Inze, D. 1994. The *Arabidopsis thaliana* apurinic endonuclease Arp reduces human transcription factors Fos and Jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**: 3299-3303.

Baier, M. y Dietz, K.J. 1996. 2-Cys Peroxiredoxin bas1 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, **111**: 651.

Baier, M. y Dietz, K.J. 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 J.*, **12**: 179-190.

Baker, N.R. y Horton, P. 1988. Chlorophyll fluorescence quenching during photoinhibition. En: *Photoinhibition* (Kyle, D.J., Osmond, C.B. y Arntzen, C.J. eds.), pp. 145-168. Elsevier. Amsterdam.

Barber, J. 1989. Function and molecular biology of photosystem II. *Oxford Surveys of Plant Cell Biol.*, **6**: 115-162.

Bassham, J.A. y Krause, G.H. 1969. Free energy changes and metabolic regulation in steady-state photosynthetic carbon reduction. *Biochim. Biophys. Acta*, **189**:207-221.

Berry J. y Björman, O. 1980. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **31**:491-543

Bower, M.S., Matias, D.M., Fernandes-Carvalho, E., Mazzurco, M., Gu, T., Rothstein, S.J. y Goring, D.R. 1996. Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of a *Brassica* S-locus receptor kinase. *Plant Cell*, **8**: 1641-1650.

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

Brezeale, V.D., Buchanan, B.B. y Wolosiuk, R.A. 1978. Chloroplast sedoheptulose-1,7-bisphosphatase: Evidence for regulation by the ferredoxin/thioredoxin system. *Z. Naturforsch.*, **33**: 521-528.

Buchanan, B.B. 1980. Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **31**: 341-374.

Buchanan, B.B. 1991. Regulation of the CO₂ assimilation in oxigenic photosynthesis: the ferredoxin/thioredoxin system. *Arch. Biochem. Biophys.*, **288**: 1-9.

Buchanan, B.B. 1992. Carbon dioxide assimilation in oxygenic and anoxygenic photosynthesis. *Photosynth. Res.*, **33**: 147-162.

Buchanan, B.B. Schurmann, P. y Kalberer, P.P. 1971. Ferredoxin-activated fructose diphosphatase of spinach chloroplast. Resolution of the system, properties of the alkaline diphosphatase component and physiological significance of the ferredoxin-linked activation. *J. Biol. Chem.* **246**: 5952-5959.

Buchanan, B.B., Wolosiuk, R.A. y Schurmann, P. 1979. Thioredoxin and enzyme regulation. *Trends Biochem. Sci.*, **4**: 93-96.

Buchanan, B.B., Schurmann, P., Jacquot, J.P. 1994. Thioredoxin and metabolic regulation. *Semin. Cell. Biol.*, **5**: 285-293..

Camp, P.J., Huber, S.C. y Moreland, D.E. 1984. Changes in enzymes of sucrose metabolism and the activation of certain chloroplast enzymes during wheat leaf senescence. *J. Exp. Bot.*, **35**: 659-668.

Carlberg, I., Rintamaki, E., Aro, E.M. y Andersson B. 1999. Thylakoid protein phosphorylation and the thiol redox state. *Biochemistry*, **38**: 3197-3204.

Carrasco, J.L., Chueca, A., Sahrawy, M., Hermoso, R., Lázaro, J.J. y López Gorgé J. 1992. Role of light in the in vivo and in vitro synthesis of spinach thioredoxin. *f. Physiol. Plant.*, **84**: 236-242.

Carrasco, J.L., Chueca, A., Prado, F.E., Hermoso, R., Lázaro, J.J., Ramos, J.L., Sahrawy, M., y López Gorgé J. 1992 Cloning, structure and expression of a pea cDNA clone coding for a photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase with some features different from those of the leaf chloroplast enzyme. *Planta*, **193**: 494-501.

Chae, H.Z., Chung, S.J. y Rhee, S.G. 1994. Thioredoxin dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.*, **269**: 27670-27678.

Champigny, M.L. y Bismuth, E. 1976. Role of photosynthetic electron transfer in light activation of Calvin cycle enzymes. *Physiol. Plant.*, **36**: 95-100.

Charles, S.A. y Halliwell, B. 1980. Properties of freshly purified and thiol-treated spinach chloroplast fructose bisphosphatase. *Biochem. J.*, **185**: 689-693.

Charles, S.A. y Halliwell, B. 1981. Light activation of fructose bisphosphatase in isolated spinach chloroplasts and deactivation by hydrogen peroxide. *Planta*, **151**: 242-246

Chueca, A., Lázaro, J.J. y López Gorgé, J. 1977. Fructose-1,6-bisphosphatase from spinach leaf chloroplast: subunit structure. *Plant Sci. Lett.*, **8**: 71-77.

Chueca, A., Lázaro, J.J. y López Gorgé, J. 1984. Light induced nuclear synthesis of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant Physiol.*, **75**: 539-541.

Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. y Hsu, L. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**: 2110-2117.

Cossar, J.D., Darling, A.J., Ip, S.M., Rowell, P. y Stewart, W.P.D. 1994. Immunocytochemical localizations of thioredoxins in cyanobacteria *Anabaena cylindrica* and *Anabaena variabilis*. *Gen. Microbiol.*, **131**: 3029-3035.

Crawford N.A., Yee B.H. y Buchanan B.B. 1981. Thioredoxin profiles of seeds, etiolated seedlings, and green seedlings of developing barley plants. *Plant Sci. Lett.*, **22**:317-326

Crétin, C., Luchetta P., Joly C., Miginiac-Maslow M., Decottignies P., Jacquot J.P., Vidal J. y Gadal P. 1988. Identification of a cDNA clone for sorghum leaf malate dehydrogenase (NADP). Light-dependent mRNA accumulation. *Eur. J. Biochem.*, **174**:497-501

Crétin, C., Luchetta, P., Joly, C., Decottignies, P., Lepiniec, L., Gadal, P., Sallantin, M., Huet, J.C. y Pernollet, J.C. 1990. Primary structure of sorghum malate dehydrogenase (NADP) deduced from cDNA sequence. Homology with malate dehydrogenase (NAD). *Eur. J. Biochem.*, **192**: 299-303.

Cuming, A.C., Bennett, J. 1981. Biosynthesis of the light-harvesting chlorophyll a/b protein. Control of messenger RNA activity by light. *Eur. J. Biochem.*, **118**: 71-80.

Danon, A. y Mayfield, S.P. 1994. Light-regulated translation of chloroplast messenger RNAs through redox potential. *Science*, **5191**: 1717-1719.

Decottignies, P., Schmitter, J.M., Miginiac-Maslow, M., Le Maréchal, P., Jacquot, J.P. y Gadal, P. 1988. Primary structure of the light-dependent regulatory site of corn NADP-malate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **263**: 11780-11785.

Demmig-Adams, B. 1990. Carotenoids and photoprotection in plants. A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1020**: 1-24.

Droux, M., Miginiac-Maslow, M., Jacquot, J.P., Gadal, P., Crawford, N.A., Kosower, N.S y Buchanan, B.B. 1987. Ferredoxin-thioredoxin reductase: a catalytically active dithiol group links photoreduced ferredoxin to thioredoxin functional in photosynthetic enzyme regulation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **256**: 372-380.

Droux, M., Crawford, N.A. y Buchanan, B.B. 1988. Mechanism of thioredoxin-linked activation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **305**: 335-342.

Ebbighausen, H., Hatch, M.D., Lilley, R.McC., Krömer, S., Stitt, H.M. y Heldt, H.-M. 1987. On the function of malate-oxalacetate shuttles in a plant cell. En: *Plant Mitochondria: Structural, Functional and Physiological Aspects* (Moore, A.L. y Beechey, R.B. eds.) Plenum Press. New York.

Eklund, H., Gleason, F.K. y Holmgren A. 1991. Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Protein: Structure, Function and Genetics*, **11**: 13-28.

Ernst, D., Pfeiffer, F., Schefbeck, K., Weyrauch, C. y Oesterheld, D. 1987. Phytochrome regulation of mRNA levels on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in etiolated rye seedlings (*Secale cereale*). *Plant Mol. Biol.* **10**: 21-33.

Falk, S., Maxwell, D.P., Laudenbach, D.E. y Huner, N.P.A. 1996. Photosynthetic adjustment to temperature. En: *Photosynthesis and the Environment* (Baker, N.R. ed.), pp. 367-385. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht , The Netherlands.

Faske, M., Backhausen, J.E., Sendker, M., Singer-Bayrle, M., Scheibe, R. y von Schaewen, A. 1997. Transgenic tobacco plants expressing pea chloroplast Nmdh cDNA in sense and antisense orientation. *Plant Physiol.*, **115**: 705-715.

Fickenscher, K. y Scheibe, R. 1983. Purification and properties of NADP-dependent malate dehydrogenase from pea leaves. *Biochim. Biophys. Acta* **749**: 249-254.

Fischer, K.H. y y Latzko, E. 1980. Chloroplast ribulose-5-phosphate kinase: light-mediated activation and detection of both soluble and membrane-associated activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **89**: 300-306.

Fonollá, J., Hermoso, R., Carrasco, J.L., Chueca, A., Lázaro, J.J., Prado, F.E. y López Gorgé, J. 1994. Antigenic relationship between chloroplast and cytosolic fructose-1,6-bisphosphatases. *Plant Physiol.*, **104**: 381-386.

Foyer, Ch. 1993. Interactions between electron transport and carbon assimilation in leaves coordination of activities and control. En: *Photosynthesis: Photoreactions to Plant Productivity* (Abrol Y.P, Mohanty, P. y Govindjee eds.), pp. 199-224. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht , The Netherlands.

Foyer, Ch., Lelandais, M. y Kunert, K.J. 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.*, **92**:696-717.

Foyer, Ch. y Mullineaux, P.M. 1998. The presence of dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase in plant tissues. *FEBS Lett.*, **425**: 528-529.

Freyssinet, G. y Buetow, D.E. 1984. Regulation and expression of genes for chloroplast proteins. *Israel J. Bot.*, **33**: 107-131.

Fromm, H., Devic, M., Fluhr, R. y Edelman, M. 1985. Control of psbA gene expression: In mature *Spirodela* chloroplasts light regulation of 32-kd protein synthesis is independent of transcript level. *EMBO J.*, **4**:291-295.

Gallagher, T.F. y Ellis, R.J. 1982. Light-stimulated transcription of genes for two chloroplast polypeptides in isolated pea leaf nuclei. *EMBO J.*, **1**: 1493-1498.

Gardemann, A., Schimkat, D. y Heldt, H.W. 1986. Control of CO₂ fixation. Regulation of stromal fructose-1,6-bisphosphatase in spinach by pH and Mg²⁺ concentration. *Planta*, **168**: 536-545.

Gibson, J.L., Chen, J.H., Tower, P.A. y Tabita F.R. 1990. The fructose-1,6-bisphosphatase and phosphoribulokinase genes form part of a large operon in *Rhodobacter sphaeroides*: primary structure and insertional mutagenesis analysis. *Biochemistry*, **29**: 8085-8093.

Giersch, C. y Robinson, S.P. 1987. Effects of photoinhibition on photosynthetic carbon metabolism in intact isolated spinach chloroplasts. *Aust. J. Plant Physiol.*, **14**: 439-449.

Gietl, Ch. 1992. Malate dehydrogenase isoenzymes: Cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles. *Biochim. Biophys. Acta*, **1100**: 217-234.

Gobin, P., Ng, P.K.W., Buchanan, B.B. y Kobrehel, K. 1997. Sulfhydryl-disulfide changes in proteins of developing wheat grain. *Plant Physiol. Biochem.*, **35**: 777-783.

Goldmark, P.J., Curry, J., Morris, C.F. y Walker-Simmons, M.K. 1992. Cloning and expression of an embryo specific mRNA upregulated in hydrated dormant seeds. *Plant Mol. Biol.*, **19**: 433-441.

Gontero, B., Meunier, J.C., Buc, J. y Ricard, J. 1984. The "slow" pH-induced conformational transition of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase and the control of the Calvin cycle. *Eur. J. Biochem.*, **145**: 485-488.

Grace, S.C. y Logan, B.A. 1996. Acclimation of foliar antioxidant systems to growth irradiance in three broad-leaved evergreen species. *Plant Physiol.*, **112**: 1631-1640.

Gray, G.R., Boese, S.R. y Huner, N.P.A. 1994. A comparison of low temperature growth vs. low temperature shifts to induce resistance to photoinhibition in spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Physiol. Plant.*, **90**: 560-566.

Gray, G.R., Savitch, L.V., Ivanov, A.G. y Huner, N.P.A. 1996. Photosystem II excitation pressure and development of resistance to photoinhibition. II. Adjustment of photosynthetic capacity in winter wheat and winter rye. *Plant Physiol.*, **110**: 61-71.

Grossman, A., Bartlett, S.G., Schmidt, G.W., Mullet, J.E. y Chua, N.H. 1982. Optimal conditions for post-translational uptake of proteins by isolated chloroplasts. *J. Biol. Chem.*, **277**: 1558-1563.

Halliwell, B. 1987. Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. *Chem. Phys. Lett.*, **44**: 327-340.

Harbinson, J., Genty, B. y Foyer, Ch. 1990. Relationship between photosynthetic electron transport and stromal enzyme activity in pea leaves. *Plant Physiol.*, **94**: 545-553.

Hartman, H., Syvanen, M. y Buchanan, B.B. 1990. Contrasting evolutionary histories of chloroplast thioredoxin *f* and thioredoxin *m*. *Mol. Biol. Evol.* **7**: 247-254.

Hatch, M.D. y Slack, C.R. 1969. NADP-specific malate dehydrogenase and glycerate kinase in leaves and evidence for their location in chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **34**: 589-593.

Havaux, M., Grnszecki, W.I., Dupont, I. y Leblanc, R.M. 1991. Increased heat emission and its relationship to the xanthophyll cycle in pea leaves exposed to strong light stress. *J. Photochem. Photobiol. B.*, **8**: 361-370.

Havaux, M. y Strasser, R.J. 1990. Protection of photosystem II by light in heat-stressed pea leaves. *Z.Naturforsch.*, **45c**: 1133-1141.

Havaux, M. y Strasser, R.J. 1992. Antagonistic effects of red and far-red lights on the stability of Photosystem II in pea leaves exposed to heat. *Photochem. Photobiol.*, **55**: 621-624.

Heber, U. 1974. Metabolic exchange between chloroplasts and cytoplasm. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, **25**: 393-341.

Heber, U., Takahama, U., Neimanis, S. y Shimizu-Takahama, M. 1982. Levels of some photosynthetic intermediates and activation of light regulated enzymes during photosynthesis of chloroplasts and green leaf protoplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **679**: 287-299.

Heldt, H.W., Werdam, K., Milovancev, M. y Geller, G. 1973. Alkalinization of the chloroplast stroma caused by light dependent proton flux into the thylakoid space. *Biochim. Biophys. Acta*, **314**: 224-241.

Hermoso, R., Chueca, A., Lázaro, J.J. y López Gorgé, J. 1987. An immunological method for quantitative determination of photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase in leaf crude extracts. *Photosynth. Res.*, **14**: 269-278

Hermoso, R., Fonollá, J., de Felipe, M.R., Vivó, A., Chueca, A., Lázaro, J.J. y López Gorgé, J. 1992. Double immunological localization of thioredoxin *f* and photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase in spinach leaves. *Plant Physiol.*, **30**: 39-46.

Herschbach, C., Jouanin, L. y Rennenberg, H. 1998. Overexpression of g-glutamylcysteine synthetase, but not of glutathione synthetase elevates glutathione allocation in the phloem of transgenic poplar (*Populus tremula* x *P. alba*) trees. *Plant Cell Physiol.*, **39**: 447-451.

Hertig, C.M. y Wolosiuk, R.A. 1980. A dual effect of Ca²⁺ on chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**: 325-333.

Hertig, C.M. y Wolosiuk, R.A. 1983. Studies on the hysteretic properties of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.*, **258**: 984-988.

Hewitt, E. 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. In: *Commonwealth Bureau of Horticulture and Plant Crops*. CAB, Farham Royal Brucks, England, 431.

Hirasawa, M., Schürmann, P., Jacquot, J.P., Manieri, W., Jacquot, P., Keryer, E., Hartman, F.C. y Knaff, D.B. 1999. Oxidation-reduction properties of chloroplast thioredoxins, ferredoxin:thioredoxin reductase and thioredoxin *f*-regulated enzymes. *Biochemistry*, **38**: 5200-5205.

Holmgren, A. 1985. Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.*, **54**: 237-271.

Holmgren, A. 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.*, **264**: 13963-13966.

Horsnell, P.R. y Raines, Ch.A. 1991. Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, **17**: 185-186.

Huppe, H.C., de Lamotte-Guéry, F., Jacquot, J.P. y Buchanan B.B. 1990. The ferredoxin-thioredoxin system of a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. Identification and characterization of thioredoxins and ferredoxin-thioredoxin components. *Planta*, **180**: 341-351.

Ish-Horowicz D. y Burke J.F. 1981. Rapid and efficient cosmid vector cloning. *Nucleic Acids Res.*, **9**: 2989-2998.

Ishiwatari, Y., Honda, Ch., Kawashima, I., Nakamura, S., Hirano, H., Mori, S., Fujiwara, T., Hayashi, H. y Chino, M. 1995. Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap. *Planta*, **195**: 456-463.

Issakidis, E., Decottignies, P. y Miginiac-Maslow, M. 1993. A thioredoxin-independent fully active NADP-malate dehydrogenase obtained by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett.*, **321**: 55-58.

Issakidis, E., Saarinen, M., Decottignies, P., Jacquot, J.P., Crétin, C., Gadal, P. y Miginiac-Maslow, M. 1994. Identification and characterization of the second regulatory disulfide bridge of recombinant sorghum leaf NADP-malate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **269**: 3511-3517.

Ivanov, B.N. 1998. Oxygen reduction in chloroplasts and the ascorbate cycle. *Biochemistry (Moscow)* **63**: 133-138

Jacquot, J.P., Buchanan, B.B., Martin, F. Y Vidal, J. 1981. Enzyme regulation in C₄ photosynthesis: purification and properties of thioredoxin linked NADP-malate dehydrogenase from corn leaves. *Plant Physiol.*, **68**: 300-304.

Jacquot, J.P., Lancelin, J.M. y Meyer, Y. 1997a. Thioredoxins: structure and function in plant cells. *New Phytol.*, **136**: 543-570.

Jacquot, J.P., López-Jaramillo, J., Chueca, A., Cherfils, J., Lemaire, S., Chedozeau, B., Miginiac-Maslow, M., Decottignies, P., Wolosiuk, R.A. y López Gorgé, J. 1995. High level expression of recombinant pea chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase and mutagenesis of its regulatory site. *Eur. J. Biochem.*, **229**: 675-681.

Jacquot, J.P., López-Jaramillo, J., Miginiac-Maslow, M., Lemaire, S., Cherfils, J., Chueca, A. y López Gorgé, J. 1997b. Cysteine 153 is required for redox regulation of pea chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *FEBS Lett.*, **401**: 143-147.

Jacquot, J.P., Vidal, J., Gadal, P. y Schürmann, P. 1978. Evidence for the existence of several enzyme-specific thioredoxins in plants. *FEBS Lett.*, **96**:243-246

Kagawa, T. y Bruno, P.L. 1988. NADP-Malate dehydrogenase from leaves of *Zea mays*: purification and physical, chemical, and kinetics properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, **260**: 674-695.

Kautsky, H. y Hirsch, A. 1931. Neue Versuche zur Kohlenstoff assimilation. *Naturwissenschaften*, **19**: 964.

Kelly, G.J., Zimmermann, G. y Latzko, E. 1976. Light induced activation of fructose-1,6-bisphosphatase in isolated intact chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**: 193-199.

Kelly, G.J., Zimmermann, G. y Latzko, E. 1982. Fructose bisphosphatase from spinach leaf chloroplast and cytoplasm. *Methods Enzimol.*, **90**: 371-378.

Khayat, E. y Daie, J. 1991. Purification of the cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase and immunological analysis of light/dark modulation in sugarbeet leaves. *Plant Physiol.*, Suppl., **96**: 84.

Kleczkowski, L.A. y Randall, D.D. 1985. Light and thiol activation of maize leaf glycerate kinase. The stimulating effect of reduced thiredoxins and ATP. *Plant Physiol.*, **79**: 274-277.

Kloppstech, K. Light regulation of photosynthesis genes. *Physiol. Plant.*, **100**: 739-747.

Koßmann, J., Müller-Röber, B., Dyer, T.A., Raines, Ch.A., Sonnewald, U. y Willmitzer, L. 1992. Cloning and expression analysis of the plastidic fructose-1,6-bisphosphatase coding sequence from potato: circumstantial evidence for the import of hexoses into chloroplasts. *Planta*, **188**: 7-12.

Kossmann, J., Sonnewald, U. y Willmitzer, L. 1994. Reduction of the chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase in transgenic potato plants impairs photosynthesis and plant growth. *Plant J.*, **6**: 637-650.

Krause, G.H. 1977. Light induced movement of magnesium ions in intact chloroplasts. Spectroscopic determination with Eriochrome blue SE. *Biochim. Biophys. Acta*, **460**: 500-510.

Krause, G.H. 1988. Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiol. Plant.*, **74**: 566-574.

Krause, G.H., Somersalo, S., Zumbusch, E., Weyers, B. y Laasch, H. 1990. On the mechanism of photoinhibition in chloroplasts. Relationship between changes in fluorescence and activity of photosystem II. *J. Plant Physiol.*, **136**: 472-479.

Krause, G.H. 1994. Photoinhibition induced by low temperatures. En: *Photoinhibition of Photosynthesis, from Molecular Mechanisms to the Field* (Baker, N.R. y Boyer, J.R. eds) pp. 331-348. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK.

Kromer, S., Stitt, M. y Heldt, H.W. 1988. Mitochondrial oxidative phosphorylation participating in photosynthetic metabolism of a leaf cell. *FEBS Lett.*, **226**: 352-356.

Kuge, S. y Jones, N. 1994. YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J.*, **13**:655-664.

Kuhlemeier, C., Green, P.J. y Chua, N.H. 1987. Regulation of gene expression in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **38**: 221-257.

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

Law, M.Y., Charles, S.A. y Halliwell, B. 1983. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of paraquat. *Biochem J.*, **210**: 899-903.

Lázaro, J.J., Chueca, A., López Gorgé, J. y Mayor, F. 1974. Fructose-1,6-diphosphatase from spinach leaf chloroplasts: purification and heterogeneity. *Phytochemistry*, **13**: 2455-2461.

Lázaro, J.J., Chueca, A., López Gorgé, J. y Mayor, F. 1975a. Properties of spinach chloroplast fructose-1,6-diphosphatase. *Phytochemistry*, **14**: 2579-2583.

Lázaro, J.J., Chueca, A., López Gorgé, J. y Mayor, F. 1975b. Fructose-1,6-diphosphatase from spinach leaf chloroplasts: molecular weight transitions of the purified enzyme. *Plant Sci. Lett.*, **5**: 49-55.

Lepiniec, L., Hodges, M., Gadal, P. y Crétin, C. 1992. Isolation, characterization and nucleotide sequence of a full-length pea cDNA encoding thioredoxin *f*. *Plant Mol. Biol.*, **18**:1023-1025.

Li, X., Nield, J., Hayman, D. y Langridge, P. 1995. Thioredoxin activity in the C terminus of *Phalaris S* protein. *Plant J.*, **8**: 133-138.

Lloyd, J.C., Raines, Ch.A., John, U.P. y Dier, T.A. 1991. The chloroplast FBPase gene of wheat: structure and expression of the promoter in photosynthetic and meristematic cells of transgenic tobacco plants. *Mol. Gen. Genet.*, **225**: 209-216.

Long, S.P., Humphries, S. y Falkowski, P.G. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **45**: 633-662.

López Jaramillo, Chueca, A., Jacquot, J.P., Hermoso, R., Lázaro, J.J., Sahrawy, M. y López Gorgé, J. 1997. High-yield expression of pea thioredoxin *m* and assessment of its efficiency in chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase activation. *Plant Physiol.*, **114**: 1169-1175.

Lozano, R.M., Wang, J.H., Yee, B.C., Peters, A., Kobrehel, K. y Buchanan, B.B. 1996. New evidence for a role for thioredoxin *h* in germination and seedling development. *Planta*, **200**: 100-106.

Luchetta, P., Crétin, C. y Gadal, P. 1990. Structure and characterization of the *Sorghum vulgare* gene encoding NADP-malate dehydrogenase. *Gene*, **89**: 171-177.

Luchetta, P., Crétin, C. y Gadal, P. 1991. Organization and expression of the two homologous genes encoding the NADP-malate dehydrogenase in *Sorghum vulgare* leaves. *Mol. Gen. Genet.*, **228**: 473-481.

Mandel, Y. y Higa, A. 1970. Calcium-dependent bacteriophage infection. *J. Mol. Biol.*, **53**: 159-162.

Marcus, F., Moberly L. y Latshaw, S.P. 1988. Comparative aminoacid sequence of fructose-1,6-bisphosphatases: identification of a region unique to the light regulated chloroplast enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **85**: 5375-5383.

Martino-Catt, S. y Ort, D. 1992. Low temperature interrupts circadian regulation of transcriptional activity in chilling-sensitive plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**: 3731-3735

Mathis, P. y Rutherford, A.W. 1987. The primary reactions of photosystems I and II of algae and higher plants. En: *Photosynthesis* (Amesz, J. ed.), pp 63-96. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

McKinney, D.W., Buchanan, B.B. y Wolosiuk, R.A. 1979. Association of a thioredoxin-like protein with chloroplast coupling factor (CF₁). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **86**: 1178-1184.

Melis, A. 1999. Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage *in vivo*?. *Trends Plant Sci.*, **4**: 130-135.

Metzler, M.C., Rothermel, B.A. y Nelson, T. 1989. Maize NADP-malate dehydrogenase: cDNA cloning, sequence and mRNA characterization. *Plant Mol. Biol.*, **12**: 713-722.

Michel, H.P. y Benett, J. 1987. Identification of the phosphorylation site of an 8.3 kDa protein from photosystem II of spinach. *FEBS Lett.*, **212**: 103-108.

Mills, J.D., Mitchell, P. y Schurmann, P. 1980. Modulation of coupling factor ATPase activity in intact chloroplasts. The role of thioredoxin. *FEBS Lett.*, **112**: 173-177.

Minakuchi, K., Yabushita, T., Masumura, T., Ichihara, K. y Tanaka, K. 1994. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding rice glutaredoxin. *FEBS Lett.*, **337**: 157-160

Morell, S., Follmann, H., De Tullio, M. y Häberlein, I. 1997. Dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase are phantom indicators of oxidative stress in plants. *FEBS Lett.*, **414**: 567-570.

Muller, E.G y Buchanan, B.B. 1989. Thioredoxin is essential for photosynthetic growth: the thioredoxin *m* gene of *Anacystis nidulans*. *J. Biol. Chem.*, **264**: 4008-4014.

Noctor, G., Arisi, A.C.M., Jouanin, L., Kunert, K.J., Rennenberg, H. y Foyer, Ch. 1998. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J. Exp. Bot.*, **49**: 623-647.

Olsen, L.J., Theg, S.M., Selman, B.R. y Keegstra, K. 1989. ATP is required for the binding of precursor proteins to chloroplast. *J. Biol. Chem.*, **264**: 6724-6729.

Osmond, C.B. 1994. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. En: *Photoinhibition of Photosynthesis, from Molecular Mechanisms to the Field* (Baker, N.R. y Boyer, J.R. eds), pp. 1-24, BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK.

Papageorgiu, G. 1975. Chlorophyll fluorescence: an intrinsic probe of photosynthesis. En: *Bioenergetics of Photosynthesis* (Govindjee, E. ed.), pp. 319-366. Academic Press. New York.

Pasternak, C., Assemat, K., Breton A.M., Clement Metral, J.D. y Klug, G. 1996. Expression of the thioredoxin gene (*trx A*) in *Rhodobacter sphaeroides* Y. is regulated by oxygen. *Mol. Gen. Genet.*, **250**: 189-196.

Plá, A., Chueca, A. y López Gorgé, J. 1981. A new procedure for the purification of spinach leaf photosynthetic fructose-1,6-diphosphatase by affinity chromatography on mercaptoethylamine-sepharose. *Photosynth. Res.*, **2**: 291-296.

Pötter, E. y Kloppstech, K. 1993. Effects os light stress on the early light-inducible proteins in barley. *Eur. J. Biochem.*, **214**: 779-786.

Powles, S. B. 1984. Photoinhibition of Photosynthesis induced by visible light. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **35**: 15-44.

Prado, F.E., Lázaro, J.J. y López Gorgé, J. 1991. Regulation by Ca^{2+} of a cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase from spinach leaves. *Plant. Physiol.*, **96**: 1026-1033.

Racker, E. y Schroeder, E.A.R. 1958. Reductive pentose phosphate cycle. II. Specific C-1 phosphatase for fructose-1,6-diphosphate and sedoheptulose-1,7-diphosphate. *Arch. Biochem. Biophys.*, **74**: 326-344.

Raines, Ch.A., Lloyd, J.C., Longstaff, M., Bradley, D. y Dyer T.A. 1988. Chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase: the product of a mosaic gene. *Nucleic Acids Res.*, **16**: 7931-7942.

Raines, Ch.A., Lloyd, J.C. y Dyer T.A. 1991. Molecular biology of the C3 photosynthetic carbon reduction cycle. *Photosynth Res.*, **27**: 1-14.

Raines, Ch.A., Longstaff, M., Lloyd, J.C. y Dyer, T.A. 1989. Complete coding sequence of wheat phosphoribulokinase: Developmental and light-dependent expression of the mRNA. *Mol Gen Genet.*, **220**:43-48.

Ray, T.B. y Black, C.C. 1979. The C₄ pathway and its regulation. En: *Encyclopedia of Plant Physiology* (Gibbs, M. y Latzko, E. eds) New Series Vol. 6, pp. 77-112. Springer-Verlag. New York.

Rebeille, F., Hatch, M.D. 1986. Regulation of NADP-malate dehydrogenase in C₄ plants: Effect of varying NADPH to NADP ratios and thioredoxin redox state on enzyme activity in reconstituted systems. *Arch Biochem Biophys.*, **249**: 164-170.

Reng, W., Riessland, R., Schiebe, R. y Jaenicke, R. 1993. Cloning, site-specific mutagenesis, expression and characterization of full-length chloroplast NADP-malate dehydrogenase from *Pisum sativum*. *Eur. J. Biochem.*, **217**: 189-197.

Rey, P., Pruvot, G., Becuwe, N., Eymery, F., Rumeau, D. y Peltier, G. 1998. A novel thioredoxin-like protein located in the chloroplast is induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants. *Plant J.*, **13**: 97-107.

Rivera-Madrid, R., Mestres, D., Marinho, P., Jacquot, J.P., Decottignies, P., Miginiac-Maslow, M. y Meyer, Y. 1995. Evidence for five divergent thioredoxin *h* sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 5620-5624.

Rodríguez Andrés, A., Lázaro, J.J., Chueca, A., Hermoso, R. y López Gorgé, J. 1987. Binding of photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase to chloroplast membrane. *Plant Sci.*, **52**: 41-48.

Rodríguez Andrés, A., Lázaro, J.J., Chueca, A., Hermoso, R. y López Gorgé, J. 1990. Effects of alcohols on the association of photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase to thylakoid membranes. *Physiol. Plant.*, **78**: 409-413.

Ruelland, E. y Miginiac-Maslow, M. 1999. Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins: activation or relief from inhibition?. *Trends Plant Sci.*, **4**: 136-141.

Sahrawy, M., Chueca, A., Hermoso, R., Lázaro, J.J. y López Gorgé, J. 1988. Effect of light quality and intensity on the biosynthesis of photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase from pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *Plant Physiol. (Life Sci. Adv.)*, **7**: 55-59.

Sahrawy, M., Chueca, A., Hermoso, R., Lázaro, J.J. y López Gorgé, J. 1990a. Role of light in the biosynthesis and turnover of photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase in pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *New Phytol.*, **115**: 603-608.

Sahrawy, M., Chueca, A., Hermoso, R., Lázaro, J.J. y López Gorgé, J. 1990b. In-vivo and in-vitro synthesis of photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase from pea (*Pisum sativum* L.). *Planta.*, **182**: 319-324.

Sahrawy, M., Chueca, A. y López Gorgé, J. 1995. Site-directed mutagenesis shows that lysine-299 is essential for activity of pea chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant Sci.*, **106**: 81-89.

Sahrawy, M., Hecht, V., López-Jaramillo, J., Chueca, A., Chartier, Y. y Meyer Y. 1996. Intron position as an evolutionary marker of thioredoxins and thioredoxin domains. *J. Mol. Evol.*, **42**: 422-431.

Salamon, Z., Tollin, G., Hirasawa, M., Gardet-Salvi, L., Stritt-Etter, A.L., Knaff, D.B. y Schürmann, P. 1995. The oxidation-reduction properties of spinach thioredoxins f and m and of ferredoxin:thioredoxin reductase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1230**: 114-118.

Sasaki, T., Chino, M., Hayashi, H y Fujiwara, T. 1998. Detection of several mRNA species in rice phloem sap. *Plant Cell. Physiol.*, **39**:895-897.

Sassenrath, G.F. y Ort, D.R. 1990. The relationship between inhibition of photosynthesis at low temperature and the inhibition of photosynthesis after rewarming in chilling-sensitive tomato. *Plant Physiol Biochem.*, **28**: 457-465.

Scheibe, R. 1981. Thioredoxin *m* in pea chloroplasts: Concentration and redox state under light and dark conditions. *FEBS Lett.*, **133**: 301-304.

Scheibe, R. 1987. NADP⁺-malate dehydrogenase in C₃ plants: Regulation and role of a light-activated enzyme. *Physiol. Plant.*, **71**: 393-400.

Scheibe, R. 1990. Light/dark modulation. Regulation of chloroplast metabolism in a new light. *Bot. Acta*, **103**: 323-334.

Scheibe, R. 1991. Redox modulation of chloroplast enzymes. A common principle for individual control. *Plant Physiol.*, **96**: 1-3.

Scheibe, R. y Stitt, M. 1988. Comparison of NADP-malate dehydrogenase activation, Q_A reduction and O₂ evolution in spinach leaves. *Plant Physiol. Biochem.*, **26**: 473-482.

Scheibe, R., Wagenpfeil, D. y Fischer, J. 1986. NADP-Malate dehydrogenase activity during photosynthesis in illuminated spinach chloroplasts. *J. Plant. Physiol.*, **124**: 103-110.

Schenn, J.D. y Schriek, U. 1984. A new role for thioredoxin in assimilatory sulphate reduction. Activation of adenylylsulphate kinase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* CW15. *FEBS Lett.*, **170**: 76-80.

Schobert, C., Baker, L., Szederkenyi, J., Grossmann, P., Komor, E., Hayashi, H., Chino, M. y Lucas, W.J. 1998. Identification of immunologically related proteins in sieve-tube exudate collected from monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Planta*, **206**: 245-252.

Schürmann, P., Wolosiuk., R.A., Brezeale, V.D. y Buchanan, B.B. 1976. Two proteins function in the regulation of photosynthetic CO₂ assimilation in chloroplasts. *Nature*, **263**: 257-258.

Schürmann, P., Roux, J. y Salvi, L. Modification of thioredoxin specificity of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase by substrate and Ca²⁺. *Physiol. Vég.*, **23**: 813-818.

Slovacek, R.E. y Vaughn, S. 1982. Chloroplast sulphhydryl groups and the light activation of fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant Physiol.*, **70**: 978-981.

Smillie, R.M. 1960. Alkaline C-1 fructose-1,6-bisphosphatase. Evidence for its participation in photosynthesis. *Nature*, **187**: 1024-1025.

Somersalo, S. y Krause, G.H. 1989. Photoinhibition at chilling temperature. Fluorescence characteristics of unhardened and cold-acclimated spinach leaves. *Planta*, **177**: 409-416.

Somersalo, S. y Krause, G.H. 1990. Reversible photoinhibition of unhardened and cold-acclimated spinach leaves at chilling temperature.. *Planta*, **180**: 181-187.

Soulié, J.M., Buc, J., Meunier, J.C., Pradel, J. y Ricard, J. 1981. Molecular properties of thioredoxin *f* and the photoregulation of the activity of fructose-1,6-bisphosphatase. *Eur. J. Biochem.*, **119**: 497-502.

Steiger, H.M. y Beck, E. 1981. Formation of hydrogen peroxide and oxygen dependence of photosynthetic CO₂ assimilation by intact chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, **22**: 561-576.

Stein, M., Jacquot, J.P., Jeannette, E., Decottignies, P., Hodges, M., Lancelin, J.M., Mittard, V., Schmitter, J.M. y Miginiac-Maslow, M. 1995. *Chlamydomonas reinhardtii* thioredoxins: structure of the genes coding for the chloroplastic *m* and

cytosolic *h* isoforms; expression in *Escherichia coli* of the recombinant proteins, purification and biochemical properties. *Plant Mol. Biol.*, **28**: 487-503.

Stein, M. y Wolosiuk, R.A. 1987. The effect of chaotropic anions on the activation and activity of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.*, **262**: 16171-16179.

Steinback, K.E., Pfister, K. y Arntzen, C.J. 1981. Trypsin mediated removal of herbicide binding sites within the photosystem II complex. *Z. Naturforsch.*, **36**: 98-108.

Stitt, M., Huber, S. y Kerr, P. 1987. Control of photosynthetic sucrose formation. En: *The Biochemistry of Plants*, vol. 10: *Photosynthesis*. (Hatch, M.D., Boardman, N.K., eds), pp 327-409. Academic Press, New York,

Stitt, M. y Heldt, H.W. 1985. Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose-2,6-bisphosphatase. Intercellular metabolite distribution and properties of the cytosolic fructose-bisphosphatase in leaves of *Zea mays* L. *Planta.*, **164**: 179-186.

Stryer, L. 1995. Biochemistry, Fourth Edition. W.E. Freeman and Company, New York.

Tischner, R. y Hutterman, A. 1978. Light mediated activation of nitrite reductase in synchronous *Chlorella*. *Plant Physiol.*, **62**: 284-286.

Tischner, R. y Schmidt, A. 1982. A thioredoxin-mediated activation of glutamine synthase and glutamate synthase in synchronous *Chlorella sorokiniana*. *Plant Physiol.*, **70**: 113-116.

Trevanion, S.J., Furbank, R.T. y Ashton, A.R. 1997. NADP-malate dehydrogenase in the C₄ plant *Flaveria bidentis*. *Plant Physiol.*, **113**: 1153-1165.

Venugopalan, C. y Kapoor, H.C. 1997. Single step isolation of plant RNA. *Phytochemistry*, **46**: 1303-1305.

Vidal, J. y Gadal, P. 1981. Evidence for the *de novo* synthesis of nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate malate dehydrogenase during greening of corn leaves. *Physiol. Vég.*, **19**: 483-489.

Villeret, V., Huang, S., Zhang, Y., Xue, Y. y Lipscomb, W.N. 1995. Crystal structure of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase at 2.8 Å resolution. *Biochemistry*, **34**: 4299-4306.

Wadsworth, G.J., Redinbaugh, M.G. y Scandalios, J.G. 1988. A procedure for the small-scale isolation of plant RNA suitable for RNA blot analysis. *Anal. Biochem.*, **172**: 279-283.

Walker, D.A. 1976. CO₂ fixation by intact chloroplasts: Photosynthetic induction and its relation to transport phenomena and control mechanisms. En: *The Intact Chloroplast* (J. Barber, ed.), pp. 235-276. Elsevier, Amsterdam.

Werdam, K., Heldt, H.W. y Milovancev, M. 1975. The role of pH in the regulation of carbon fixation in the chloroplast stroma. *Biochim. Biophys. Acta*, **396**: 276-292.

Wink, M. y Hartmann, T. 1981. Activation of chloroplast localized enzymes of quinolizidine alkaloid biosynthesis by reduced thioredoxin. *Plant Cell Rep.*, **1**: 6-9.

Wolosiuk, R.A. 1986. The role of thioredoxin *f* and organic solvents in the regulation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphate. En: *Thioredoxin and Glutaredoxin Systems: Structure and Function* (Holmgren, A. *et al.* eds), pp. 253-266. Raven Press. New York.

Wolosiuk, R.A., Buchanan, B.B. y Crawford, N.A. 1977. Regulation of NADP-malate dehydrogenase by the light activated ferredoxin/thioredoxin system of chloroplasts. *FEBS Lett.*, **81**: 253-258.

Wolosiuk, R.A. y Buchanan, B.B. 1977. Thioredoxin and glutathione regulate photosynthesis in chloroplasts. *Nature*, **266**: 565-566.

Wolosiuk, R.A. y Buchanan, B.B. 1978a. Activation of chloroplast NADP-linked glyceraldehyde-3-P dehydrogenase by the ferredoxin/thioredoxin system. *Plant Physiol.*, **61**: 669-671.

Wolosiuk, R.A. y Buchanan, B.B. 1978b. Regulation of chloroplast phosphoribulokinase by the ferredoxin/thioredoxin system. *Arch. Biochem. Biophys.*, **189**: 97-101.

Yuan, X.H. y Anderson, L.E. 1987. Changing activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from pea chloroplasts during photosynthetic induction. *Plant Physiol.*, **85**: 598-600.

Ziegler, H. y Ziegler, I. 1965. The influence of light on the NADP⁺-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Planta*, **65**: 369-380.

Ziegler, H. y Ziegler, I. 1967. The light induced increase in the activity of NADP⁺-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Planta*, **72**: 162-169.

Ziegler, H., Ziegler, I. y Schmidt-Clausen, H.J. 1965. The influence of light intensity and light quality on the increase in activity of the NADP⁺-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Planta*, **67**: 344-356.

Zimmermann, G., Kelly, G.J. y Latzko, E. 1976. Efficient purification and molecular properties of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Eur. J. Biochem.*, **70**: 361-367.

Zimmermann, G., Kelly, G.J. y Latzko, E. 1978. Purification and properties of spinach leaf cytoplasmic fructose-1,6-bisphosphate. *J. Biol. Chem.*, **253**: 5952-5956.