

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL**



**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**

**ESTUDIO DE DIFERENTES ASPECTOS AGRONÓMICOS,  
FISIOLÓGICOS Y MOLECULARES DE LA APLICACIÓN DE  
H<sub>2</sub>S EN PLANTAS DE *Brassica Oleracea* "CV. BRONCO"**

**Programa de Doctorado en Biología Fundamental y de  
Sistemas**

**David Montesinos Pereira**

**Editor:** Universidad de Granada. Tesis Doctorales

**Autor:** David Montesinos Pereira

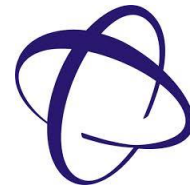
**ISBN:** 978-84-1306-799-5

**URI:** <http://hdl.handle.net/10481/67832>

**Granada, diciembre 2020**



**Universidad de Granada**



**Facultad de Ciencias**

**Estudio de diferentes aspectos agronómicos, fisiológicos  
y moleculares de la aplicación de H<sub>2</sub>S en plantas de  
*Brassica oleracea* “CV. BRONCO”**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por el licenciado en biología David Montesinos Pereira para optar al grado de Doctor de Ciencias Biológicas con mención internacional.

Fdo.: David Montesinos Pereira

V° B° del director de tesis:

Fdo.: Dr. Juan Manuel Ruiz Sáez

Catedrático Universidad de Granada

**Granada, diciembre 2020**



## Financiación y publicaciones

El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el grupo de investigación “Fisiología y fitotecnia de cultivos para el desarrollo de una agricultura sostenible” (AGR-282, Plan andaluz de investigación, Junta de Andalucía), del departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada (España). Este trabajo a sido financiado por dicho grupo.

Adicionalmente, el doctorando obtuvo una beca de movilidad del Programa de Movilidad Internacional para Estudiantes de Doctorado de la Universidad de Granada. Esta beca fue realizada en *Department of Plant Sciences*, (Universidad de California, Davis, EE. UU), bajo la supervisión del Dr. Eduardo Blumwald. julio-octubre 2019 (3 meses).

Los artículos presentados en esta memoria de han sido publicados en revistas internacionales o se encuentran en revisión:

**Montesinos-Pereira, D.**, Barrameda-Medina, Y., Baenas, N., Moreno, D.A., Sámchez-Rodríguez, E., Ruiz, J.M., 2016. Evaluation of hydrogen sulfide supply to biostimulate the nutritive and phytochemical quality and the antioxidant capacity of Cabbage (*Brassica oleracea* L. ‘Bronco’). 1 89. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2016.089.038>

**Montesinos-Pereira, D.**, de la Torre-González, A., Blasco, B., Ruiz, J.M., 2019. NaSH: Phytotoxin or biostimulant in N assimilation in *Brassica oleracea* L. ‘Bronco’ plants? *Scientia Horticulturae* 249, 471–477. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.031>

**Montesinos-Pereira, D.**, de la Torre-González, A., Blasco, B., Ruiz, J.M., 2018. Hydrogen sulphide increase the tolerance to alkalinity stress in cabbage plants (*Brassica oleracea* L. ‘Bronco’). *Scientia Horticulturae* 235, 349–356. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.021>

**Montesinos-Pereira, D.**, de la Torre-González, A., Blasco, B., Ruiz, J.M., 2020. Aspectos moleculares de la aplicación de H<sub>2</sub>S sobre los mecanismos de tolerancia de *Arabidopsis thaliana* L. frente a estrés alcalino. (Under Review)  
**pag5**

El doctorando **David Montesinos Pereira** y el director de tesis el **Dr. Juan Manuel Ruiz Sáez** garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección del director de tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores al ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, Enero 2021

Director de la Tesis

Fdo.: Juan Manuel Ruiz Sáez

Doctorando

Fdo.: David Montesinos Pereira





## **Agradecimientos:**

Mi primer contacto con una naturaleza salvaje fue en la Sierra de las Nieves, pasamos un fin de semana en un caserón adentrado en plena sierra, el tiempo era lluvioso y yo dormía en una buhardilla con el techo de madera y una ventana redonda que daba al valle, junto a la ventana había una mesa con un microscopio de juguete que pertenecía a la hija de los amigos de mis padres, dueños del caserón. Esta y otras experiencias, aderezadas con cientos de sobremesas viendo documentales de la 2, alucinando con David Attenborough y la vida privada de las plantas o planeta helado, alimentaron mi pasión por la naturaleza. Buenas siestas, haberlas, también las hubo. También solían rular libros de animales por casa y mi hermano y yo pasábamos horas preguntándonos el uno al otro cómo se llamaban los animales que ilustraban estos libros.

La vida es un suceso extraordinario, una desorbitada sucesión de extrañísimas coincidencias, y somos testigos y parte de ella. Habría que viajar muy lejos para tener alguna posibilidad de ver algo tan peculiar fuera de nuestro planeta, así que dedicar tiempo a observarla, estudiarla y tratar de entenderla me parece una tarea muy edificante.

Por darme la oportunidad de dedicarme al estudio de una ciencia tan hermosa, esta Tesis Doctoral quiero dedicarla de manera especial y sentida a mi familia. Gracias familia! Gracias a mi madre María, a mi padre Juan Pablo, a mi hermano Juan Pablo y a mi amor Sara, gracias por aguantarme y darme la vida, os quiero. También quiero dar las gracias a mi tío Miguel por hacerme ver

el “Rey León” más de 100 veces, si en este mundo hubiera más personas como tú, éste, sería un mundo más amable.

He sido afortunado, tuve buen@s profesor@s, buen@s de verdad, que continuaron forjando mi pasión por la Biología. Por ello voy a intentar hacer uso de mi mala memoria para mencionar a algún@s, pidiendo disculpas de antemano porque dejaré a much@s en el tintero, sin duda, importantes. Aun así, gracias a mi Maestro de ciencias naturales del colegio, Celso Peñas, que tiene una forma de transmitir el amor por la naturaleza y su conocimiento en biología, a la altura de los mejores divulgadores, me dejaba hipnotizado. Quiero agradecer especialmente a mi profesora Victoria y Francisca (Paca), por dotarme de las herramientas fundamentales para iniciarme en el estudio de la biología y por fomentar mi curiosidad, os debo mucho también a vosotras. Gracias Victoria, gracias Paca, aunque yo fuera un trasto, me gustaban más vuestras clases que el recreo.

En la Universidad también tuve excelentes profesores, realmente nunca llegué a idolatrar a futbolistas ni famosos pero el respeto y la admiración por mis profesores sí que fue una constante en mi vida. Víctor Arce, José Iglesias, Juan Manuel Ruíz, Federico Zurita, Enrique Iáñez, José María Ramos, José Miguel Ávila, Ana Teresa Romero, y otros que no me perdonaré haber olvidado en este momento, abristeis una ventana por la que aún estoy asomándome y que se me antoja apasionante. Gracias a tod@s.

Gracias a mi director de Tesis el Dr. Juan Manuel Ruiz, gracias por darme la oportunidad de investigar, y enseñarme fisiología vegetal, gracias Juanma, esas herramientas me acompañaran siempre.

Gracias también a mis compañeros de laboratorio; Eva, Mari, Christian, Begoña, Rocío, Yurena, Alejandro, Eloy, y Javier y a los alumnos internacionales que realizaron estancias en nuestro laboratorio, como Valeria, Cristina, Karen y Maru, vuestra aportación fue esencial para la realización de esta Tesis. Siempre os estaré agradecido.

Por ell@s y por la naturaleza salvaje culmino la presentación de esta Tesis Doctoral, cerrando una etapa y espero abriendo otra en el mundo de la investigación del mundo vivo.

Para la mujer que me da vida, luz y calor, para ti Maria, para ti Mamá.

Adaptado de "Vidalogía" (Tremendo Menda)



*“El amor por todas las criaturas vivientes es el más noble atributo del hombre.”*

Charles Darwin, *“El origen de las especies”* (1859).



## ÍNDICE





## Índice

1	Introducción General.....	1
1.1	El sulfuro de hidrógeno (H <sub>2</sub> S) en los sistemas vivos .....	1
1.2	Importancia del S en la nutrición de las plantas .....	4
1.2.1	H <sub>2</sub> S como intermediario en la asimilación del SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> .....	7
1.2.2	Mecanismos fisiológicos de respuesta al exceso de H <sub>2</sub> S .....	8
1.2.3	Producción de H <sub>2</sub> S endógeno en plantas .....	8
1.2.4	Efectos del H <sub>2</sub> S exógeno sobre la asimilación del SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> .....	10
1.2.5	Relación entre los metabolismos del S y el N en plantas .....	11
1.3	Concepto de estrés alcalino en los cultivos.....	13
1.3.1	Efecto del estrés alcalino sobre la fisiología de las plantas .....	13
1.3.2	Relación entre estrés alcalino y estrés iónico en plantas .....	14
1.3.3	Producción de ROS y respuesta antioxidante en cultivos que sufren condiciones de estrés alcalino .....	17
1.4	Perspectivas de futuro para reducir el efecto del estrés alcalino en plantas .....	21
1.5	Bibliografía .....	23
2	Justificación y objetivos .....	4
2.1	¿Por qué <i>Brassica oleracea</i> como planta de estudio? .....	4
2.2	Objetivos .....	6
2.3	Bibliografía .....	8

CAPÍTULO 1: Evaluation of hydrogen sulfide supply to biostimulate the nutritive and phytochemical quality and the antioxidant capacity of Cabbage (*Brassica oleracea* L. 'Bronco') ..... 14

Abstract..... 14

Material and methods..... 18

Results..... 26

Discussion..... 31

References..... 40

CAPÍTULO 2: NaSH: phytotoxin or biostimulant in N assimilation in *Brassica oleracea* L. 'Bronco' plants? ..... 50

Abstract..... 50

1. Introduction ..... 51

2. Material and methods..... 54

3. Results ..... 61

4. Discussion..... 68

5. Conclusion ..... 74

6. References..... 74

CAPÍTULO 3: Hydrogen sulphide increase the tolerance to alkalinity stress in cabbage plants (*BRASSICA OLERACEA* L. "BRONCO") ..... 84

Abstract..... 84

Introduction ..... 86

2. Material and methods ..... 92

3. Results .....	98
4. Discussion.....	104
5. Conclusion .....	112
References.....	112

**CAPÍTULO 4:** Aspectos moleculares de la aplicación de H<sub>2</sub>S sobre los

mecanismos de tolerancia de *Arabidopsis thaliana* L. al estrés alcalino ..... 126

Resumen.....	126
1. Introducción .....	128
2. Material y métodos.....	133
3. Resultados .....	135
4. Discusión .....	144
5. Conclusión .....	151
6. Bibliografía .....	153
3 Discusión general .....	167
3.1 Bibliografía .....	186
4 Conclusiones .....	195
5 Conclusions .....	196



RESUMEN/ABSTRACT



## RESUMEN

En el capítulo 1, se investigaron los efectos potenciales del sulfuro de hidrógeno en la biomasa de la parte aérea, la calidad nutricional y la capacidad antioxidante de *Brassica oleracea*, mediante la aplicación de dosis crecientes de NaHS (NaHS como donador de H<sub>2</sub>S; 0,5, 1, 2,5 y 5 mM). Los resultados mostraron que los tratamientos 0,5 y 1 mM de NaHS aumentaron la biomasa y la calidad nutricional de la col 'Bronco' (es decir, clorofilas, carotenoides, antocianinas, flavonoles, fenoles totales y sinigrina). Por otra parte, hubo un aumento en la peroxidación de lípidos y el contenido de peróxido de hidrógeno tras la aplicación de dosis superiores a 2,5 mM NaHS. Por lo tanto, seleccionamos las dosis de 0,5 y 1 mM NaHS como óptimas para las plantas de Col. La aplicación de 2,5 y 5 mM de NaHS produjo una excesiva peroxidación de lípidos, disminuciones en la biomasa de las plantas y pérdidas de clorofilas, siendo todos ellos considerados efectos negativos, y claras evidencias de estrés en las plantas. En cuanto a aplicaciones prácticas, este estudio sugiere que la aplicación exógena de NaHS como donador de H<sub>2</sub>S a 0,5 y 1 mM puede ser útil como bioestimulante para aumentar el rendimiento y la composición promotora de la salud de la planta de Col (*Brassica oleracea* L. 'Bronco').

Dada la relación íntima que guardan los procesos de asimilación de N y S en plantas, en el capítulo 2, se estudiaron los efectos de diferentes dosis de sulfuro de hidrógeno en forma de NaSH (0, 0,5, 1,2,5 y 5 mM) sobre la formación y asimilación del NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en plantas de *Brassica oleracea* L. 'Bronco'. Según nuestros resultados, los tratamientos 0,5 y 1 mM de NaSH aumentaron la biomasa mientras disminuían la concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. En el tratamiento 0,5

mM de NaSH, la acumulación de  $\text{NH}_4^+$  disminuyó con la estimulación de la actividad GS, resultando en un mayor contenido en ciertos aminoácidos (AAs) y proteínas solubles, lo que podría estar relacionado con la mayor biomasa encontrada en este tratamiento. Sin embargo, los tratamientos 2,5 y 5 mM de NaSH indujeron la formación y acumulación de  $\text{NH}_4^+$ , así como la fotorrespiración. Esta acumulación excesiva de  $\text{NH}_4^+$  pudo ser responsable de la menor biomasa en estos tratamientos (2,5 y 5 mM de NaSH). Por ello, en este capítulo concluimos que la acumulación excesiva de  $\text{NH}_4^+$  puede ser responsable de la disminución de la biomasa en los tratamientos 2,5 y 5 mM de NaSH. Por otro lado, concluimos que la aplicación de 0,5 mM de NaSH podría ser una estrategia beneficiosa para mejorar los procesos involucrados en la asimilación del N, acompañada de un aumento de la biomasa de los cultivos de col.

A continuación, en el capítulo 3, se investigó cómo la aplicación de sulfuro de hidrógeno (0,5 mM de NaHS) en *Brassica oleracea* L. 'Bronco' influye en los procesos implicados en la homeostasis del glutatión y la tolerancia al estrés alcalino (50mM  $\text{NaHCO}_3:\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Según nuestros resultados, el estrés alcalino aumenta el contenido en  $\text{O}_2^-$ , la peroxidación de lípidos y las actividades de las enzimas glioxalasa I (Gly I) y glioxalasa II (Gly II) que desintoxican el metilglioxal (MG) al tiempo que disminuyen la biomasa, la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), la actividad de las enzimas que intervienen en la síntesis de glutatión (GSH) y en el ciclo AsA-GSH, así como el contenido en glutatión reducido y las diferentes formas de ascorbato (AsA). Por otro lado, la aplicación del NaHS mejoró la respuesta antioxidante, induciendo la actividad SOD y mejorando los procesos involucrados en la homeostasis del



glutación, impulsando el contenido en glutatión reducido (GSH) así como la actividad de las enzimas clave en la síntesis del glutatión y en el ciclo de AsA-GSH. En consecuencia, la aplicación de H<sub>2</sub>S en forma de NaHS a una concentración de 0,5 mM podría fortalecer la tolerancia de *Brassica oleracea* L. 'Bronco' frente a estrés alcalino.

Por último, en el capítulo 4 se investigó como la aplicación de sulfuro de hidrógeno (50 µM de NaHS) en plantas de *Arabidopsis thaliana* L. influyó sobre la expresión relativa de los genes implicados en la asimilación del azufre, la homeostasis del glutatión y la implicación de éstos en la tolerancia al estrés alcalino (50mM NaHCO<sub>3</sub>:Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). De acuerdo con nuestros resultados la aplicación de H<sub>2</sub>S (NaHS) mitigó el efecto nocivo del estrés alcalino evidenciado por la reducción en la pérdida de biomasa del 31 % tras aplicar H<sub>2</sub>S a plantas sometidas a estrés alcalino. Por otro lado, no se observaron incrementos significativos específicos en respuesta a la aplicación de H<sub>2</sub>S sobre la expresión relativa de los genes implicados en la biosíntesis de las enzimas e isoenzimas claves en la regulación de los procesos de asimilación de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Serat 1,1; OAS TL, OAS TL B; OAS TL C; ATPS ; ATPS 2, ATPS 3; ATPS 4 y APR 1) y la homeostasis del glutatión (GMPasa; GDPME; L-GAL PPasa; LGALDH; L-GLDH; SOD 1;SOD 2; APX; MDHAR; GR2; GR 1; gsh 1; gsh 2 y GPX) bajo condiciones de estrés alcalino.



## ABSTRACT

In chapter 1, the potential effects of hydrogen sulfide on the biomass of the aerial part, the nutritional quality and the antioxidant capacity of *Brassica oleracea* were investigated, through the application of increasing doses of NaHS (NaHS as a donor of H<sub>2</sub>S; 0.5, 1, 2.5 and 5 mM). The results showed that the treatments 0.5 and 1 mM of NaHS increased the biomass and the nutritional quality of the 'Bronco' cabbage (that is, chlorophylls, carotenoids, anthocyanins, flavonols, total phenols and sinigrin). On the other hand, there was an increase in lipid peroxidation and hydrogen peroxide content after the application of doses above 2.5 mM NaHS. Therefore, we selected the doses of 0.5 and 1 mM NaHS as optimal for the plants of Col. The application of 2.5 and 5 mM NaHS produced an excessive peroxidation of lipids, decreases in the biomass of the plants and losses of chlorophylls, being all of them considered negative effects, and clear evidence of stress in the plants. In terms of practical applications, this study suggests that the exogenous application of NaHS as a donor of H<sub>2</sub>S at 0.5 and 1 mM can be useful as a biostimulant to increase the yield and health-promoting composition of the cabbage plant (*Brassica oleracea* L. 'Bronco').

Given the intimate relationship between the processes of assimilation of N and S in plants, in chapter 2, the effects of different doses of hydrogen sulfide in the form of NaSH (0, 0.5, 1,2,5 and 5 mM) on the formation and assimilation of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in plants of *Brassica oleracea* L. 'Bronco' were studied. According to our results, the 0.5 and 1 mM NaSH treatments increased the biomass while decreasing the NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration. In the 0.5 mM NaSH treatment, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> accumulation decreased with the stimulation of GS activity, resulting in a higher content of certain amino acids (AAs) and soluble proteins, which could be

related to the higher biomass found in this treatment. However, the 2.5 and 5 mM NaSH treatments induced the formation and accumulation of  $\text{NH}_4^+$ , as well as photorespiration. This excessive accumulation of  $\text{NH}_4^+$  could be responsible for the lower biomass in these treatments (2.5 and 5 mM NaSH). Therefore, in this chapter we conclude that the excessive accumulation of  $\text{NH}_4^+$  may be responsible for the decrease in biomass in the 2.5 and 5 mM NaSH treatments. On the other hand, we conclude that the application of 0.5 mM of NaSH could be a beneficial strategy to improve the processes involved in the assimilation of N, accompanied by an increase in the biomass of cabbage crops.

Next, in Chapter 3, we investigated how the application of hydrogen sulfide (0.5 mM NaHS) in *Brassica oleracea* L. 'Bronco' influences the processes involved in glutathione homeostasis and alkali stress tolerance (50 mM  $\text{NaHCO}_3:\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). According to our results, alkaline stress increases the  $\text{O}_2^{\cdot-}$  content, lipid peroxidation and the activities of the enzymes glyoxalase I (Gly I) and glyoxalase II (Gly II) which detoxify methylglyoxal (MG) while decreasing the biomass, superoxide dismutase (SOD) activity, the activity of the enzymes involved in glutathione (GSH) synthesis and in the AsA-GSH cycle, as well as the reduced glutathione content and the different forms of ascorbate (AsA) On the other hand, the application of NaHS improved the antioxidant response, inducing SOD activity and improving the processes involved in glutathione homeostasis, boosting the reduced glutathione (GSH) content as well as the activity of key enzymes in glutathione synthesis and the AsA-GSH cycle. Consequently, the application of  $\text{H}_2\text{S}$  in the form of NaHS at a concentration of 0.5 mM could strengthen the tolerance of *Brassica oleracea* L. 'Bronco' to alkaline stress.

Finally, in Chapter 4 it was investigated how the application of hydrogen sulfide (50  $\mu$ M NaHS) in *Arabidopsis thaliana* L. plants influenced the relative expression of genes involved in sulfur assimilation, glutathione homeostasis and the involvement of these genes in alkali stress tolerance (50 mM NaHCO<sub>3</sub>:Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). According to our results, the application of H<sub>2</sub>S (NaHS) mitigated the harmful effect of alkaline stress evidenced by the reduction in biomass loss of 31% after applying H<sub>2</sub>S to plants subjected to alkaline stress. On the other hand, no significant specific increases were observed in response to the application of H<sub>2</sub>S on the relative expression of genes involved in the biosynthesis of enzymes and isoenzymes key to the regulation of SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Serat 1,1) assimilation processes; OAS TL, OAS TL B; OAS TL C; ATPS ; ATPS 2, ATPS 3; ATPS 4 and APR 1) and glutathione homeostasis (GMPase; GDPME; L-GAL PPase; LGALDH; L-GLDH; SOD 1;SOD 2; APX; MDHAR; GR2; GR 1; gsh 1; gsh 2 and GPX) under alkaline stress conditions.



## INTRODUCCIÓN GENERAL







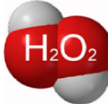

## **1 Introducción General**

### **1.1 El sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) en los sistemas vivos**

El S se puede encontrar en varios estados de oxidación biológicamente relevantes que van desde -2 como Ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S), ion sulfuro de hidrógeno (HS<sup>-</sup>) e ion sulfuro (S<sup>2-</sup>) hasta +6 como Trióxido de azufre (SO<sub>3</sub>), sulfato (SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>) y peroxosulfato (SO<sub>5</sub><sup>-2</sup>). El H<sub>2</sub>S es un gas incoloro con olor a huevos podridos, es importante en el ciclo biogeoquímico del S y es utilizado como fuente de energía por bacterias purpuras (Chromatiales) y verdes (Chlorobiales) del azufre. Es un ácido débil con pKa1 de 6,9 y pKa 2 > 12 y una solubilidad acuosa de 80 mM a 37 °C. Por tanto, a pH fisiológico de 7.4, la relación de HS<sup>-</sup>:H<sub>2</sub>S es de 3:1. Para mayor brevedad, el H<sub>2</sub>S se usa para referirse al total de grupos de sulfuros libres (es decir, H<sub>2</sub>S + HS<sup>-</sup> + S<sup>2-</sup>) (Kabli y Banerjee 2010). Este gas se produce en ambientes naturales como bolsas de petróleo y gas natural, formando parte de gases volcánicos, en manantiales de aguas termales, aguas pantanosas, lagunas o aguas estancadas. También puede tener un origen antropológico y producirse en desagües, tanques de harinas o aceite de pescado, barcos pesqueros y alcantarillado.

Durante el siglo pasado, se pensaba que el H<sub>2</sub>S era sólo una molécula tóxica, y no fue hasta 1990 que Kimura y colaboradores revelaron su papel en las funciones esenciales de la fisiología humana, abriendo un nuevo campo emergente de las ciencias de la vida (Abe y Kimura, 1996). El primer ensayo fisiológico publicado en 1996 demostró que El H<sub>2</sub>S actúa como un neuromodulador endógeno (Abe y Kimura, 1996). La participación del H<sub>2</sub>S en muchas actividades fisiológicas y procesos patológicos en los animales se ha

descrito en las dos últimas décadas, incluyendo su papel en la regulación de la proliferación celular, la apoptosis, los procesos inflamatorios, la hipoxia, la neuromodulación, y cardio protección (Wang, 2014; Olan, 2015; Paul y Snyder, 2015). Por lo tanto, el H<sub>2</sub>S es ahora aceptado como un "gasotransmisor" (compuesto gaseoso de señalización) que es tan importante como molécula de señalización, como lo son el óxido nítrico (NO) y el monóxido de carbono (CO) en los mamíferos, y el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en las plantas (Kimura, 1996; Martelli et al., 2015; Paul y Snyder, 2012). El término "gasotransmisor" se introdujo en 2002 para describir estas moléculas, que tienen en común, que se producen endógenamente con una función de señalización, que se generan por vías enzimáticas y son permeables a las membranas celulares, además de que su biosíntesis endógena puede ser regulada, siendo su efecto dosis-dependiente (Esquema 1). Sin embargo, el interés científico por el H<sub>2</sub>S en el pasado también se debió principalmente a su papel en importantes y devastadoras enfermedades humanas, como los trastornos neurodegenerativos, incluidas la enfermedad de Alzheimer, Parkinson y de Huntington (Pau et al., 2014); y el cáncer (Wu et al., 2015; Wu et al., 2018).

				
Name	Hydrogen sulfide	Nitric oxide	Hydrogen peroxide	Carbon monoxide
Chemical formula	H-S-H	N=O	HO-OH	C=O
Molecular mass (g mol <sup>-1</sup> )	34.08	30.01	34.01	28.01
Chemical reactivity	Very high	Very high	High	Moderate
Toxicity concentration	5-30 μM	0.5-150 μM	0.5-500 μM	30-50 ppm
Enzymatic production	Animals	Plants	Animals	Plants
	CBS CSE 3-MTS	L-/D-DES CAS CS SiR	eNOS iNOS nNOS	NRs NOS?
Concentration in cells	nM-μM	nM	nM-μM	nM-μM
Half life in vivo	Seconds-minutes	seconds	Seconds-minutes	Minutes
Protein modification	Persulfidation	s-nitrosation	s-sulfenylation	?

CBS: cystathionine β-synthase; CSE: Cystathionine γ-lyase; 3-MTS: 3-mercaptopyruvate sulfur transferase; L-/D-DES: cysteine desulfhydrase; CAS: β-cyano-alanine synthase; CS: cysteine synthase; SiR: Sulfite reductase; NOS: Nitric oxide synthase; NRs: Nitrate reductases; PAO: polyamine oxidase; SOD: Superoxide dismutase; POX: peroxidase; HO-1: Heme oxygenase 1.

**Esquema 1:** Comparación de las moléculas de señalización en plantas y mamíferos. Se considera que el sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S), el óxido nítrico (NO), el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el monóxido de carbono (CO) son moléculas señalizadoras en diversas e importantes vías fisiológicas de las células. Estas moléculas inorgánicas se producen endógenamente por vías enzimáticas y tienen masas moleculares similares pero una reactividad química diferente. Adaptación de Aroca et al. 2020.

Por otra parte, aunque las primeras descripciones de los efectos del H<sub>2</sub>S en las plantas datan de la década de 1960 (Rodríguez-Kabana et al., 1965), el interés por el papel del H<sub>2</sub>S en los sistemas vegetales surgió más tarde. No fue hasta la última década que los efectos del H<sub>2</sub>S fueron descritos en la germinación de semillas (Zhang et al., 2008), en el número y la longitud de las raíces adventicias (Zhang et al., 2009) y la regulación de los genes involucrados en la fotosíntesis (Shen et al., 2011). A partir de entonces, los efectos protectores del H<sub>2</sub>S exógeno contra diferentes tipos de estrés fueron documentados, como la protección frente al estrés oxidativo, estrés por metales (Zhang et al., 2008; Zhang et al., 2010), tolerancia a la sequía y al calor (Shen et al., 2013; Li et al., 2012) y estrés osmótico y salino (Shi et al., 2013). De esta manera, emergieron numerosas publicaciones sobre el efecto dosis dependiente del H<sub>2</sub>S,

postulándose como una importante molécula de señalización que tiene una función análoga en los sistemas vegetales a la descrita en mamíferos.

También se demostró que el H<sub>2</sub>S es un regulador de otros procesos fisiológicos importantes en las plantas, como la apertura/cierre estomático (Papanatsiou et al., 2015). Por lo tanto, su importancia en la mitigación del estrés por sequía se debe a la capacidad del H<sub>2</sub>S de inducir el cierre de estomas en *Arabidopsis thaliana* (García-Mata y Lamattina, 2010) Otro efecto positivo del H<sub>2</sub>S fue descrito por Dooley y colaboradores, quienes demostraron que dosis bajas de H<sub>2</sub>S afectan fuertemente el metabolismo de las plantas, mejoran la germinación, provocan un crecimiento significativo de las plantas y aumentan la biomasa, lo que conduce a un mayor rendimiento de los frutos (Dooley et al., 2013). También se ha demostrado que el H<sub>2</sub>S participa en la regulación de la senescencia de la flor en plantas (Zhang et al., 2011), en la formación de raíces laterales en el tomate, mediada por la regulación de la auxina (Fang et al., 2014) y en la biosíntesis de la nicotina en el tabaco (Chen et al., 2016).

## 1.2 Importancia del S en la nutrición de las plantas

El S es un elemento esencial para todos los organismos vivos como componente clave de los aminoácidos cisteína y metionina, así como de cofactores, polisacáridos, lípidos y centros de Hierro-azufre. Son las plantas junto con hongos y procariotas los encargados de asimilar este elemento mediante su reducción e incorporación a moléculas orgánicas a partir de sulfato a través de la llamada ruta de asimilación reductora del sulfato (Takahashi et al., 2011).

El primer paso en la utilización del S por parte de las plantas es, por tanto, la captación de sulfato inorgánico por los transportadores de sulfato. Una vez en la epidermis, el sulfato se transfiere de célula en célula al cilindro central a través de plasmodesmos. El sulfato puede transportarse vía apoplástica en algunas especies vegetales. Se cree que existe un transportador pasivo que permite el paso del sulfato del apoplasto al citoplasma, pero aún no ha sido identificado. Una vez dentro de la célula, el sulfato se almacena en la vacuola, o es metabolizado inmediatamente. (Takahashi et al., 2011; Takahashi et al., 2010).

Usando la energía de la hidrólisis del ATP, el sulfato es activado formándose adenosina 5'fosfosulfato (APS) mediante una reacción de adenilación. Esta reacción está catalizada por la ATP sulfurilasa (ATPS). El enlace de alta energía formado entre el sulfato y el fosfato hará que una catálisis enzimática posterior esté termodinámicamente favorecida y, por el contrario, la síntesis de APS será termodinámicamente desfavorable. En plantas, la síntesis de APS es impulsada gracias a la hidrólisis del pirofosfato. Al contrario que en animales, las plantas son capaces de reducir el sulfato activado (APS) en los plastos hasta sulfito mediante la reacción catalizada por la enzima APS reductasa (APR). El sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) generado en esta reacción es posteriormente reducido a sulfuro ( $\text{S}^{2-}$ ) por la enzima dependiente de ferredoxina sulfito reductasa (SiR), y finalmente incorporado a O-acetilserina (OAS) para formar cisteína, precursor directo o indirecto de todos los compuestos orgánicos que contienen S reducido en plantas y animales. Este proceso denominado vía de asimilación reductora de sulfato (Esquema 1) en la que el azufre se incorpora al

metabolismo primario, es esencial para la supervivencia, y no puede ser reemplazada por ninguna otra vía enzimática (Takahashi et al., 2011).

El sulfuro formado por la sulfito reductasa es incorporado a la OAS por la acción de la enzima O-acetilserina tiol liasa (OAS-TL) formando cisteína. El compuesto OAS es sintetizado a su vez a partir de serina y acetil-coenzima-A por la enzima serina acetiltransferasa (SAT) (Wirtz y Hell, 2006). En condiciones normales la síntesis de cisteína está limitada por la concentración de OAS más que por los niveles de sulfuro, ya que la concentración de OAS está muy por debajo de la  $K_m^{OAS}$  en las diferentes isoformas de OAS-TL, mientras que la concentración de sulfuro en cloroplastos y citosol son mayores que la  $K_m^{sulfuro}$  (Kruger et al., 2009). Cabe destacar que mientras el sulfuro se produce exclusivamente en los plastos, la síntesis de cisteína tiene lugar en todos los orgánulos proteínogénicos. Las tres isoformas principales de las enzimas OAS-TL y SAT se encuentran en plastos, citosol y mitocondrias (Kopriva et al., 2009). Aunque cada compartimento es capaz de producir suficiente cisteína para sostener el crecimiento, bajo condiciones normales la síntesis está compartimentada.

Es necesaria una interacción coordinada que asegure que el sulfuro producido en los plastos pueda reaccionar en el citosol con el OAS generado en la mitocondria. La importancia biológica de esta división del trabajo es aún desconocida. La habilidad de las plantas para crecer con solo una isoforma de las enzimas SAT u OAS-TL muestra claramente que el OAS, el sulfuro y la cisteína pueden pasar libremente de un compartimento a otro. Por ejemplo, para la síntesis de cisteína mitocondrial el sulfuro debe atravesar cuatro membranas. Se ha sugerido que el  $H_2S$  podría difundir a través de la

membrana del cloroplasto, pero el estroma del cloroplasto está a pH 8,5 en condiciones de iluminación (Heldt et al., 1973), pH al cual el 95% del sulfuro se encuentra en forma cargada ( $\text{HS}^-$ ) por lo que la capacidad de difusión a través de la bicapa lipídica estaría muy limitada. Por ello es probablemente exista una proteína transportadora. Esta proteína unida a sulfuro podría ser el sustrato directo para OAS-TL y sería parte de lo que se postuló como “vía de intermediarios unidos” en la asimilación de sulfato (Kopriva y Koprivova, 2004), fundamentada en la detección de intermediarios unidos en la asimilación del sulfato a proteínas y la actividad tiosulfonato reductasa medidas en extractos de algas (Schmidt, 1973).

### **1.2.1 $\text{H}_2\text{S}$ como intermediario en la asimilación del $\text{SO}_4^{2-}$**

De cualquier manera, unido o libre, el  $\text{H}_2\text{S}$  es un metabolito esencial para las células de la planta e indispensable para su supervivencia. Mutantes “Knockdown” con una actividad reducida de la enzima SiR mostraron una fuerte reducción del crecimiento, y la catálisis enzimática llevada a cabo por esta enzima está considerada como un “cuello de botella” en la asimilación reductiva del sulfato que no puede ser compensada por ningún otro proceso enzimático (Khan et al., 2010). Sin embargo, probablemente debido a esta función esencial, la SiR no está regulada en la misma medida que la APS reductasa (Kopriva et al., 2009), que se considera el paso regulador clave de la vía (Scheerer et al., 2010), o el complejo de cisteína sintasa, que es responsable de la utilización de sulfuro para la síntesis de cisteína (Wirtz et al., 2004). Sin embargo, el papel esencial de la asimilación de sulfato en las plantas y la posición central del  $\text{H}_2\text{S}$  como intermediario es un hito contra el cual se deben

medir y evaluar cuidadosamente todas las demás funciones potenciales del H<sub>2</sub>S por su importancia biológica.

### **1.2.2 Mecanismos fisiológicos de respuesta al exceso de H<sub>2</sub>S**

Como se comentó anteriormente la mayor fuente de azufre disponible para las plantas es el SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> que se encuentra en el suelo, pero éstas son capaces de utilizar otras fuentes de azufre como el que se encuentra en la atmosfera de forma gaseosa como son el dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) y el H<sub>2</sub>S que existían en mayor cantidad antes de los años 80, (Lamers et al., 2013). La forma en que las plantas se enfrentan a la exposición a estos gases tóxicos (a altas concentraciones) se debe en gran parte a su asimilación en compuestos orgánicos de S, aunque también existen otros mecanismos de desintoxicación (Yarmolinsky et al., 2013; Riemenschneider et al., 2005). Por lo tanto, la exposición al SO<sub>2</sub> conduce tanto a una mayor reducción del gas a sulfuro como a la síntesis de cisteína y glutatión (Brunold et al., 1983). Sin embargo, parte del SO<sub>2</sub> se oxida a SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> mediante la enzima sulfito oxidasa. El H<sub>2</sub>S, por otra parte, se asimila principalmente a los tioles (Durenkanp y De Kok, 2004). La rápida asimilación de los gases es importante, ya que causan rápidamente la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés oxidativo. El aumento de la síntesis de cisteína, con sulfuro como intermediario, cumple así dos propósitos; reduciendo la concentración activa de los gases en las hojas, y también haciendo que haya más glutatión disponible para proteger contra el estrés oxidativo.

### **1.2.3 Producción de H<sub>2</sub>S endógeno en plantas**



A parte de la enzima SiR existen al menos cuatro enzimas más capaces de producir H<sub>2</sub>S. La OAS-TL que sintetiza cisteína a partir de OAS y sulfuro, también puede catalizar de manera reversible produciendo H<sub>2</sub>S a partir de cisteína (Riemenschneider et al., 2005 b).

En segundo lugar, la enzima principal en cuanto a cantidad de H<sub>2</sub>S producido es la L-cisteína desulfurilasa (LCD) que metaboliza la cisteína en H<sub>2</sub>S, piruvato y amonio (Harrington y Smith, 1980; Álvarez et al., 2010) Además, una enzima homóloga a la O-acetilserina (tiol) liasa DES1 también muestra actividad L-cisteína desulfurilasa en Arabidopsis (Álvarez et al., 2010).

En tercer lugar, la b-cianoalanina sintasa, utiliza cisteína para desintoxicar el cianuro con H<sub>2</sub>S como subproducto (Akopyan et al., 1975; Hatzfeld et al., 2000). El cianuro se forma durante la síntesis de etileno y es un potente inhibidor de la cadena respiratoria, por lo tanto, la b-cianoalanina sintasa está presente en las mitocondrias (Hatzfeld et al., 2000; Warrillouw y Hawkesford, 2000). La cuarta enzima implicada en la homeostasis del H<sub>2</sub>S en plantas es la D-cisteína desulfhidrida, que de manera similar a la DES1 produce piruvato, amonio y H<sub>2</sub>S (Hatzfeld et al., 2000). Curiosamente, aunque los sustratos se diferencian solo en la quiralidad, las dos proteínas, la L-cisteína y la D-cisteína desulfhidrasa, no están relacionadas, excepto que ambas usan piridoxal fosfato como cofactor.

Si bien todas estas enzimas son capaces de producir H<sub>2</sub>S, solo la OAS-TL parece ser capaz de asimilar H<sub>2</sub>S. Además, los productores de H<sub>2</sub>S difieren en su capacidad para inducir rápidamente un "estallido" de H<sub>2</sub>S como se esperaría por su función en la señalización. La liberación de H<sub>2</sub>S por la b-cianoalanina sintasa y la D-cisteína desulfhidridasa depende de los sustratos que se

encuentran en baja concentración en las células vegetales, por lo que su papel en la homeostasis del H<sub>2</sub>S aún no está muy clara.

#### **1.2.4 Efectos del H<sub>2</sub>S exógeno sobre la asimilación del SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>**

La exposición al H<sub>2</sub>S tiene consecuencias en la nutrición del azufre a todos los niveles. El aumento de la disponibilidad de cisteína en las plantas fumigadas reduce la demanda de captación y reducción de SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, de hecho, la captación de SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> y la APS reductasa están reprimidas en gran medida en las plantas expuestas a SO<sub>2</sub> o H<sub>2</sub>S (Yarmolinsky et al., 2013). Curiosamente, los efectos de la fumigación y los mecanismos de regulación difieren en las especies de plantas individuales (Durenkamp et al. 2007). Por lo general, la fumigación con H<sub>2</sub>S alivia los síndromes de inanición por SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> (Koralewska et al 2008). Las plantas cultivadas en solución nutritiva sin SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> sostienen el crecimiento cuando se exponen simultáneamente a H<sub>2</sub>S.

El H<sub>2</sub>S asimilado en las hojas puede proporcionar suficiente S para la síntesis de proteínas y todos los demás componentes celulares necesarios para el crecimiento, y puede considerarse un nutriente. De hecho, en algunos ecosistemas, el H<sub>2</sub>S es una fuente importante, si no la principal, de S ambiental. En este sentido, un estudio realizado sobre isótopos de S reveló que en muchas plantas de pantanos y pastos marinos más del 50% del azufre se origina a partir del H<sub>2</sub>S. Sin embargo, este H<sub>2</sub>S no es atmosférico, sino que se origina en el suelo a través del metabolismo anaeróbico de bacterias (Lamers et al., 2013). Por lo tanto, si bien la función del H<sub>2</sub>S como nutriente y fuente de S para el crecimiento de las plantas puede ser marginal para las plantas y cultivos tradicionales, es muy importante en suelos y ecosistemas específicos.

### **1.2.5 Relación entre los metabolismos del S y el N en plantas**

Las vías de asimilación del S y el N están bien coordinadas, y se ha demostrado que la deficiencia de un elemento dificulta en gran medida la vía metabólica de asimilación del otro. En particular, el S es un nutriente esencial para los aminoácidos azufrados (cisteína y metionina), los antioxidantes naturales (glutathión reducido; GSH), las coenzimas, los grupos prostéticos (ferredoxina), las vitaminas, los metabolitos secundarios, las fitoquelatinas (PC), los lípidos y la asimilación de N (Scherer, 2008). En este sentido, algunos autores afirman que la adición de este mineral en forma de sulfato de amonio aumenta la biomasa y el rendimiento en plantas como el trigo y mejora la eficiencia en el uso de N (NUE) (Salvagiotti et al., 2009). Otros investigadores afirman que el reabastecimiento de  $\text{SO}_4^{2-}$  después de 3 días de privación de S reactiva rápidamente el proceso de asimilación de N al estimular la actividad de enzimas como la nitrato reductasa (NR) y glutamina sintetasa (GS) (Zhang et al., 2015a, 2015b).

El N, a pesar de ser un macronutriente esencial, a menudo actúa como un factor limitante del crecimiento (Antal et al., 2010). En condiciones normales, el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) es la principal fuente de N y su asimilación es esencial para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas (Cruz et al., 2004). La disponibilidad de  $\text{NO}_3^-$  se ha definido como uno de los factores más limitantes en el crecimiento de los cultivos (Glass, 2003). Este nutriente es esencial para la planta como parte de los ácidos nucleicos y aminoácidos, realizando funciones de señalización y regulación de proteínas. Además, también tiene

una gran importancia en la bioquímica de compuestos tales como coenzimas, pigmentos, metabolitos secundarios y poliaminas (Maathuis, 2009).

La reducción de  $\text{NO}_3^-$  en amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) involucra la acción secuencial de la NR y la nitrito-reductasa (NiR) (Oliveira et al., 2001). Otra vía por la que las plantas pueden producir  $\text{NH}_4^+$  es la fotorrespiración. Este proceso puede producir 20 veces más  $\text{NH}_4^+$  que la generada por la reducción de  $\text{NO}_3^-$  y se considera la mayor fuente de este catión, especialmente en las plantas C3 (Hirel y Lea, 2001). El  $\text{NH}_4^+$  a elevadas concentraciones es tóxico para las plantas, causando la extrusión de protones asociada con la absorción de  $\text{NH}_4^+$ , alteraciones del pH citosólico, y desacoplamiento de la fotofosforilación (Kronzucker et al., 2001). Por lo tanto, debe ser rápidamente asimilado en compuestos orgánicos de N a través de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintetasa (GOGAT). Alternativamente, la glutamato deshidrogenasa (GDH) también puede catalizar la incorporación del  $\text{NH}_4^+$  al glutamato por la aminación reductora del 2-oxoglutarato (Cammaerts y Jacobs, 1985). Aunque el papel fisiológico exacto de esta enzima en el crecimiento y desarrollo de las plantas no están claros, se sabe que es activado por el  $\text{NH}_4^+$  y se postula como vía anaplerótica activada bajo condiciones ambientales adversas (Bittsánszky et al., 2015). Tradicionalmente, la aplicación de  $\text{NO}_3^-$  a suelos deficientes en nutrientes ha mejorado la salud de las plantas y por tanto la producción de los cultivos (Garnett et al., 2009). Algunos investigadores han mejorado el proceso de asimilación del  $\text{NO}_3^-$  por sobreexpresión de las enzimas clave involucradas en este proceso (GS y GOGAT), demostrando que ésta inducción aumenta la biomasa y el rendimiento de los granos en cultivos como el frijol y arroz (Yamaya et al., 2002).

### **1.3 Concepto de estrés alcalino en los cultivos**

Uno de los estreses ambientales en los que todavía no ha sido probado experimentalmente el efecto de la aplicación de H<sub>2</sub>S es el estrés alcalino.

El estrés alcalino podría definirse como el estrés producido por sales alcalinas como el NaHCO<sub>3</sub> Y el Na CO<sub>3</sub>. Por tanto, es importante recalcar que este tipo de estrés lo causan sales alcalinas y no neutras (NaCl), que causan lo que comúnmente se conoce como "estrés por salinidad" (Shi y Sheng, 2005; Shi y Wang, 2005). Sin embargo, el efecto de ambos tipos de estrés puede ser similar. Por otro lado, hay varios investigadores que afirman que el estrés por alcalinidad provoca daños más severos que el estrés por salinidad. (Kawanabe y Zhu, 1991; Wang et al., 2008).

El estrés alcalino, es muy común en zonas áridas y semiáridas, disminuye la productividad agrícola en estas regiones, donde la agricultura es normalmente intensiva. En todo el mundo, el 10% de los suelos cultivados están sujetos a condiciones de estrés alcalino (Tanji, 2002), y la FAO predice que para el año 2050 la reducción de la tierra disponible para la agricultura por la presencia de estos tipos de estrés superará el 50% (Jin et al., 2008).

#### **1.3.1 Efecto del estrés alcalino sobre la fisiología de las plantas**

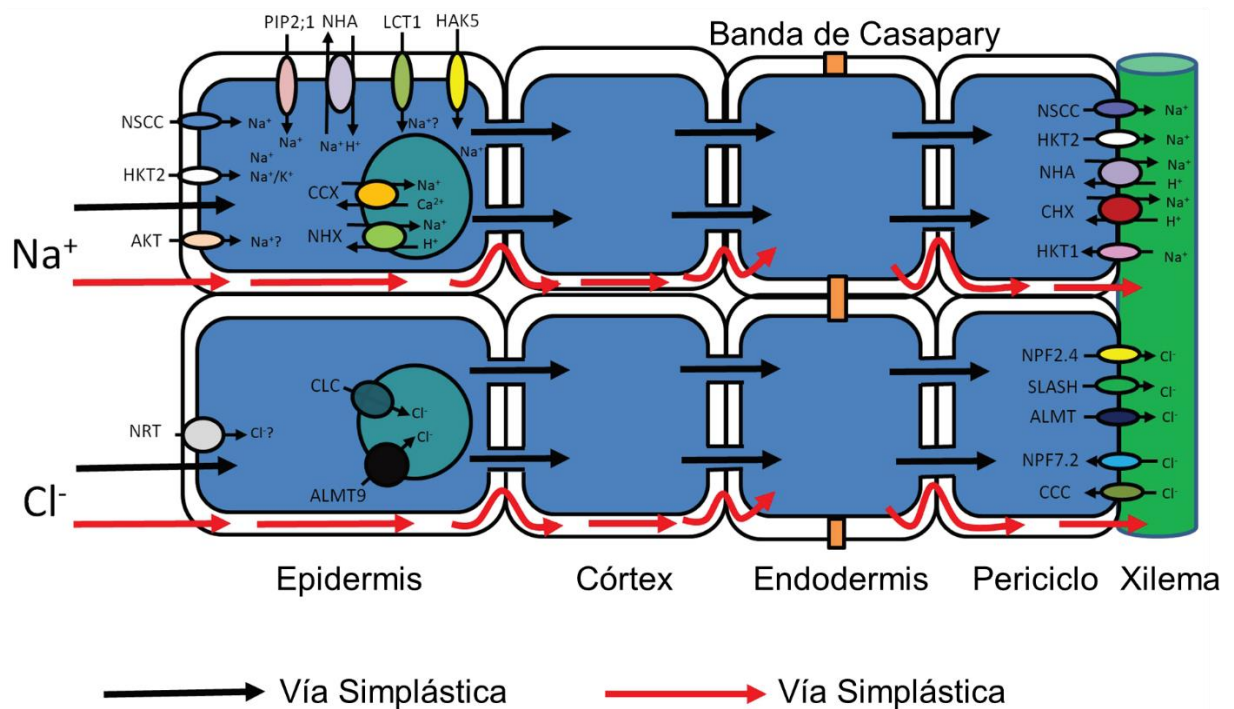
El elevado pH y la acumulación masiva de sodio (Na<sup>+</sup>) provocada por el estrés alcalino pueden dar lugar a una falta de protones y a la alteración o inhibición de los gradientes y/o potenciales electroquímicos en las células radiculares, alterando muchas funciones fisiológicas, como la captación de agua y de iones (Wang et al., 2011a; Wang et al., 2011b). Debido a estas alteraciones de las

funciones fisiológicas de la raíz, el estrés alcalino ( $\text{pH} > 8,5$ ) inhibe el crecimiento y la fotosíntesis.

La inhibición de la fotosíntesis es el resultado de la degradación de los pigmentos fotosintéticos, a menudo debido al estrés alcalino por la menor captación de  $\text{Mg}^{2+}$  causada por su precipitación en la rizosfera (Li et al., 2010). Otros autores sostienen que la limitación en la disponibilidad del P debido a su precipitación en condiciones alcalinas puede disminuir la ingesta de  $\text{CO}_2$  para la fotosíntesis (Fredeen et al., 1990). La reducción de la captación de  $\text{CO}_2$  debido a este tipo de estrés causa daño oxidativo en las células y altera el metabolismo antioxidante, generando ROS, ya que el exceso de electrones producidos durante la fotosíntesis se transfiere a las moléculas de  $\text{O}_2$  produciéndose ROS (Cakmak, 2005).

### **1.3.2 Relación entre estrés alcalino y estrés iónico en plantas**

El estrés alcalino trae consigo asociado de forma inherente un estrés iónico debido a que las sales alcalinas en disolución aportan grandes cantidades de  $\text{Na}^+$  al medio. Es por ello que cuando se da esta acumulación de sales en el suelo, la planta empieza a absorber los iones que componen estas sales incrementando los daños en las diferentes estructuras celulares. El mecanismo por el cual las plantas bajo condiciones de estrés alcalino-salino absorben  $\text{Na}^+$  es un mecanismo complejo. Como se muestra en el esquema 2, la absorción ocurre vía simplástica y apoplástica, proceso en el cual están implicados más de una docena de transportadores diferentes (Isayenkov y Maathus, 2019).



**Esquema 2:** Representación gráfica del mecanismo de entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en plantas. Adaptación de Isayenkov y Maathuis (2019).

Como hemos indicado, la absorción excesiva de  $\text{Na}^+$  también genera una toxicidad en si misma alterando el metabolismo y la ionómica de la planta (Acosta-Motos et al. 2017). Por lo general, un exceso en la absorción de este ion provoca una reducción de la absorción y una alteración en la distribución de otros nutrientes y compuestos esenciales para el metabolismo de la planta como potasio ( $\text{K}^+$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ),  $\text{NO}_3^-$  o fosfatos ( $\text{PO}_4^-$ ) (Acosta-Motos et al., 2017; Liang et al., 2018; Isayenkov y Maathuis, 2019). Todo ello unido a la incapacidad de los transportadores iónicos de ejercer su función, producida por el elevado pH contribuye a generar un desbalance con múltiples efectos nocivos sobre el metabolismo primario y secundario de la planta. Con el fin de

evitar estas alteraciones metabólicas y el efecto tóxico de la acumulación de  $\text{Na}^+$  algunas plantas han desarrollado estrategias de defensa como:

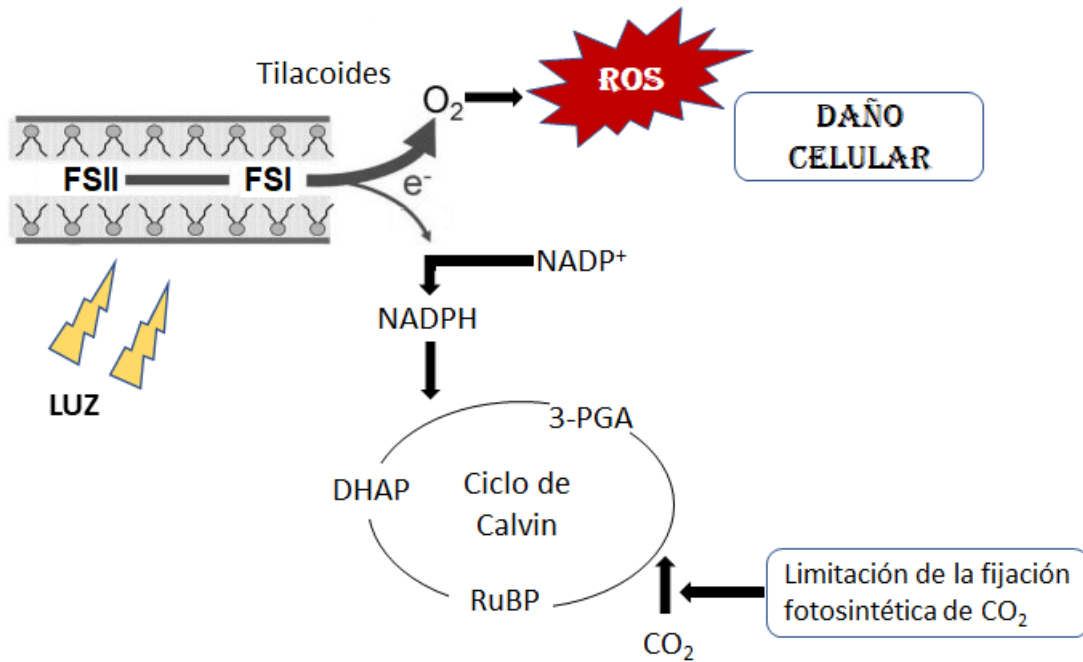
- La exclusión, donde el  $\text{Na}^+$  junto con el cloro ( $\text{Cl}^-$ ) son expulsados directamente a la rizosfera a través de canales iónicos específicos, evitando de esta manera el estrés osmótico e iónico generado por la absorción de estos iones (Wu, 2018).
- Acumulación de  $\text{K}^+$  y su concentración relativa con respecto al  $\text{Na}^+$  puede constituir, en sí mismo, un mecanismo de defensa frente a este tipo de estrés (Munns y Tester, 2008), debido a que ambos iones tienen un comportamiento osmótico similar. El  $\text{K}^+$  puede competir con la entrada de  $\text{Na}^+$  en la raíz y en las células corticales, por lo que si la planta logra mantener un ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  bajo esta podría mejorar su tolerancia al estrés (Isayenkov y Maathuis, 2019).
- Compartimentalización, que constituye otro mecanismo común y de gran importancia de tolerancia frente a este tipo de estrés, donde los iones de  $\text{Na}^+$  son reducidos en el interior de las vacuolas mediante antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  evitando así las alteraciones osmóticas y bioquímicas que se generan (Acosta-Motos et al., 2017; Liang et al., 2018; Isayenkov y Maathuis, 2019). Sin embargo, para la compartimentalización se requiere un incremento consecuente de la presión osmótica en el citosol, lo que puede darse por ejemplo mediante una acumulación de  $\text{K}^+$  o compuestos osmocompatibles (Munns y Tester, 2008).



### **1.3.3 Producción de ROS y respuesta antioxidante en cultivos que sufren condiciones de estrés alcalino**

Si el estrés alcalino-salino se mantiene en el tiempo comienzan a generarse multitud de alteraciones metabólicas en las plantas. En las hojas adultas comienzan a acumularse sales que la planta no puede diluir lo que provoca desajustes en el metabolismo de ésta, que dan lugar por lo general a la formación de ROS, y a la aparición de daño y muerte celular que puede conllevar la muerte de la planta (Acosta-Motos et al., 2017; Isayenkov y Maathuis, 2019). Además, si la tasa de crecimiento de hojas jóvenes es inferior a la pérdida de hojas adultas, la maquinaria fotosintética no puede abastecer de carbohidratos a las hojas jóvenes, reduciendo aún más el ratio de crecimiento (Munns y Tester, 2008).

La reducción de la capacidad fotosintética generada por el estrés alcalino-salino es la principal causa de generación de ROS, que se acumulan en las hojas provocando un daño oxidativo a estructuras celulares, compuestos y alterando drásticamente el metabolismo de la planta completa (Acosta-Motos et al., 2017; Liang et al., 2018). Además de la reducción de la capacidad fotosintética, el estrés alcalino provoca el cierre de los estomas, entre otras causas por una reducción en la concentración de  $K^+$ . El cierre estomático reduce el flujo de  $CO_2$  en las hojas y su asimilación en el ciclo de Calvin, lo que causa que los electrones que provienen de la fotólisis del  $H_2O$  no encuentren los equivalentes de  $NADP^+$  procedente de la fijación del  $CO_2$ , lo que conlleva que estos electrones puedan unirse al oxígeno molecular ( $O_2$ ) libre, generándose de esta manera las ROS (Esquema 3).



**Esquema 3:** Representación esquemática de la generación de ROS debido a la limitación de CO<sub>2</sub> proveniente de la fotosíntesis de las plantas. Adaptación de Cakmak (2005).

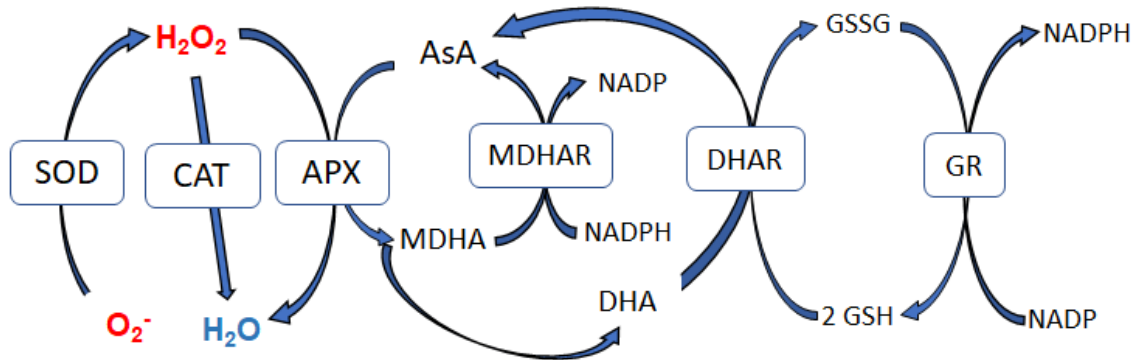
Las ROS generadas bajo condiciones de estrés alcalino-salino han de ser eliminadas para evitar el daño oxidativo a estructuras celulares y procesos bioquímicos. Las ROS reaccionan con las membranas celulares especialmente en las membranas de los tilacoides que son ricas en ácidos grasos insaturados. La peroxidación lipídica produce la ruptura de lípidos, lo cual afecta a su función en las membranas, causando pérdida de fluidez, rotura de los enlaces lipídicos e inactivación de enzimas de membrana (Miyake et al., 2005).

Para evitar este daño oxidativo, las plantas disponen de mecanismos de detoxificación de ROS. Estos mecanismos pueden dividirse en sistemas enzimáticos constituidos por las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (GR). Por otro lado, las plantas también disponen de sistemas antioxidantes no

enzimáticos, formados por compuestos antioxidantes como los compuestos fenólicos (fenoles, flavonoides, carotenoides, etc.), ácido ascórbico (AsA) y glutatión (GSH) (Shalata et al., 2001; Reddy et al., 2004). El incremento en la concentración de iones  $\text{Na}^+$  así como la alteración de la absorción de nutrientes por el elevado pH hacen que se incremente las ROS, que provoca a su vez un incremento en la actividad de las enzimas que intervienen en la respuesta antioxidante, así como un incremento de la síntesis de compuestos antioxidantes (Singh et al., 2017; Liang et al., 2018).

La SOD constituye la primera línea de defensa frente a las ROS y provoca la dismutación del ion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) en peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) parte del cual es neutralizado por la enzima CAT (esquema 4). Esta enzima en las hojas se encuentra únicamente en los peroxisomas que son los encargados de la detoxificación mediante una reacción peroxidasa, siendo el donador más común en esta reacción el AsA (Aroca et al. 2002). Por otro lado, el AsA está presente a elevadas concentraciones en los cloroplastos, citosol, vacuolas y espacio apoplástico de las células de la hoja, y tiene un papel fundamental en la neutralización del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El AsA se oxida hasta monodehidroascorbato (MDHA), mediante la APX para detoxificar el  $\text{H}_2\text{O}_2$  siendo regenerado por dos enzimas, la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), que utiliza NADPH como donador de electrones, y la dehidroascorbato reductasa (DHAR) que utiliza dos moléculas de GSH (Esquema 4). El GSH es el compuesto tiolico de bajo peso molecular mayoritario en plantas, cuya función principal es la regeneración del AsA mediante la DHAR. En esta regeneración de AsA, el GSH se oxida pasando a glutatión disulfuro (GSSG). El GSH es regenerado por la glutatión reductasa (GR), en una reacción NADPH-dependiente (Arora et al.

2002) (Esquema 4). Además, el GSH por si solo puede neutralizar el oxígeno singlete y los radicales hidroxilos.



**Esquema 4:** Representación esquemática del ciclo de Foyer-Halliwell-Asada para la detoxificación de ROS, sistemas enzimáticos y no enzimáticos.

Otro sistema antioxidante no enzimático es la acumulación de compuestos fenólicos (fenoles y flavonoides). Los fenoles pueden actuar como filtro de absorción de la radiación y limitan la excitación de las clorofilas durante las condiciones desfavorables, protegiendo y conservando así el aparato fotosintético y pudiendo actuar además como antioxidantes. Entre sus mecanismos de acción antioxidante se encuentran (Harbone y Willians 2000):

- La supresión de la formación de ROS por inhibición de enzimas.
- El secuestro de ROS, evitando el daño oxidativo.
- La sobre-regulación o protección de los sistemas antioxidantes.

#### **1.4 Perspectivas de futuro para reducir el efecto del estrés alcalino en plantas**

Debido a todo lo indicado anteriormente es necesario mejorar el conocimiento existente sobre cómo son y donde residen los mecanismos de tolerancia al estrés alcalino en las plantas. En la última década el H<sub>2</sub>S se postula como una molécula con efectos bioestimulantes cuyo uso podría mitigar los efectos nocivos de numerosos tipos de estrés abiótico, potenciando la eficacia de los mecanismos antioxidantes de las plantas (Zhang et al., 2008; Wang et al., 2010; Dawood et al., 2012; Wang et al., 2012; Chen et al., 2013; Sun et al., 2013; Shan et al., 2014; Lai et al., 2014; Singh et al., 2015). Por otro lado, se ha observado como el H<sub>2</sub>S interviene en la apertura y cierre de estomas (García-Mata y Lamattina, 2010; Scuffi et al., 2014), así como en el crecimiento, desarrollo y procesos que combaten el envejecimiento de las plantas (Zhang et al. 2011). Curiosamente, se ha demostrado que, en los procesos fisiológicos mencionados anteriormente también están involucradas algunas otras moléculas de señalización como el Ca<sup>2+</sup> y el NO (Wang et al. 2012).

Otro de los efectos del H<sub>2</sub>S descubiertos más recientemente sobre la tolerancia de las plantas al estrés, como veremos en el último capítulo de la presente tesis, reside en su implicación en la persulfidación de proteínas diana que intervienen en los mecanismos antioxidantes, entre otros (Aroca et al. 2020). Sin embargo, los mecanismos y las proteínas que intervienen en estos procesos continúan siendo poco conocidos. Pero sin duda tras los últimos descubrimientos se abre una vía de investigación apasionante sobre esta molécula, que podría dotarnos de una potente herramienta para incrementar la

tolerancia al estrés alcalino y otros tipos de estreses abióticos en plantas cultivables.

## **1.5 Bibliografía**

Abe, K., Kimura, H., 1996. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci.* 16, 1066–1071. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-03-01066.1996>

Acosta-Motos, J.R., Ortuño, M.F., Bernal-Vicente, A., Diaz-Vivancos, P., Sanchez-Blanco, M.J., Hernandez, J.A., 2017. Plant Responses to Salt Stress: Adaptive Mechanisms. *Agronomy* 7, 18. <https://doi.org/10.3390/agronomy7010018>

Akopyan, T.N., Braunstein, A.E., Goryachenkova, E.V., 1975. Beta-cyanoalanine synthase: purification and characterization. *PNAS* 72, 1617–1621. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.4.1617>

Ali, B., Mwamba, T.M., Gill, R.A., Yang, C., Ali, S., Daud, M.K., Wu, Y., Zhou, W., 2014. Improvement of element uptake and antioxidative defense in *Brassica napus* under lead stress by application of hydrogen sulfide. *Plant Growth Regul* 74, 261–273. <https://doi.org/10.1007/s10725-014-9917-9>

Álvarez, C., Calo, L., Romero, L.C., García, I., Gotor, C., 2010. An O-Acetylserine(thiol)lyase Homolog with L-Cysteine Desulfhydrase Activity Regulates Cysteine Homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 152, 656–669. <https://doi.org/10.1104/pp.109.147975>

Antal, T., Mattila, H., Hakala-Yatkin, M., Tyystjärvi, T., Tyystjärvi, E., 2010. Acclimation of photosynthesis to nitrogen deficiency in *Phaseolus vulgaris*. *Planta* 232, 887–898. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1227-5>

Aroca, A., Gotor, C., Bassham, D.C., Romero, L.C., 2020. Hydrogen Sulfide: From a Toxic Molecule to a Key Molecule of Cell Life. *Antioxidants (Basel)* 9. <https://doi.org/10.3390/antiox9070621>

Arora, A., Sairam, R.K., Srivastava, G., 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current science* 82, 1227–1238.

Bittsánszky, A., Pilinszky, K., Gyulai, G., Komives, T., 2015. Overcoming ammonium toxicity. *Plant Science* 231, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.12.005>

Brunold, C., Landolt, W., Lavanchy, P., 1983. SO<sub>2</sub> and assimilatory sulfate reduction in beech leaves. *Physiologia Plantarum* 59, 313–318. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1983.tb04207.x>

Cakmak, I., 2005a. The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168, 521–530. <https://doi.org/10.1002/jpln.200420485>

Cakmak, I., 2005b. The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168, 521–530. <https://doi.org/10.1002/jpln.200420485>

Cammaerts, D., Jacobs, M., 1985. A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 163, 517–526. <https://doi.org/10.1007/BF00392709>

Chen, J., Wang, W.-H., Wu, F.-H., You, C.-Y., Liu, T.-W., Dong, X.-J., He, J.-X., Zheng, H.-L., 2013. Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in barley seedlings. *Plant Soil* 362, 301–318. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1275-7>



Chen, J., Wu, F.-H., Wang, W.-H., Zheng, C.-J., Lin, G.-H., Dong, X.-J., He, J.-X., Pei, Z.-M., Zheng, H.-L., 2011. Hydrogen sulphide enhances photosynthesis through promoting chloroplast biogenesis, photosynthetic enzyme expression, and thiol redox modification in *Spinacia oleracea* seedlings. *J Exp Bot* 62, 4481–4493. <https://doi.org/10.1093/jxb/err145>

Chen, X., Chen, Q., Zhang, X., Li, R., Jia, Y., Ef, A.A., Jia, A., Hu, L., Hu, X., 2016. Hydrogen sulfide mediates nicotine biosynthesis in tobacco (*Nicotiana tabacum*) under high temperature conditions. *Plant Physiol Biochem* 104, 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.02.033>

Christou, A., Manganaris, G.A., Papadopoulos, I., Fotopoulos, V., 2013. Hydrogen sulfide induces systemic tolerance to salinity and non-ionic osmotic stress in strawberry plants through modification of reactive species biosynthesis and transcriptional regulation of multiple defence pathways. *J Exp Bot* 64, 1953–1966. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert055>

Cruz, J.L., Mosquim, P.R., Pelacani, C.R., Araújo, W.L., DaMatta, F.M., 2004. Effects of nitrate nutrition on nitrogen metabolism in cassava. *Biologia Plantarum* 48, 67–72. <https://doi.org/10.1023/B:BIOP.0000024277.51293.02>

Dawood, M., Cao, F., Jahangir, M.M., Zhang, G., Wu, F., 2012. Alleviation of aluminum toxicity by hydrogen sulfide is related to elevated ATPase, and suppressed aluminum uptake and oxidative stress in barley. *Journal of Hazardous Materials* 209–210, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.12.076>

Dooley, F.D., Nair, S.P., Ward, P.D., 2013. Increased Growth and Germination Success in Plants following Hydrogen Sulfide Administration. PLOS ONE 8, e62048. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062048>

Durenkamp, M., De Kok, L.J., 2004. Impact of pedospheric and atmospheric sulphur nutrition on sulphur metabolism of *Allium cepa* L., a species with a potential sink capacity for secondary sulphur compounds. Journal of Experimental Botany 55, 1821–1830. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh187>

Durenkamp, M., De Kok, L.J., Kopriva, S., 2007. Adenosine 5'-phosphosulphate reductase is regulated differently in *Allium cepa* L. and *Brassica oleracea* L. upon exposure to H<sub>2</sub>S. J Exp Bot 58, 1571–1579. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm031>

Fang, T., Cao, Z., Li, J., Shen, W., Huang, L., 2014. Auxin-induced hydrogen sulfide generation is involved in lateral root formation in tomato. Plant Physiology and Biochemistry 76, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.12.024>

Fredeen, A.L., Raab, T.K., Rao, I.M., Terry, N., 1990. Effects of phosphorus nutrition on photosynthesis in *Glycine max* (L.) Merr. Planta 181, 399–405. <https://doi.org/10.1007/BF00195894>

García-Mata, C., Lamattina, L., 2010. Hydrogen sulphide, a novel gasotransmitter involved in guard cell signalling. New Phytologist 188, 977–984. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03465.x>

Garnett, T., Conn, V., Kaiser, B.N., 2009. Root based approaches to improving nitrogen use efficiency in plants. *Plant Cell Environ* 32, 1272–1283. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02011.x>

Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>

Glass, A.D.M., 2003. Nitrogen Use Efficiency of Crop Plants: Physiological Constraints upon Nitrogen Absorption. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22, 453–470. <https://doi.org/10.1080/07352680390243512>

Hancock, J.T., Whiteman, M., 2014. Hydrogen sulfide and cell signaling: Team player or referee? *Plant Physiology and Biochemistry* 78, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.02.012>

Harborne, J.B., Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481–504. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00235-1)

Harrington, H.M., Smith, I.K., 1980. Cysteine Metabolism in Cultured Tobacco Cells. *Plant Physiology* 65, 151–155. <https://doi.org/10.1104/pp.65.1.151>

Hatzfeld, Y., Maruyama, A., Schmidt, A., Noji, M., Ishizawa, K., Saito, K., 2000.  $\beta$ -Cyanoalanine synthase is a mitochondrial cysteine synthase-like protein in spinach and *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 123, 1163–1171. <https://doi.org/10.1104/pp.123.3.1163>

Heldt, H.W., Werdan, K., Milovancev, M., Geller, G., 1973. Alkalization of the chloroplast stroma caused by light-dependent proton flux into the thylakoid

space. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 314, 224–241.

[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(73\)90137-0](https://doi.org/10.1016/0005-2728(73)90137-0)

Hirel, B., Lea, P.J., 2001. Ammonia Assimilation, in: Lea, P.J., Morot-Gaudry, J.-F. (Eds.), *Plant Nitrogen*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 79–99.

[https://doi.org/10.1007/978-3-662-04064-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-662-04064-5_4)

Isayenkov, S.V., Maathuis, F.J.M., 2019. Plant Salinity Stress: Many Unanswered Questions Remain. *Front. Plant Sci.* 10.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00080>

Jin, H., Kim, H.R., Plaha, P., Liu, S.K., Park, J.Y., Piao, Y.Z., Yang, Z.H., Jiang, G.B., Kwak, S.S., An, G., Son, M., Jin, Y.H., Sohn, J.H., Lim, Y.P., 2008.

Expression profiling of the genes induced by Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and NaCl stresses in leaves and roots of *Leymus chinensis*. *Plant Science* 175, 784–792.

<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.07.016>

Kabil, O., Banerjee, R., 2010. Redox biochemistry of hydrogen sulfide. *J Biol Chem* 285, 21903–21907. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.128363>

Kawanabe, S., Zhu, T.C., 1991. Degeneration and conservation of *Aneurolepidium chinense* grassland in Northern China. *J. Jap. Grassland Soc.*

37, 91–99.

Khan, M.S., Haas, F.H., Samami, A.A., Gholami, A.M., Bauer, A., Fellenberg, K., Reichelt, M., Hänsch, R., Mendel, R.R., Meyer, A.J., Wirtz, M., Hell, R.,

2010. Sulfite Reductase Defines a Newly Discovered Bottleneck for Assimilatory Sulfate Reduction and Is Essential for Growth and Development in

*Arabidopsis thaliana*. The Plant Cell 22, 1216–1231.

<https://doi.org/10.1105/tpc.110.074088>

Kopriva, S., Koprivova, A., 2004. Plant adenosine 5'-phosphosulphate reductase: The past, the present, and the future. Journal of Experimental Botany 55, 1775–1783. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh185>

Kopriva, S., Mugford, S.G., Matthewman, C., Koprivova, A., 2009. Plant sulfate assimilation genes: redundancy versus specialization. Plant Cell Rep 28, 1769–1780. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0793-0>

Koralewska, A., Stuiver, C.E.E., Posthumus, F.S., Kopriva, S., Hawkesford, M.J., De Kok, L.J., 2008. Regulation of sulfate uptake, expression of the sulfate transporters Sultr1;1 and Sultr1;2, and APS reductase in Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*) as affected by atmospheric H<sub>2</sub>S nutrition and sulfate deprivation. Functional Plant Biology 35, 318–327. <https://doi.org/10.1071/FP07283>

Kronzucker, H.J., Britto, D.T., Davenport, R.J., Tester, M., 2001. Ammonium toxicity and the real cost of transport. Trends in Plant Science 6, 335–337. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02022-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02022-2)

Krueger, S., Niehl, A., Martin, M.C.L., Steinhauser, D., Donath, A., Hildebrandt, T., Romero, L.C., Hoefgen, R., Gotor, C., Hesse, H., 2009. Analysis of cytosolic and plastidic serine acetyltransferase mutants and subcellular metabolite distributions suggests interplay of the cellular compartments for cysteine biosynthesis in *Arabidopsis*. Plant, Cell & Environment 32, 349–367. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01928.x>

Lai, D., Mao, Y., Zhou, H., Li, F., Wu, M., Zhang, J., He, Z., Cui, W., Xie, Y., 2014. Endogenous hydrogen sulfide enhances salt tolerance by coupling the reestablishment of redox homeostasis and preventing salt-induced K<sup>+</sup> loss in seedlings of *Medicago sativa*. *Plant Science* 225, 117–129. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.06.006>

Lamers, L.P.M., Govers, L.L., Janssen, I.C., Geurts, J.J., Van der Welle, M.E., Van Katwijk, M.M., Van der Heide, T., Roelofs, J.G., Smolders, A.J., 2013. Sulfide as a soil phytotoxin—a review. *Front. Plant Sci.* 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00268>

LI, R., SHI, F., FUKUDA, K., YANG, Y., 2010. Effects of salt and alkali stresses on germination, growth, photosynthesis and ion accumulation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Soil Science and Plant Nutrition* 56, 725–733. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2010.00506.x>

Li, Z.-G., Gong, M., Xie, H., Yang, L., Li, J., 2012. Hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-induced heat tolerance in tobacco (*Nicotiana tabacum* L) suspension cultured cells and involvement of Ca<sup>2+</sup> and calmodulin. *Plant Science* 185–186, 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.10.006>

Li, Z.-G., Yi, X.-Y., Li, Y.-T., 2014. Effect of pretreatment with hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide on heat tolerance in relation to antioxidant system in maize (*Zea mays*) seedlings. *Biologia (Poland)* 69, 1001–1009. <https://doi.org/10.2478/s11756-014-0396-2>

Liang, W., Ma, X., Wan, P., Liu, L., 2018. Plant salt-tolerance mechanism: A review. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495, 286–291. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.043>

Lynch, D.V., Thompson, J.E., 1984. Lipoxygenase-mediated production of superoxide anion in senescing plant tissue. *FEBS Letters* 173, 251–254. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(84\)81057-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)81057-1)

Maathuis, F.J., 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology, Physiology and Metabolism* 12, 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.04.003>

Martelli, A., Testai, L., Breschi, M.C., Blandizzi, C., Viridis, A., Taddei, S., Calderone, V., 2012. Hydrogen sulphide: novel opportunity for drug discovery. *Medicinal Research Reviews* 32, 1093–1130. <https://doi.org/10.1002/med.20234>

Mittova, V., Guy, M., Tal, M., Volokita, M., 2002. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: increased activities of antioxidant enzymes in root plastids. *Free Radic Res* 36, 195–202. <https://doi.org/10.1080/10715760290006402>

Miyake, C., Miyata, M., Shinzaki, Y., Tomizawa, K., 2005. CO<sub>2</sub> Response of Cyclic Electron Flow around PSI (CEF-PSI) in Tobacco Leaves—Relative Electron fluxes through PSI and PSII Determine the Magnitude of Non-photochemical Quenching (NPQ) of Chl Fluorescence. *Plant Cell Physiol* 46, 629–637. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci067>

Munns, R., Tester, M., 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59, 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>

Olas, B., 2015. Hydrogen sulfide in signaling pathways. *Clinica Chimica Acta* 439, 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.037>

Oliveira, I.C., Brenner, E., Chiu, J., Hsieh, M.-H., Kouranov, A., Lam, H.-M., Shin, M.J., Coruzzi, G., 2001. Metabolite and light regulation of metabolism in plants: lessons from the study of a single biochemical pathway. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34, 567–575. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2001000500003>

Papanatsiou, M., Scuffi, D., Blatt, M.R., García-Mata, C., 2015. Hydrogen Sulfide Regulates Inward-Rectifying K<sup>+</sup> Channels in Conjunction with Stomatal Closure. *Plant Physiology* 168, 29–35. <https://doi.org/10.1104/pp.114.256057>

Paul, B.D., Sbodio, J.I., Xu, R., Vandiver, M.S., Cha, J.Y., Snowman, A.M., Snyder, S.H., 2014. Cystathionine  $\gamma$ -lyase deficiency mediates neurodegeneration in Huntington's disease. *Nature* 509, 96–100. <https://doi.org/10.1038/nature13136>

Paul, B.D., Snyder, S.H., 2015. Modes of physiologic H<sub>2</sub>S signaling in the brain and peripheral tissues. *Antioxid Redox Signal* 22, 411–423. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5917>

Paz, R.C., Reinoso, H., Espasandín, F.D., González Antivilo, F.A., Sansberro, P.A., Rocco, R.A., Ruiz, O.A., Menéndez, A.B., 2014. Alkaline, saline and mixed saline-alkaline stresses induce physiological and morpho-anatomical changes in *Lotus tenuis* shoots. *Plant Biology* 16, 1042–1049. <https://doi.org/10.1111/plb.12156>



Ramachandra Reddy, A., Chaitanya, K.V., Vivekanandan, M., 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J Plant Physiol* 161, 1189–1202.

<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.01.013>

Riemenschneider, A., Nikiforova, V., Hoefgen, R., De Kok, L.J., Papenbrock, J., 2005a. Impact of elevated H<sub>2</sub>S on metabolite levels, activity of enzymes and expression of genes involved in cysteine metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry* 43, 473–483. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.04.001>

Riemenschneider, A., Riedel, K., Hoefgen, R., Papenbrock, J., Hesse, H., 2005b. Impact of Reduced O-Acetylserine(thiol)lyase Isoform Contents on Potato Plant Metabolism. *Plant Physiology* 137, 892–900. <https://doi.org/10.1104/pp.104.057125>

Rodriguez-Kabana, R., Jordan, J.W., Hollis, J.P., 1965. Nematodes: Biological Control in Rice Fields: Role of Hydrogen Sulfide. *Science* 148, 524–526. <https://doi.org/10.1126/science.148.3669.524>

Salvagiotti, F., Castellarín, J.M., Miralles, D.J., Pedrol, H.M., 2009. Sulfur fertilization improves nitrogen use efficiency in wheat by increasing nitrogen uptake. *Field Crops Research* 113, 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2009.05.003>

Scheerer, U., Haensch, R., Mendel, R.R., Kopriva, S., Rennenberg, H., Herschbach, C., 2010. Sulphur flux through the sulphate assimilation pathway is differently controlled by adenosine 5'-phosphosulphate reductase under stress and in transgenic poplar plants overexpressing  $\gamma$ -ECS, SO, or APR. *J Exp Bot* 61, 609–622. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp327>

Scherer, H.W., 2008. Impact of Sulfur on N<sub>2</sub> Fixation of Legumes, in: Khan, N.A., Singh, S., Umar, S. (Eds.), Sulfur Assimilation and Abiotic Stress in Plants. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 43–54. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-76326-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-540-76326-0_3)

Schmidt, A., 1973. Sulfate reduction in a cell-free system of *Chlorella* - The ferredoxin dependent reduction of a protein-bound intermediate by a thiosulfonate reductase. *Archiv für Mikrobiologie* 93, 29–52. <https://doi.org/10.1007/BF00666079>

Scuffi, D., Álvarez, C., Laspina, N., Gotor, C., Lamattina, L., García-Mata, C., 2014. Hydrogen Sulfide Generated by L-Cysteine Desulfhydrase Acts Upstream of Nitric Oxide to Modulate Abscisic Acid-Dependent Stomatal Closure. *Plant Physiology* 166, 2065–2076. <https://doi.org/10.1104/pp.114.245373>

Shan, C., Liu, H., Zhao, L., Wang, X., 2014. Effects of exogenous hydrogen sulfide on the redox states of ascorbate and glutathione in maize leaves under salt stress. *Biol Plant* 58, 169–173. <https://doi.org/10.1007/s10535-013-0366-5>

Shan, C., Zhang, S., Li, D., Zhao, Y., Tian, X., Zhao, X., Wu, Y., Wei, X., Liu, R., 2011. Effects of exogenous hydrogen sulfide on the ascorbate and glutathione metabolism in wheat seedlings leaves under water stress. *Acta Physiol Plant* 33, 2533. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0746-4>

Shen, J., Xing, T., Yuan, H., Liu, Z., Jin, Z., Zhang, L., Pei, Y., 2013. Hydrogen Sulfide Improves Drought Tolerance in *Arabidopsis thaliana* by MicroRNA Expressions. *PLOS ONE* 8, e77047. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077047>

Shi, D., Sheng, Y., 2005. Effect of various salt–alkaline mixed stress conditions on sunflower seedlings and analysis of their stress factors. *Environmental and Experimental Botany* 54, 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.05.003>

Shi, D., Wang, D., 2005. Effects of various salt-alkaline mixed stresses on *Aneurolepidium chinense* (Trin.) Kitag. *Plant Soil* 271, 15–26. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-1307-z>

Shi, H., Ye, T., Chan, Z., 2013. Exogenous application of hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide enhanced multiple abiotic stress tolerance in bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L). Pers.). *Plant Physiology and Biochemistry* 71, 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.07.021>

Singh, M., Singh, A., Prasad, S., Singh, R., 2017. Regulation of plants metabolism in response to salt stress: an omics approach. *Acta Physiologiae Plantarum* 39. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2345-x>

Singh, V.P., Singh, S., Kumar, J., Prasad, S.M., 2015. Hydrogen sulfide alleviates toxic effects of arsenate in pea seedlings through up-regulation of the ascorbate–glutathione cycle: Possible involvement of nitric oxide. *Journal of Plant Physiology* 181, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.03.015>

Sun, J., Wang, R., Zhang, X., Yu, Y., Zhao, R., Li, Z., Chen, S., 2013. Hydrogen sulfide alleviates cadmium toxicity through regulations of cadmium transport across the plasma and vacuolar membranes in *Populus euphratica* cells. *Plant Physiol Biochem* 65, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.01.003>

Takahashi, H., 2010. Chapter 4 - Regulation of Sulfate Transport and Assimilation in Plants, in: Jeon, K.W. (Ed.), *International Review of Cell and*

Molecular Biology, International Review of Cell and Molecular Biology. Academic Press, pp. 129–159. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(10\)81004-4](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(10)81004-4)

Takahashi, H., Kopriva, S., Giordano, M., Saito, K., Hell, R., 2011. Sulfur Assimilation in Photosynthetic Organisms: Molecular Functions and Regulations of Transporters and Assimilatory Enzymes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 157–184. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103921>

Tanji, K.K., 2002. Salinity in the Soil Environment, in: Läuchli, A., Lüttge, U. (Eds.), *Salinity: Environment - Plants - Molecules*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 21–51. [https://doi.org/10.1007/0-306-48155-3\\_2](https://doi.org/10.1007/0-306-48155-3_2)

Wang, B.-L., Shi, L., Li, Y.-X., Zhang, W.-H., 2010. Boron toxicity is alleviated by hydrogen sulfide in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. *Planta* 231, 1301–1309. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1134-9>

Wang, H., Wu, Z., Chen, Y., Yang, C., Shi, D., 2011a. Effects of salt and alkali stresses on growth and ion balance in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant, Soil and Environment* 57, 286–294. <https://doi.org/10.17221/36/2011-pse>

Wang, H., Wu, Z., Chen, Y., Yang, C., Shi, D., 2011b. Effects of salt and alkali stresses on growth and ion balance in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant, Soil and Environment* 57, 286–294. <https://doi.org/10.17221/36/2011-pse>

Wang, R., 2014. Gasotransmitters: growing pains and joys. *Trends in Biochemical Sciences* 39, 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.03.003>

Wang, X., Geng, S., Ri, Y.-J., Cao, D., Liu, J., Shi, D., Yang, C., 2011a. Physiological responses and adaptive strategies of tomato plants to salt and

alkali stresses. *Scientia Horticulturae* 130, 248–255.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.07.006>

Wang, X., Geng, S., Ri, Y.-J., Cao, D., Liu, J., Shi, D., Yang, C., 2011b.

Physiological responses and adaptive strategies of tomato plants to salt and

alkali stresses. *Scientia Horticulturae* 130, 248–255.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.07.006>

Wang, Y., Li, L., Cui, W., Xu, S., Shen, W., Wang, R., 2012. Hydrogen sulfide

enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed

germination by nitric oxide pathway. *Plant Soil* 351, 107–119.

<https://doi.org/10.1007/s11104-011-0936-2>

Wang, Y., Ma, H., Liu, G., Xu, C., Zhang, D., Ban, Q., 2008. Analysis of Gene

Expression Profile of *Limonium bicolor* under NaHCO<sub>3</sub> Stress Using cDNA

Microarray. *Plant Mol Biol Rep* 26, 241–254. [https://doi.org/10.1007/s11105-](https://doi.org/10.1007/s11105-008-0037-4)

[008-0037-4](https://doi.org/10.1007/s11105-008-0037-4)

Warrilow, A.G.S., Hawkesford, M.J., 2000. Cysteine synthase (O-acetylserine

(thiol) lyase) substrate specificities classify the mitochondrial isoform as a

cyanoalanine synthase. *Journal of Experimental Botany* 51, 985–993.

<https://doi.org/10.1093/jexbot/51.347.985>

Wirtz, M., Droux, M., Hell, R., 2004. O-acetylserine (thiol) lyase: An enigmatic

enzyme of plant cysteine biosynthesis revisited in *Arabidopsis thaliana*. *Journal*

*of Experimental Botany* 55, 1785–1798. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh201>

Wirtz, M., Hell, R., 2006. Functional analysis of the cysteine synthase protein complex from plants: Structural, biochemical and regulatory properties. *Journal of Plant Physiology* 163, 273–286. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.11.013>

Wu, D., Si, W., Wang, M., Lv, S., Ji, A., Li, Y., 2015. Hydrogen sulfide in cancer: Friend or foe? *Nitric Oxide* 50, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2015.08.004>

Wu, D., Wang, H., Teng, T., Duan, S., Ji, A., Li, Y., 2018. Hydrogen sulfide and autophagy: A double edged sword. *Pharmacological Research* 131, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.03.002>

Wu, H., 2018. Plant salt tolerance and Na<sup>+</sup> sensing and transport. *The Crop Journal* 6, 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2018.01.003>

Yamaya, T., Obara, M., Nakajima, H., Sasaki, S., Hayakawa, T., Sato, T., 2002. Genetic manipulation and quantitative-trait loci mapping for nitrogen recycling in rice. *Journal of Experimental Botany* 53, 917–925. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.917>

Yarmolinsky, D., Brychkova, G., Fluhr, R., Sagi, M., 2013. Sulfite Reductase Protects Plants against Sulfite Toxicity. *Plant Physiology* 161, 725–743. <https://doi.org/10.1104/pp.112.207712>

Zhang, H., Hu, L.-Y., Hu, K.-D., He, Y.-D., Wang, S.-H., Luo, J.-P., 2008. Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates oxidative damage against copper stress. *J Integr Plant Biol* 50, 1518–1529. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00769.x>

Zhang, H., Hu, S.-L., Zhang, Z.-J., Hu, L.-Y., Jiang, C.-X., Wei, Z.-J., Liu, J., Wang, H.-L., Jiang, S.-T., 2011. Hydrogen sulfide acts as a regulator of flower

senescence in plants. *Postharvest Biology and Technology* 60, 251–257.

<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.01.006>

Zhang, H., Tan, Z.-Q., Hu, L.-Y., Wang, S.-H., Luo, J.-P., Jones, R.L., 2010.

Hydrogen Sulfide Alleviates Aluminum Toxicity in Germinating Wheat Seedlings. *Journal of Integrative Plant Biology* 52, 556–567.

<https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00946.x>

Zhang, H., Tang, J., Liu, X.-P., Wang, Y., Yu, W., Peng, W.-Y., Fang, F., Ma,

D.-F., Wei, Z.-J., Hu, L.-Y., 2009. Hydrogen Sulfide Promotes Root Organogenesis in *Ipomoea batatas*, *Salix matsudana* and *Glycine max*. *Journal*

*of Integrative Plant Biology* 51, 1086–1094. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2009.00885.x>

Zhang, J.-T., Mu, C.-S., 2009. Effects of saline and alkaline stresses on the germination, growth, photosynthesis, ionic balance and anti-oxidant system in

an alkali-tolerant leguminous forage *Lathyrus quinquenervius*. *Soil Science and Plant Nutrition* 55, 685–697. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2009.00411.x>

Zhang, Q., Lee, B.-R., Park, S.-H., Zaman, R., Avice, J.-C., Ourry, A., Kim, T.-

H., 2015. Sulfate resupply accentuates protein synthesis in coordination with nitrogen metabolism in sulfur deprived *Brassica napus*. *Plant Physiology and*

*Biochemistry* 87, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.12.006>





## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



## 2 Justificación y objetivos

### 2.1 ¿Por qué *Brassica oleracea* como planta de estudio?

La elección de *Brassica oleracea* para la realización de esta tesis doctoral se basa en tres características:

- 1- En general la familia de las Brassicaceas está compuesta por plantas que muestran grandes requerimientos de S para su adecuado y óptimo crecimiento, por lo que en estas plantas resulta mas factible comprobar el efecto que produce la aplicación exógena de H<sub>2</sub>S sobre determinados procesos fisiológicos.
- 2- Desde un punto de vista agronómico es una planta que resulta muy interesante ya que además de ser un cultivo cada vez más consumido por la población, la col está considerada un alimento rico en compuestos bioactivos muchos de ellos dependientes de la nutrición con S, por lo que en esta tesis doctoral también estudiaremos el efecto del H<sub>2</sub>S sobre la calidad nutricional de *Brassica oleracea*.
- 3- Según resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación *Brassica oleracea* es una planta sensible al estrés alcalino, que será el que estudiaremos en esta tesis doctoral, y por lo tanto podremos comprobar de forma más eficaz el posible efecto beneficioso de la aplicación de H<sub>2</sub>S.

La Col pertenece a la familia de las *Brassicaceae* que comprende una gran variedad de especies y cultivares, algunos de los más conocidos son *B. oleracea* (es decir, coles, coles de Bruselas, brócoli), *B. rapa* (nabos), *B. napus* (rábanos), *Sinapis spp.* (mostazas), etc. En los últimos años, y como acabamos

de describir en la segunda característica que justifica la utilización de esta planta en el presente trabajo de investigación, estos cultivos se consumen cada vez más por sus características organolépticas y sus posibles beneficios para la salud como una buena fuente de compuestos bioactivos (Figura 1).

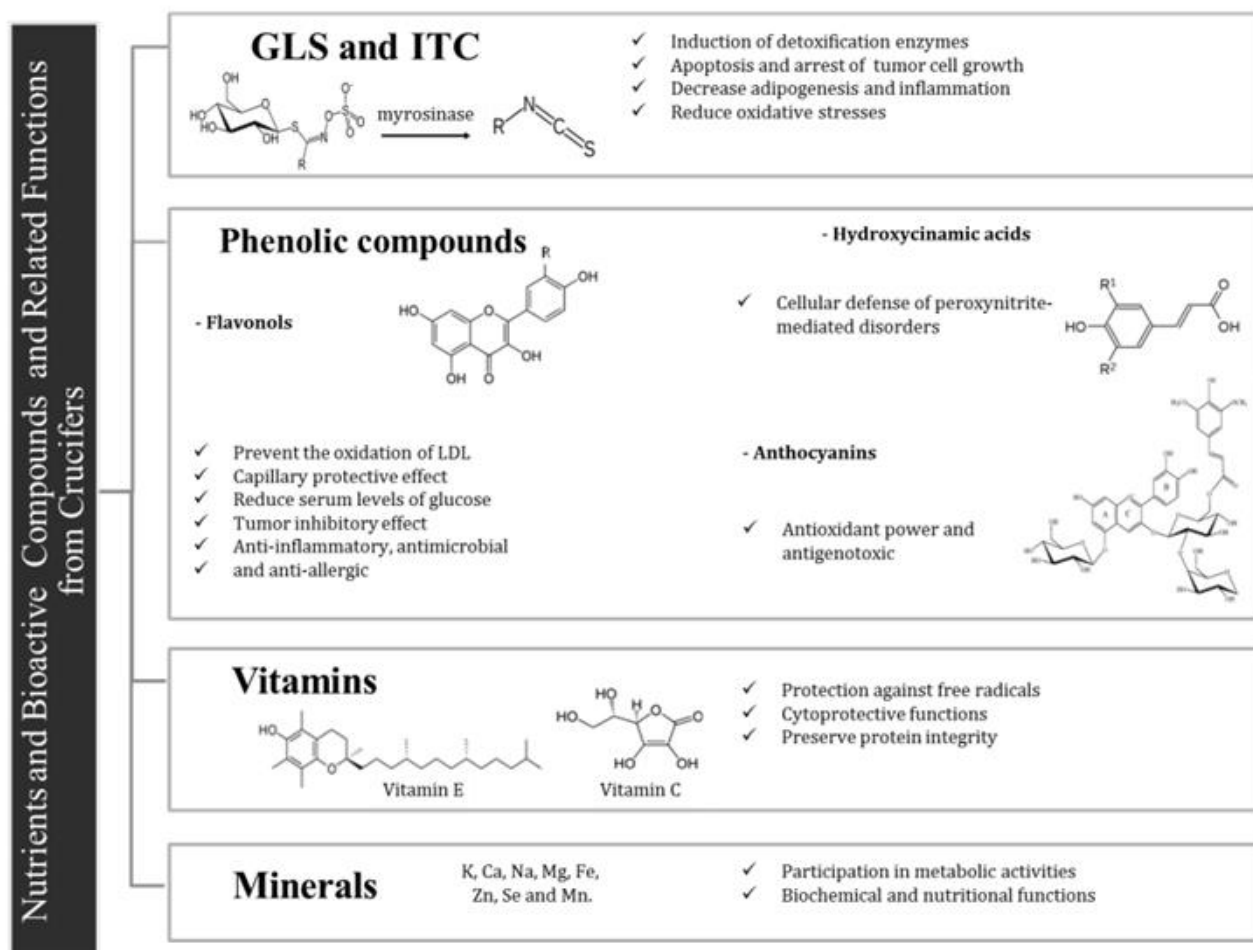


Figura 1. Nutrientes y fitoquímicos en crucíferas y beneficios asociados para la salud.

Los compuestos de azufre-nitrógeno que contienen glucosinolatos (GLS) se encuentran casi exclusivamente en esta familia, siendo su efecto beneficioso para la salud supuestamente inducido por sus productos de hidrólisis (bioactivos), los isotiocyanatos (ITC). Los GLS no tienen una bioactividad conocida en sí mismos, pero son hidrolizados para liberar ITC, compuestos

altamente reactivos que pueden activar el factor nuclear de transcripción celular de los mamíferos (derivado de los eritroides 2), como el Nrf2 y al hacerlo, mejorar la defensa del huésped. La activación del factor de transcripción Nrf2 aumenta las enzimas de desintoxicación para eliminar las sustancias químicas carcinogénicas y mecanismos adicionales (López-Chillón et al., 2018).

Los compuestos fenólicos presentes en esta planta principalmente son: flavonoles, antocianinas y ácidos hidroxicinámicos, cuya principal bioactividad es su capacidad antioxidante. Además, en la col la presencia de carotenoides así como las vitaminas (C, E, K) también han sido considerados como nutrientes con actividad biológica.

En definitiva, la riqueza fitoquímica de los alimentos de Brassica está llamando la atención de la comunidad científica por ser potencialmente protectores del sistema cardiovascular y ejercer su efecto frente a ciertos tipos de cáncer y trastornos neurológicos, principalmente por sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Baenas et al., 2016).

## **2.2 Objetivos**

El objetivo de la presente tesis doctoral es el estudio de los parámetros agronómicos, fisiológicos y moleculares de la aplicación de H<sub>2</sub>S exógeno en plantas de *Brassica oleracea* L. "BRONCO", así como, su implicación en los mecanismos de tolerancia frente a estrés alcalino.

Este objetivo general se subdivide a su vez en 4 objetivos concretos que se intentan resolver en los 4 capítulos que forman parte de esta Tesis Doctoral, y que son:

**Objetivo 1:** En primer lugar, demostrar que influencia tiene la aplicación exógena de sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) sobre los parámetros agronómicos y nutricionales de *Brassica oleracea* L. “Bronco”, y definir bajo condiciones experimentales controladas que dosis de aplicación es la más adecuada para potenciar estas características.

**Objetivo 2:** En segundo lugar, se pretende estudiar si existe alguna relación entre el contenido en compuestos bioactivos y biomasa con los cambios producidos en la fisiología de la planta a nivel de su nutrición mineral, poniendo el foco sobre los procesos de asimilación de N, con el fin de ayudar a definir una dosis “óptima” de H<sub>2</sub>S.

**Objetivo 3:** En tercer lugar, comprobar si la aplicación de la dosis de H<sub>2</sub>S definida en los dos objetivos anteriores como “óptima”, mejora la resistencia a la exposición a un estrés alcalino en plantas de *Brassica oleracea* L. (BRONCO).

**Objetivo 4:** Finalmente, analizar la expresión relativa de los genes que codifican para las enzimas principales que intervienen en los posibles mecanismos de resistencia al estrés alcalino tras aplicar H<sub>2</sub>S exógeno en plantas de *Arabidopsis thaliana* L.

### **2.3 Bibliografía**

Baenas, N., Francisco, M., Velasco, P., Cartea, M., Cristina, G.-V., Moreno, D.A., 2016. Bioactive Compounds from Brassicaceae as Health Promoters. pp. 27–47.

Lopez-Chillon, M.T., Baenas, N., Villano, D., Zafrilla, P., Garcia-Viguera, C., Moreno, D.A., 2018. Broccoli for food and health – research and challenges. *Acta horticulturae*.





## CAPÍTULO 1



**Efecto del sulfuro de hidrogeno como bioestimulante de la calidad fitoquímica, nutricional y antioxidante de la Col (*Brassica olerace* L. 'Bronco')**

David Montesinos-Pereira, Yurena Barrameda-Medina, Nieves Baenas, Diego A. Moreno, Begoña Blasco, Juan M. Ruiz.

**Resumen**

En el presente trabajo se investigaron los efectos potenciales del sulfuro de hidrógeno en la biomasa de la parte aérea, la calidad nutricional y la capacidad antioxidante de *Brassica oleracea*, mediante la aplicación de dosis crecientes de NaHS (NaHS como donador de H<sub>2</sub>S; 0,5, 1, 2,5 y 5 mM). Los resultados mostraron que los tratamientos 0,5 y 1 mM de NaHS aumentaron la biomasa y la calidad nutricional de la col 'Bronco' (es decir, clorofilas, carotenoides, antocianinas, flavonoles, fenoles totales y sinigrina). Por otra parte, hubo un aumento en la peroxidación de lípidos y el contenido de peróxido de hidrógeno tras la aplicación de dosis superiores a 2,5 mM NaHS. Por lo tanto, seleccionamos las dosis de 0,5 y 1 mM NaHS como óptimas para la Col. La aplicación de 2,5 y 5 mM de NaHS produjo una excesiva peroxidación de lípidos, disminuciones en la biomasa de las plantas y pérdidas de clorofilas, siendo todos ellos considerados efectos negativos, provocando claras evidencias de estrés en las plantas. En cuanto a aplicaciones prácticas, este

estudio sugiere que la aplicación exógena de NaHS como donador de H<sub>2</sub>S a 0,5 y 1 mM puede ser útil como bioestimulante para aumentar el rendimiento y la composición fitoquímica de la planta de Col (*Brassica oleracea* L. 'Bronco').

**Adapted from Journal of Applied Botany and Food Quality (2016)**

**Evaluation of hydrogen sulfide supply to biostimulate the nutritive and phytochemical quality and the antioxidant capacity of Cabbage (*Brassica oleracea* L. 'Bronco')**

David Montesinos-Pereira<sup>1\*</sup>, Yurena Barrameda-Medina<sup>1</sup>, Nieves Baenas <sup>2</sup>, Diego A. Moreno <sup>2</sup>, Eva Sánchez-Rodríguez<sup>1</sup>, Begoña Blasco<sup>1</sup>, Juan M. Ruiz<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Plant Physiology, Faculty of Sciences, University of Granada, Granada, Spain

<sup>2</sup>Phytochemistry Lab, Department of Food Science and Technology, CEBAS-CSIC, Campus Universitario Espinardo, Espinardo, Murcia, Spain.

**Abstract**

The potential effects of the hydrogen sulfide on shoot biomass, nutritional quality and antioxidant capacity of *Brassica oleracea*, were investigated through the application of increasing doses of NaHS (H<sub>2</sub>S donor NaHS; 0.5, 1, 2.5, and 5 mM). The results showed that the 0.5 and 1 mM NaHS treatments increased biomass and the quality composition of 'Bronco' cabbage (i.e. chlorophylls, carotenoids, anthocyanins, flavonols, total phenolics and sinigrin). On the other hand, there was an increase in lipid peroxidation and hydrogen peroxide content with the application of doses higher than 2.5 mM NaHS. Therefore, we selected the 0.5 and 1 mM NaHS dosages as optimal for cabbage. The 2.5 and 5 mM NaHS produced an excessive lipid peroxidation, decreases in plant biomass and losses of chlorophylls, being all considered negative effects, and clear evidences of stressful situation for the plants. For practical purposes, this study suggested that exogenous application of H<sub>2</sub>S donor NaHS at 0.5 and 1

mM may be useful as bio-stimulant to boost the yield and the health-promoting composition of 'Bronco' cabbage (*Brassica oleracea* L.).

**Keywords:** Hydrogen sulfide, health-promoting compounds, *Brassica oleracea*, antioxidant capacity.

## Introduction

Sulfur is an essential mineral nutrient element, crucial for sulfur- amino acids (cysteine and methionine), natural antioxidants (reduced glutathione; GSH), co-enzymes, prosthetic groups, vitamins, secondary metabolites, phytochelatins (PCs) and lipids (Khan et al., 2014 a; Khan et al., 2014 b). With respect to the different forms of application to plants of this macronutrient in last few years there has been an increased interest in the study of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) on plant physiology (Lisjak et al., 2013). High doses of H<sub>2</sub>S in greenhouses caused leaf lesions, defoliation, reduced growth, and death of sensitive species such as alfalfa (*Medicago sativa* L.), lettuce (*Lactuca sativa*), sugar beet (*Beta vulgaris*) (Thompson and Kats, 1978). Although several works showed that this compound can adversely affects the growth and physiology of crops (Koch and Erskine, 2001), recent works suggests that H<sub>2</sub>S is a more fundamental molecule which is produced by plants and used to control plant function (Zhang et al., 2010). So, H<sub>2</sub>S has shown its action as a signal molecule and it has been used to promote the antioxidant enzyme activities and uptake of elements against abiotic stress in barley (Gadalla and Snyder, 2010; Dawood et al. 2012).

Moreover, it was observed that H<sub>2</sub>S involved in the antioxidant response

against osmotic stresses (i.e. excessive boron and drought) in cucumber and sweet potato respectively (Zhang et al., 2009; wan et al., 2010). Nonetheless, the application of H<sub>2</sub>S increased the antioxidant capacity and quality parameters in fruits and berries (i.e., mulberry, kiwi, and strawberry) (hu et al., 2012; hu et al., 2014; Zhu et al., 2014). *Brassicaceae* vegetables are economically relevant crops and important human foods worldwide, highly used in China, Japan, India, and European countries (Cartea et al., 2010). The popularity and consumption of Brassica is growing because of their renewed relevance on human health through the prevention of certain degenerative diseases (i.e. cardiovascular, cognitive, Alzheimer's and Parkinson's, etc.) and reduction in the risks of suffering from cancer (i.e., lung, breast, colon, prostate) (Cartea et al., 2010; Podsedek, 2007; Bazzano et al., 2002; Smith-Warner et al., 2003; Cho et al., 2004). These health-promoting properties are attributed to their composition very rich in intrinsic and indirect antioxidants (Cartea et al., 2010). Natural antioxidants in Brassica, includes ascorbate, anthocyanins, phenolic compounds and carotenoids (Galati and O'brien, 2004). Of particular relevance, ascorbate or vitamin C and phenolic compounds are highlighted, as well as the phenolic compounds, which has been shown to exert antioxidant, anticarcinogenic, antimicrobial, antiallergic, antimutagenic, and anti-inflammatory activities (Martínez-Valverde et al., 2002).

Moreover, essentially unique to cruciferous crops and foods, and more relevant in terms of health-promoting effects are the glucosinolates (GLSs). The GLSs are a heterogeneous family of molecules characterized by a similar

basic structure containing a sulphur-linked  $\beta$ -D-glucopyranoside, a sulphonated oxime, and a side chain derived from different amino acids, which allow their classification in: aliphatic, aromatic, and indolic GLSs (FahEy et al., 2001). GLSs have gained growing attention for their potential health-promoting properties, as their hydrolysis products (isothiocyanates, ITCs) are able to induce phase 2 detoxification enzymes and protect mammals against chemically induced cancer (Zhang et al., 1992). So, the consumption of vegetables containing glucosinolates, such as *Brassica oleracea* varieties, may confer protection against different types of cancer (Cartea et al., 2010; Zhang et al., 1992).

One strategy to improve the nutritional characteristics of crops is the optimal application of different forms of S. The most widely used form of S for this purpose has been  $\text{SO}_4^-$ , favoring yield in number of fruits and the vitamin C content in strawberries (Eshghi and Jamali, 2014). Others authors also reported increased total phenolics and antioxidant capacity in mango fruits upon application of sodium bisulfate (Siddiq et al., 2013). In addition to  $\text{SO}_4^-$ , in the last few years it has been observed that the application of S in a more reduced form than  $\text{SO}_4^-$  such as  $\text{H}_2\text{S}$  could have a positive effect on the nutritional quality, but such treatments were performed during postharvest, for example in mulberry, after applying 0.8 mM of the  $\text{H}_2\text{S}$  donor NaHS, increased contents of ascorbate and soluble proteins, were found, maintaining the postharvest quality (hu et al., 2014). Using the same fumigation (0.8 mM of the  $\text{H}_2\text{S}$  donor NaHS) resulted in increased firmness and colour, and delayed respiratory damage in strawberries, prolonging postharvest shelf life (hu et al., 2012). Nevertheless, there are very limited



studies to examine the potential beneficial effects of H<sub>2</sub>S on the nutritional quality, yield and phytochemical quality of leafy vegetables not affected by any abiotic or biotic stress, and therefore, the aim of this study was to determine the influence of H<sub>2</sub>S application (as sodium hydrosulfide hydrate, NaHS + H<sub>2</sub>O) on the biomass production and antioxidant capacity response and the nutritional and phytochemical quality of 'Bronco' cabbage (*Brassica oleracea* L.).

## Material and methods

### Plant material and treatments

Seeds of *B. oleracea* cv. Bronco (Saliplant S.L., Spain) were germinated and grown for 35 days in cell flats of 3 cm × 3 cm × 10 cm filled with a perlite mixture substratum. The flats were placed on benches in an experimental greenhouse located in Southern Spain (Saliplant S.L., Motril, Granada). After 35 days, the seedlings were transferred to a growth chamber under the following controlled environmental conditions: Relative humidity 50 %; Day/night temperatures 25/18 °C; 16/8 h photoperiod at a photosynthetic photon flux density (PPFD) of 350 μmol m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup> (measured at the top of the seedlings with a 190 SB quantum sensor, LI-CORInc., Lincoln, Nebraska, USA). Under these conditions the plants were grown in hydroponic culture in lightweight polypropylene trays (60 cm diameter top, bottom diameter 60 cm and 7 cm in height) of 3 L volume. Throughout the experiment the plants were treated with a growth solution made up of 4 mM KNO<sub>3</sub>, 3 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 2 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2 μM MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 10 μM ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.25 μM CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.1 μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 5 mg L<sup>-1</sup> Fe-chelate (Sequestrene; 138

FeG100) and 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ . This solution, with a pH of 5.5-6.0, was changed every three days.

### **Experimental design**

The NaHS treatments were initiated 43 days after germination and were maintained for 30 days. To determine the concentrations of NaHS to apply, it was carried out a previous culture in which it was observed the response of *Brassica oleracea* L. 'Bronco' to a wide range of concentrations of NaHS, ranging from 0.01 mM to 6 mM in which was observed as the most appropriate doses to study the effects of fortification and toxicity in this species were: 0.5, 1, 2.5 and 5 mM of NaHS. For that reason, the experiment consisted in a randomized complete block design with five treatments that were supplied with the irrigation solution (complete nutrient solution amended with different NaHS levels: 0 mM NaHS; and 0.5 mM, 1 mM, 2.5 mM and 5 mM NaHS), arranged in 8 plants per tray (In expanded polystyrene support) and three replicates per treatment.

### **Plant sampling**

Plants of each treatment (73 days after germination) were divided into roots and leaves, washed with distilled water, dried on filter paper and weighed, thereby obtaining fresh weight (FW). Half of leaves from each treatment were frozen at -30 °C for further work and biochemical assays and the other half of the plant material was lyophilised for 48 h to obtain the dry weight (DW) and the subsequent analysis of phenolics and GLSs.

### **Determination of $\text{H}_2\text{S}$ content**

0.1 g of *Brassica oleracea* leaves were ground under liquid nitrogen and extracted by 1 mL phosphate buffered saline (50 mM, pH 6.8) containing 0.1 M EDTA and 0.2 M ascorbic acid. After centrifugation at 12000 rpm for 15 min at 4 °C, 400 mL of the supernatant was injected to 200 mL 1 % zinc acetate and 200 mL 1 N HCl. After 30 min reaction, 100 mL 5 mM dimethyl-p-phenylene-diamine dissolved in 7 mM HCl was added to the trap followed by the injection of 100 mL 50 mM ferric ammonium sulfate in 200 mM HCl. After 15 min incubation at room temperature, the amount of H<sub>2</sub>S was determined at 667 nm. Solutions with different concentrations of Na<sub>2</sub>S were used in a calibration curve (Sekiya et al., 1982).

#### **Chlorophyll concentration and lipid peroxidation**

For the extraction of chlorophylls, chlorophyll a (Chla) and b (Chlb), 0.1 g of leaves were ground in semidarkness and resuspended in 10 mL of cold acetone at 80 %. Immediately afterwards, the samples were centrifuged at 800 rpm and the absorbance of the supernatant was measured at 653 and 666. The concentrations of Chl a and Chl b were calculated (Wellburn, 1994).

For the MDA assay, leaves were homogenized with 3 mL of 50 mM solution containing 0.07 % NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O and 1.6 % Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>· 12 H<sub>2</sub>O and centrifuged at 15.000 rpm for 25 min in a refrigerated centrifuge. For measurement of MDA concentration 3 mL of 20 % trichloroacetic acid (TCA) containing 0.5 % thiobarbituric acid (TBA) was added to a 1 mL aliquot of the supernatant. The mixture was heated at 95 °C for 30 min, quickly cooled in an ice bath and then centrifuged at 10400 rpm for 10 min. The absorbance of the supernatant was read at A<sub>532</sub> and A<sub>600</sub> nm

(Heath and Packer, 1968). The result of MDA was expressed as Abs g<sup>-1</sup> FW.

The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content of leaf samples was colorimetrically measured (Mukherjee and Choudhuri, 1983). Leaf samples were extracted with cold acetone to determine the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels. An aliquot (1 mL) of the extracted solution was mixed with 200 mL of 0.1 % titanium dioxide at 20 % (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the mixture was then centrifuged at 8000 rpm for 15 min. The intensity of yellow colour of the supernatant was measured at 415 nm. The result of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration was expressed as mg g<sup>-1</sup> FW.

#### **Antioxidant activity test**

In the free radical scavenging effect (DPPH) assay, antioxidants reduce the free radical 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, which has an absorption maximum at A<sub>515</sub>. To measure the DPPH test, the absorbance of the reaction mixture at A<sub>517</sub> was read with a spectrophotometer. Methanol (0.5 mL), replacing the extract, was used as the blank. The percentage of free-radical scavenging effect was calculated as follows: scavenging effect (% g<sup>-1</sup>) = [1 - (A<sub>517</sub> sample/A<sub>517</sub> blank)] × 100.

To measure the reducing power test, 300 µL of leaves extract (0.1 g per mL methanol 80 %), phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6, 0.5 mL) and K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub> (1 % v/w, 2.5 mL, Fluka, Steinheim, Germany) was placed in an Ependrof tube and allowed to react for 20 min at 50 °C. The tube was immediately cooled over crushed ice, and then 150 µL Cl<sub>3</sub>CCOOH (10 %, Fluka) was added. After centrifugation at 5000 rpm for 10 min, an aliquot of 300 µL supernatant was mixed with 300 µL distilled water and 40 µL FeCl<sub>3</sub> (0.1 %).

Then, the absorbance at 700 nm was measured with a spectrophotometer. Increased absorbance of the reaction mixture indicated greater reducing power (Hsu et al., 2003).

### **Antioxidant compounds**

For the extraction of total carotenoids, 0.1 g of leaves were ground in semidarkness and resuspended in 1 mL of cold acetone at 80 %. Immediately afterwards, the samples were centrifuged at 6.000 rpm and the absorbance of the supernatant was measured at 470 nm. To calculate the concentrations of total carotenoids and anthocyanins, the edible leaves were homogenized in propanol: HCl:H<sub>2</sub>O (18:1:81) and further extracted in boiling water for 3 min. After centrifugation at 7.400 rpm for 40 min at 4 °C, the absorbance of the supernatant was measured at 535 and 650 nm (Wellbum 1982). The absorbance due to anthocyanins was calculated as  $A = A_{535} - A_{650}$  (Lange, Shropshire and Mohr, 1971). Finally, the determination of reduced ascorbate (AsA) in leaf extracts was following the method based on the reduction of Fe<sup>3+</sup> to Fe<sup>2+</sup> by AsA in acid solution. Leaves material were homogenized in liquid N<sub>2</sub> with metaphosphoric acid at 5 % (w/v) and centrifuged at 4 °C for 15 min. Absorbance was measured at A<sub>525</sub> nm against a standard AsA curve that followed the same procedure as above. The results of reduced AsA were expressed as µg g<sup>-1</sup> FW (Law et al., 1983).

### **Extraction and determination of phenolic compounds and glucosinolates**

Lyophilised samples (50 mg) were extracted with 1 mL of methanol 70 % V/V in a vortex for 1min, then heated at 70 °C for 30 min in a heating bath, with shaking every 5 min using a vortex stirrer, and centrifuged (12000 × g, 10 min, 4 °C). The supernatants were collected and methanol was completely removed using a rotary evaporator. The dry material obtained was re-dissolved in 1 mL of ultrapure water and filtered through a 0.22 µm Millex-HV13 filter (Millipore,

Billerica, MA, USA).

### **HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup> qualitative and quantitative analysis**

Glucosinolates and phenolic compounds were determined using a LC-MS multipurpose method that simultaneously separates intact glucosinolates and phenolics (Francisco et al., 2009), with slight modifications. Firstly, the GLSs were identified from the extracted samples following their MS<sup>2</sup> [M-H] fragmentations in HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>, carried out on a Luna C18 100A column (250 × 4.6 mm, 5 µm particle size; Phenomenex, Macclesfield, UK). Water:formic acid (99:1, v/v) and acetonitrile were used as mobile phases A and B, respectively, with a flow rate of 800 µL/min. The linear gradient started with 1 % of solvent B, reaching 17 % solvent B at 15 min up to 17 min, 25 % at 22, 35 % at 30, 50 % at 35, which was maintained up to 45 min. The injection volume was 5 µL. The HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup> analyses were carried out in an Agilent HPLC 1200 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) and coupled to a mass detector in series. The HPLC system consisted of a binary capillary pump (model G1376A), an autosampler (model G1377A), a degasser (model G1379B), a sample cooler (model G1330B), and a photodiode array detector (model G1315D), and controlled by Chem Station software (v.B.0103-SR2). The mass detector was a Bruker, model Ultra HCT (Bremen, Germany) ion trap spectrometer equipped with an electrospray ionization interface (ESI) and controlled by Bruker Daltonic Esquire software (v.6.1). The ionization conditions were adjusted at 350 °C and 4 kV for capillary temperature and voltage, respectively. The nebulizer pressure and flow rate of nitrogen were 60.0 psi and 11 L/min, respectively. The full-scan mass covered the range from

$m/z$  50 up to  $m/z$  1000. Collision induced fragmentation experiments were performed in the ion trap using helium as the collision gas, with voltage ramping cycles from 0.3 up to 2 V. Mass spectrometry data were acquired in the negative ionization mode for glucosinolates.  $MS^n$  was carried out in the automatic mode on the more abundant fragment ion in  $MS^{(n-1)}$ . Chromatograms were recorded at 227 nm for glucosinolates and 330 nm for phenolic compounds. Sinigrin was used as aliphatic glucosinolate and glucobrassicin as indolicglucosinolate external standards (Phytoflan, Heidelberg, Germany). Caffeoylquinic acid derivatives were quantified as chlorogenic acid (5-caffeoylquinic acid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany), flavonols (mainly quercetin and kaempferol

#### **Statistical analysis**

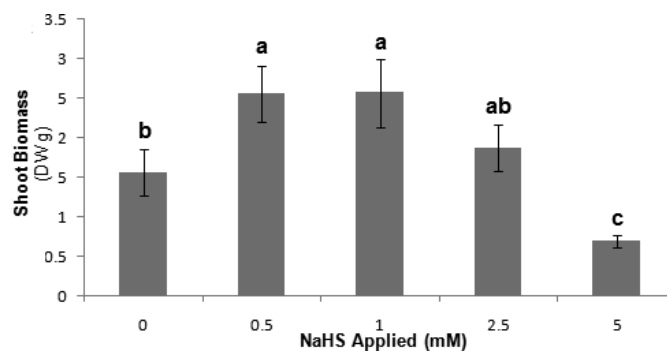
For statistical analysis, data compiled were submitted to ANOVA, and differences between the means were compared with Fisher's least significant difference (LSD;  $P < 0.05$ ).



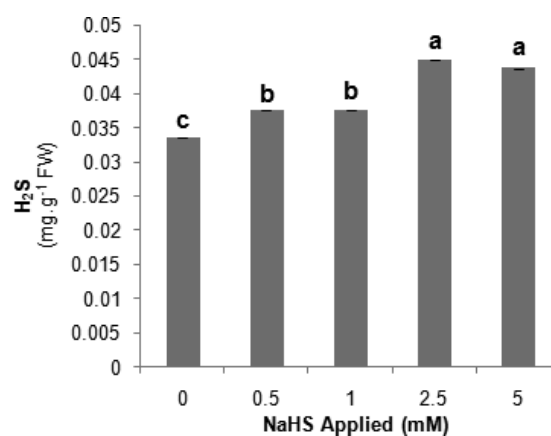
## Results

### Effects of NaHS on shoot biomass and H<sub>2</sub>S foliar concentration

The greatest increase in shoot biomass was observed after the application of the dose 0.5 and 1 mM of NaHS, while higher doses 5 mM resulted in a significant decrease of biomass respect to the control (Fig. 1). The content of H<sub>2</sub>S was found at a moderate increase at 0.5 and 1 mM NaHS, and a higher increase was observed at 2.5 and 5 mM NaHS (Fig. 2).



**Fig. 1:** Effects of different doses of NaHS on shoot biomass. Columns are mean  $\pm$  S.E. ( $n=9$ ). Different letters indicate significant difference between values.



**Fig. 2:** Effects of different doses of NaHS on H<sub>2</sub>S shoot concentration. Columns are mean S.E. ( $n = 9$ ). Different letters indicate significant difference between values.

## Effects of NaHS on chlorophylls concentration and lipid peroxidation

Tab. 1 shown Chlorophylls (Chl a and Chl b), Malonyldialdehyde (MDA) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contents in 'Bronco' cabbage plants treated with NaHS. The Chl a concentration increased slightly and significantly at 0.5 mM NaHS, but decreased at 5 mM NaHS respect to control plants (Tab. 1). The treatments of 1 and 2.5 mM NaHS did not show any significant difference respect to the untreated control (Tab. 1). The concentration of Chl b only showed a significant increase in 0.5 mM dose, whereas there were no significant differences in other treatments respect to the control plants (Tab. 1). A higher MDA concentration was observed at 1, 2.5 and 5 mM of NaHS (Tab. 1). Finally, the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increased moderately at 0.5, 1, and 2.5 mM NaHS and showed an acute increase at 5 mM (Tab. 1).

**Tab. 1:** Effects of different doses of NaHS on chlorophylls, lipid peroxidation and hydrogen peroxide concentration.

Treatments	Chlorophyll a (mg·g <sup>-1</sup> FW)	Chlorophyll b (mg·g <sup>-1</sup> FW)	MDA (Abs·g <sup>-1</sup> FW)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg·g <sup>-1</sup> FW)
Control	0.149 ± 0.003 b	0.069 ± 0.002 b	0.608 ± 0.004 d	0.429 ± 0.008 c
0.5 mM NaHS	0.162 ± 0.004 a	0.073 ± 0.001 a	0.656 ± 0.009 c	0.471 ± 0.007 b
1.0 mM NaHS	0.145 ± 0.002 b	0.071 ± 0.000 ab	0.733 ± 0.011 b	0.466 ± 0.010 b
2.5 mM NaHS	0.152 ± 0.002 b	0.072 ± 0.001 ab	0.715 ± 0.013 b	0.448 ± 0.002 ab
5.0 mM NaHS	0.119 ± 0.001 c	0.060 ± 0.001 ab	1.017 ± 0.015 a	0.533 ± 0.008 a
<i>p</i> -Value	***	*	***	***
LSD <sub>0.05</sub>	0.008	0.004	0.033	0.028

Values are mean ± S.E. (n=9). LSD, least significant difference; ns, not significant \* P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001.

## Antioxidant capacity tests

DPPH and the reducing power antioxidant capacity tests are presented in Fig. 3. The DPPH assay results showed a significant increase only at the 5 mM NaHS dose. The reducing power test showed a significant increase at the 2.5 and 5 mM NaHS treatments, compared to the control.

**Natural Antioxidants**

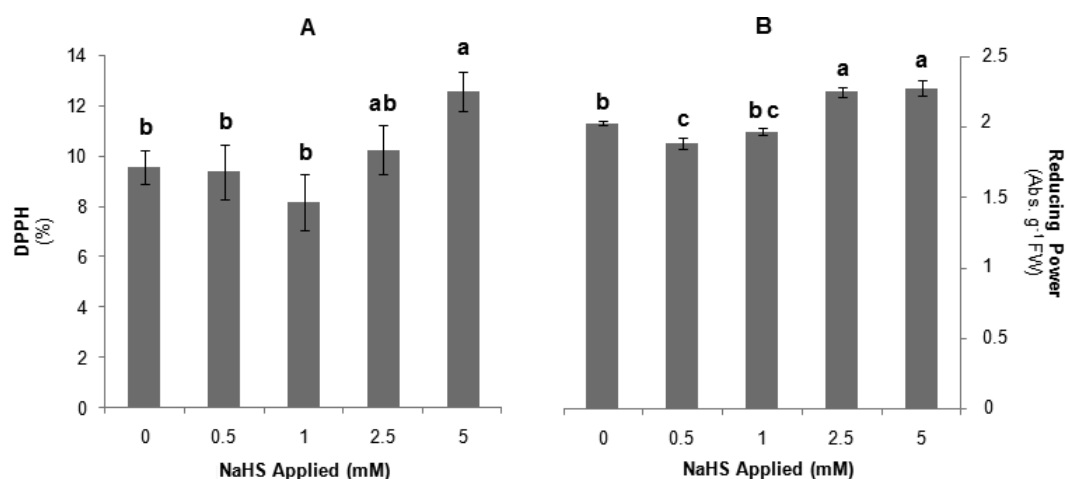
With respect to the carotenoids there was a significant increase with the application of all doses of NaHS respect to the control plants (0 mM NaHS) (Tab. 2). The concentration of anthocyanins significantly increased with the increasing NaHS dosages (Tab. 2). Vitamin C (reduced AsA) concentration increased at 2.5 and 5 mM NaHS treatment and of the levels at 0.5 and 1 mM of NaHS were in the same range of the control (Tab. 2).

**Phenolic compounds and glucosinolates**

Tab. 3 shows the different types of phenolics quantified in the samples. The application of the 0.5 mM NaHS dose exerted a significant effect on the content, while at 5 mM NaHS there was a significant decrease respect to the untreated control (Tab. 3). On the other hand, we did not observe any statistically significant difference in the contents of caffeic and sinapic acid derivatives upon the treatments, only and slight increase in sinapic acid derivatives at 0.5 mM NaHS not statistically significant (Tab. 3). Then the addition of total phenolics, following response of the major components in the samples (flavonols and sinapic acid derivatives), showed increased content at 0.5 mM NaHS, and a significantly reduced content at 5 mM respect to the control (Tab. 3). The analysis of intact glucosinolates in 'Bronco' cabbage (Tab. 4), revealed only slight and significant increases at 1 mM for sinigrin, and for 4-hydroxyglucobrassicin at 2.5 and 5 mM.

The concentrations of glucoberin and glucobrassicin, as well as the addition of aliphatic or indolic GLSs varied only slightly according to the treatments, and at the end, the total GLSs remained unchanged (Tab. 4). It is worth mentioning that the glucoiverberin, a common glucosinolate in this species was absent in

the studied samples (Data not shown).



**Fig. 3:** Effects of different doses of NaHS on DPPH (A) and reducing power (B) antioxidant tests. Columns are mean  $\pm$  S.E. ( $n = 9$ ). Different letters indicate significant difference between values.

**Tab. 2:** Effects of different doses of NaHS on carotenoids, anthocyanin and reduced AsA concentration.

Treatments	Carotenoids (mg · g <sup>-1</sup> FW)	Anthocyanin (A <sub>535</sub> · g <sup>-1</sup> FW)	Reduced AsA (μg g <sup>-1</sup> FW)
Control	0.023 $\pm$ 0.0003 c	0.780 $\pm$ 0.005 d	674.62 $\pm$ 36.57 c
0.5 mM NaHS	0.028 $\pm$ 0.0008 a	0.875 $\pm$ 0.008 c	713.63 $\pm$ 12.13 c
1.0 mM NaHS	0.025 $\pm$ 0.0004 b	0.884 $\pm$ 0.007 c	674.09 $\pm$ 09.56 c
2.5 mM NaHS	0.026 $\pm$ 0.0002 ab	1.137 $\pm$ 0.056 b	818.59 $\pm$ 12.72 b
5.0 mM NaHS	0.025 $\pm$ 0.0002 b	1.270 $\pm$ 0.011 a	880.90 $\pm$ 10.84 a
<i>p</i> -Value	***	***	***
LSD <sub>0.05</sub>	0.001	0.074	55.06

Values are mean  $\pm$  S.E. ( $n=9$ ). LSD, least significant difference; ns, not significant \*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$ ; \*\*\*  $P<0.001$ .

**Tab. 3:** Effects of different doses of NaHS on phenolic compounds

Phenolic compounds (mg g <sup>-1</sup> DW)				
	Flavonols	Caffeic acid derivatives	Sinapic derivatives acid	Total Phenolics
Control	7.88 $\pm$ 0.05 b	1.36 $\pm$ 0.04 a	39.93 $\pm$ 1.28 a	49.27 $\pm$ 1.63 b
0.5 mM NaHS	10.53 $\pm$ 0.21 a	1.44 $\pm$ 0.17 a	47.68 $\pm$ 4.70 a	64.40 $\pm$ 1.44 a
1.0 mM NaHS	7.95 $\pm$ 0.20 b	1.20 $\pm$ 0.28 a	39.07 $\pm$ 0.36 a	49.56 $\pm$ 1.36 b
2.5 mM NaHS	6.51 $\pm$ 0.09 b	1.41 $\pm$ 0.18 a	38.07 $\pm$ 3.95 a	46.01 $\pm$ 4.59 bc
5.0 mM NaHS	4.47 $\pm$ 0.01 c	1.01 $\pm$ 0.03 a	34.98 $\pm$ 1.79 a	40.56 $\pm$ 2.56 c

<i>p</i> -Value	***	n.s	n.s	***
LSD <sub>0.05</sub>	1.46	0.54	9.22	8.25

Values are mean  $\pm$  S.E. (n=9). LSD, least significant difference; ns, not significant \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

**Tab. 4:** Effects of different doses of NaHS on glucosinolate concentrations.

Glucosinolates (mg g <sup>-1</sup> DW)							
	Glucoiberin	Sinigrin	4-Hydroxy-glucobrassicin	Glucobrassicin	Total aliphatics	Total indolics	Total GLSs
Control	1.84 $\pm$ 0.05 a	0.74 $\pm$ 0.04 b	0.02 $\pm$ 0.01 b	0.76 $\pm$ 0.05 a	2.59 $\pm$ 0.08 a	0.78 $\pm$ 0.02 a	3.70 $\pm$ 0.05 a
0.5 mM NaHS	1.49 $\pm$ 0.21 a	0.63 $\pm$ 0.09 b	0.01 $\pm$ 0.00 b	0.47 $\pm$ 0.05 a	2.12 $\pm$ 0.30 a	0.49 $\pm$ 0.08 b	2.61 $\pm$ 0.05 a
1.0 mM NaHS	1.47 $\pm$ 0.20 a	1.01 $\pm$ 0.06 a	0.02 $\pm$ 0.00 b	0.50 $\pm$ 0.05 a	2.49 $\pm$ 0.27 a	0.53 $\pm$ 0.01 b	3.02 $\pm$ 0.05 a
2.5 mM NaHS	0.80 $\pm$ 0.09 b	0.39 $\pm$ 0.02 c	0.03 $\pm$ 0.00 ab	N.D	1.18 $\pm$ 0.07 b	0.03 $\pm$ 0.00 c	1.21 $\pm$ 0.05 a
5.0 mM NaHS	0.31 $\pm$ 0.01 c	0.22 $\pm$ 0.01 c	0.04 $\pm$ 0.03 a	N.D	0.53 $\pm$ 0.53 c	0.04 $\pm$ 0.00 c	0.57 $\pm$ 0.05 a
<i>p</i> -Value	***	***	*	n.s	***	***	n.s
LSD <sub>0.05</sub>	0.44	0.17	0.016	0.11	0.6	0.7	8.25

Values are mean  $\pm$  S.E. (n=9). LSD, least significant difference; ns, not significant \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

## Discussion

Previous studies found that applications of low concentrations of H<sub>2</sub>S at 100 mg/L, could significantly increase the growth of alfalfa, lettuce and sugar beets (Thompson et al., 1979). Under the 0.5 and 1 mM NaHS treatments the Cabbage (*Brassica oleracea* L. 'Bronco') shoots biomass improved in final result by 64 and 65 % respectively if compared to the untreated plants (Fig. 1). In leaves of *Brassica napus* the application of H<sub>2</sub>S at 0.2 mM increased the growth in terms of plant height by 5 % (Basharat Ali, 2014). On the other hand, in the 5 mM NaHS treatment a significant decrease in shoots biomass was found (Fig. 1). The application of NaHS at elevated concentrations may exert a toxic effect to the *B. oleracea* indicated by the decreased biomass (Koch and Erskine, 2001; Lamers et al., 2013). Supported

by the results, the effect of NaHS on the shoots biomass is positive, at low dosages (0.5 and 1 mM) while the high levels (5 mM) applied are negative for the plant growth and biomass with significant losses of 55 % (Fig. 1). Although, the physiological mechanisms involved in the effects of the H<sub>2</sub>S are unknown, it is clear that the intervention of secondary metabolites and proteins (i.e. enzymes) and alterations in cell membranes be involved and probably not as simple disturbance in the sulphur balance in the plant (Kuramata et al., 2009).

On the other hand, the phytotoxicity of H<sub>2</sub>S appears to result from its high affinity to the metallo-groups of proteins (Beauchamp et al., 1984). Both, damage to cell membranes and the interaction of H<sub>2</sub>S with cell enzymes, could explain the reduction of biomass that occurs at 2.5 and 5 mM of NaHS. These results are correlated with the foliar levels of H<sub>2</sub>S found in the samples (Fig. 2). These data are consistent with previous works where an increased concentration of H<sub>2</sub>S after the supply of 200 mg H<sub>2</sub>S Kg<sup>-1</sup> to wheat plants (Khan et al., 2015). Others reports also showed increased H<sub>2</sub>S concentrations in mulberry after application of 0.8 mM of NaHS (hu et al., 2014).

The main indicators of the presence or absence of stress in plants, in addition to the production of biomass, are Chls levels and lipid peroxidation (Van Kooten and Snel, 1990; Ashrafi et al., 2015). In our study Chl a and Chl b significantly increased at 0.5 mM NaHS (Tab. 1). These results agreed with those obtained in *Spinacia oleracea* after applying 0.1 mM NaHS resulting in a significant increase in plant biomass, chlorophyll content and the number of grana lamellae in chloroplasts (Chen et al., 2011), and with the observation of an increased chlorophyll content when elemental sulfur was applied to

wheat (*Triticum aestivum*) (Khan et al., 2015). On the contrary, in our study we observed a decrease in Chl when applying the 5 mM treatments, and it is well known that the reduction in leaf pigments is a typical oxidative stress indicator, which might be attributed to pigment photo-oxidation, chlorophyll degradation and/or chlorophyll synthesis deficiency (Ahmed et al., 2009).

With regard to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the higher dose of NaHS (5 mM) gave rise to the highest levels (Tab. 1), and could be related to a decline in biomass (Fig. 1). So, in this case may the overproduction of radicals, result in severe cellular damages or trigger a genetically controlled cell death program (Van Breusegem et al., 2001). On the other hand, MDA content presents a very charged increase in treatment 5 mM (67 %) relative to the control (Tab. 1), which confirms that a type oxidative stress is occurring. The increases in MDA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels and the degradation of chlorophyll were observed in *Brassica oleracea* exposed to the highest dose (5 mM) (Tab. 1), must be, directly or indirectly, attributable to the high dose of NaHS-induced oxidative damage. However, we observed a small increase in 0.5-mM and 1-mM treatments, which does not correspond to a decrease in biomass (Tab. 1 and Fig. 1). This could be explained because hydrogen peroxide production could act as a signal to trigger mechanisms involved in the antioxidant response in plants (Wimalasekera et al., 2011).

The toxic or beneficial effects a priori produced by NaHS treatments could affect the nutritional characteristics of plants (hu et al., 2014). Therefore, it is appropriate to measure the antioxidant capacity of fruits and vegetables to get an index of its health benefits (Molyneux et al., 2004). There are a



number of tests that can be used to measure the antioxidant capacity, among them are reducing power test, significant indicator of potential antioxidant activity and DPPH free-radical scavenging test, based on the removal of 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical. In our study we observed an increase in both test with the doses 2.5 and 5 mM (Fig. 3). These results corroborate the obtained in others works that found an increase in the DPPH and reducing test after application of H<sub>2</sub>S in Cucumber and lotus roots (Yu et al., 2013; Sun et al., 2015). Correlating the results obtained in the antioxidant test, exogenous toxic NaHS application could be enhancing the antioxidant response through the increase in the synthesis of antioxidant compounds in treatments 2.5 and 5 mM with respect to control plant (Fig. 3).

One of these group of compounds are carotenoids that in our study showed a significant increase (by 22 %) when plants were subjected to 1 mM of NaHS as compared with the control (Tab. 2). These results are consistent with those obtained by other researchers after applying H<sub>2</sub>S to broccoli plants, and finding an increased content of carotenoids (Li et al., 2014). With respect to the anthocyanins concentration, we observed a concomitant increase in the content of anthocyanins to the applied dose of NaHS, presenting the highest concentrations at 5mM (Tab. 2). Finally, we found an increase in vitamin C content at the 2.5 and 5 mM of NaHS, by 21 and 30 % respectively, and non-significant differences in the other treatments, with respect to the control (Tab. 2). This increase may be resulting from the promoted ascorbate homeostasis in response to high dose of NaHS. According to this, increased contents of AsA were observed with the application of NaHS to mulberry fruits and broccoli plants (Hu et al., 2014).

The highest dosages of NaHS (2.5 and 5 mM) in our study promoted higher contents of natural antioxidants, which could be part of a stress response mechanism. However, the application of beneficial dosages in our work as 0.5 and 1 mM of NaHS potentiate the increase in concentrations of antioxidant compounds like carotenoids, several of them are precursors of vitamin A (i.e.  $\beta$ -carotene,  $\gamma$ -carotene, and  $\beta$ -cryptoxanthin), and due to conjugated double bonds, they are both radical scavengers and quenchers of singlet oxygen. Lower serum  $\beta$ -carotene levels have been linked to higher rates of cancer and cardiovascular diseases, as well as to increased risk of myocardial infarction among smokers (Rice-Evans et al., 1997). Another important antioxidant compound which are increased in our study after application of NaHS are anthocyanins. These compounds are present in various fruits and vegetables provide the natural pigmentation and exhibit a wide range of antioxidant protection and therapeutic benefits including the integrity of genomic DNA, potent cardioprotective, neuroprotective, antiinflammatory, and anticarcinogenic properties (Juranić and Zizak, 2005).

Finally, more than 85 % of vitamin C in human diets is supplied by fruits and vegetables (Lee and Kader, 2001). In fact, Vitamin C has many biological activities in human body and has been found that reduce levels of C-reactive protein (CRP), a marker of inflammation and possibly a predictor of heart disease (Block et al., 2004). Therefore, the increase in concentration of these compounds in leafy vegetables like *Brassica oleracea* by the application of adequate doses of H<sub>2</sub>S as 0.5 and 1 mM can increase the production of biomass and its nutritional quality making their consumption may be beneficial to human health.

In addition to the antioxidant compounds that we have just described, in the present study we observed an increase in the concentration of flavonols and total phenolics with application of 0.5 mM of NaHS (Tab. 3). Recent works showed an increase in phenol content after the application of 15  $\mu\text{L L}^{-1}$  of  $\text{H}_2\text{S}$  in Lotus roots (Sun et al., 2015). The health benefits of phenolic compounds have been widely studied in recent years, including cardioprotective, anti-inflammatory, anti-carcinogenic, and antimicrobial activities, mainly attributed to their antioxidant and radical scavenging properties, and their metal chelation ability (Del Rio et al., 2013).

So, the increase in flavonols concentration and total phenols with the application of 0.5 mM of NaHS increases the nutritional quality of *Brassica oleracea*. On the other hand, the flavonols and total phenols concentration decreased in 5 mM NaHS treatments since this high dose could be causing a stress in the plants of *Brassica oleracea* that inhibits the formation of these compounds (Tab. 3), similar results obtain others authors when after applying 2.4 mM  $\text{H}_2\text{S}$  donor NaHS in broccoli plants produced a decrease in the content of total phenols (Li et al., 2014). In terms of the caffeic acid derivatives and sinapic acid derivatives content not showed significant difference in any of the treatments with respect to the control.

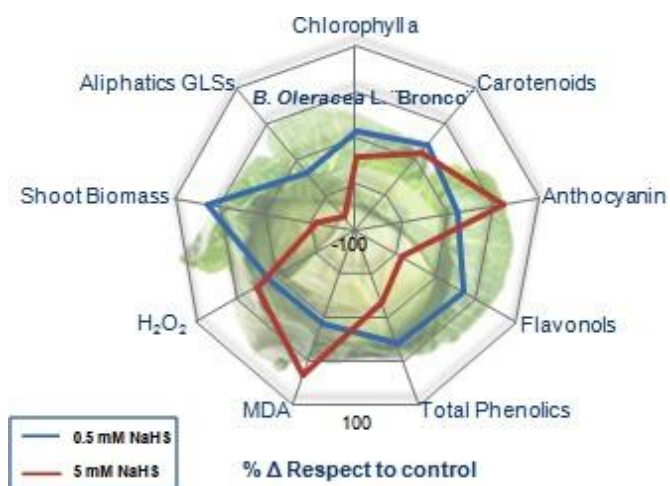
In addition to antioxidant vitamins, carotenoids, and polyphenols, Brassica vegetables provide a large group of GLSs (Plumb et al., 1996). These compounds possess rather low antioxidant activity, but the products of their hydrolysis can protect against cancer (Keum et al., 2004). Some authors observed in their studies that the GLSs content was not affected by  $\text{H}_2\text{S}$  and  $\text{SO}_2$  exposure, demonstrating that these sulfur compounds did not form a sink

for excessive atmospheric sulfur supplied (Westerman et al., 2001; Aghajanzadeh et al., 2014). However, in our study only the aliphatic sinigrin increased at 1 mM NaHS but the 4-hidroxioglucobrasicin was slightly higher at 2.5- and 5-mM dose (Tab. 4). This increase in sinigrin with the treatment 1 mM of NaHS is interesting in terms of improving the nutritional quality because hydrolysis products from sinigrin (i.e. Allyl isothiocyanate), is biologically active against cancer (Park et al., 2013).

It is also interesting that indolic glucosinolates (i.e. glucobrassicin) responded to the highest dosages, selected as toxic or dangerous for these plants, and could be also a sign of stress in the plant, since the indolic glucosinolates always respond to the stress conditions and the aliphatic glucosinolates are more influenced by the variety than to the environment (Fahey et al., 2001; Charron et al., 2005). Besides, the higher sinigrin content can have a significant impact on the organoleptic parameters (aroma and taste) of the cabbage (Banerjee et al., 2014). A decrease in the content of indolic and aliphatic glucosinolates with 2.5 and 5 mM treatments was observed in our study and this decrease in the content of these bioactive compounds could have a negative effect on the nutritional quality of *Brassica oleracea*. Finally, the application of certain doses of H<sub>2</sub>S as we have seen is an effective strategy for modulate glucosinolates profile and thus improve the nutraceutical value of Brassica vegetables (Banerjee et al., 2014).

In view of the results obtained, we can conclude that the effect of the application of NaHS in plants of *Brassica oleracea* L. 'Bronco' is dose-dependent (Scheme 1). In the present study the application in the range of 0.5 to 1 mM of NaHS to a crop of leafy vegetables like *Brassica oleracea* seems to increase the

production of antioxidant compounds such, carotenoids, anthocyanins, total phenols, flavonols, and the glucosinolate. Together with an increase in the biomass doses of 0.5 to 1 mM of NaHS can be defined as 'optimal' to improve the yield and nutritional quality of *Brassica oleracea* var. 'Bronco'. On the other hand, the application of higher dosages (i.e. 2.5 mM of NaHS) could be considered as 'toxic' according to generating an excess of lipid peroxidation, decreases in shoot biomass and losses of chlorophyll as well as reduction in bioactive compounds for the nutritional and phytochemical quality of Brassica vegetables phenolics and glucosinolates, showing clear evidences distress.



**Scheme 1:** Percent variation in some indicative quality and stress parameters after applying low dose (0.5 mM) and high dose (5 mM) of NaHS relative to control plants.

### Acknowledgements

This work was financed by the Investigation group AGR161.

## References

- AHMED, C.B., ROUINA, B.B., SENSOY, S., BOUKHRIS, M., ABDALLAH, F.B., 2009: Changes in gas exchange, proline accumulation and antioxidative enzyme activities in three olive cultivars under contrasting water availability regimes. *Environ. Exp. Bot.* 67, 345–352.
- ASHRAFI, E., RAZMJOO, J., ZAHEDI, M., PESSARAKLI, M., 2015: Screening Alfalfa for Salt Tolerance Based on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes. *Agronomy Journal*, 107, 167.
- BANERJEE, A., VARIYAR, P.S., CHATTERJEE, S., SHARMA, A., 2014: Effect of post harvest radiation processing and storage on the volatile oil composition and glucosinolate profile of cabbage. *Food Chem.* 151, 22–30.
- BASHARAT ALI, R.A.G., 2014: Hydrogen sulfide alleviates cadmium-induced morpho-physiological and ultrastructural changes in *Brassica napus*. *Ecotox. Environ. Safe.* 110 C, 197–207.
- BAZZANO, L.A., HE, J., OGDEN, L.G., LORIA, C.M., VUPPUTURI, S., MYERS, L., WHELTON, P.K., 2002: Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 93–99.
- BEAUCHAMP, R.O., BUS, J.S., POPP, J.A., BOREIKO, C.J., ANDJELKOVICH, D.A., 1984: A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 13, 25–97.
- BLOCK, G., JENSEN, C., DIETRICH, M., NORKUS, E.P., HUDES, M., PACKER, L., 2004: Plasma C-reactive protein concentrations in active and passive smokers: influence of antioxidant supplementation. *J. Am. Coll. Nutr.* 23, 141–147.
- CARTEA, M.E., FRANCISCO, M., SOENGAS, P., VELASCO, P., 2010: Phenolic compounds in brassica vegetables. *Molecules.* 16, 251–280.
- CHARRON, C.S., SAXTON, A.M., SAMS, C.E., 2005: Relationship of climate and genotype to seasonal variation in the glucosinolate-myrosinase system I. Glucosinolate content in ten cultivars of *Brassica oleracea* grown in fall and spring seasons. *J. Sci. Food Agric.* 85, 671–68.
- CHEN, J., WU, F. H., WANG, W. H., ZHENG, C. J., LIN, G. H., DONG, X. J., HE, J. X., PEI, Z. M., ZHENG, H. L., 2011: Hydrogen sulphide enhances photosynthesis through promoting

- chloroplast biogenesis, photosynthetic enzyme expression, and thiol redox modification in *Spinacia oleracea* seedlings J. Exp. Bot. 62, 4481–4493.
- CHO, E., SEDDON, J.M., ROSNER, B., WILLETT, W.C., HANKINSON, S.E., 2004: Prospective study of intake of fruits, vegetables, vitamins, and carotenoids and risk of age-related maculopathy. Arch. Ophthalmol. 122, 883–892.
- DAWOOD, M., CAO, F., JAHANGIR, M.M., ZHANG, G., WU, F., 2012: Alleviation of aluminum toxicity by hydrogen sulfide is related to elevated ATPase, and suppressed aluminum uptake and oxidative stress in barley. J. Hazard. Mater. 209–210, 121–128.
- DEL RIO, D., RODRIGUEZ-MATEOS, A., SPENCER, J.P.E., TOGNOLINI, M., BORGES, G., CROZIER, A., 2013: Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. Antioxid. Redox Signal. 18, 1818–1892.
- ESHGHI, S., JAMALI, B., 2014: Using plant bioregulators to improve production and fruit quality of strawberry. Acta Horticulturae.
- FAHEY, J.W., ZALCMANN, A.T., TALALAY, P., 2001: The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. Phytochemistry. 56, 5–51.
- FRANCISCO M., MORENO D.A., CARTEA M.E., FERRERES F., GARCÍA-VIGUERA C., VELASCO P., 2009: Simultaneous identification of glucosinolates and phenolic compounds in a representative collection of vegetable *Brassica rapa*. J. Chromatogr. A. 1216: 6611– 6619.
- GADALLA, M.M., SNYDER, S.H., 2010: Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. J. Neurochem. 113, 14–26.
- GALATI, G., O'BRIEN, P.J., 2004: Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. Free Radic. Biol. Med. 37, 287–303.
- HEATH, R.L., PACKER, L., 1968: Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125, 189–198.
- HSU, C. L., CHEN, W., WENG, Y. M., TSENG, C. Y., 2003: Chemical composition, physical properties, and antioxidant activities of yam flours as affected by different drying methods. Food Chem. 83, 85–92.
- HU, H., SHEN, W., LI, P., 2014: Effects of hydrogen sulphide on quality and antioxidant capacity of mulberry fruit. J. Food Sci. Technol. 49, 399–409.



- HU, L. Y., HU, S. L., WU, J., LI, Y. H., ZHENG, J. L., WEI, Z. J., LIU, J., WANG, H. L., LIU, Y. S., ZHANG, H., 2012: Hydrogen Sulfide Prolongs Postharvest Shelf Life of Strawberry and plays an antioxidative role in fruits. *J. Agric. Food Chem.* 60, 8684–8693.
- JURANIĆ, Z., ZIZAK, Z., 2005: Biological activities of berries: from antioxidant capacity to anti-cancer effects. *Biofactors.* 23, 207–211.
- KEUM, Y. S., JEONG, W. S., KONG, A.N.T., 2004: Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mutat. Res.* 555, 191–202.
- KHAN, M.I.R., NAZIR, F., ASGHER, M., PER, T.S., KHAN, N.A., 2015: Selenium and sulfur influence ethylene formation and alleviate cadmium-induced oxidative stress by improving proline and glutathione production in wheat. *J. Plant Physiol.* 173, 9–18.
- KHAN, N.A., KHAN, M.I.R., ASGHER, M., FATMA, M., MASOOD, A., SYEED, S., 2014 a: Salinity tolerance in plants: revisiting the role of sulfur metabolites. *J. Plant. Biochem.Physiol.* 2, 2.
- KHAN, M.I.R., ASGHER, M., KHAN, N.A., 2014 b: Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycinebetaine and ethylene in mungbean (*Vigna radiata L.*). *Plant Physiol. Bioch.* 80, 67–74.
- Koch, M.S., Erskine, J.M., 2001: Sulfide as a phytotoxin to the tropical seagrass *Thalassia testudinum*: interactions with light, salinity and temperature. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 266, 81–95.
- LAMERS, L.P.M., GOVERS, L.L., JANSSEN, I.C.J.M., GEURTS, J.J.M., VAN DER WELLE, M.E.W., VAN KATWIJK, M.M., VAN DER HEIDE, T., ROELOFS, J.G.M., SMOLDERS, A.J.P., 2013: Sulfide as a soil phytotoxin. In *Reviews of Front. Plant Sci.* 4.
- LANGE, H., SHROPSHIRE, W., MOHR, H., 1971: An Analysis of Phytochrome-mediated Anthocyanin Synthesis. *Plant Physiol.* 47, 649–655.
- LAW, M.Y., CHARLES, S.A., 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.
- LEE, S.K., KADER, A.A., 2000: Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol. Tec.* 20, 207–220.

- LI, S.-P., HU, K. D., HU, L. Y., LI, Y. H., JIANG, A. M., XIAO, F., HAN, Y., LIU, Y. S., ZHANG, H., 2014: Hydrogen Sulfide Alleviates Postharvest Senescence of Broccoli by Modulating Antioxidant Defense and Senescence-Related Gene Expression. *J. Agric. Food Chem.* 62, 1119–1129.
- LISJAK, M., TEKLIĆ, T., WILSON, I.D., WHITEMAN, M., HANCOCK, J.T., 2013: Hydrogen sulfide: environmental factor or signalling molecule?. *Plant Cell Environ.* 36, 1607–1616.
- MARTÍNEZ-VALVERDE, I., PERIAGO, M.J., PROVAN, G., CHESSON, A., 2002: Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J. Sci. Food Agric.* 82, 323–330.
- MOLYNEUX, S.L., LISTER, C.E., SAVAGE, G.P., 2004: An investigation of the antioxidant properties and colour of glasshouse grown tomatoes. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 55, 537–545.
- MUKHERJEE, S.P., CHOUDHURI, M.A., 1983: Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiol. Plantarum.* 58, 166–170.
- NAKAMURA, M., KURAMATA, M., KASUGAI, I., ABE, M., YOUSSEFIAN, S., 2009: Increased thiol biosynthesis of transgenic poplar expressing a wheat O-acetylserine (thiol) lyase enhances resistance to hydrogen sulfide and sulfur dioxide toxicity. *Plant Cell Rep.* 28, 313–323.
- PARK, M.-H., ARASU, M.V., PARK, N.-Y., CHOI, Y. J., LEE, S. W., AL-DHABI, N.A., KIM, J.B., KIM, S. J., 2013: Variation of glucoraphanin and glucobrassicin: anticancer components in Brassica during processing. *Food Sci. Technol. (Campinas)*, 33, 624–631.
- PLUMB, G.W., LAMBERT, N., CHAMBERS, S.J., WANIGATUNGA, S., HEANEY, R.K., PLUMB, J.A., ARUOMA, O.I., HALLIWELL, B., MILLER, N.J., WILLIAMSON, G., 1996: Are Whole Extracts and Purified Glucosinolates from Cruciferous Vegetables Antioxidants? *Free Radic. Res.* 25, 75–86.
- PODSEDEK, A., 2007: Natural antioxidants and antioxidant capacity of brassica vegetables. In reviews of *J. Food Compo. Anal.* 40, 1-11.
- RICE-EVANS, C.A., SAMPSON, J., BRAMLEY, P.M., HOLLOWAY, D.E., 1997: Why do we expect carotenoids to be antioxidants in vivo?. *Free Radic. Res.* 26, 381–398.
- SEKIYA, J., SCHMIDT, A., WILSON, L.G., FILNER, P., 1982: Emission of hydrogen sulfide by leaf tissue in response to L-cysteine. *Plant Physiol.* 70, 430–436.

- SIDDIQ, M., SOGI, D.S., DOLAN, K.D., 2013: Antioxidant properties, total phenolics, and quality of fresh-cut “Tommy Atkins” mangoes as affected by different pre-treatments. *Food Sci. Technol.-LEB.* 53, 156–162.
- SMITH-WARNER, S.A., SPIEGELMAN, D., YAUN, S. S., ALBANES, D., BEESON, W.L., VAN DEN BRANDT, P.A., FESKANICH, D., FOLSOM, A.R., FRASER, G.E., FREUDENHEIM, J.L., GIOVANNUCCI, E., GOLDBOHN, R.A., GRAHAM, S., KUSHI, L.H., MILLER, A.B., PIETINEN, P., ROHAN, T.E., SPEIZER, F.E., WILLETT, W.C., HUNTER, D.J., 2003: Fruits, vegetables and lung cancer: a pooled analysis of cohort studies. *Int. J. Cancer.* 107, 1001–1011.
- SUN, Y., ZHANG, W., ZENG, T., NIE, Q., ZHANG, F., ZHU, L., 2015. Hydrogen sulfide inhibits enzymatic browning of fresh-cut lotus root slices by regulating phenolic metabolism. *Food Chem.* 177, 376–381.
- THOMPSON, C.R., KATS, G., 1978: Effects of continuous hydrogen sulfide fumigation on crop and forest plants. *Environ. Sci. Technol.* 12, 550–553.
- THOMPSON, C.R., KATS, G., LENNOX, R.W., 1979: Effects of fumigating crops with hydrogen sulfide or sulfur dioxide. *California Agriculture.* 33, 9–10.
- VAN BREUSEGEM, F., VRANOVÁ, E., DAT, J.F., INZÉ, D., 2001: The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci.* 161, 405–414.
- VAN KOOTEN, O., SNEL, J.F., 1990: The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosyn. Res.* 25, 147–150.
- WANG, B. L., SHI, L., LI, Y. X., ZHANG, W. H., 2010: Boron toxicity is alleviated by hydrogen sulfide in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. *Planta*, 231, 1301–1309.
- WELLBURN, A.R., 1994: The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144, 307–313.
- WESTERMAN, S., BLAKE-KALFF, M.M.A., DE KOK, L.J., STULEN, I., 2001: Sulfate uptake and utilization by two varieties of *Brassica oleracea* with different sulfur need as affected by atmospheric H<sub>2</sub>S. *Phyton-Ann. Rei. Bot. A.* 41, 49–62.
- WIMALASEKERA, R., TEBARTZ, F., SCHERER, G.F.E., 2011: Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Sci.* 181, 593–603.

- YU, L. X., ZHANG, C. J., SHANG, H. Q., WANG, X. F., WEI, M., YANG, F. J., SHI, Q. H., 2013: Exogenous hydrogen sulfide enhanced antioxidant capacity, amylase activities and salt tolerance of cucumber hypocotyls and radicles. *J. Integr. Agr.* 12, 445–456.
- ZHANG, H., TAN, Z. Q., HU, L. Y., WANG, S. H., LUO, J. P., JONES, R.L., 2010: Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in germinating wheat seedlings. *J. Integr. Plant Biol.* 52, 556–567.
- ZHANG, H., YE, Y. K., WANG, S. H., LUO, J. P., TANG, J., MA, D. F., 2009: Hydrogen sulfide counteracts chlorophyll loss in sweetpotato seedling leaves and alleviates oxidative damage against osmotic stress. *Plant Growth Regul.* 58, 243–250.
- ZHANG, Y., TALALAY, P., CHO, C.G., POSNER, G.H., 1992: A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 2399–2403.
- ZHU, L., WANG, W., SHI, J., ZHANG, W., SHEN, Y., DU, H., WU, S., 2014: Hydrogen sulfide extends the postharvest life and enhances antioxidant activity of kiwi fruit during storage. *J. Sci. Food Agric.* 94, 2699–2704.



## CAPÍTULO 2



**NaSH: ¿Fitotoxina o bioestimulante en la asimilación del N en plantas de *Brassica oleracea* L. 'Bronco'?**

**D. Montesinos-Pereira, A. de la Torre-González, B. Blasco, J.M. Ruiz.**

**Resumen**

Las vías de asimilación del S y el N están bien coordinadas, y la adición de S aumenta la biomasa y el rendimiento de las plantas y mejora la eficiencia en el uso del N (NUE). Sin embargo, no hay estudios disponibles que hayan intentado explicar los efectos de la aplicación de NaSH en el rendimiento de los cultivos y el metabolismo del N. Este estudio investiga los efectos de diferentes dosis de sulfuro de hidrógeno en forma de NaSH (0, 0,5, 1,2,5 y 5 mM) sobre la formación y asimilación del  $\text{NH}_4^+$  en plantas de *Brassica oleracea* L. 'Bronco'. Según nuestros resultados, los tratamientos 0,5 y 1 mM de NaSH aumentaron la biomasa mientras disminuían la concentración de  $\text{NO}_3^-$ . En el tratamiento 0,5 mM de NaSH, la acumulación de  $\text{NH}_4^+$  disminuyó con la estimulación de la actividad GS, resultando en un mayor contenido en ciertos aminoácidos (AAs) y proteínas solubles, lo que podría estar relacionado con la mayor biomasa encontrada en este tratamiento. Sin embargo, los tratamientos 2,5 y 5 mM de NaSH indujeron la formación y acumulación de  $\text{NH}_4^+$ , así como la fotorrespiración. Esta acumulación excesiva de  $\text{NH}_4^+$  pudo ser responsable de la menor biomasa en estos tratamientos (2,5 y 5 mM de NaSH). Por lo tanto, concluimos que la acumulación excesiva de  $\text{NH}_4^+$  puede ser responsable de la disminución de la biomasa en los tratamientos 2,5 y 5 mM de NaSH. Por otro



lado, la aplicación de 0,5 mM de NaSH podría ser una estrategia beneficiosa para mejorar los procesos involucrados en la asimilación del N, acompañada de un aumento de la biomasa de los cultivos.

**Adapted from Scientia Horticulturae (2019)**

**NaSH: phytotoxin or biostimulant in N assimilation in *Brassica oleracea* L.**

**'Bronco' plants?**

Montesinos-Pereira D, de la Torre-González A, Blasco B, Ruiz JM

Department of Plant Physiology, Faculty of Sciences, University of Granada, E-18071 Granada, Spain

**Abstract**

Assimilatory pathways of S and N are well coordinated, and addition of S increases the biomass and yield in plants and improves efficiency in the use of N (NUE). However, no available studies have attempted to explain the effects of NaSH application on crop yield and N metabolism. This study investigates the effects of different doses of hydrogen sulfide as NaSH (0, 0.5, 1, 2.5 and 5 mM) in the formation and assimilation of  $\text{NH}_4^+$  in plants of *Brassica oleracea* L. 'Bronco'. According to our results, treatments of 0.5 and 1 mM NaSH increased biomass while decreasing the  $\text{NO}_3^-$  concentration. In the treatment 0.5 mM of NaSH,  $\text{NH}_4^+$  accumulation diminished with the stimulation of the GS activity, resulting in a greater content in certain amino acids (AAs); this also boosted the soluble-protein content, which could be related to the greater biomass found in this treatment. However, 2.5 and 5 mM of NaSH induced the formation and accumulation of  $\text{NH}_4^+$  by further reducing this as well as photorespiration. This

excessive accumulation of  $\text{NH}_4^+$  may be responsible for the lower biomass in these treatments (2.5 and 5 mM of NaSH). We conclude that excessive accumulation of  $\text{NH}_4^+$  may be responsible for the decline in biomass in the treatments 2.5 and 5 mM of NaSH. Therefore, the application of 0.5 mM of NaSH could be a beneficial strategy for improving the processes involved in the N assimilation, accompanied by enhanced crop biomass.

Keywords: *Brassica oleracea* L. 'Bronco' · Bioestimulant · Hydrogen sulfide · N assimilation · Phytotoxin

## 1. Introduction

Nitrogen, though an essential macronutrient, frequently acts as a limiting factor for growth (Antal et al., 2010). Under normal conditions, nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) is the main N source and its assimilation is essential for normal plant growth and development (Cruz et al., 2004). The availability of  $\text{NO}_3^-$  has been defined as one of the most limiting factors in the growth of crops (Glass, 2003). This nutrient is essential for the plant as part of nucleic acids and amino acids, performing functions in signaling and protein regulation. This also has a great importance in the biochemistry of compounds such as co-enzymes, pigments, secondary metabolites, and polyamines (Maathuis, 2009).

The reduction of  $\text{NO}_3^-$  to ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) involves the sequential action of nitrate reductase (NR) and nitrite reductase (NiR) (Oliveira et al., 2001). Another pathway by which the plants can produce  $\text{NH}_4^+$  is photorespiration. This process can produce 20-fold more  $\text{NH}_4^+$  than that generated by  $\text{NO}_3^-$  reduction

and is considered the largest source of this cation, especially in C3 plants (Hirel and Lea, 2001).

$\text{NH}_4^+$  is toxic to plants, causing proton extrusion associated with  $\text{NH}_4^+$  uptake, cytosolic pH disturbances, and uncoupling of photophosphorylation (Kronzucker et al., 2001). Therefore, it must be rapidly assimilated into nontoxic organic nitrogen compounds via glutamine synthetase (GS) and glutamate synthase (GOGAT). Alternatively, glutamate dehydrogenase (GDH) can also catalyze  $\text{NH}_4^+$  incorporation into glutamate by reductive amination of 2-oxoglutarate (Cammaerts and Jacobs, 1985). Although the exact physiological roles of this enzyme in plant growth and development are not clear, it is known to be activated by ammonium and it has been proposed to play a complementary role under adverse environmental conditions (Bittsánszky et al., 2015). Traditionally, the application of  $\text{NO}_3^-$  to these nutrient-deficient soils has improved plant health and therefore production (Garnett et al., 2009). Some investigators have enhanced the process of  $\text{NO}_3^-$  assimilation by overexpression of the key enzymes involved in this process (GS and GOGAT), demonstrating that this overexpression augments biomass and grain yield in such crops as bean and rice (Yamaya et al., 2002). There are other mechanisms by which the efficiency of N assimilation has been improved, such as the use of rootstock genotypes having greater capacity to take up this nutrient and therefore of improving assimilation in the aerial part (Sánchez-Rodríguez et al., 2011). Other authors claim that another way to improve efficiency in N (NUE) use is by manipulating carbon metabolism at the level of transcription factors that regulate genes involved in the metabolism of organic acids (Masclaux-Daubresse et al., 2010). It should be noted that fertilization with other essential nutrients such as sulfur

reportedly raise NUE, since a good nutritional status of S in the plant facilitates N uptake and assimilation (Salvagiotti et al., 2009).

Assimilatory pathways of S and N are well coordinated and deficiency in one element has been shown to extensively obstruct the metabolic pathway of the other (Hawkesford and de Kok, 2006; Scherer, 2008). In particular, sulfur is an essential nutrient for sulfur-amino acids (cysteine and methionine), natural antioxidants (reduced glutathione; GSH), co-enzymes, prosthetic groups (ferredoxin), vitamins, secondary metabolites, phytochelatins (PCs), lipids, and N assimilation (Scherer, 2008). In this sense, some authors claim that the addition of this mineral in the form of ammonium sulfate increases the biomass and yield in plants such as wheat and improves efficiency in the use of N (NUE) (Salvagiotti et al., 2009). Other researchers claim that sulfate resupply after 3 days of sulfur deprivation rapidly reactivates the assimilation process by stimulating the activity of NR, GS, and OASTL (Zhang et al., 2015).

With respect to the different forms of applying this macronutrient to plants, in last few years interest has intensified in the study of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) on plant physiology (Lisjak et al., 2013). High doses of H<sub>2</sub>S in greenhouses caused leaf lesions, defoliation, stunted growth, and provoked the death of sensitive species such as alfalfa (*Medicago sativa* L), lettuce (*Lactuca sativa*), and sugar beet (*Beta vulgaris*) (Thompson and Kats, 1978). Although several works have shown that this compound can adversely affect the growth and physiology of crops (Koch and Erskine, 2001), recent works suggest that H<sub>2</sub>S is a more fundamental molecule which is produced by plants and used to control plant function (Zhang et al., 2010). In fact, H<sub>2</sub>S has proved active as a signal molecule and has been used to promote the antioxidant enzyme activities and

uptake of elements against abiotic stress in barley (Dawood et al., 2012). Another specific signaling role for H<sub>2</sub>S in plants perhaps includes its role in controlling stomatal activity. However, there is inconsistency in this regard, some groups suggesting that it is involved in closure (García-Mata and Lamattina, 2010), while others suggest that it induces opening (Lisjak et al., 2011).

Furthermore, no available studies have attempted to explain the effects of NaSH application on crop yield and N metabolism, and therefore the aim of this study was to analyze the way in which sulphur application in the form of NaHS influences biomass production and nitrogen metabolism in *Brassica oleracea* L. "Bronco".

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material and treatments

Seeds of *B. oleracea* cv. Bronco (Saliplant S.L., Spain) were germinated and grown for 35 days in cell flats of 3 cm × 3 cm × 10 cm filled with a perlite mixture substratum. The flats were placed on benches in an experimental greenhouse located in Southern Spain (Saliplant S.L., Motril, Granada). After 35 days, the seedlings were transferred to a growth chamber under the following controlled environmental conditions: Relative humidity 50%; Day/night temperatures 25/18 °C; 16/8 h photoperiod at a photosynthetic photon flux density (PPFD) of 350  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (measured at the top of the seedlings with a 190 SB quantum sensor, LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, USA). Under these conditions the plants were grown in hydroponic culture in lightweight polypropylene trays (60

cm diameter top, bottom diameter 60 cm and 7 cm in height) of 3 L volume. Throughout the experiment the plants were treated with a growth solution made up of 4 mM KNO<sub>3</sub>, 3 mM Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 2 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2 μM MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 10 μM ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.25 μM CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.1 μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 5 mg L<sup>-1</sup> Fe-chelate (Sequestrene; 138 FeG100) and 10 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. This solution, with a pH of 5.5–6.0, was changed every three days.

## 2.2. Experimental design

The NaSH treatments were initiated 43 days after germination and were maintained for 30 days. The experiment consisted in a randomized complete block design with five treatments that were supplied with the irrigation solution (complete nutrient solution amended with different NaSH levels: 0 mM NaSH as control; and 0.5 mM, 1 mM, 2.5 mM and 5 mM NaSH as treatments, using eight plants per replicate and three replicates per treatment.

## 2.3. Plant sampling

Plants of each treatment (73 days after germination) were divided into roots and leaves, washed with distilled water, dried on filter paper and weighed, thereby obtaining fresh weight (FW). Half of leaves from each treatment were frozen at -80 °C for further work and biochemical assays and the other half of the plant material was lyophilised for 48h to obtain the dry weight (DW).

## 2.4. Determination of H<sub>2</sub>S concentration

*Brassica oleracea* leaves were ground under liquid nitrogen and extracted by 1 mL phosphate buffered saline (50 mM, pH 6.8) containing 0.1 M EDTA and 0.2

M ascorbic acid. After centrifugation at 12000 rpm for 15 min at 4 °C, 400 mL of the supernatant was injected to 200 mL 1% zinc acetate and 200 mL 1 N HCl. After 30 min reaction, 100 mL 5 mM dimethyl-p-phenylene-diamine dissolved in 7 mM HCl was added to the trap followed by the injection of 100 mL 50 mM ferric ammonium sulfate in 200 mM HCl. After 15 min incubation at room temperature, the amount of H<sub>2</sub>S was determined at 667 nm (Sekiya et al., 1982).

#### 2.5. Determination of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentrations

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> were analyzed from an aqueous extraction of 0.2 g of DW in 10 mL of Millipore-filtered water. NH<sub>4</sub><sup>+</sup> was determined by using the colorimetric method described by Krom (1980). A 100 µL aliquot was taken for NO<sub>3</sub><sup>-</sup> determination and added to 10 % (w/v) salicylic acid in sulfuric acid at 96 %, and the NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration was measured by spectrophotometry as performed by Cataldo et al. (1975).

#### 2.6. N assimilation enzymes

Leaves were ground in a mortar at 0 °C in 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 7.5) containing 2 mM EDTA, 1.5 % (w/v) soluble casein, 2 mM dithiothreitol (DTT), and 1 % (w/v) insoluble polyvinylpyrrolidone. The homogenate was filtered and then centrifuged at 30,000 g for 20 min. The resulting extract (cytosol and organelle fractions) was used to measure the enzyme activity of NR, GOGAT, and GDH. The extraction medium was optimized for these enzyme activities so that they could be extracted together according to the same method (Singh and Srivastava, 1986).

NR assay followed the methodology of Kaiser and Lewis (1984).  $\text{NO}_2^-$  formed was determined colorimetrically at 540 nm after azocoupling with sulphanilamide and naphthylethylenediamine dihydrochloride. GOGAT activity was assayed spectrophotometrically at 30 °C by monitoring the oxidation of NADH at 340 nm, essentially as indicated by Singh and Srivastava (1986), always within 2 h of extraction. Two controls, without ketoglutarate and glutamine, respectively, were used to correct for endogenous NADH oxidation. The decrease in absorbance was recorded for 5 min. The protein concentration of the extracts used for the determination of the activity of all enzymes was obtained according to the method described by Bradford (1976), using bovine serum albumin to the pattern curve.

GDH activity was assayed by monitoring the oxidation of NADH at 340 nm, essentially as indicated by Singh and Srivastava (1986). The reaction mixture consisted of 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer (pH 7.5) with 200 mM  $\text{NH}_4^+$  sulfate, 0.15 mM NADH, 2.5 mM 2-oxoglutarate, and enzyme extract. Two controls, without ketoglutarate and  $\text{NH}_4^+$  sulfate, respectively, were used to correct for endogenous NADH oxidation. The decrease in absorbance was recorded for 3 min.

GS was determined by an adaptation of the hydroxamate synthetase assay published by Kaiser and Lewis (1984). Leaves were ground in a mortar at 0 °C in 50 mL of maleic acid-KOH buffer (pH 6.8), containing 100 mM sucrose, 2 % (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol, and 20 % (v/v) ethyleneglycol. The homogenate was centrifuged at 30,000 g for 20 min. The resulting extract was used to measure the enzyme activity of GS. The reaction mixture used in the GS assay was composed of 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer (pH 7.5), with 4 mM EDTA, 100 mM L-



sodium glutamate, 450 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 300 mM hydroxylamine, 100 mM ATP, and enzyme extract. Two controls were prepared, one without glutamine and the other without hydroxylamine. After incubation at 28 °C for 30 min, the formation of glutamylhydroxamate was colorimetrically determined at 540 nm after complexing with acidified ferric chloride.

## 2.7. Photorespiration enzymes

For the GO determination, fresh leaf tissue (0.1 g) was ground in a chilled mortar with PVPP and 1 mL of 50 mM Tris–HCl buffer (pH 7.8) with 0.01 % Triton X-100 and 5 mM 1,4-dithioerythritol (DTT). The homogenate was centrifuged at 30,000g for 20 min. The supernatant was decanted and immediately used for the enzyme assay. GO was assayed as described by Feierabend and Beevers (1972) with modifications. A volume of assay mixture containing 50 mM Tris–HCl buffer (pH 7.8), 0.009 % Triton X-100, 3.3 mM phenylhydrazine HCl (pH 6.8), 50 µL of plant extract, and 5 mM glycolic acid (neutralized to pH 7 with KOH) was used to start the reaction. GO activity was determined by following the formation of glyoxylate phenylhydrazone at 324 nm for 2 min after an initial lag phase of 1 min.

For determination of GGAT, leaves were ground in a chilled mortar in 100 mM Tris–HCl buffer (pH7.3) containing 0.1 % (v/v) Triton X-100 and 10 mM DTT. The homogenate was centrifuged at 20,000g for 10 min. The resulting extract was used to measure enzyme activity. The extraction medium was optimized for the enzyme activities such that they could be extracted together using the same method (Hoder and Rej, 1983).

## 2.8. Amino acids (AAs) profile determination

AAs were measured by high performance liquid chromatography (HPLC, Agilent 1100). Fresh leaf tissue was homogenized in methanol containing DL-3-aminobutyric acid as an internal standard and samples were agitated. Subsequently, 200  $\mu$ L of chloroform were added and samples were agitated again for 5 min. Finally, 400  $\mu$ L of ultra-pure water were added and samples were then vortexed and centrifuged at 13 000 g for 5 min. The upper phase was transferred to a microtube and dried under vacuum over-night. Dry residues were resuspended in an appropriate volume of ultra-pure water and 10  $\mu$ L of the resulting extract were sampled for amino acid derivatization according to the AccQ Tag Ultra Derivatization Kit protocol (Waters Corp., Milford, USA) (Rubio-Wilhelmi et al., 2012).

#### 2.9. Soluble proteins concentration and total reduced-N determination

Soluble proteins were determined by homogenization of 0.1 g FW in 50 mM cold  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer at pH7 and centrifugation at 12,000 g for 15 min. The resulting supernatant was used for the determination of soluble proteins were measured with Bradford G-250 reagent (Bradford, 1976).

A sample of 0.1 g DW was digested with sulfuric acid and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Wolf, 1982). After dilution with deionized water, a 1-mL aliquot of the digest was added to the reaction medium containing buffer [5 % potassium sodium tartrate, 100  $\mu$ M sodium phosphate, and 5.4 % (w/v) sodium hydroxide], 15 %/0.03 % (w/v) sodium silicate/sodium nitroprusside, and 5.35 % (v/v) sodium hypochlorite. Samples were incubated at 37 °C for 15 min, and total reduced N

was measured by spectrophotometry according to the method of Baethgen and Alley (1989).

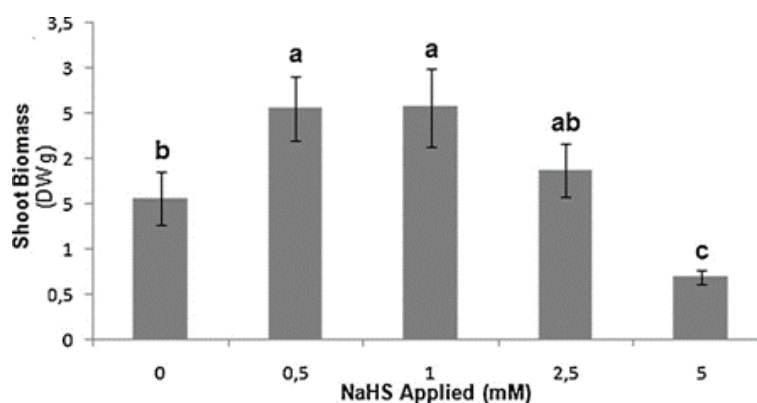
#### 2.10. Statistical analysis

For statistical analysis, data compiled were submitted to ANOVA at 95% confidence, using the Statgraphics Centurion XVI program. Means were compared with Fisher's least significant difference (LSD). The significance levels were expressed as \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; ns, not significant.

### 3. Results

#### 3.1. Effects of NaSH on shoot biomass and H<sub>2</sub>S foliar concentration

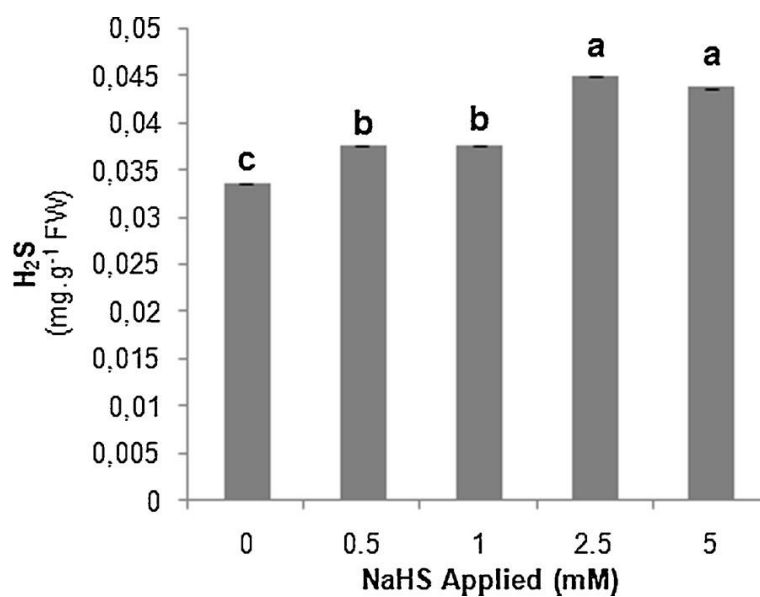
The greatest increase in shoot biomass was observed after the application of the dose 0.5 and 1 mM of NaSH, while the application of 5 mM reduced biomass relative to the control treatment (Fig. 1).



**Fig. 1** Effects of different doses of NaSH on shoot biomass. Columns are mean  $\pm$  S.E. ( $n = 9$ ).

Different letters indicate significant difference between values.

The H<sub>2</sub>S concentration generally increased in all treatments compared with the 0-mM dose of NaSH (Fig. 2). The treatments 0.5 and 1 mM moderately raised values with respect to control, while the highest values resulted with 2.5 and 5 mM of NaSH (Fig. 2).



**Fig. 2** Effects of different doses of NaSH on H<sub>2</sub>S foliar concentration. Columns are mean  $\pm$  S.E. ( $n = 9$ ). Different letters indicate significant difference between values.

### 3.2. Effects of NaSH on the NO<sub>3</sub><sup>-</sup> reduction

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> content significantly increased with the doses 2.5 and 5 mM whereas 0.5 and 1 mM caused a significant decrease with respect to control (Table 1). While NR activity significantly rose in the 5-mM treatment, it fell significantly with 0.5, 1 and 2.5 mM compared to control (Table 1). A higher ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) concentration resulted in the doses 2.5 and 5 mM of NaSH, but lower with the dose 0.5 and 1 mM (Table 1).

**Table 1** Effects of different doses of NaHS on NO<sub>3</sub><sup>-</sup> content, NR activity and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> content

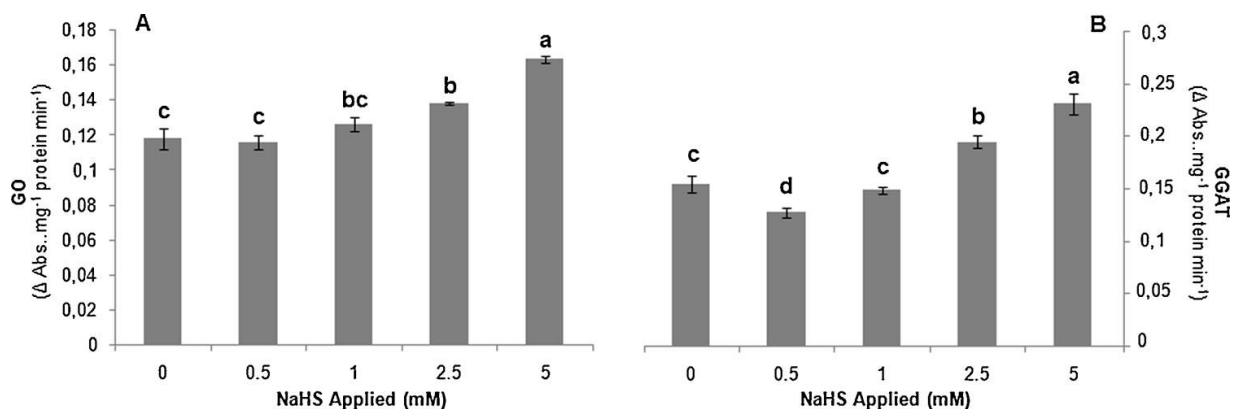
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg.g <sup>-1</sup> DW)	NR (mmol mg <sup>-1</sup> prot h <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg.g <sup>-1</sup> DW)
Control	1.47 ± 0.01	0.91 ± 0.03	4.88 ± 0.24
0.5 mM NaHS	1.09 ± 0.01	0.55 ± 0.03	3.81 ± 0.20
1.0 mM NaHS	0.68 ± 0.06	0.29 ± 0.02	3.55 ± 0.10
2.5 mM NaHS	1.61 ± 0.02	0.43 ± 0.02	9.46 ± 0.35
5.0 mM NaHS	1.71 ± 0.01	1.44 ± 0.02	12.86 ± 0.24
<i>p</i> -Value	***	***	***
LSD <sub>0.05</sub>	0.089	0.08	0.69

Values are mean ± S.E. (n=9). LSD, least significant difference; \* *P*<0.05; \*\* *P*<0.01; \*\*\* *P*<0.001; ns, not significant

### 3.3. Effects of NaSH on photorespiration process

GO activity significantly increased with the dose 2.5 and 5 mM compared with control (Fig. 3A). Treatment 0.5 and 1 mM did not alter GO activity with respect to the control (Fig. 3A). The GGAT activity was stronger in the 2.5- and 5-mM

NaSH treatment but weaker in the 0.5-mM NaSH treatment, whereas no significant differences resulted with the application of 1 mM of NaSH (Fig. 3B).



**Fig. 3** Effects of different doses of NaSH on the activity of the enzymes involved in photorespiration: (A) GO and (B) GGAT. Columns are mean  $\pm$  S.E. ( $n = 9$ ). Different letters indicate significant difference between values.

### 3.4. Effects of NaSH on $\text{NH}_4^+$ assimilation

GS activity significantly increased under 0.5-, 2.5-, and 5-mM NaSH treatments compared with the control, while values in the 1-mM treatment did not significantly differ from control (Table 2). On the other hand, GOGAT activity rose only in 5-mM dose (Table 2). The GDH activity augmented with the dose 5 mM, whereas a significant decrease resulted with 0.5 NaSH mM compared with control (Table 2).

**Table 2** Effects of different doses of NaHS on the activity of GS, GOGAT and GDH

	GS (mmol mg <sup>-1</sup> prot min <sup>-1</sup> )	GOGAT (ΔAbs mg <sup>-1</sup> prot min <sup>-1</sup> )	GDH (ΔAbsmg <sup>-1</sup> prot min <sup>-1</sup> )
Control	0.90 ± 0.03	0.062 ± 0.01	0.27 ± 0.03
0.5 mM NaHS	1.07 ± 0.02	0.041 ± 0.01	0.22 ± 0.01
1.0 mM NaHS	0.93 ± 0.02	0.056 ± 0.01	0.25 ± 0.02
2.5 mM NaHS	1.26 ± 0.02	0.047 ± 0.01	0.31 ± 0.01
5.0 mM NaHS	1.97 ± 0.07	0.101 ± 0.01	0.58 ± 0.02
<i>p</i> -Value	***	***	***
LSD <sub>0.05</sub>	0.11	0.03	0.06

Values are mean ± S.E. (n=9). LSD, least significant difference; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; ns, not significant



### 3.5. Effects of NaSH on AAs profile

In terms of the concentration of different types of AAs analyzed, the 0.5-mM of NaSH treatment presented higher concentrations of several AAs, such as asparagine (Asn), serine (Ser), cysteine (Cys), glutamine (Gln), histidine (His), threonine (Thr), tyrosine (Tyr) phenylalanine (Phe), isoleucine (Ile), leucine (Leu) and lysine (Lys) with respect to the control (Table 3). The greatest fall in the content of total AAs occurred in treatment 5 mM of NaSH compared with control. On the other hand, the content in total AAs increased in the treatment 0.5 mM of NaSH with respect to treatments 2.5 and 5mM of NaSH (Table 3).

### 3.6. Effects of NaSH on soluble proteins and total reduced N concentrations

The concentrations of soluble proteins and total reduced N increased significantly in the treatments 0.5 and 1mM of NaSH while treatments with 2.5, and 5 mM registered a decline compared with control (Table 4).

**Table 4** Effects of different doses of NaHS on the foliar concentration of soluble proteins and total reduced N

	Soluble proteins (mg g <sup>-1</sup> FW)	Total reduced N (mg g <sup>-1</sup> DW)
Control	1.99 ± 0.24 c	32.27 ± 1.07 c
0.5 mM NaHS	3.27 ± 0.38 a	39.92 ± 1.64 a
1.0 mM NaHS	2.29 ± 0.31 b	37.65 ± 1.86 b
2.5 mM NaHS	1.32 ± 0.17 d	27.42 ± 0.72 d
5.0 mM NaHS	1.07 ± 0.11 e	25.11 ± 0.68 d
<i>p</i> -Value	***	***
LSD <sub>0.05</sub>	0.16	2.68

Values are mean ± S.E. (n=9). LSD, least significant difference; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; ns, not significant

**Table 3** Effect of different doses of NaHS on foliar amino acids profile

	Amino acids profile ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW)				
	Control	0.5 mM NaHS	1.0 mM NaHS	2.5 mM NaHS	5.0 mM NaHS
Aspartate	5.97 $\pm$ 0.08	5.89 $\pm$ 0.18	5.73 $\pm$ 0.02	5.40 $\pm$ 0.26	4.81 $\pm$ 0.08
Glutamate	2.67 $\pm$ 0.12	1.73 $\pm$ 0.07	1.59 $\pm$ 0.16	1.20 $\pm$ 0.22	0.90 $\pm$ 0.05
Asparagine	3.11 $\pm$ 0.09	6.32 $\pm$ 0.16	1.91 $\pm$ 0.33	1.14 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.05
Serine	0.47 $\pm$ 0.06	1.26 $\pm$ 0.03	0.49 $\pm$ 0.03	1.08 $\pm$ 0.35	0.24 $\pm$ 0.01
Cysteine	0.27 $\pm$ 0.03	1.21 $\pm$ 0.05	0.15 $\pm$ 0.03	0.73 $\pm$ 0.09	0.13 $\pm$ 0.01
Glutamine	3.33 $\pm$ 0.08	5.85 $\pm$ 0.27	1.90 $\pm$ 0.21	1.75 $\pm$ 0.29	2.05 $\pm$ 0.08
Histidine	8.13 $\pm$ 0.39	9.62 $\pm$ 1.37	6.63 $\pm$ 0.39	5.43 $\pm$ 0.75	1.45 $\pm$ 0.05
Glycine	1.08 $\pm$ 0.04	0.93 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.04	0.26 $\pm$ 0.01
Threonine	1.81 $\pm$ 0.05	2.51 $\pm$ 0.19	0.65 $\pm$ 0.07	0.65 $\pm$ 0.08	0.20 $\pm$ 0.01
Arginine	5.04 $\pm$ 0.20	5.49 $\pm$ 0.25	1.50 $\pm$ 0.22	0.77 $\pm$ 0.05	0.96 $\pm$ 0.05
Alanine	5.10 $\pm$ 0.10	5.35 $\pm$ 0.61	4.54 $\pm$ 0.10	3.99 $\pm$ 0.46	2.73 $\pm$ 0.08
Thyroxine	0.37 $\pm$ 0.02	0.61 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.04	0.20 $\pm$ 0.01	0.21 $\pm$ 0.01
Valine	1.10 $\pm$ 0.09	1.03 $\pm$ 0.02	0.51 $\pm$ 0.04	0.45 $\pm$ 0.01	0.55 $\pm$ 0.01
Tryptophan	2.08 $\pm$ 0.07	1.88 $\pm$ 0.18	0.69 $\pm$ 0.08	0.86 $\pm$ 0.03	1.22 $\pm$ 0.05
Phenylalanine	7.63 $\pm$ 0.19	9.46 $\pm$ 0.45	3.14 $\pm$ 0.49	2.11 $\pm$ 0.18	0.38 $\pm$ 0.01
Isoleucine	1.94 $\pm$ 0.04	2.33 $\pm$ 0.00	1.01 $\pm$ 0.08	0.41 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.01
Leucine	0.81 $\pm$ 0.01	2.01 $\pm$ 0.17	0.47 $\pm$ 0.01	0.72 $\pm$ 0.08	0.29 $\pm$ 0.01
Lysine	3.02 $\pm$ 0.04	4.96 $\pm$ 0.06	0.95 $\pm$ 0.07	1.98 $\pm$ 0.00	1.15 $\pm$ 0.01
Total	53.77 $\pm$ 2.45	68.44 $\pm$ 3.11	32.09 $\pm$ 1.89	29.01 $\pm$ 2.21	18.87 $\pm$ 0.85

Values are mean  $\pm$  S.E. (n=9). LSD, least significant difference; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; n.s. = not significant.

## 4. Discussion

### 4.1. Effects of NaSH on shoot biomass and H<sub>2</sub>S foliar concentration

Previous studies have reported that applications of H<sub>2</sub>S at low concentrations (H<sub>2</sub>S at 100 mg/L) significantly stimulate growth in alfalfa, lettuce, and sugar beets (de Kok et al., 1983), while other researchers have found greater leaf dry weight in *Brassica napus* after applying H<sub>2</sub>S (Ali et al. 2014). In agreement with these findings, our results showed, for 0.5 and 1 mM of NaSH treatments, greater shoot biomass than in control (Fig. 1). On the other hand, in the 5-mM NaSH treatment, shoot biomass diminished (Fig. 1), implying that NaSH application at high concentrations may be toxic to the plant and thus may lower biomass (Koch and Erskine, 2001). Whereas the above results indicate that the effect of NaSH application on shoot biomass is dose-dependent, 0.5 and 1 mM augmented biomass, while the 5 mM dose significantly lowered biomass with respect to control (Fig. 1).

Although the exact physiological mechanism whereby the H<sub>2</sub>S exerts its toxic effect is not yet clear, it is known to be related to the reactions of their secondary products with cellular components such as enzymes and membranes instead of simply from a disturbance in the status of sulfur in plants (Nakamura et al., 2009). On the other hand, the phytotoxicity of H<sub>2</sub>S appears to result from its high affinity for the metallo-groups of proteins (Beauchamp et al., 1984). Damage to cell membranes as well as the interaction of H<sub>2</sub>S with cell enzymes could explain reduced biomass after the treatments 2.5 and 5 mM of NaSH (Fig. 1).

In this study, endogenous H<sub>2</sub>S generally increased under the application of all NaSH doses, the highest values being recorded at the doses 2.5 and 5 mM (Fig. 2). These data are consistent with those registered by Zhang et al. (2010), who observed a greater concentration of sulfur after the implementation of 200 mg Kg<sup>-1</sup> of this in wheat plants. Other authors have reported greater H<sub>2</sub>S content in mulberry fruits after the application of 0.8 mM of NaSH (Hu et al. 2014).

#### 4.2. Effects of NaSH on the NO<sub>3</sub><sup>-</sup> reduction and photorespiration process

In our study, the NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration with a 0.5- and 1-mM dose of NaSH fell with respect to control (Table 1). This is a desirable effect in the nutritional quality of *Brassica oleracea* L. 'Bronco', since limiting human nitrate intake is relevant because of the toxicological issues involved in vegetable consumption. Although is NO<sub>3</sub><sup>-</sup> considered non-toxic, it may induce toxicity as a result of its conversion to nitrite in the digestive tract (Zeilmaker et al., 2010).

This lower NO<sub>3</sub><sup>-</sup> content in the treatments of 0.5 and 1 mM, could be related to higher assimilation. Nevertheless, the reaction catalyzed by NR, the critical step in NO<sub>3</sub><sup>-</sup> assimilation (Lea and Azevedo, 2006), in our study, showed significantly less activity with treatments 0.5 and 1 mM of NaSH (Table 1). This decrease is consistent with the greater NR activity induced by NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, as reported elsewhere (Cruz et al., 2004). In the present study, lower NR activity resulted in a significant decline in the NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentration in the treatments of 0.5 and 1 mM, compared to the control (Table 1). However, we found a higher concentration of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in treatments with 2.5 and 5 mM of NaSH (Table 1), which appear to have raised NR activity (Cruz et al. 2004), resulting in greater NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in these

treatments relative to the control. Indeed, other authors report a higher  $\text{NH}_4^+$  content in relation to increased  $\text{NO}_3^-$  assimilation (Rubio-Wilhelmi et al., 2012).

$\text{NH}_4^+$  can be formed not only by  $\text{NO}_3^-$  assimilation but also by diverse metabolic pathways such as photorespiration or protein degradation (Tercé-Laforgue et al., 2004). It has been estimated that the production of  $\text{NH}_4^+$  by photorespiration is much greater than the primary assimilation of  $\text{NH}_4^+$  resulting from nitrate reduction and it is known that the photorespiration intensifies under stress conditions (Wingler et al., 2000; Bai et al., 2008). In fact, in the present study, we observed accelerated activity GO and GGAT in this process under the doses 2.5 and 5 mM of NaSH, which was related to higher  $\text{NH}_4^+$  concentrations in these treatments (Figs. 3A-B). This  $\text{NH}_4^+$  accumulation may be toxic to the plant, triggering common ammonium toxicity symptoms including biomass reduction, reactive oxygen species overproduction, pH deregulation, or ion imbalance (Fuertes-Mendizábal et al., 2013). Therefore, this increase in  $\text{NH}_4^+$  concentration in these treatments may be correlated with a loss in shoot biomass in such treatments (Table 1 and Fig. 1). The enzymes involved in photorespiration (GO and GGAT) in the 0.5- and 1-mM of NaSH treatments remained the same or decreased respect to control (Figs. 3A-B), which, coupled with a reduced assimilation of  $\text{NO}_3^-$  in these treatments (Table 1) explains their lower  $\text{NH}_4^+$  concentration (Table 1). This intensification in the activity of enzymes involved in photorespiration after applying high doses (2.5 and 5 mM) of NaSH, could be because this compound acts as a signal molecule promoting the closure of the stomata (García-Mata and Lamattina, 2010). This closure could lower the  $\text{CO}_2$  concentration, thereby favoring the oxygenase activity of the enzyme ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase oxygenase (Rubisco).

#### 4.3. Effects of NaSH on $\text{NH}_4^+$ assimilation, AAs profile and soluble proteins and total reduced N concentrations

The high  $\text{NH}_4^+$  content generated in the assimilation of nitrate and photorespiration with 2.5- and 5-mM doses must be quickly assimilated into non-toxic organic compounds. This assimilation occurs via GS-GOGAT, resulting in organic forms such as glutamate (Glu) and glutamine (Gln). These amino acids (AAs) are precursors in the synthesis of other AAs, nucleic acids, chlorophylls and hormones (Oliveira et al., 2001). With respect to the treatments 0.5, 2.5, and 5 mM NaSH, the greater GS activity compared to control augmented shoot biomass only in the treatment 0.5 mM of NaSH, so that for this treatment a direct relationship might exist between the increase in biomass and N assimilation (Table 2 and Fig. 1). In the treatment 0.5 mM of NaSH, the GOGAT activity remained the same as in control plants (Table 2). This, coupled with the intensified GS activity led to stronger  $\text{NH}_4^+$  assimilation, correlating with the rise in biomass observed under this treatment (Table 2 and Fig. 1). On the other hand, the 1-mM treatment showed no significant difference with respect to control (Table 2), and thus in this case the greater shoot biomass could be due to the induction of another physiological process key for plant growth, such as photosynthesis (data not shown). Finally, GOGAT activity was stimulated by the 5-mM NaSH dose compared with control (Table 2). NADH-GOGAT is the isoform analyzed in this work and seems to be controlled by the N-status of the plant: its activity increases in response to ammonium ions and it has therefore been argued that NADH-GOGAT plays a fundamental role in primary nitrogen assimilation in plants (Esposito et al., 2005). This could explain why in the treatment 5-mM NaSH increased GOGAT activity (Table 2). However, this

intensified activity of one of the key enzymes in N assimilation failed to remove the excess of  $\text{NH}_4^+$  in this treatment.

Alternatively, GDH also catalyzed  $\text{NH}_4^+$  incorporation into glutamate by reductive amination of 2-oxoglutarate. It has been proposed that  $\text{NH}_4^+$  might be a signal responsible for inducing GDH activity (Masclaux-Daubresse et al., 2010). Indeed, our study shows a burst in the GDH activity with the 5-mM dose relative to the control, and this might be involved in the uptake of excessive  $\text{NH}_4^+$  found in this treatment (Tables 1 and 2). However, the intensified assimilation and GDH activity with 2.5 and 5 mM of NaSH (Table 2), appeared to be insufficient to reduce the  $\text{NH}_4^+$  concentrations (Table 1) and did not translate as an increase in amino acids and soluble proteins (Table 3 and Fig. 4). Another possible explanation of these results could be that in the 2.5 and 5 mM of NaSH treatments the amino acids produced are transported to growth zones due to the toxicity of  $\text{NH}_4^+$  caused in the intermediate leaves of these plants, which would explain the induction of the enzymes GS, GOGAT, and GDH (Table 2) and the reduction of the concentration in these treatments of amino acids (Table 3), soluble proteins and total reduced N (Table 4). On the other hand, treatments 0.5 and 1 mM did not appreciably stimulate the activity of the enzyme GDH (Table 2), perhaps because in these treatments  $\text{NH}_4^+$  does not undergo an excessive buildup (Table 1).

In terms of the concentration of different types of AAs analyzed, humans are unable to synthesize the so-called essential amino acids: methionine (Met), Thr, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr and Hys; therefore, these compounds must be supplied in adequate amounts in the diet for metabolic needs. In this study, we observed that most of these essential amino acids increased with the application of 0.5

mM of NaSH with respect to the control plants (Table 3), so the application of this treatment could suppose an increase in the intake of beneficial compounds for the human.

Also note that the amino acids Ser and Cys also increased their concentration in the treatment 0.5 mM of NaSH (Table 3). This suggests that the application of 0.5 mM of NaSH stimulates S assimilation, since Ser is the substrate of the enzyme SAT and Cys is the final product of the sulfur assimilation process. Cys is also key in the formation of organic sulfur compounds, which could also contribute to the biomass growth observed in these treatments (Gotor et al., 2015).

In the present study, the sharpest increase in total AA content, compared with control, occurred in the treatment of 0.5 mM of NaSH, and these AAs are used in protein synthesis. In fact, the highest content of total amino acids (Table 3) correlates with a higher concentration of soluble proteins as well as biomass in 0.5-mM NaSH treatment with respect to the control (Table 4 and Fig. 1). On the other hand, the total content in AAs decrease in the 2.5- and 5-mM NaSH and this was reflected in a decrease in soluble proteins and total reduced N (Tables 3 and 4). Indeed, the soluble protein declined in treatments 2.5 and 5 mM of NaSH relative to the control treatment (Table 4). It should be noted that the increase in total reduced N in the treatments 0.5 and 1mM with respect to the control (Table 4) correlated with greater biomass (Fig. 1).



## 5. Conclusion

In view of the results, we conclude that excessive accumulation of  $\text{NH}_4^+$  may be responsible for the decline in biomass in the treatments 2.5 and 5 mM of NaSH. Therefore, the application of 0.5 mM of NaSH could be a beneficial strategy for improving the processes involved in the N assimilation, accompanied by enhanced essential amino acids and crop biomass production.

## Acknowledgements

This work was financed by the PAI programme (Plan Andaluz de Investigación, Grupo de Investigación AGR161).

## 6. References

- Ali, B., Gill, RA., Yang, S., Gill, MB., Ali, S., Rafiq, MT., Zhou, W., 2014. Hydrogen sulfide alleviates cadmium-induced morpho-physiological and ultrastructural changes in *Brassica napus*. *Ecotox. Environ. Safe.* 110, 197–207.
- Antal, T., Mattila, H., Hakala-Yatkin, M., Tyystjärvi, T., Tyystjärvi, E., 2010. Acclimation of photosynthesis to nitrogen deficiency in *Phaseolus vulgaris*. *Planta* 232, 887–898.
- Baethgen, WE., Alley, MM., 1989. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 20, 961–969.
- Bai, J., Xu, DH., Kang, HM., Chen, K., Wang, G., 2008. Photoprotective function of photorespiration in *Reaumuria soongorica* during different levels of drought stress in natural high irradiance. *Photosynthetica* 46, 232–237.
- Beauchamp, RO., Bus, JS., Popp, JA., Boreiko, CJ., Andjelkovich, DA., 1984. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Crit. Rev.Toxicol.* 13, 25–97.
- Bitsánszky, A., Pilinszky, K., Gyulai, G., Komives, T., 2015. Overcoming ammonium toxicity. *Plant Sci.* 231, 184–190.

- Bradford, MM., 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.
- Cammaerts, D., Jacobs, M., 1985. A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 163, 517–526.
- Cataldo, DA., Maroon, M., Schrader, LE., Youngs, VL., 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 6, 71–80.
- Cruz, JL., Mosquim, PR., Pelacani, CR., Araújo, WL., Da Matta, FM., 2004. Effects of nitrate nutrition on nitrogen metabolism in *Cassava*. *Biol. Plant.* 48, 67–72.
- Dawood, M., Cao, F., Jahangir, MM., Zhang, G., Wu, F., 2012. Alleviation of aluminum toxicity by hydrogen sulfide is related to elevated ATPase, and suppressed aluminum uptake and oxidative stress in barley. *J. Hard. Mater.* 209–210, 121–128.
- De Kok, LJ., Thompson, CR., Mudd, B., Kats, G., 1983. Effect of H<sub>2</sub>S fumigation on water-soluble sulfhydryl compounds in shoots of crop plants. *Zeitschrift Pflanzenphysiol* 111, 85-89.
- Esposito, S., Guerriero, G., Vona, V., Di, V., Rigano, M., Carfagna, S., Rigano, C., 2005. Glutamate synthase activities and protein changes in relation to nitrogen nutrition in barley: the dependence on different plastidic glucose-6P dehydrogenase isoforms. *J. Exp. Bot.* 56, 55–64.
- Feierabend, J., Beevers, H., 1972. Developmental studies on microbodies in wheat leaves: I. Conditions influencing enzyme development. *Plant Physiol.* 49, 28–32.
- Fuertes-Mendizábal, T., González-Torralba, J., Arregui, LM., González-Murua, C., González-Moro, MB., Estavillo, JM., 2013. Ammonium as sole N source improves grain quality in wheat. *J. Sci. Food Agric.* 93, 2162–2171.
- García-Mata, C., Lamattina, L., 2010. Hydrogen sulphide, a novel gasotransmitter involved in guard cell signalling. *New Phytol.* 188, 977–984.
- Garnett, T., Conn, V., Kaiser, BN., 2009. Root based approaches to improving nitrogen use efficiency in plants. *Plant Cell Environ.* 32, 1272–1283.

- Glass, ADM., 2003. Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraints upon nitrogen absorption. *Crit. Rev. Plant Sci.* 22, 453–470.
- Gotor, C., Laureano-Marin, AM., Moreno, I., Aroca, A., Garcia, I., Romero, LC., 2015. Signaling in the plant cytosol: cysteine or sulfide?. *Amino Acids* 47, 2155-2164.
- Hawkesford, MJ., De Kok, LJ., 2006. Managing sulphur metabolism in plants. *Plant Cell Environ.* 29, 382–395.
- Hirel, B., Lea, P.J., 2001. Ammonia Assimilation, in: Lea, PDPJ., Morot-Gaudry, J-F. (Eds.), *Plant Nitrogen*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 79–99.
- Hoder, M., Rej, R., 1983. Alanine aminotransferase. In: Bergmeyer, HU., Bergmeyer, J., Gral, M. (Eds.) *Methods of enzymatic analysis* 3, 444–456.
- Hu, H., Shen, W., Li, P., 2014. Effects of hydrogen sulphide on quality and antioxidant capacity of mulberry fruit. *Int. J. Food Sci. Technol.* 49, 399–409.
- Kaiser, JJ., Lewis, O., 1984. Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of nitrate-fed *Helianthus annuus* L. *Plant Soil* 77, 127–130.
- Koch, MS., Erskine, JM., 2001. Sulfide as a phytotoxin to the tropical seagrass *Thalassia testudinum*: interactions with light, salinity and temperature. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 266, 81–95.
- Krom, MD., 1980. Spectrophotometric determination of ammonia: a study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *Analyst* 105, 305–316.
- Kronzucker, HJ., Britto, DT., Davenport, RJ., Tester, M., 2001. Ammonium toxicity and the real cost of transport. *Trends Plant Sci.* 6, 335–337.
- Lea, P., Azevedo, R., 2006. Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. *Ann. Appl. Biol.* 149, 243–247.
- Lisjak, M., Teklic, T., Wilson, ID., 2013. Whiteman M and Hancock JT, Hydrogen sulfide: environmental factor or signalling molecule?. *Plant Cell Environ.* 36, 1607–1616.
- Lisjak, M., Teklić, T., Wilson, ID., Wood, M., Whiteman, M., Hancock, JT., 2011. Hydrogen sulfide effects on stomatal apertures. *Plant Signal Behav.* 6, 1444–1446.

- Maathuis, FJ., 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 250–258.
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., Suzuki, A., 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann. Bot.* 105, 1141–1157.
- Nakamura, M., Kuramata, M., Kasugai, I., Abe, M., Youssefian, S., 2009. Increased thiol biosynthesis of transgenic poplar expressing a wheat O-acetylserine (thiol) lyase enhances resistance to hydrogen sulfide and sulfur dioxide toxicity. *Plant Cell Rep.* 28, 313–323.
- Oliveira, IC., Brenner, E., Chiu, J., Hsieh, MH., Kouranov, A., Lam, HM., Shin, MJ., Coruzzi, G., 2001. Metabolite and light regulation of metabolism in plants: lessons from the study of a single biochemical pathway. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34, 67–575.
- Rubio-Wilhelmi, MM., Sanchez-Rodriguez, E., Rosales, MA., Blasco, B., Rios, JJ., Romero, L., Blumwald. E., Ruiz, JM., 2012. Ammonium formation and assimilation in PSARK::IPT tobacco transgenic plants under low N. *J. Plant Physiol.* 169, 157–162.
- Salvagiotti, F., Castellarín, JM., Miralles, DJ., Pedrol, HM., 2009. Sulfur fertilization improves nitrogen use efficiency in wheat by increasing nitrogen uptake. *Field Crop Res.* 113, 170–177.
- Sánchez-Rodríguez, E., Rubio-Wilhelmi, MM., Blasco, B., Constán-Aguilar, C., Romero, L., Ruiz JM., 2011. Variation in the use efficiency of N under moderate water deficit in tomato plants (*Solanum lycopersicum*) differing in their tolerance to drought. *Acta Physiol. Plant.* 33, 1861–1865.
- Scherer, HW., 2008. Impact of Sulfur on N<sub>2</sub> Fixation of Legumes, in: Khan, DNA., Singh, DS., Umar, DS. (Eds.), *Sulfur Assimilation and Abiotic Stress in Plants*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 43–54.
- Sekiya, J., Schmidt, A., Wilson, LG., Filner, P., 1982. Emission of hydrogen sulfide by leaf tissue in response to L-cysteine. *Plant Physiol.* 70, 430–436.
- Singh, RP., Srivastava, HS., 1986. Increase in glutamate synthase (NADH) activity in maize seedlings in response to nitrate and ammonium nitrogen. *Physiol. Plant.* 66, 413–416.

- Tercé-Laforgue, T., Mäck, G., Hirel, B., 2004. New insights towards the function of glutamate dehydrogenase revealed during source-sink transition of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants grown under different nitrogen regimes. *Physiol. Plant.* 120, 220–228.
- Thompson, CR., Kats, G., 1978. Effects of continuous hydrogen sulfide fumigation on crop and forest plants. *Environ. Sci. Technol.* 12, 550–553.
- Wingler, A., Lea, PJ., Quick, WP., Leegood, RC., 2000. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philos. Trans. Res. Soc. London B Biol. Sci.* 355, 1517–1529.
- Wolf, B., 1982. A comprehensive system of leaf analyses and its use for diagnosing crop nutrient status. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 13, 1035–1059.
- Yamaya, T., Obara, M., Nakajima, H., Sasaki, S., Hayakawa, T., Sato, T., 2002. Genetic manipulation and quantitative-trait loci mapping for nitrogen recycling in rice. *J. Exp. Bot.* 53, 917–925.
- Zeilmaker, MJ., Bakker, MI., Schothorst, R., Slob, W., 2010. Risk assessment of N-nitrosodimethylamine formed endogenously after fish-with-vegetable meals. *Toxicol. Sci.* 116, 323–335.
- Zhang, H., Tan, ZQ., Hu, LY., Wang, SH., Luo, JP., Jones, RL., 2010. Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in germinating wheat seedlings. *J. Integr. Plant Biol.* 52, 556–567.
- Zhang, Q., Lee, BR., Park, SH., Zaman, R., Avice, JC., Ourry, A., Kim, TH., 2015. Sulfate resupply accentuates protein synthesis in coordination with nitrogen metabolism in sulfur deprived *Brassica napus*. *Plant Physiol. Biochem.* 87, 1–8.



## CAPÍTULO 3





**El sulfuro de hidrógeno incrementa la tolerancia al estrés por alcalinidad en plantas de Col (*Brassica oleracea* L. 'Bronco')**

**D. Montesinos-Pereira, A. de la Torre-González, B. Blasco, J.M. Ruiz.**

**Resumen**

El presente estudio investiga cómo la aplicación de sulfuro de hidrógeno (0,5 mM de NaHS) en *Brassica oleracea* L. 'Bronco' influye en los procesos implicados en la homeostasis del glutatión y la tolerancia al estrés alcalino (50mM NaHCO<sub>3</sub>:Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Según nuestros resultados, el estrés alcalino aumenta el contenido en O<sub>2</sub><sup>-</sup>, la peroxidación de lípidos y las actividades de las enzimas glioxalasa I (Gly I) y glioxalasa II (Gly II) que desintoxican el metilglioxal (MG), al tiempo que disminuyen la biomasa, la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), la actividad de las enzimas que intervienen en la síntesis de glutatión (GSH) y en el ciclo AsA-GSH, así como el contenido en glutatión reducido y las diferentes formas de ascorbato (AsA). Por otro lado, la aplicación del NaHS mejoró la respuesta antioxidante, induciendo la actividad SOD y mejorando los procesos involucrados en la homeostasis del glutatión, impulsando el contenido en glutatión reducido (GSH) así como la actividad de las enzimas clave en la síntesis del glutatión y en el ciclo de AsA-GSH. En consecuencia, la aplicación de H<sub>2</sub>S en forma de NaHS a una concentración de

0,5 mM podría fortalecer la tolerancia de *Brassica oleracea* L. 'Bronco' frente a estrés alcalino.

Adapted from *Scientia Horticulturae* (2018)

Hydrogen sulphide increase the tolerance to alkalinity stress in cabbage plants (*BRASSICA OLERACEA* L. “BRONCO”)

D. Montesinos-Pereira, A. de la Torre-González, B. Blasco, J.M. Ruiz

### Abstract

The present study investigates how the application of hydrogen sulphide (0.5 mM of NaHS) in *Brassica oleracea* L. ‘Bronco’ influences the processes involved in glutathione homeostasis and tolerance to alkaline stress (50 mM NaHCO<sub>3</sub>:Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). According to our results, alkaline stress increases the O<sub>2</sub><sup>·-</sup> content, lipid peroxidation, and the activities of the enzymes glyoxalase I (Gly I) and glyoxalase II (Gly II) that detoxify methylglyoxal (MG) while decreasing biomass, the activity of superoxide dismutase (SOD), the activity of enzymes involved in glutathione (GSH) synthesis and in the AsA-GSH cycle, as well as the content in reduced glutathione and the different forms of ascorbate (AsA). On the other hand, the application of NaHS improved the antioxidant response inducing SOD activity and improving processes involved in glutathione homeostasis, boosting the reduced GSH content as well as the activity of key enzymes in glutathione synthesis and in the AsA-GSH cycle. Consequently, the application of H<sub>2</sub>S in the form of NaHS at a concentration of 0.5 mM could fortify the tolerance of *BRASSICA OLERACEA* L. ‘Bronco’ against alkaline stress.

**Keywords:** Alkaline stress; Antioxidant response; *Brassica oleracea* L.; Glutathione homeostasis; Hydrogen sulphide.



## Introduction

Alkaline stress can be defined as a stress by alkaline salts, such as  $\text{NaHCO}_3$  and  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Therefore, it is important to specify that this type of stress is caused by alkaline salts and not by neutral salts ( $\text{NaCl}$ ), which causes what is commonly known as “salinity stress” (Shi and Sheng, 2005; Shi and Wang, 2005). However, the effects of the two types of stress can be similar in some cases, but several studies have shown that alkaline stress provokes more severe damage than does salinity stress (Kawanabe and Zhu, 1991; Wang et al., 2008).

Alkaline stress, very common in arid and semiarid areas, lowers agricultural productivity in these regions, where agriculture is normally intensive. Worldwide, 10% of cultivated soils are subject to alkaline stress (Tanji, 2002), and the FAO predicts that by the year 2050, the reduction in land available for agriculture for the presence of these types of stress will exceed 50% (Jin et al., 2008).

The high pH and the massive accumulation of  $\text{Na}^+$  provoked by alkaline stress can lead to a lack of protons and to the destruction or inhibition of the electrochemical gradients/potentials in root cells, altering many physiological functions, such as water and ion uptake (Wang et al., 2011a; Wang et al., 2011b). Due to these alterations in physiological functions of the root, alkaline stress ( $\text{pH} > 8.5$ ) inhibits growth and photosynthesis. Inhibited photosynthesis results from fewer photosynthetic pigments, often due to under alkaline stress to a lower uptake of  $\text{Mg}^{2+}$  caused by its precipitation in the rhizosphere (Li et al., 2010). Other authors contend that

P limitation due to its precipitation under alkaline conditions may diminish CO<sub>2</sub> intake for photosynthesis (Fredeen et al., 1990). The reduced CO<sub>2</sub> intake due to this type of stress causes oxidative damage in cells and alters antioxidant metabolism, generating reactive oxygen species (ROS). Excess electrons produced during photosynthesis are transferred to O<sub>2</sub> molecules and these produce ROS (Cakmak, 2005).

The ROS released adversely affect biological structures, including DNA damage, amino acid oxidation, and lipid peroxidation (Asada, 1999; Johnson et al., 2003). ROS react with cell membranes, especially thylacoid membranes, which are rich in unsaturated fatty acids. Lipid peroxidation breaks up these fatty acids, disrupting their function in the membrane, disturbing fluidity, breaking lipid bonds, and inactivating membrane enzymes (Miyake et al., 2005).

To avoid this type of damage, plants have ROS detoxification mechanisms which can be divided into: enzymatic systems, composed of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR), dehydroascorbate reductase (DHAR), monodehydroascorbate reductase (MDHAR); and non-enzymatic systems, made up of antioxidant compounds such as phenolic compounds (e.g. phenols, flavonoids, carotenoids), ascorbic acid (AsA), and glutathione (GSH) (Shalata et al., 2001; Reddy et al., 2004).

Therefore, treatments to stimulate the antioxidant response in plants could be effective to reduce the damage provoked by alkaline stress. Recently, research has focused on the use of fortification programmes with ions such as

iodine, selenium, and silica to reduce or alleviate abiotic stress. In addition to the ions mentioned above, these treatments also use exogenous H<sub>2</sub>S.

For many years, H<sub>2</sub>S has been considered a phytotoxin, since high doses of H<sub>2</sub>S applied to greenhouse crops cause leaf injury, defoliation, growth reduction, and death in sensitive species such as alfalfa (*MEDICAGO SATIVA* L.) and lettuce (*LACTUCA SATIVA*), among others (Thompson and Kats, 1978). However, recent studies indicate that H<sub>2</sub>S application at certain doses can act as a signaling molecule, bolstering tolerance to different types of abiotic stress by inducing the antioxidant response, especially stimulating GSH synthesis. These results refer to heat stress in *ZEA MAYS*, drought stress in *Triticum AESTIVUM* L., cold stress in *MUSA* spp., stress from excess arsenates in *Pisum SATIVUM* L., stress from heavy metals with lead in *BRASSICA NAPUS*, and salt stress in strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Camarosa) (Shan et al., 2011; Christou et al., 2013; Li et al., 2014; Ali et al., 2014; Luo et al., 2015; Singh et al., 2015).

In fact, greater tolerance against these types of stress from the induction of the antioxidant response can be achieved by altering GSH homeostasis, since this compound is fundamental in this process. GSH, a tripeptide with a thiol group composed of three amino acids (L-cysteine, acid L-glutamic, and glycine), is consumed in numerous redox reactions to combat oxidative stress, giving rise to its oxidized form GSSG (Mishra et al., 2008). The enzyme serine acetyltransferase (SAT) is considered the key enzyme in cysteine synthesis, providing one of the substrates of GSH synthesis (Droux, 2004). GSH is synthesized in two steps that depend on ATP catalyzed by the enzymes glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -ECS; the enzyme

that limits the speed of the process) and the enzyme glutathione synthetase (GS) (Noctor and Foyer, 1998; Tripathi et al., 2012). First,  $\gamma$ -ECS catalyses the formation of the peptide bond between the  $\gamma$ -carboxyl group of glutamate and the  $\alpha$ -amino cysteine, and then GS catalyses the formation of the peptide bond between the cysteinyl group of  $\gamma$ -glutamylcysteine and the  $\alpha$ -amine group of glycine (Flocco et al., 2004). It has been demonstrated that the overexpression of the enzyme serine acetyltransferase SAT increased resistance to oxidative stress in transgenic tobacco plants (Blaszczyk et al., 1999). On the other hand, recent studies show that  $H_2S$  can act in the regulation of GSH synthesis and accumulation, increasing  $\gamma$ -ECS activity under conditions of water stress in wheat plants (Shan et al., 2011).

The GSH has diverse functions in the protection against oxidative stress, acting in the ascorbate-glutathione cycle, which is fundamental in antioxidant defense. In this cycle, APX reduces hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) to water using AsA as the electron donor, in such a way that this latter compound is oxidized, converting to dehydroascorbate (DHA), which in turn is again reduced to AsA using reduced GSH as the electron donor. On the other hand, the GSSG formed is transformed again into reduced GSH in the reaction catalyzed by the NAD(P)H-dependent enzyme GR (Gomes et al., 2013). Some researchers hold that the ascorbate-glutathione cycle plays a prominent role in tolerance against alkaline stress (Liu et al., 2015). On the other hand, there are studies stating that  $H_2S$  pretreatments increase enzyme activities in ROS detoxification, such as those involved in the ascorbate-glutathione cycle: APX, GR, DHAR, and one of the key



enzymes in GSH synthesis, such as  $\gamma$ -ECS under salinity-stress conditions (Shan et al., 2014). Under these conditions, it has also been observed that the decrease in the AsA/DHA and GSH/GSSG quotients was mitigated after H<sub>2</sub>S application (Shan et al., 2014).

In addition, GSH actively participates in the detoxification of MG, which can cause oxidative stress that closely resembles that caused when the ROS concentration rises in plant cells (Wang et al., 2009; Desai et al., 2010). MG is a cytotoxic compound generated through the glycolysis pathway in eukaryote cells (Yadav et al., 2005a), and its overproduction can be generated through fatty acids or the metabolism of amino acetone (Casazza et al., 1984). The small quantity of MG produced under normal growth conditions can easily and quickly be metabolized by the glyoxalase system of the plant. However, different stress conditions can trigger greater production and thus accumulation of MG. Depending on the species, the MG concentration can rise 2 to 6 fold in response to the different types of stress, such as salinity, drought, or cold (Yadav et al., 2005a,b).

Many works show that the MG content increases under osmotic stress and that GSH metabolism is important in the detoxification of this compound under these conditions (Veena et al., 1999). MG is detoxified primarily by maintaining the homeostasis of GSH through the glyoxalase system. This involves the activity of two enzymes: glyoxalase I (Gly I) and glyoxalase II (Gly II). Gly I uses a molecule of reduced GSH to convert MG into S-d-lactoylglutathione (SLG). Afterwards Gly II converts SLG into d-lactate and a molecule of reduced GSH that is re-cycled to enter the system again (Yadav et al., 2008). Transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.)

plants that overexpress Gly I show significant tolerance to MG and to high NaCl concentrations. In these plants, Gly I expression reportedly increases in response to salt stress, osmotic stress, and phytohormone stimuli (Espartero et al., 1995). Also, it has been shown that the application of NaHS (0.1 mM) can spur the activity of Gly I and Gly II when an excess of MG is generated under conditions of Cd stress in rice plants (*ORYZA SATIVA* L. cv. BRR1 dhan52). Finally, another enzyme that also determines the homeostasis of GSH is glutathione peroxidase (GPX), which uses the GSH pool as a substrate to detoxify H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced under stress conditions (Anjum et al., 2012). For example, the overexpression of the enzyme GPX in transgenic tobacco plants increased seedling growth under different stress conditions of cold (10 °C), heat (30 °C), and salinity (100 mM of NaCl) (Roxas et al., 2000). Li et al. (2014) have reported increased GPX activity after pretreatment of *ZEA MAYS* plants with NaHS (3 mM) under heat-stress conditions.

In view of the above, in the present work, we seek to determine the alterations caused in antioxidant metabolism, and specifically GSH homeostasis under severe alkaline stress. In this sense, we determine whether NaHS application could fortify the antioxidant capacity and promote GSH homeostasis in *Brassica oleracea* 'Bronco' plants under alkalinity stress, with the final aim of considering the use of this compound as a fortifier in areas where the levels of alkaline salts in the soil limit yield and quality in these crops.

## 2. Material and methods

### 2.1 Crop management and experimental design

Seeds of *B. OLERACEA* cv. Bronco (genotype sensitive to alkalinity) were germinated and grown for 30 days in cell flats of 3 cm × 3 cm × 10 cm filled with a perlite mixture substratum. The flats were placed on benches in an experimental greenhouse located in Southern Spain (Saliplant S.L., Motril, Granada). After 30 days, the seedlings were transferred to a growth chamber under the following controlled environmental conditions: Relative humidity 50%; Day/ night temperatures 25/18 °C; 16/8 h photoperiod at a photosynthetic photon flux density (PPFD) of 350  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (measured at the top of the seedlings with a 190 SB quantum sensor, LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, USA). The plants were acclimating to these conditions during 8 days. Under these conditions the plants were grown in hydroponic culture in lightweight polypropylene trays (60 cm diameter top, bottom diameter 60 cm and 7 cm in height) of 3 L volume. Throughout the experiment the plants were treated with a growth solution made up of 4 mM  $\text{KNO}_3$ , 3 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 2 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 6 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.25  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.1  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 5  $\text{mg L}^{-1}$  Fe-chelate (Sequestrene; 138 FeG100) and 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ . This solution, with a pH of 5.5–6.0, was changed every three days.

The treatments were initiated 38 days after germination and were maintained for 25 days. The experiment consisted in a randomized complete block design with three treatments, a first treatment (Control) received complete

nutrient solution, a second treatment (alkalinity) received complete nutrient solution plus 50 mM NaHCO<sub>3</sub>:Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (9:1) (pH = 9) and a third treatment (alkalinity-NaHS) received complete nutrient solution plus 50 mM NaHCO<sub>3</sub>:Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (9:1) (pH = 9) and 0.5 mM of NaHS, using eight plants per replicate and three replicates per treatment. NaHS was applied at a dose of 0.5 mM, which we have confirmed in previous studies to stimulate growth in *BRASSICA OLERACEA* cv. Bronco plants (Montesinos-Pereira et al., 2016).

## 2.2 Plant sampling

Plants of each treatment (63 days after germination) were divided into roots and leaves, washed with distilled water, dried on filter paper and weighed, thereby obtaining fresh weight (FW). Half of leaves from each treatment were frozen at -30 °C for further work and biochemical assays and the other half of the plant material was lyophilized for 48 h to obtain the dry weight (DW).

## 2.3. SOD activity, O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content, and lipid peroxidation

### (Lipoxygenase (LOX) activity and MDA content)

SOD activity was assayed by monitoring the inhibition of the photochemical reduction of nitro blue tetrazolium (NBT) according to the methods of and Beyer and Fridovich (1987) and Giannopolitis and Ries (1977), with some modifications Leaves material were homogenized in liquid N<sub>2</sub> with buffer Heppes-HCl 50 mM pH 7.6 containing 5 mM EDTA and 1% polyvinylpyrrolidone (PVP) centrifuged at 4 °C for 10 min. One unit of SOD activity was defined as

the amount of enzyme required to cause 50% inhibition of the reduction of NBT as monitored at  $A_{560}$  nm. Determination of  $O_2^-$  in leaf extracts was based on the ability to reduce NBT (Kubiś, 2008). Optical density was measured at a wave-length of  $A_{580}$  nm and the  $O_2^{\% -}$  concentration was expressed as  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW.

The  $H_2O_2$  concentration in leaf extracts was colorimetrically measured as described by Mukherjee and Choudhuri (1983). Leaf samples were extracted with cold acetone to determine the  $H_2O_2$  levels. The intensity of yellow color of the supernatant was measured at  $A_{415}$  nm. The result of  $H_2O_2$  concentration was expressed as  $\text{mg g}^{-1}$  DW.

LOX activity in leaf extracts was measured according to Minguez-Mosquera et al. (1993), using 50 mM K-phosphate buffer (pH 6.0) containing 5 mM EDTA and 1% PVP for extraction. The LOX activity was calculated following the rise in the extinction at  $A_{234}$ , expressed as  $\Delta \text{Abs min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  protein. For the MDA assay, leaves were homogenized with 3 ml of 50 mM solution containing 0.07%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  and 1.6%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  and centrifuged at  $20,000 \times g$  for 25 min in a refrigerated centrifuge. For measurement of MDA concentration 3 ml of 20% trichloroacetic acid (TCA) containing 0.5% thiobarbituric acid (TBA) was added to a 1-mL aliquot of the supernatant. The mixture was heated at 95 °C for 30 min, quickly cooled in an ice bath and then centrifuged at  $10,000 \times g$  for 10 min. The absorbance of the supernatant was read at  $A_{532}$  and  $A_{600}$  nm. The result of MDA was expressed as  $\Delta \text{Abs g}^{-1}$  DW.

## 2.4 GSH synthesis and concentration

The SAT activity was performed following Tripathi et al. (2012). The reaction mixture contained 63 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1.25 mM EDTA, 1.25 mM DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid), 0.1 mM acetyl-CoA, 1 mM and L-Serine. The rate of reaction was followed at  $A_{412}$  nm.

For the assay of  $\gamma$ -ECS, plants were homogenized in 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 5 mM EDTA and 1% PVP. The reaction mixture contained 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM KCl, 2 mM EDTA, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Na<sub>2</sub>ATP, 2 mM phosphoenolpyruvate, 10 mM L- glutamate, 10 mM L- $\alpha$ -aminobutyrate, 0.2 mM NADH, 7 unit ml<sup>-1</sup> pyruvate kinase (ICN, USA) and 10 unit ml<sup>-1</sup> L-lactic dehydrogenase (Sigma, USA) Seelig and Meister (1984). The reaction was initiated by the addition of enzyme extract. Activity of  $\gamma$ -ECS was determined from the rate of formation of ADP (assumed to be equal to the rate of NADH oxidation; monitored at 340 nm and expressed as  $\Delta$  Abs min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein).

Reduced GSH, GSSG and total GSH (reduced GSH + GSSG) were assayed according to the GSSG-recycling method described by Griffith (1980). Leaves material were homogenized in liquid N<sub>2</sub> with meta- phosphoric acid at 5% (w/v) and centrifuged at 13,500×g and 4 °C for 15 min. GSSG and total GSH were assayed in the same extract. A standard curve was analyzing in the same manner as for the extracts. Reduced GSH levels were estimated as the difference between total GSH and GSSG. The results of the different forms of GSH were expressed as mg g<sup>-1</sup> DW.

## 2.5 Ascorbate–glutathione cycle

The activities of the enzymes APX and GR were assayed in leaf extracts following Rao et al. (1996). APX activity was determined by registering the absorbance change at  $A_{290}$  nm and GR activity was measured after monitoring the oxidation of NADPH at  $A_{340}$  nm for 3 min.

The determination of total AsA concentration (reduced AsA and DHA forms) in leaf extracts was following the method of Law et al. (1983). This method is based on the reduction of  $Fe^{3+}$  to  $Fe^{2+}$  by AsA in acid solution. Leaves material were homogenized in liquid  $N_2$  with metaphosphoric acid at 5% (w/v) and centrifuged at 4 °C for 15 min. Absorbance was measured at  $A_{525}$  nm against a standard AsA curve that followed the same procedure as above. The results were used to quantify the total AsA concentration, while the reduced AsA was quantified in the same way as the previous procedure, replacing 0.1 ml of DTT with 0.1 ml of distilled  $H_2O$ . Finally, the DHA concentration was deduced from the difference between total AsA and reduced AsA. The result of AsA forms were expressed as  $mg\ g^{-1}$  DW.

## 2.6 GSH metabolism enzymes

Glyoxalase I assay was carried out according to Hasanuzzaman et al. (2011). The increase in absorbance was recorded at  $A_{240}$  nm for 1 min. One unit of Glyoxalase I is the amount of enzyme that will convert 1.0  $\mu$ mole of S-

lactoylglutathione from methylglyoxal and reduced GSH per minute at pH 6.6 and 25 °C.

Glyoxalase II activity was determined according to the method of Principato et al. (1987) by monitoring the formation of GSH at  $A_{412}$  nm for 1 min. One unit of Glyoxalase II is the amount of enzyme that will convert 1.0  $\mu$ mole of GSH from S-lactoylglutathione per minute at pH 6.6 and 25 °C.

GPX activity was measured as described by Elia et al., (2003) with slight modification using  $H_2O_2$  as a substrate. The oxidation of NADPH was recorded at  $A_{340}$  nm for 1 min. The protein concentration of the extracts was determined according to the method of Bradford (1976), using bovine-serum albumin as the standard.

## 2.7 Statistical analysis

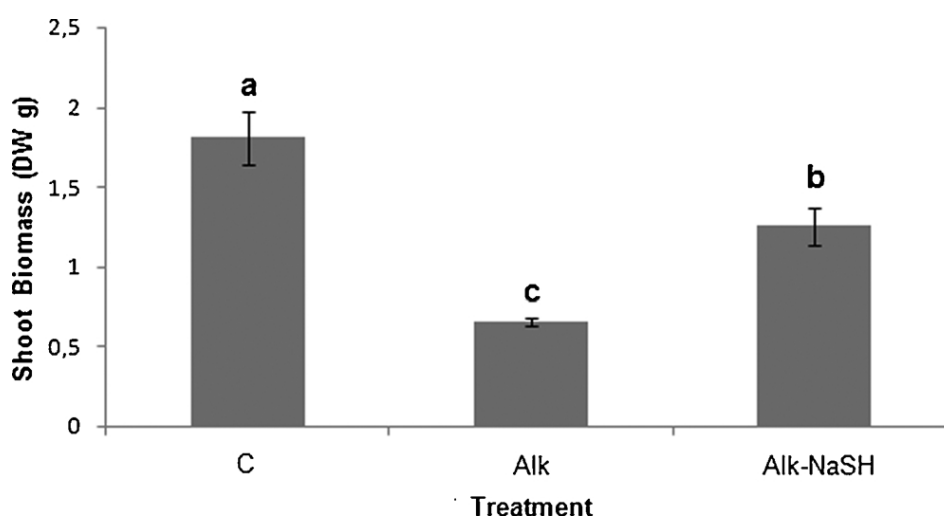
For statistical analysis, data compiled were submitted to ANOVA, and difference between the means were compared with Fisher's least significant difference (LSD;  $P < 0.05$ ).



### 3. Results

#### 3.1 Foliar biomass

Cabbage plants (*Brassica oleracea* L. 'Bronco') subjected to alkaline stress underwent a significant reduction in foliar biomass with respect to control plants, while this reduction was less acute with an application of 0.5 mM de NaHS (Fig. 1).



**Fig. 1.** Effect of alkalinity and NaHS application on shoot biomass in leaves *Brassica oleracea*. Values are means ( $n = 9$ ) and differences between means were compared using Fisher's least significant difference test (LSD,  $p = 0.05$ ).

#### 3.2 SOD activity, $O_2^{\cdot-}$ , $H_2O_2$ content and lipid peroxidation

SOD activity significantly diminished under alkalinity conditions, although the NaHS application boosted the activity of this enzyme under these conditions

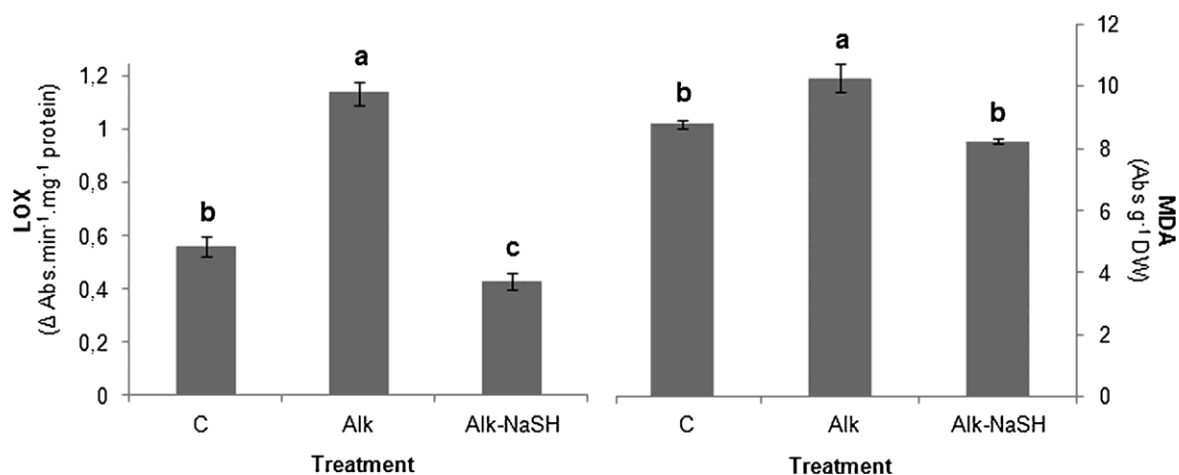
(Table 1). With regard to the foliar  $O_2^{\cdot -}$  concentration, this ROS significantly increased its concentration under alkalinity with respect to control, this gain reducing with NaHS application (Table 1). On the other hand, the  $H_2O_2$  content fell significantly in the alkaline treatment as well as in the alkalinity-NaHS treatment with respect to control with a striking reduction in  $H_2O_2$  when NaHS was applied under alkalinity conditions as compared with the alkaline treatment without NaHS (Table 1).

**Table 1:** Influence of alkalinity and NaSH application on SOD activity and ROS concentration in leaves of *B. oleracea*. Superoxide dismutase (SOD), anion superoxide ( $O_2^{\cdot -}$ ) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ).

	SOD (Units $min^{-1}mg^{-1}$ Prot)	$O_2^{\cdot -}$ ( $\mu g g^{-1}$ DW)	$H_2O_2$ ( $mg g^{-1}$ DW)
Control	27.69 $\pm$ 1.39 a	0.323 $\pm$ 0.075 c	6.017 $\pm$ 0.124 a
Alkalitnity	2.820 $\pm$ 0.09 c	1.441 $\pm$ 0.084 a	3.078 $\pm$ 0.151 b
Akalinity-NaSH	8.190 $\pm$ 0.28 b	0.616 $\pm$ 0.055 b	2.079 $\pm$ 0.068 c
<i>p</i> -Value	***	***	***
LSD <sub>0.05</sub>	2.41	0.21	0.35

Values are mean  $\pm$  S.E. (n=9). LSD, least significant difference; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; ns, not significant

Figure 2 shows the activity of the enzyme LOX as well as the foliar MDA content in cabbage (*Brassica oleracea* L. 'Bronco'), reflecting that the greatest increase in LOX activity occurred under the alkaline treatment, which was correlated with a greater content in MDA in this same treatment (Fig. 2).



**Fig. 2.** Effect of alkalinity and NaHS application on lipid peroxidation in leaves of *B. oleracea*. Lipoyxygenase activity (LOX) (A) and malondialdehyde concentration (B). Values are means ( $n = 9$ ) and differences between means were compared using Fisher's least significant difference test (LSD,  $p = 0.05$ ).

### 3.3 Synthesis and content of the different forms of GSH

In terms of the activity of the main enzymes involved in GSH synthesis, the activity of SAT and  $\gamma$ -ECS proved greatest in the control treatment. However, a significant increase was found in  $\gamma$ -ECS activity in the alkalinity-NaHS treatment with respect to the alkalinity treatment (Table 2).

**Table 2:** Influence of alkalinity and NaSH application on glutathione synthesis in leaves *B. oleracea*. Serine acetyltransferase (SAT),  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -ECS).

	SAT ( $\Delta$ Abs $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ Prot)	$\gamma$ -ECS ( $\Delta$ Abs $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ Prot)
Control	0.495 $\pm$ 0.047 a	2.682 $\pm$ 0.031 a
Alkalinity	0.277 $\pm$ 0.008 b	0.350 $\pm$ 0.036 c
Alkalinity-NaSH	0.304 $\pm$ 0,015 b	0.653 $\pm$ 0.016 b
<i>p</i> -Value	***	***
LSD <sub>0.05</sub>	0.085	0.085

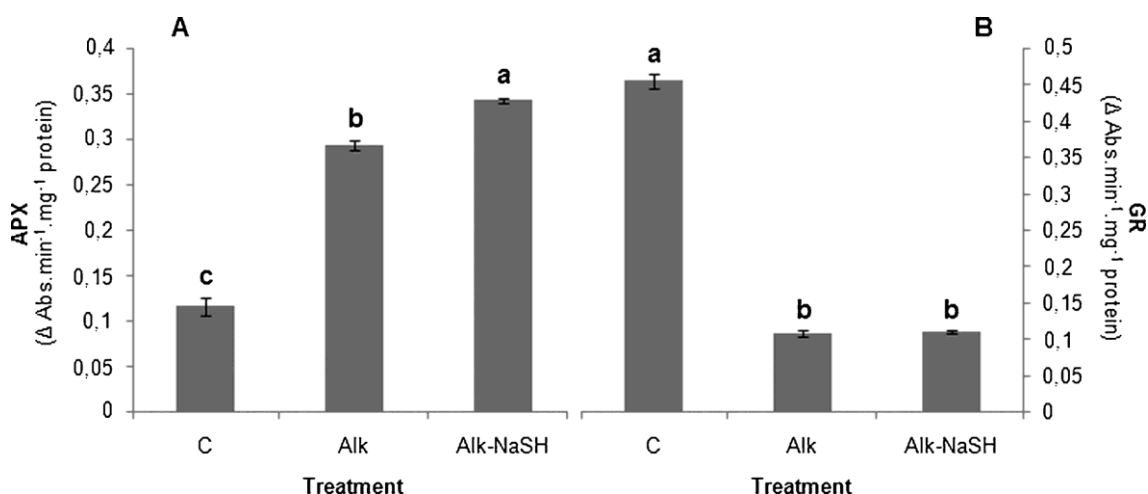
Values are means ( $n = 9$ ) and differences between means were compared using Fisher's least-significant difference test (LSD,  $p = 0.05$ ).

On the other hand, the total GSH concentration significantly declined in the alkalinity treatment with respect to control. However, no significant differences in the total GSH content in the alkalinity-NaHS treatment were found compared with control (Table 3). With regard to the GSH forms examined, a significant decrease was found in the concentration of reduced GSH in both treatments in comparison with control, although in this case the plants that received NaHS under alkalinity conditions significantly increased their content in reduced GSH with respect to those receiving the alkaline treatment alone (Table 3). On the contrary, GSSG significantly increased in the alkalinity treatment, while in the alkalinity-NaHS treatment no significant differences were found in comparison with control (Table 3). Finally, although the highest value of the GSH/GSSG quotient appeared in the treatment control,

it should be emphasized that in the alkalinity-NaHS treatment, this quotient greatly increased with respect to the alkalinity treatment (Table 3).

### 3.4 Ascorbate-glutathione cycle

With respect to the activity of the enzyme APX, the greatest increase occurred in the alkalinity-NaHS treatment, followed by the alkalinity treatment compared with control (Fig. 3). With respect to the activity of the enzyme GR, a significant decline was noted in the alkalinity treatment as well as in the alkalinity-NaHS treatment with respect to control (Fig. 3).



**Fig. 3.** Effect of alkalinity and NaHS application on the key enzymes of ascorbate-glutathione cycle in leaves of *B. oleracea*. Glutathione reductase (GR) (A) and ascorbate peroxidase (APX) (B). Values are means ( $n = 9$ ) and differences between means were compared using Fisher's least-significant difference test (LSD,  $p = 0.05$ ).

The content in the different forms of ascorbate in the cabbage leaves are shown in Table 4, where both the content in total AsA, reduced AsA, and DHA diminished in both treatments with alkalinity with respect to control. On the other

hand, the greatest decline in the AsA:DHA ratio was found in the alkalinity-NaHS treatment, while no significant differences were found between plants subjected to alkaline stress and control (Table 4).

**Table 4:** Influence of alkalinity and NaSH application on concentration of ascorbate in leaves *B. oleracea*. Total ascorbate (total AsA), reduced ascorbate (AsA), oxidized ascorbate (DHA) and AsA/DHA ratio (AsA/DHA).

	Total AsA (mg g <sup>-1</sup> PS)	AsA (mg g <sup>-1</sup> PS)	DHA (mg g <sup>-1</sup> PS)	AsA/DHA (mg g <sup>-1</sup> PS)
Control	4.89 ± 0.14 a	2.99 ± 0.10 a	1.89 ± 0.22 a	1.82 ± 0.27 a
Alcalinidad	4.10 ± 0.15 b	2.66 ± 0.06 b	1.43 ± 0.13 b	2.00 ± 0.19 a
Alcalinidad+ NaSH	3.09 ± 0.07 c	1.71 ± 0.03 c	1.38 ± 0.08 b	1.18 ± 0.04 b
<i>p</i> -Value	***	***	*	*
LSD <sub>0.05</sub>	0.39	0.2	0.45	0.57

Values are means (n = 9) and differences between means were compared using Fisher's least-significant difference test (LSD, p = 0.05).

### 3.5 GSH metabolism enzymes

The activities of the enzymes Gly I and Gly II increased both in the alkalinity treatment as well as in the alkalinity-NaHS one with respect to control (Table 5). However, the activity of Gly I and Gly II in the alkalinity-NaHS treatment declined in activity with respect to the alkalinity treatment that presented the highest activities (Table 5). On the other hand, the activity of the enzyme GPX significantly decreased in both treatments with alkalinity with respect to control, although the activity of this enzyme increased with the application of NaHS compared to no application under alkaline conditions, which presented the lowest activity (Table 5).

**Table 5:** Influence of alkalinity and NaSH application on some enzymes involved in GSH metabolism in leaves of *B. oleracea*. Glyoxalase I (Gly I), glyoxalase II (Gly II), and glutathione peroxidase (GPX).

	Gly I (Units L <sup>-1</sup> )	Gly II (Units L <sup>-1</sup> )	GPX (Δ Abs min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> Prot)
Control	0.045 ± 0.003 c	0.053 ± 0.002 c	5.667 ± 0.167 a
Alkalitnity	0.996 ± 0.070 a	0.100 ± 0.005 a	1.864 ± 0.016 c
Akalinity-NaSH	0.304 ± 0.040 b	0.075 ± 0.003 b	2.229 ± 0.041 b
<i>p</i> -Value	***	***	***
LSD <sub>0.05</sub>	0.152	0.011	0.29

Values are means ( $n = 9$ ) and differences between means were compared using Fisher's least significant difference test (LSD,  $p = 0.05$ ).

#### 4. Discussion

Previous studies have demonstrated that NaHS application can improve plant growth and antioxidant response to different types of abiotic stress such as heat, water, or salinity (Shan et al., 2011; Christou et al., 2013; Li et al., 2014). However, there is very little information on the effect of applying exogenous NaHS to encourage tolerance to alkalinity stress. Many works demonstrate that alkalinity stress depresses growth and yield in plants (Zhang and Mu, 2009; Paz et al., 2014). In the present study, the cabbage plants under alkaline stress registered 64% lower foliar biomass (Fig. 1). This decrease was mitigated after NaHS application, as the biomass loss in the alkalinity-NaHS treatment was only 30% with respect to control (Fig. 1).

SOD is a key enzyme in the stress tolerance of plants, serving as the first line of defense against the toxic effects of high ROS levels, since this enzyme catalyzes the reaction of  $O_2^{\cdot-}$ , dismutation to molecular oxygen and  $H_2O_2$  (Gill and Tuteja, 2010). Some researchers have shown that in tomato plants submitted to alkaline Hoagland solutions at different ascending concentrations of 25-100 Mm, SOD activity is inhibited, as is the increase in the  $O_2^{\cdot-}$  content in the most alkaline treatments (Gong et al., 2013). In this sense, the present study shows a significant decline in SOD activity both in the alkaline treatment (-90%) as well as in the alkalinity-NaHS treatment (-70%) with respect to control, which is correlated with an increase in the  $O_2^{\cdot-}$  content of 77% and 47%, respectively, in the two treatments (Table 1). It bears highlighting that although it diminished with respect to control, the SOD activity surged 65% when NaHS was added to plants under alkalinity conditions, in comparison with the alkaline treatment without NaHS (Table 1). According to these results, the NaHS applied lowered the  $O_2^{\cdot-}$  content by 57% with respect to plants under alkalinity and therefore the greatest SOD activity after NaHS application plays a fundamental role in eliminating this ROS (Table 1). These results agree with those of Ali et al. (2014), who observed that under stress from excess Pb, SOD activity declined and  $O_2^{\cdot-}$  was overproduced, but that this situation was mitigated by applying 0.1 and 0.2 mM of NaHS to *Brassica napus* L. plants submitted to these stress conditions. Finally, it should be noted that the decrease in  $O_2^{\cdot-}$  after the NaHS application correlated directly with the increase in biomass of this treatment (Fig. 1). On the other hand, part of the  $O_2^{\cdot-}$  present in the plants is generated when the enzyme LOX catalyzes the oxidation reaction of fatty acids



(Lynch and Thompson, 1984). Therefore, greater LOX activity results in greater ROS production, which causes oxidative stress (Sánchez-Rodríguez et al., 2010), and therefore greater LOX activity is one of the reasons why lipid peroxidation increases under stress conditions, the magnitude of this

process being proportional to the MDA concentration (Aziz and Larher, 1998). In our study, we found greater LOX activity, which correlated with the higher content in MDA under conditions of alkaline stress with respect to control (Fig. 2). However, after applying 0.5 mM of NaHS, LOX activity and the MDA content significantly fell with respect to the plants submitted to alkaline stress (Fig. 2). In fact, other researchers have also observed a decrease in MDA content under heat-stress conditions in maize when a pretreatment of 0.7 mM of NaHS was applied (Li et al., 2014). These results appear to indicate that H<sub>2</sub>S plays a major role in ROS detoxification under alkaline stress.

Another of the ROS that accumulates in the plant under stress conditions is H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In our study, we found a significant fall (32%) in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration in the alkalinity-NaHS treatment with respect to the alkalinity treatment (Table 1). These results coincide with those of Li et al. (2014) and Singh et al., (2015) reporting that the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content declined after NaHS was applied under heat-stress conditions in *Zea mays* and arsenate stress in *Pisum sativum* L., respectively. The lowest concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were presented in the alkalinity treatments (Table 1). This result could be explained by the lower SOD activity (Table 1), which is responsible for the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and that under alkalinity conditions could be affected by a deficit in the availability of micronutrients Fe, Cu, Mn and Zn that are necessary for the induction of this enzymatic activity (Montesinos-Pereira et al., 2016).

GSH is one of the most important compounds involved in detoxifying ROS. Appearing abundantly in reduced form in different plant tissues, GSH is located in all the cell compartments, such as the cytosol, endoplasmic reticulum, vacuoles, mitochondria, chloroplasts, and peroxisomes as well as in the apoplast, and plays a central part in a multitude of physiological processes such as sulphate-transport regulation, signal transduction, metabolite conjugation, detoxification of xenobiotics, and control of gene expression of stress response (Gill and Tuteja, 2010). The activity of the enzyme SAT and especially  $\gamma$ -ECS, limiting enzymes in the GSH-synthesis process, underwent an increase under alkalinity conditions after the application of NaHS (Table 2).

Similar results have been reported by Shan et al. (2014) who, after applying 0.6mM of NaHS to maize plants subjected to salinity stress, found higher  $\gamma$ -ECS activity. In addition, Birke et al. (2015) found increased SAT activity after applying 1 ppm of H<sub>2</sub>S to *Arabidopsis thaliana* plants, stimulating the synthesis of GSH and the antioxidant capacity in these plant species. Some studies suggest that high GSH production contributes to the antioxidant protection under oxidative adverse conditions (Noctor and Foyer, 1998). In the present study,  $\gamma$ -ECS activity increased by 46% in the alkalinity-NaHS treatment with respect to the alkalinity treatment; however, despite that this increase did not reflect a greater content in total GSH, this treatment maintained the GSH levels of the control treatment (Table 3). On the other hand, the greater  $\gamma$ -ECS activity was correlated with a 51% increase in the content of reduced GSH observed in the alkalinity-NaHS treatment with respect to the alkalinity treatment (Tables 2 and 3). In this sense, many works show that the application of H<sub>2</sub>S in any of its chemical forms (Na<sub>2</sub>S, NaHS, GYY4137, AP97, and AP105) boosts the

reduced GSH content in plants, and thus its antioxidant capacity and its tolerance to different types of stress such as salinity, osmotic, or heavy-metal stress (Hancock and Whiteman, 2014). On the other hand, it bears highlighting that the GSSG content in the alkalinity treatment was greater with an increase of 60% with respect to control. However, the alkalinity-NaHS treatment showed no significant differences with respect to control (Table 3). Consequently, the GSH/GSSG quotient rose by 78% after NaHS was applied to the plants under alkalinity stress compared to the plants subjected to alkaline stress without NaHS (Table 3). Shan et al. (2014) also reported an increase in the GSH/GSSG quotient in maize plants after pretreatments with 0.6 mM of NaHS under salinity conditions, suggesting that the application of NaHS could act to maintain the redox state of GSH under stress conditions.

The enzyme APX within the AsA-GSH cycle, plays a major role in eliminating ROS (Gill and Tuteja, 2010). In fact, in this study, we found a rise of 60% in APX activity in the alkalinity treatment, as well as a surge of 66% in the alkalinity-NaHS treatment with respect to control (Fig. 3). This leads us to suspect that one of the main mechanisms of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in *Brassica oleracea* L. 'Bronco' is the greater APX activity and that the application of NaHS (0.5 mM) promotes the stronger activity of this enzyme. This sharp spike in APX activity could explain the decline in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content found in the alkalinity and alkalinity-NaHS treatments with respect to control (Fig. 3, Table 1). These results are consistent with those reported by other authors who have noted more vigorous APX activity after applying NaHS to plants subjected to different types of abiotic stress, accompanied by a concomitant improvement in the antioxidant capacity in the species studied (Li et al., 2014; Shan et al., 2014; Ali

et al., 2014). On the contrary, as opposed to other authors who hold that NaHS application stimulates GR activity under different stress conditions (Hancock and Whiteman, 2014), in the present study we found GR activity to decline both in the alkalinity and alkalinity-NaHS treatment with respect to control (Fig. 3).

Another key antioxidant compound for plants is AsA, which helps detoxify  $H_2O_2$  (Foyer, 1993). Our results show that in the plants under alkaline stress, all the forms of AsA studied significantly diminished (Table 4). Similar results have been found by other researchers who subjected tomato plants to alkaline stress (25–100 mM de  $NaHCO_3$ ), reporting decreases in these forms of ascorbate (Gong et al., 2013). However, although some studies state that NaHS application increases the content in reduced AsA under drought and salinity stress (Shan et al., 2011; Shan et al., 2014), in the present work, we found a decline in the total AsA content, reduced AsA, and the AsA/DHA quotient in the alkalinity-NaHS treatment compared with the alkalinity treatment (Table 4). This reduction could be due to the high activity of APX found, since this enzyme consumes reduced AsA, used as a cofactor to eliminate the excess  $H_2O_2$  produced in these alkaline treatments (Fig. 3, Table 1).

Another process induced under stress conditions is MG metabolism of (Yadav et al., 2008), for which it could be defined as an indicator of the degree of stress. The function of the glyoxalase pathway has been widely studied, demonstrating that the enzymes Gly I and Gly II act in coordination to convert MG and other 2-oxaldehydes to their respective 2-hydroxycarboxylic acids using GSH as a cofactor in a two-step reaction. The detoxification of MG therefore depends heavily on the availability of cellular GSH, and GSH deficiency limits hemithioacetal production, leading to MG accumulation (Hossain et al., 2012).

Recent studies indicate that the activities of Gly I and Gly II augment under stress conditions. For example, Nahar et al. (2015) state that, in *VIGNA RADIATA* L. plants under water stress, the activity of these two enzymes significantly increased. Barrameda-Medina et al. (2014) also detected higher activity in both enzymes under Zn-toxicity conditions in the same plant cultivar as in our study (*BRASSICA OLERACEA* L. 'Bronco'). In this study, we found a rise in the activity of 95% and 47% greater than control for Gly I and Gly II, respectively, after the alkaline treatment (Table 5). On the other hand, the application of 0.5 mM of NaHS in plants under alkaline stress lowered Gly I and Gly II activities by 69% and 25%, respectively, compared to plants without NaHS under the same stress conditions (Table 5). It should be emphasized that no previous study is available on the involvement of the glyoxalase pathway in plants under alkaline-stress conditions. In this sense, the results found in the present study indicate firstly that in the system of glyoxylases, the enzyme that most induces its activity under alkaline stress is Gly I. Secondly, we found that the application of 0.5 mM of NaHS depressed the activities of Gly I and Gly II with respect to the alkalinity treatment and that this decrease could indicate that the application of NaHS reduces or mitigates the appearance of stress and thus the formation of MG (Table 5).

Finally, another enzyme involved in the homeostasis of glutathione is GPX, and some authors have confirmed that this enzyme plays an essential role in eliminating ROS and in cell protection in higher plants, given the strong affinity of this enzyme for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Gill and Tuteja, 2010). Our results show that the GPX activity reduced its activity in plants under alkaline stress with respect to control (Table 5). On the other hand, NaHS application augmented GPX activity from

16% in the alkalinity-NaHS treatment with respect to the treatment of alkalinity without NaHS (Table 5). These results agree with those of other authors who have observed that GPX activity surges after NaHS is applied to plants subjected to different types of abiotic stress, resulting in greater antioxidant capacity of the species studied (Li et al., 2014; Shan et al., 2014; Ali et al., 2014).

## 5. Conclusion

Our results suggest that the alkaline stress gives rise to oxidative stress, increasing the content in the ion  $O_2^{\cdot-}$  and lipid peroxidation, which significantly reduces the biomass in *Brassica oleracea* L. CV 'Bronco' plants. NaHS application increased the antioxidant response through the induction of the processes involved in GSH homeostasis, reducing the harmful effect of ROS and significantly mitigating the biomass loss caused by alkalinity. The application of NaHS (0.5 mM) could act as a fortifier in *Brassica oleracea* L. CV 'Bronco' plants cultivated in soils with a high content in alkaline salts increasing their tolerance to these stress conditions.

## Acknowledgements

This work was financed by the PAI programme (Plan Andaluz de Investigación, Grupo de Investigación AGR161)

## References

Ali, B., Mwamba, T.M., Gill, R.A., Yang, C., Ali, S., Daud, M.K., Wu, Y., Zhou, W., 2014. Improvement of element uptake and antioxidative defense in *Brassica napus* under lead stress by application of hydrogen sulfide. *Plant Growth Regul.* 74, 261–273.

Anjum, N.A., Ahmad, I., Mohmood, I., Pacheco, M., Duarte, A.C., Pereira, E., Umar, S., Ahmad, A., Khan, N.A., Iqbal, M., Prasad, M.N.V., 2012. Modulation

of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids—a review. *Environ. Exp. Bot.* 75, 307–324.

Asada, K., 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 601–639.

Aziz, A., Larher, F., 1998. Osmotic stress induced changes in lipid composition and peroxidation in leaf discs of *Brassica napus* L. *J. Plant Physiol.* 153, 754–762.

Barrameda-Medina, Y., Montesinos-Pereira, D., Romero, L., Blasco, B., Ruiz, J.M., 2014. Role of GSH homeostasis under Zn toxicity in plants with different Zn tolerance. *Plant Sci.* 227, 110–121.

Beyer, W.F., Fridovich, I., 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 161, 559–566.

Birke, H., De Kok, L.J., Wirtz, M., Hell, R., 2015. The role of compartment-specific cysteine synthesis for sulfur homeostasis during H<sub>2</sub>S exposure in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 56, 358–367.

Blaszczyk, A., Brodzik, R., Sirko, A., 1999. Increased resistance to oxidative stress in transgenic tobacco plants overexpressing bacterial serine acetyltransferase. *Plant J.* 20, 237–243.

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.



Cakmak, I., 2005. The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *Z. Pflanzenernähr Bodenk* 168, 521–530.

Casazza, J.P., Felver, M.E., Veech, R.L., 1984. The metabolism of acetone in rat. *J. Biol. Chem.* 259, 231–236.

Christou, A., Manganaris, G.A., Papadopoulos, I., Fotopoulos, V., 2013. Hydrogen sulfide induces systemic tolerance to salinity and non-ionic osmotic stress in strawberry plants through modification of reactive species biosynthesis and transcriptional regulation of multiple defence pathways. *J. Exp. Bot.* 64, 1953–1966. Desai, K.M.,

Chang, T., Wang, H., Banigesh, A., Dhar, A., Liu, J., Untereiner, A., Wu, L., 2010. Oxidative stress and aging: Is methylglyoxal the hidden enemy? *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 88, 273–284.

Droux, M., 2004. Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. *Photosyn. Res.* 79, 331–348.

Elia, A.C., Galarini, R., Taticchi, M.I., Dörr, A.J.M., Mantilacci, L., 2003. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. *Ecotox. Environ. Saf.* 55, 162–167.

Espartero, J., Sánchez-Aguayo, I., Pardo, J.M., 1995. Molecular characterization of glyoxalase-I from a higher plant; up-regulation by stress. *Plant Mol. Biol.* 29, 1223–1233.

Flocco, C.G., Lindblom, S.D., Smits, E.A.H.P., 2004. Overexpression of enzymes involved in glutathione synthesis enhances tolerance to organic pollutants in *Brassica juncea*. *Int. J. Phytorem.* 6, 289–304.

Foyer, C.H., 1993. In *Antioxidants in Higher Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 31–58.

Kawanabe, S., Zhu, T.C., 1991. Degeneration and conservation of *Aneurolepidium chinense* grassland in Northern China. *J. Jpn. Grassl. Soc.* 37, 91–99.

Fredeen, A.L., Raab, T.K., Rao, I.M., Terry, N., 1990. Effects of phosphorus nutrition on photosynthesis in *Glycine max* (L.) Merr. *Planta* 181, 399–405.

Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59, 309–314.

Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930.

Gomes, M.P., Duarte, D.M., Carneiro, M.M.L.C., Barreto, L.C., Carvalho, M., Soares, A.M., Guilherme, L.R.G., Garcia, Q.S., 2013. Zinc tolerance modulation in *Myracrodruon urundeuva* plants. *Plant Physiol. Biochem.* 67, 1–6.

D. Montesinos-Pereira et al. *Scientia Horticulturae* 235 (2018) 349–356 355

Gong, B., Wen, D., Vanden Langenberg, K., Wei, M., Yang, F., Shi, Q., Wang, X., 2013. Comparative effects of NaCl and NaHCO<sub>3</sub> stress on photosynthetic parameters, nutrient metabolism, and the antioxidant system in tomato leaves. *Sci. Hortic.* 157, 1–12.

Griffith, O.W., 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106, 207–212.

Hancock, J.T., Whiteman, M., 2014. Hydrogen sulfide and cell signaling: Team player or referee? *Plant Physiol. Biochem.* 78, 37–42.

Hasanuzzaman, M., Hossain, M.A., Fujita, M., 2011. Nitric oxide modulates antioxidant defense and the methylglyoxal detoxification system and reduces salinity-induced damage of wheat seedlings. *Plant Biotechnol. Rep.* 5, 353–365.

Hossain, M.A., Piyatida, P., da Silva, J.A.T., Fujita, M., 2012. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *J. Bot.* 2012, e872875.

Jin, H., Kim, H.R., Plaha, P., Liu, S.K., Park, J.Y., Piao, Y.Z., Yang, Z.H., Jiang, G.B., Kwak, S.S., An, G., Son, M., Jin, Y.H., Sohn, J.H., Lim, Y.P., 2008. Expression profiling of the genes induced by Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and NaCl stresses in leaves and roots of *Leymus chinensis*. *Plant Sci.* 175, 784–792.

Johnson, S.M., Doherty, S.J., Croy, R.R.D., 2003. Biphasic superoxide generation in potato tubers. A self-amplifying response to stress. *Plant Physiol.* 131, 1440–1449.

Kubiś, J., 2008. Exogenous spermidine differentially alters activities of some scavenging system enzymes, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and superoxide radical levels in water-stressed cucumber leaves. *J. Plant Physiol.* 165, 397–406.

Law, M.Y., Charles, S.A., 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.

Li, R., Shi, F., Fukuda, K., Yang, Y., 2010. Effects of salt and alkali stresses on germination, growth, photosynthesis and ion accumulation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Soil Sci. Plant Nutr.* 56, 725–733.

Liu, N., Jin, Z., Wang, S., Gong, B., Wen, D., Wang, X., Wei, M., Shi, Q., 2015. Sodic alkaline stress mitigation with exogenous melatonin involves reactive oxygen metabolism and ion homeostasis in tomato. *Sci. Hortic.* 181, 18–25.

Li, Z.G., Yi, X.Y., Li, Y.T., 2014. Effect of pretreatment with hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide on heat tolerance in relation to antioxidant system in maize (*Zea mays*) seedlings. *Biologia* 69, 1001–1009.

Luo, Z., Li, D., Du, R., Mou, W., 2015. Hydrogen sulfide alleviates chilling injury of banana fruit by enhanced antioxidant system and proline content. *Sci. Hortic.* 183, 144–151.

Lynch, D.V., Thompson, J.E., 1984. Lipoxygenase-mediated production of superoxide anion in senescing plant tissue. *FEBS Lett.* 173, 251–254.

Minguez-Mosquera, M.I., Jaren-Galan, M., Garrido-Fernandez, J., 1993. Lipoxygenase activity during pepper ripening and processing of paprika. *Phytochemistry* 32, 1103–1108.

Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Trivedi, P.K., 2008. Thiol metabolism and antioxidant systems complement each other during arsenate detoxification in *Ceratophyllum demersum* L. *Aquat. Toxicol.* 86, 205–215.

Miyake, C., Miyata, M., Shinzaki, Y., Tomizawa, K., 2005. CO<sub>2</sub> response of cyclic electron flow around PSI (CEF-PSI) in tobacco leaves—relative electron

fluxes through PSI and PSII determine the magnitude of non-photochemical quenching (NPQ) of Chl fluorescence. *Plant Cell Physiol.* 46, 629–637.

Montesinos-Pereira, D., Barrameda-Medina, Y., Baenas, N., Moreno, D.A., Blasco, B., Ruiz, J.M., 2016. Evaluation of hydrogen sulfide supply to biostimulate the nutritive and phytochemical quality and the antioxidant capacity of cabbage (*Brassica oleraceae* L. Bronco). *J. App. Bot. Food Qual.* 89, 290–298.

Mukherjee, S.P., Choudhuri, M.A., 1983. Effect of some reducing agents on water stressinduced oxidative and deteriorative processes of *Vigna* seedlings. *Biol. Plant* 25, 401–407.

Nahar, K., Hasanuzzaman, M., Alam, M.M., Fujita, M., 2015. Glutathione-induced drought stress tolerance in mung bean: coordinated roles of the antioxidant defence and methylglyoxal detoxification systems. *AoB Plants* 7.

Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249–279.

Paz, R.C., Reinoso, H., Espasandin, F.D., González-Antivilo, F.A., Sansberro, P.A., Rocco, R.A., Ruiz, O.A., Menéndez, A.B., 2014. Alkaline, saline and mixed saline–alkaline stresses induce physiological and morpho-anatomical changes in *Lotus tenuis* shoots. *Plant Biol. J.* 16, 1042–1049.

Principato, G.B., Rosi, G., Talesa, V., Giovannini, E., Uotila, L., 1987. Purification and characterization of two forms of glyoxalase II from the liver and brain of Wistar rats. *Biochem. Biophys. Acta* 911, 349–355.

Rao, M.V., Paliyath, G., Ormrod, D.P., 1996. Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 110,125–136.

Reddy, A.R., Chaitanya, K.V., Vivekanandan, M., 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J. Plant Physiol.* 161, 1189–1202.

Roxas, V.P., Lodhi, S.A., Garrett, D.K., Mahan, J.R., Allen, R.D., 2000. Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant Cell Physiol.* 41, 1229–1234.

Sánchez-Rodríguez, E., Rubio-Wilhelmi, M.M., Cervilla, L.M., Blasco, B., Rios, J.J., Rosales, M.A., Romero, L., Ruiz, J.M., 2010. Genotypic differences in some physiological parameters symptomatic for oxidative stress under moderate drought in tomato plants. *Plant Sci.* 178, 30–40.

Seelig, G.F., Meister, A., 1984. Gamma-glutamylcysteine synthetase. Interactions of an essential sulfhydryl group. *J. Biol. Chem.* 259, 3534–3538.

Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M., Tal, M., 2001. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-tolerant oxidative stress: the root antioxidative system. *Physiol. Plant* 112, 487–494.

Shan, C., Zhang, S., Li, D., Zhao, Y., Tian, X., Zhao, X., Wu, Y., Wei, X., Liu, R., 2011. Effects of exogenous hydrogen sulfide on the ascorbate and glutathione metabolism in wheat seedlings leaves under water stress. *Acta Physiol. Plant* 33, 2533–2540.

Shan, C., Liu, H., Zhao, L., Wang, X., 2014. Effects of exogenous hydrogen sulfide on the redox states of ascorbate and glutathione in maize leaves under salt stress. *Biol. Plant* 58, 169–173.

Shi, D., Sheng, Y., 2005. Effect of various salt–alkaline mixed stress conditions on sunflower seedlings and analysis of their stress factors. *Environ. Exp. Bot.* 54, 8–21.

Shi, D., Wang, D., 2005. Effects of various salt-alkaline mixed stresses on *Aneurolepidium chinense* (Trin.) Kitag. *Plant Soil* 271, 15–26.

Singh, V.P., Singh, S., Kumar, J., Prasad, S.M., 2015. Hydrogen sulfide alleviates toxic effects of arsenate in pea seedlings through up-regulation of the ascorbate–glutathione cycle: Possible involvement of nitric oxide. *J. Plant Physiol.* 181, 20–29.

Tanji, K.K., 2002. Salinity in the soil environment. In: Läuchli, A., Lüttge, U. (Eds.), *Salinity: Environment - Plants - Molecules*. Springer, Netherlands, pp. 21–51.

Thompson, C.R., Kats, G., 1978. Effects of continuous hydrogen sulfide fumigation on crop and forest plants. *Environ. Sci. Technol.* 12, 550–553.

Tripathi, P., Mishra, A., Dwivedi, S., Chakrabarty, D., Trivedi, P.K., Singh, R.P., Tripathi, R.D., 2012. Differential response of oxidative stress and thiol metabolism in contrasting rice genotypes for arsenic tolerance. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 79, 189–198.

Veena, N., Reddy, V.S., Sopory, S.K., 1999. Glyoxalase I from *Brassica juncea*: molecular cloning, regulation and its over-expression confer tolerance in transgenic tobacco under stress. *Plant J.* 17, 385–395.

Wang, H., Liu, J., Wu, L., 2009. Methylglyoxal-induced mitochondrial dysfunction in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.* 77, 1709–1716.

Wang, H., Wu, Z., Chen, Y., Yang, C., Shi, D., 2011a. Effects of salt and alkali stresses on growth and ion balance in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Soil Environ.* 57, 286–294.

Wang, X., Geng, S., Ri, Y.J., Cao, D., Liu, J., Shi, D., Yang, C., 2011b. Physiological responses and adaptive strategies of tomato plants to salt and alkali stresses. *Sci. Hortic.* 130, 248–255.

Wang, Y., Ma, H., Liu, G., Xu, C., Zhang, D., Ban, Q., 2008. Analysis of gene expression profile of *Limonium bicolor* under NaHCO<sub>3</sub> stress using cDNA microarray. *Plant Mol. Biol. Rep.* 26, 241–254.

Yadav, S.K., Singla-Pareek, S.L., Ray, M., Reddy, M.K., Sopory, S.K., 2005a. Methylglyoxal levels in plants under salinity stress are dependent on glyoxalase I and glutathione. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337, 61–67.

Yadav, S.K., Singla-Pareek, S.L., Reddy, M.K., Sopory, S.K., 2005b. Transgenic tobacco plants overexpressing glyoxalase enzymes resist an increase in methylglyoxal and maintain higher reduced glutathione levels under salinity stress. *FEBS Lett.* 579, 6265–6271.



Yadav, S.K., Singla-Pareek, S.L., Sopory, S.K., 2008. An overview on the role of methylglyoxal and glyoxalases in plants. *Drug Metab. Drug Interact.* 23, 51–68.

Zhang, J.T., Mu, C.S., 2009. Effects of saline and alkaline stresses on the germination, growth, photosynthesis, ionic balance and anti-oxidant system in an alkali-tolerant leguminous forage *Lathyrus quinquenervius*. *Soil Sci. Plant Nutr.* 55, 685–697.



## CAPÍTULO 4



**Aspectos moleculares de la aplicación de H<sub>2</sub>S sobre los mecanismos de tolerancia de *Arabidopsis thaliana* L. al estrés alcalino**

**D. Montesinos-Pereira, A. de la Torre-González, E. León, B. Blasco, J.M. Ruiz\***

**Department of Plant Physiology, Faculty of Sciences, University of Granada, E-18071 Granada, Spain**

**Resumen**

En el presente estudio se investigó como la aplicación de sulfuro de hidrógeno (50 µM de NaHS) en plantas de *Arabidopsis thaliana* L. influyó sobre los procesos implicados en la asimilación del azufre, la homeostasis del glutatión y la implicación de éstos en la tolerancia al estrés alcalino (50mM NaHCO<sub>3</sub>:Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). De acuerdo con nuestros resultados la aplicación de H<sub>2</sub>S (NaHS) mitigó el efecto nocivo del estrés alcalino evidenciado por la reducción en la pérdida de biomasa del 31 % tras aplicar H<sub>2</sub>S a plantas sometidas a estrés alcalino. Por otro lado, no se observaron incrementos significativos específicos en respuesta a la aplicación de H<sub>2</sub>S sobre la expresión relativa de los genes implicados en la biosíntesis de las enzimas e isoenzimas claves en la regulación de los procesos de asimilación de SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> (Serat 1,1; OAS TL, OAS TL B; OAS TL C; ATPS ; ATPS 2, ATPS 3; ATPS 4 y APR 1) y la homeostasis del glutatión (GMPasa; GDPME; L-GAL PPasa; LGALDH; L-GLDH; SOD

1;SOD 2; APX; MDHAR; GR2; GR 1; gsh 1; gsh 2 y GPX) bajo condiciones de estrés alcalino.

**Palabras clave:** Estrés alcalino, estrés oxidativo, sulfuro de hidrógeno, asimilación del sulfato, *Arabidopsis thaliana*.

## 1. Introducción

El estrés alcalino podría definirse como el estrés producido por sales alcalinas como el  $\text{NaHCO}_3$  y el  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Por tanto, es importante recalcar que este tipo de estrés lo causan sales alcalinas y no neutras ( $\text{NaCl}$ ), que causan lo que comúnmente se conoce como "estrés por salinidad" (Shi y Sheng, 2005; Shi y Wang, 2005). Sin embargo, el efecto de ambos tipos de estrés puede ser similar. Por otro lado, hay varios investigadores que afirman que el estrés por alcalinidad provoca daños más severos que el estrés por salinidad. (Wang et al., 2008).

El estrés alcalino, es muy común en zonas áridas y semiáridas, disminuye la productividad agrícola en estas regiones, donde la agricultura es normalmente intensiva. En todo el mundo, el 10% de los suelos cultivados están sujetos a condiciones de estrés alcalino (Tanji, 2002), y la FAO predice que para el año 2050, la reducción de la tierra disponible para la agricultura por la presencia de estos tipos de estrés superará el 50% (Jin et al., 2008).

El elevado pH y la acumulación masiva de  $\text{Na}^+$  provocada por el estrés alcalino pueden dar lugar a una falta de protones y a la alteración o inhibición de los gradientes y/o potenciales electroquímicos en las células radiculares, alterando muchas funciones fisiológicas, como la captación de agua y de iones (Wang et al., 2011a; Wang et al., 2011b). Debido a estas alteraciones de las funciones fisiológicas de la raíz, el estrés alcalino ( $\text{pH} > 8,5$ ) inhibe el crecimiento y la fotosíntesis.

La fotosíntesis inhibida es el resultado de la degradación de los pigmentos fotosintéticos, a menudo debido al estrés alcalino por la menor captación de  $Mg^{2+}$  causada por su precipitación en la rizosfera (Li et al., 2010). Otros autores sostienen que la limitación en la disponibilidad del P debido a su precipitación en condiciones alcalinas puede disminuir la ingesta de  $CO_2$  para la fotosíntesis (Fredeen et al., 1990). Esta reducción de la ingesta de  $CO_2$  debido a este tipo de estrés causa daño oxidativo en las células y altera el metabolismo antioxidante, generando especies de oxígeno reactivas (ROS). El exceso de electrones producidos durante la fotosíntesis se transfiere a las moléculas de  $O_2$  y éstas producen ROS (Cakmak, 2005).

Las ROS liberadas afectan negativamente a las estructuras biológicas, incluidos los daños en el ADN, la oxidación de aminoácidos y la peroxidación de lípidos (Asada, 1999; Johnson et al., 2003). Las ROS reaccionan con las membranas celulares, especialmente las membranas de los tilacoides, que son ricas en ácidos grasos insaturados. La peroxidación de los lípidos rompe estos ácidos grasos, interrumpiendo su función en la membrana, perturbando la fluidez, rompiendo los enlaces lipídicos e inactivando las enzimas de la membrana (Miyake et al., 2005).

Para evitar este tipo de daños, las plantas tienen mecanismos de desintoxicación de ROS que pueden dividirse en: sistemas enzimáticos, compuestos por superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR), deshidroascorbato reductasa (DHAR), monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR); y sistemas no enzimáticos, como los compuestos fenólicos (e. por ejemplo, fenoles,



flavonoides, carotenoides), ácido ascórbico (AsA) y el glutati6n (GSH) (Shalata et al., 2001; Reddy et al, 2004).

En la 6ltima d6cada el H<sub>2</sub>S se postula como una mol6cula con efectos bioestimulantes cuyo uso podr6a mitigar los efectos nocivos de numerosos tipos de estr6s abi6tico, potenciando la eficacia de los mecanismos antioxidantes de las plantas (Dawood et al. 2012; Singh et al. 2015; Wang et al. 2010). Por otro lado, se ha observado como el H<sub>2</sub>S interviene en la apertura y cierre de los estomas (Lisjak et al. 2010) as6 como en el crecimiento, desarrollo y procesos que combaten el envejecimiento de las plantas (Zhang et al. 2011). Curiosamente, se ha demostrado que, en los procesos fisiol6gicos mencionados anteriormente tambi6n est6n involucradas algunas otras mol6culas de se6alizacion como el Ca<sup>2+</sup> y el NO (Wang et al. 2012).

Otro de los efectos del H<sub>2</sub>S descubiertos m6s recientemente sobre la tolerancia de las plantas al estr6s, reside en su implicaci6n en la persulfidaci6n de prote6nas d6ana que intervienen en los mecanismos antioxidantes, entre otros (Aroca et al, 2020). Sin embargo, los mecanismos y la regulaci6n de estos procesos contin6an siendo poco conocida.

El sulfuro es un intermediario de la ruta de asimilaci6n del SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> en plantas, usando la energ6a de la hidr6lisis del ATP, el sulfato es activado form6ndose adenosina 5'fosfosulfato (APS) mediante una reacci6n de adenilaci6n. Esta reacci6n est6 catalizada por la ATP sulfurilasa (ATPS). El enlace de alta energ6a formado entre el sulfato y el fosfato har6 que una cat6lisis enzim6tica posterior est6 termodin6micamente favorecida y, por el contrario, la s6ntesis de APS ser6 termodin6micamente desfavorable. En plantas, la s6ntesis de APS es

impulsada gracias a la hidrólisis del pirofosfato. Al contrario que en animales, las plantas son capaces de reducir el sulfato activado (APS) en los plastos hasta sulfito mediante la reacción catalizada por la enzima APS reductasa (APR). El sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) es posteriormente reducido a sulfuro ( $\text{S}^{2-}$ ) por la enzima dependiente de ferredoxina sulfito reductasa (SiR), este sulfuro es finalmente incorporado a O-acetilserina (OAS) para formar cisteína, precursor directo o indirecto de todos los compuestos orgánicos que contienen azufre reducido en plantas y animales. Este proceso denominado vía de asimilación reductora de sulfato en la que el azufre se incorpora al metabolismo primario, es esencial para la supervivencia, y no puede ser reemplazada por ninguna otra vía enzimática (12).

El sulfuro formado por la sulfito reductasa es incorporado a la OAS por la acción de la enzima O-acetilserina tiol liasa (OAS-TL) formando cisteína. La OAS es sintetizada a su vez a partir de serina y acetil-coenzima-A por la enzima serina acetiltransferasa (SAT) (Wirtz y Hell, 2006). En condiciones normales la síntesis de cisteína está limitada por la concentración de OAS más que por los niveles de sulfuro, ya que la concentración de OAS está muy por debajo de la  $K_m^{\text{OAS}}$  en las diferentes isoformas de OAS-TL, mientras que la concentración de sulfuro en cloroplastos y citosol son mayores que la  $K_m^{\text{sulfuro}}$  (Krueger et al, 2009). Cabe destacar que mientras el sulfuro se produce exclusivamente en los plastos, la síntesis de cisteína tiene lugar en todos los orgánulos proteinogénicos. Las tres isoformas principales de las enzimas OAS-TL y SAT se encuentran en plastos, citosol y mitocondrias (Watanabe et al, 2008; Kopriva et al, 2009). Aunque cada compartimento es capaz de producir

suficiente cisteína para sostener el crecimiento, bajo condiciones normales la síntesis está compartimentada.

La cisteína producida tras la asimilación del  $\text{SO}_4^{2-}$  forma parte esencial del tripéptido glutatión (GSH). De hecho, la mayor tolerancia contra el estrés oxidativo, por la inducción de la respuesta antioxidante puede lograrse alterando la homeostasis del GSH, ya que este compuesto es fundamental en este proceso. El GSH es un tripéptido con un grupo tiol compuesto de tres aminoácidos (L-cisteína, ácido L-glutámico, y glicina) que se consume en numerosas reacciones redox para combatir el estrés oxidativo, dando lugar a su forma oxidada GSSG (Mishra et al., 2008). La enzima serina acetiltransferasa (SAT) se considera la enzima clave en la síntesis de la cisteína, proporcionando uno de los sustratos de síntesis de GSH (Droux, 2004). El GSH se sintetiza en dos pasos que dependen del ATP catalizado por las enzimas glutamylcisteína sintetasa ( $\gamma$ -ECS) y la enzima glutatión sintetasa (GS) (Noctor y Foyer, 1998; Tripathi et al, 2012). En primer lugar, la  $\gamma$ -ECS cataliza la formación del péptido entre el grupo  $\gamma$ -carboxilo de glutamato y el  $\alpha$ -amino cisteína, y luego la GS cataliza la formación del enlace peptídico entre el grupo cisteinilo de la  $\gamma$ -glutamylcisteína y el grupo  $\alpha$ -amino de la glicina (Flocco et al, 2004). Se ha demostrado que la sobreexpresión de la enzima serina acetiltransferasa SAT aumentó resistencia al estrés oxidativo en las plantas de tabaco transgénico (Blaszczyk et al, 1999). Por otro lado, estudios recientes muestran que el  $\text{H}_2\text{S}$  puede actuar en la regulación de la síntesis y acumulación de GSH, aumentando  $\gamma$ -ECS en condiciones de estrés hídrico en las plantas de trigo (Shan et al., 2011).

El GSH tiene diversas funciones en la protección contra el estrés oxidativo, actuando en el ciclo ascorbato-glutatión, que es fundamental en la defensa antioxidante. En este ciclo, la ascorbato peroxidasa (APX) reduce el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua utilizando el Ascorbato (AsA) como donante de electrones, de tal manera que este último compuesto se oxida, convirtiéndose en deshidroascorbato (DHA), que a su vez se reduce a AsA usando el GSH reducido como donador de electrones. Por otro lado, el GSSG formado se transforma de nuevo en GSH reducido mediante la reacción catalizada por la enzima dependiente de NAD(P)H glutatión reductasa (GR) (Gomes et al, 2013). Algunos investigadores sostienen que el ciclo AsA/GSH juega un papel decisivo en la tolerancia contra el estrés alcalinos en plantas (Liu et al., 2015). Por otro lado, hay estudios que afirman que tratamientos previos con  $H_2S$  aumentan las actividades enzimáticas de aquellas enzimas que intervienen en la desintoxicación de las ROS, como: APX, GR, DHAR, y una de las enzimas clave en la síntesis de GSH, como la  $\gamma$ -ECS bajo condiciones de estrés por salinidad (Shan et al., 2014).

## 2. Material y métodos

### 2.1. Material vegetal

Semillas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) germinaron tras un choque térmico de 48 h a 4 °C, en cámara de cultivo (Dep. Plant Science, Plant Reproductive Biology Bldg. University of California) a 23 °C bajo una iluminación de intensidad  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (medida con 190 SB quantum sensor, LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, USA). y bajo un régimen de 16 h luz/8 h oscuridad. Las

plantas se dispusieron en bandejas con 10 alveolos de 6 cm x 6 cm de ancho, x 8 cm de alto, con 3 plantas por alveolo. A todos los tratamientos se les aplicó disolución nutritiva ½ Hoagland (Sigma-Aldrich) con un pH de 5.5 - 6.

## 2.2. Diseño experimental y tratamientos

El experimento consistió en un diseño de bloques aleatorios con 6 tratamientos, todos ellos irrigados con ½ de disolución nutritiva completa Hoagland (Sigma-Aldrich) que consistieron en: ½ de disolución nutritiva Hoagland (Sigma-Aldrich) (Control), 50 mM de tampón  $\text{NaHCO}_3:\text{Na}_2\text{CO}_3$  (9:1) (pH=9) (Alk), 50  $\mu\text{M}$  de NaHS monohidratado (HS), 50  $\mu\text{M}$   $\text{MgSO}_4$  (SO), 50  $\mu\text{M}$  NaHS monohidratado + 50 mM  $\text{NaHCO}_3:\text{Na}_2\text{CO}_3$  (9:1) (Alk+HS), 50  $\mu\text{M}$   $\text{MgSO}_4$  + 50 mM  $\text{NaHCO}_3:\text{Na}_2\text{CO}_3$  (9:1) (Alk+SO).

## 2.3. Muestreo de plantas

Los tratamientos se iniciaron 20 días después de la germinación y se muestrearon 6 plantas por cada uno de los tratamientos, siendo congeladas inmediatamente con nitrógeno líquido para el análisis de expresión mediante PCR cuantitativa (Q-PCR). 15 días después de la germinación se muestrearon las 24 plantas restantes por cada uno de los tratamientos, se lavaron con agua destilada, se secaron en papel de filtro, se pesaron y se secaron en estufa a 50 °C. Tras 3 días en la estufa las plantas se pesaron de nuevo para obtener el peso seco. Se usaron 30 plantas por replica y tres replicas por tratamiento.

## 2.4 Análisis de PCR cuantitativa

Se extrajo el ARN de plantas completas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) para el análisis mediante RNeasy® Mini Kit (Quiagen). La primera hebra de cADN se

sintetizó a partir de 1 µg de ARN total mediante QuatiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). Para la obtención de los primers se recurrió a la base de datos “The Arabidopsis Information Resource” (TAIR). La PCR cuantitativa se llevó a cabo en StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Foster City, CA), Usando SYBR® GREEN. El volumen total de reacción fue de 15 µL. La reacción incluyó 2 µL de hebra templada, 0,3 µL de primer sentido, 0,3 µL de primer anti-sentido, 7,5 µL de SYBR Green Master Mix y 4,9 µL de ARN libre de agua. El análisis por qPCR se realizó bajo las siguientes condiciones: 95 °C durante 10 min seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 30 s y 60 °C durante 30 s. Para normalizar y calibrar los valores de transcripción relativos al gen endógeno ACT se utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Sade et al, 2017) cuya expresión no cambia entre diferentes genotipos, estados del desarrollo o tratamientos. Los primers utilizados para la amplificación se muestran en la tabla 1.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2) DDCT method. *Methods*, 25, 402–408.

## 2.5. Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos se utilizó el paquete estadístico JMP (ver.7.0) del Instituto SAS. Se empleó la ANOVA para probar el efecto del genotipo en el rasgo. La prueba LS Means Tukey se utilizó para comparar las medias de los genotipos a un nivel de probabilidad del 5%. Los niveles de significación están representados por asteriscos como sigue: \*, \*\*, \*\*\* y n.s. que indican significación a  $P \leq 0,05$ , 0,01, 0,001 o no significativo, respectivamente.

## 3. Resultados

En el presente estudio, nos centraremos en los resultados que puedan arrojar luz al objetivo de discriminar el efecto de tolerancia frente a estrés alcalino que podría conferir la aplicación de H<sub>2</sub>S exógeno, intentando diferenciar si se trata de un efecto sobre la nutrición de la planta o si el H<sub>2</sub>S afecta aguas abajo a la expresión de genes de resistencia.

**Tabla 1.** Secuencias de primers utilizados para la clonación de los promotores de las enzimas objeto de estudio.

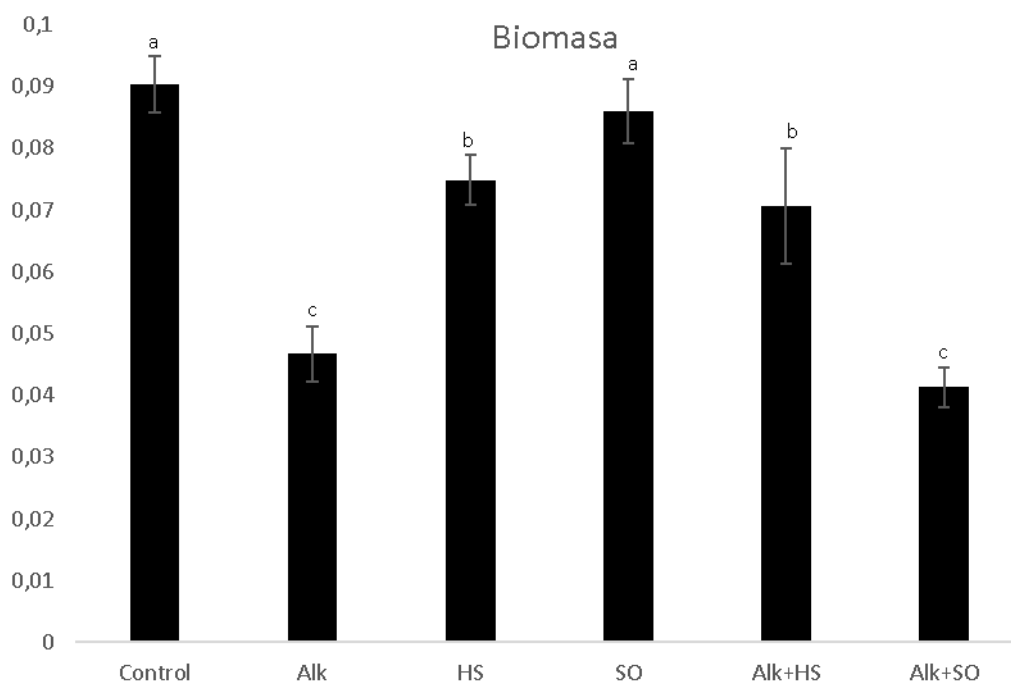
Gen	Primer con-sentido (5'-3')	Primer anti-sentido (5'-3')
Serat1,1	TGGACACAGATCAAGGCGG	ATGAGAAAGAATCGTCGAATATAGATAGC
OAS-TL A1	GAACAGAACGCAAACGTCAA	TCTTGTGAGGACCTGGCTTC
OAS-TL B	GGAAGGCTTGTTGGTTGGTA	CGAAGCTCGGGAACACAA
OAS-TL C	TGCTGGAAAACATAGCTGTT	ACCTCAGGCTGCATTTTCTC
ATPS 1	CACTCGGAGGTTTCATGAGAG	AGACGTAGCGAGTTAAAATGAAGAG
ATPS 2	GATCTTGAGTGGGTTTCATGTGAT	CTCATCTTCTCTCATGAACCCTTT
ATPS3	TGGGTTTATGAGGGAATCTGAG	GACCCATCATCGAGATTCAAC
ATPS4 F	CAAAGGTTTCATGAGACAGTCAG	GAGCCGGAACGAGTTAAAATG
APR 1	CTCGTTTCGGTGTTTCATTGGAGCC	ACAATCCCTTGCTCTAACCAAACC
APR 2	AACGCTGAGTCACATTCACGAAGCG	GAAAGTTCCACACATCAGCTCCTTC
GDPMPase	TCAGGCTGATCTCTTCCAATTTAC	TGATGCTCTAACTCCTTTTCCTTG
GDPME	AGGTGTTCTGGTTCGTAACCTCA	ATCGCTTCCCTTTGCTTTCTC
L-GalPPase	GTCCCTGTTGTTGGAGTTGTTTAT	CGCTTTGAGCTGACACTTTGAT
L-GalDH	GCAAATCAAAGGGCAAGAAGA	GCTCATCCCAACCAACACC
L-GLDH	GAGCAGCAGATTGGTGGTATTATTC	ATTGTTCCCTTCGCAGGAGTAA
GSH 1	GAAGCCACATATGGACAGACACT	CTCAAACCCAAAAGAGTCATCGAAA
GSH 2	ATTGGCTAAAGCTTGGTTGGAGTA	CGTTCTTCTGGCTGTACAATTACCA
GPX 7	TTCGCTGCAAATCCGTCTCC	ACGTTAACGATCAACAAAGG
SOD 1	GAACCTTCCAGAAGCTCCAG	CCCTTAACAATCTCACTGCTACC
SOD 2	GAAGTGTCTCTGGGCTCAAG	TGGCGGTTCTCATCTTGTG
APX	CGAGAAATACGCTGCTGATGAA	GGGAGACACACACACACACA
MDAR	AAATCACTACTCACGGCACACACT	TTTTCTTGGGCTTCCTTCATACTC
GR 1	GCAAAATACAGCACAGGCGACAT	GTAGGAGATGCCACAAACCGAA
GR 2	AGGTGGCTGGGAGAAAACGG	TCTGGGCTGTTGGGGATGTT
DHAR	ACTGGTGGGTGGAGAATGGT	TTGTTTGCAGAGACGGATGAA
ACTINA	TTCTCATGCCATCCTCCGTCTT	CAGCGATACCTGAGAACATAGTGG

### 3.1. Biomasa seca de la parte aérea

El crecimiento de las plantas se determinó midiendo la biomasa seca de la parte aérea en la que se observó una disminución generalizada en todos los tratamientos, aunque la mayor disminución se encontró en el tratamiento Alk y SO, que fueron del 43,3 % y del 48,8 % respectivamente, comparadas con las plantas crecidas en condiciones control. Por otro lado, observamos como la aplicación de HS<sup>-</sup> al tratamiento alcalino (Alk+HS) en plantas Col-0 supone un



incremento de biomasa de la parte aérea del 37,8 % con respecto a las plantas crecidas en condiciones alcalinas (Alk). Por otro lado, cabe destacar que la aplicación de sulfato al tratamiento alcalino (Alk+SO) no tuvo ningún efecto con respecto al tratamiento alcalino (Alk) (Fig.1).



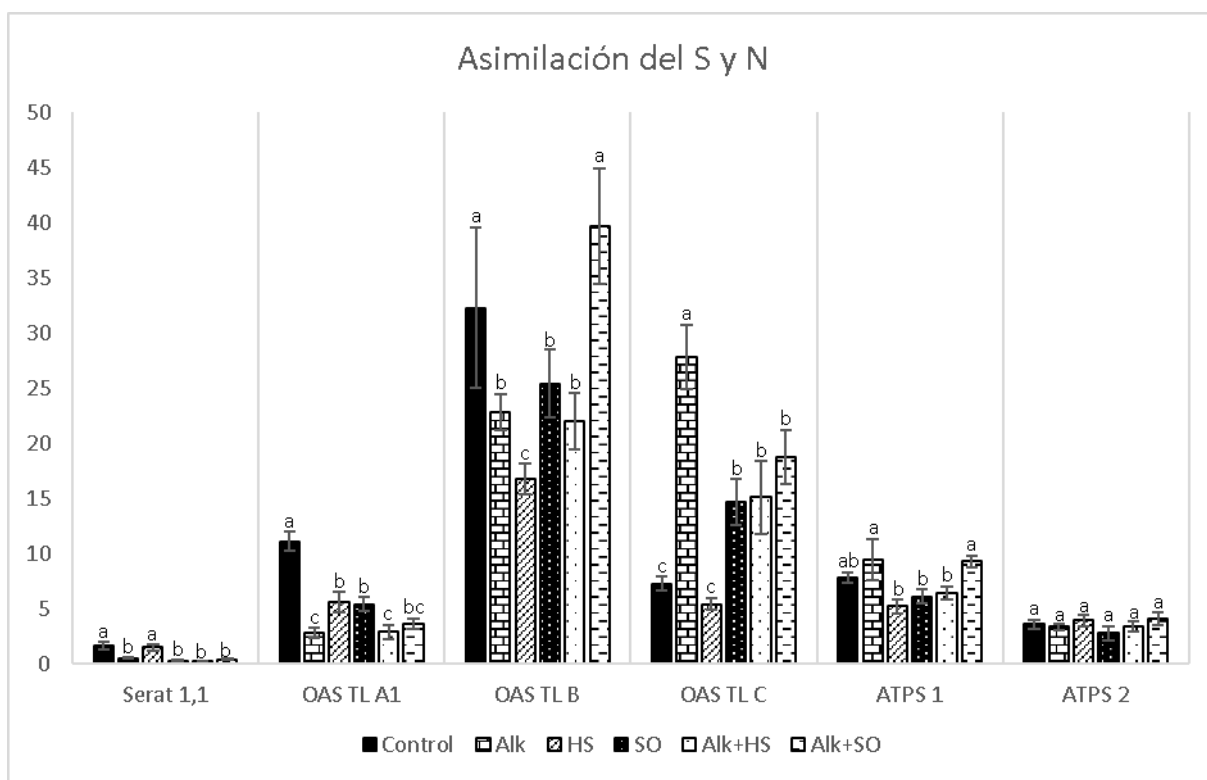
**Fig. 1.** Efecto de los diferentes tratamientos sobre la biomasa total de la parte aérea. Las columnas son la media  $\pm$  S.E. (n=9). Diferentes letras indican una diferencia significativa entre los valores.

### 3.2. Expresión relativa de los genes implicados en la nutrición de Nitrógeno y azufre.

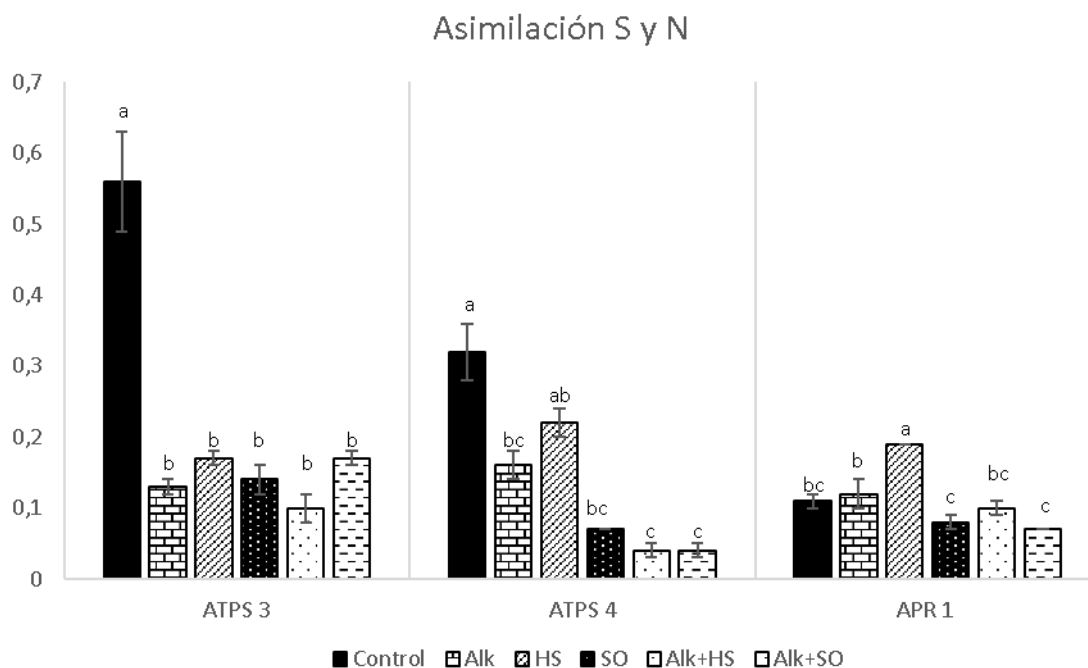
En primer lugar, cabe destacar la disminución significativa de la expresión de los genes que codifican para las enzimas O-acetilserina tiorilasa C (OAS-TL C) y ATP-sulfurilasa 1 (ATPS 1), así como un incremento significativo en la expresión del gen que codifica para la enzima adenosin-5'-fosfosulfato

reductasa 2 (APR 2) observada en el tratamiento Alk+HS con respecto al tratamiento Alk (Fig. 2a,2b).

En segundo lugar no observamos diferencias significativas en la expresión de los genes que codifican para las isoenzimas; serina acetiltransferasa 1,1 (Serat 1.1), O-acetilserina tior liasa A1 (OAS-TL A1), O-acetilserina tior liasa B (OAS-TL B), ATP sulfurilasa 2 (ATPS 2), ATP sulfurilasa 3 (ATPS 3), ATP sulfurilasa 4 (ATPS 4) y adenosin-5'-fosfosulfato reductasa 1 (APR 1), cuando comparamos el tratamiento Alk con el tratamiento Alk+HS (Fig. 2a,2b).



**Fig. 2a.** Expresión relativa de los genes implicados en la asimilación de S y N. Las columnas son la media  $\pm$  S.E. (n=9). Diferentes letras indican una diferencia significativa entre los valores.

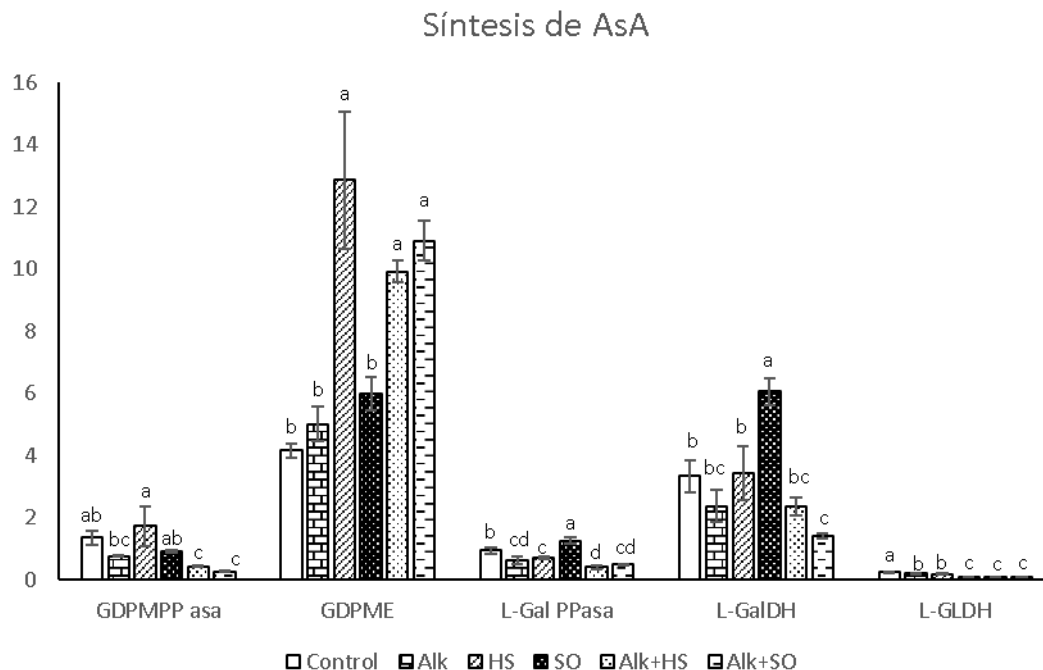


**Fig. 2b.** Expresión relativa de los genes implicados en la asimilación de S y N. Las columnas son la media  $\pm$  S.E. (n=9). Diferentes letras indican una diferencia significativa entre los valores.

### 3.3. Expresión relativa de los genes implicados en la vía de síntesis de ascorbato.

Nuestros resultados muestran un incremento en la expresión del gen GDPME en el tratamiento Alk+HS con respecto al tratamiento Alk junto con un incremento similar tras la aplicación de sulfato al tratamiento Alk (Alk+SO). Por otro lado, observamos una disminución significativa de la expresión del gen L-DLDH en el tratamiento Alk+HS comparado con el tratamiento alcalino (Alk) (Fig.3).

Sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre los tratamientos Alk y Alk+HS en la expresión de las enzimas GDP D-manosa pirofosforilasa (GDPMPPasa) L galactona deshidrogenasa (L-GalDH) (Fig.3).

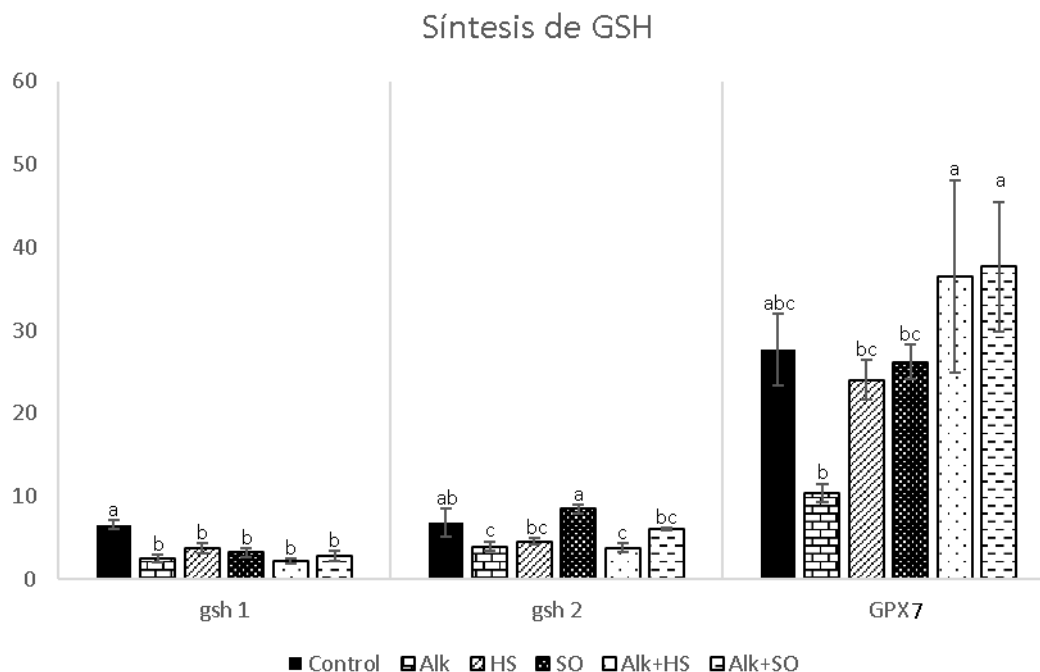


**Fig. 3.** Expresión relativa de los genes implicados en la síntesis de AsA. Las columnas son la media  $\pm$  S.E. (n=9). Diferentes letras indican una diferencia significativa entre los valores.

### 3.4. Expresión relativa de los genes implicados en el la síntesis de glutatión

En cuanto a los genes que rigen la síntesis de las enzimas que intervienen en las vías de síntesis de glutatión cabe destacar que la única que incrementó bajo condiciones de alcalinidad su expresión, fue la glutatión peroxidasa (GPX) con respecto al control alcalino (Alk) (Fig.4).

Por otro lado, no hubo diferencias significativas en la expresión de las enzimas  $\gamma$ -Glutamilcisteina sintetasa (gsh1) y glutatión sintetasa (gsh2) tras comparar el tratamiento Alk con el Alk+HS (Fig.4).



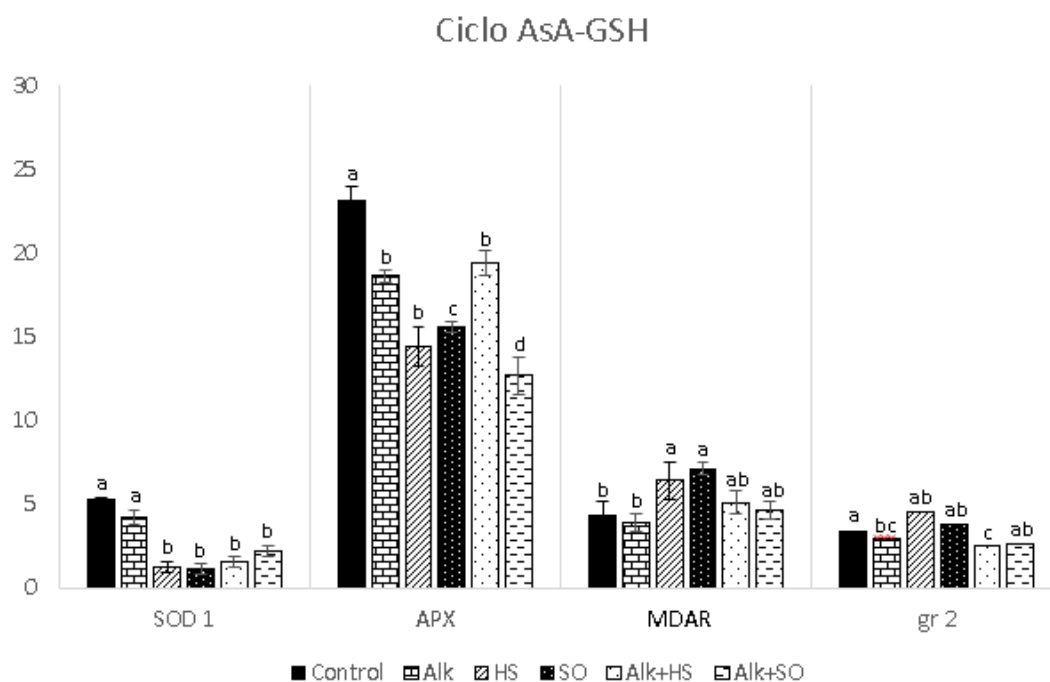
**Fig. 4.** Expresión relativa de los genes implicados en la síntesis GSH. Las columnas son la media  $\pm$  S.E. (n=9). Diferentes letras indican una diferencia significativa entre los valores.

### 3.5. Expresión relativa de los genes implicados en el ciclo ascorbato-glutación

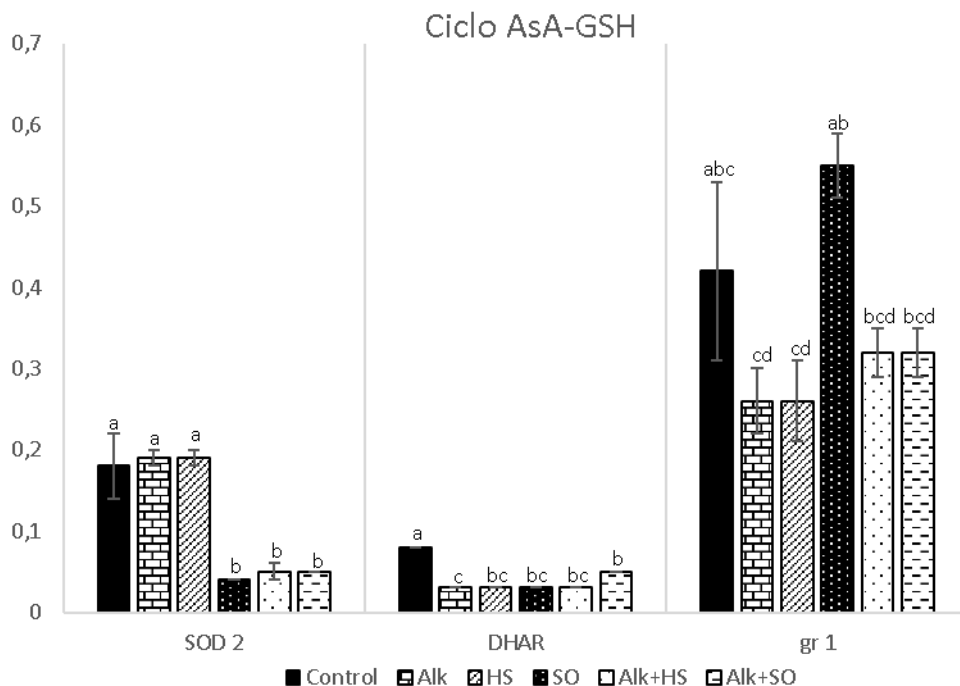
En el estudio de la expresión de los genes que intervienen en el metabolismo del glutatión destaca el descenso de la expresión de la isoenzima superóxido dismutasa 1 (SOD1) en el tratamiento Alk+HS con respecto al tratamiento Alk (Fig. 5a). Por otro lado, vemos como la expresión de la isoenzima superóxido dismutasa 2 (SOD2) experimenta un incremento con la aplicación de HS- (HS) si la comparamos con las plantas control, aunque bajo condiciones de estrés alcalino observamos un efecto contrario; es decir, una disminución drástica de la expresión de SOD2 si comparamos el tratamiento Alk con el tratamiento Alk+HS (Fig. 5b).

Por otro lado, el estudio muestra cómo se produce un incremento de la expresión de la proteína monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) con la aplicación de  $\text{SO}_4^{2-}$  (SO) y de NaHS (HS) con respecto a las plantas control (control) y al tratamiento de estrés alcalino (Alk). Dicho incremento no se produce cuando estos compuestos se aplican combinados con estrés alcalino, ni en Alk+HS ni en Alk+SO (Fig. 5a).

Mientras que no hubo diferencias significativas en la expresión de las proteínas; ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa 2 (GR2) (Fig. 5b), dehidroascorbato reductasa (DHAR), glutatión reductasa 1 (GR1) (Fig. 5a) entre los tratamientos Alk y Alk+HS.



**Fig. 5a.** Expresión relativa de los genes implicados en el ciclo AsA-GSH. Las columnas son la media  $\pm$  S.E. (n=9). Diferentes letras indican una diferencia significativa entre los valores.



**Fig. 5b.** Expresión relativa de los genes implicados en el ciclo AsA-GSH. Las columnas son la media  $\pm$  S.E. (n=9). Diferentes letras indican una diferencia significativa entre los valores.

## 4. Discusión

### 4.1 Biomasa total

La biomasa total es un indicador óptimo para evaluar el estrés sufrido por la planta y refleja su capacidad de crecimiento (Gong et al. 2013). Estudios previos han demostrado que la aplicación de NaHS puede mejorar el crecimiento y la respuesta antioxidante de plantas sometidas a diferentes tipos de estrés abiótico como calor, estrés hídrico, o salinidad (Shan et al., 2011; Christou et al., 2013; Li et al., 2014; Montesinos-Pereira et al. 2018). **art alc** Sin embargo, existe muy poca información sobre los efectos de la aplicación exógena de NaHS para mejorar la tolerancia frente al estrés alcalino. Se trata de un estrés muy nocivo para el crecimiento y desarrollo de las plantas, incluso puede producir daños más severos que el estrés por salinidad, de hecho, son

varios los autores que demuestran que el estrés alcalino disminuye el crecimiento y desarrollo de numerosas especies de plantas (Zhang and Mu, 2009; Paz et al., 2014). En el presente estudio observamos como las plantas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) sometidas a estrés alcalino perdían un 48,25 % de biomasa seca total respecto al control (Fig.1). Esta disminución se mitigó tras la aplicación de 0,5 mM de NaHS, ya que la pérdida de biomasa en el tratamiento Alk+HS fue tan solo del 17,13 % con respecto a las plantas control (Fig.1).

#### 4.2 Implicación del H<sub>2</sub>S en la asimilación de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>

Con el objetivo de discernir si la mejora de la tolerancia frente al estrés alcalino experimentada por las plantas de *Arabidopsis* mediante la aplicación de NaHS exógeno (Fig.1), se debió a una mejora en el estado nutricional de la planta a través de una inducción de la expresión de las enzimas que intervienen en la asimilación del S, en el presente trabajo se midieron las expresiones relativas de los genes que codifican para las principales enzimas que intervienen en las rutas de asimilación del sulfato. La primera etapa del proceso de asimilación del SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> consiste en la activación de éste por la enzima ATP-sulfurilasa, que produce adenosina fosfato a partir del SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y ATP (Pilon-Smits et al, 1999). Diferentes estudios atribuyen a esta enzima una función de regulación de la vía de asimilación (Logan et al, 1996; Lappartient et al, 1999). Otro paso importante en la asimilación del SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> es la incorporación del átomo de S a la cisteína, reacción catalizada por las enzimas SAT y OAS-TL (Wirtz y Droux 2005). Durante la biosíntesis de cisteína, el grupo acetyl del acetyl-CoA se transfiere a la L-serina para producir O-acetyl-serina (OAS). Esta reacción es catalizada por la enzima SAT. La síntesis posterior de cisteína en las plantas se



produce mediante la sulfhidratación de la OAS en presencia de sulfuros. Esta reacción es catalizada por la OAS-TL. Como se ha indicado en varios trabajos, la actividad SAT es mucho menor que la actividad OAS-TL y apoyando esta observación, se ha demostrado que SAT es una enzima de baja abundancia en comparación con la OAS-TL. Sin embargo, hay pruebas considerables de que SAT desempeña un papel esencial en la regulación de la biosíntesis de cisteína y la asimilación de  $\text{SO}_4^{2-}$  (Baszczyk et al. 1999; Harms et al. 2000; Höfgen et al. 2001; Nikiforova et al. 2002), dado que la sobreexpresión de OAS-TL no suele estar correlacionado con el contenido de Cys en plantas (Saito et al. 1994).

Por otra parte, cabe destacar que la cisteína como producto inicial de la asimilación del  $\text{SO}_4^{2-}$  también forma parte del tripéptido glutatión (GSH), que participa en la desintoxicación de las especies de oxígeno reactivo (ROS) y que sirve de sustrato para la síntesis de fitoquelatinas y glucosinolatos (Kopriva y Rennenberg, 2004). Aspecto en el que profundizaremos más adelante.

Talukdar y Talukdar en 2013 observaron un incremento significativo de la expresión de las proteínas SAT (LcSAT1;1 y LcSAT1;2) y OAS TL, tras la aplicación de 10  $\mu\text{M}$  de As en plantas de lenteja (*Lens culinaris* Medik). Por lo que la sobreexpresión tanto de SAT como de OAS-TL tienen una gran importancia no solo en el estado nutricional del S y la calidad nutricional de plantas cultivables (Tabe et al. 2010), sino también en la modulación a nivel transcripcional para aumentar los componentes de las cascadas de tioles en respuesta a diversos estreses abióticos (Liao et al. 2012). Sorprendentemente, en el presente estudio no se observaron diferencias en la expresión relativa de los genes que codifican para las isoenzimas Serat 1,1(SAT), OAS TL A1, OAS

TL B, ATPS2, ATPS3, ATPS4 ni APR1, mientras que sí se observó una disminución significativa de la expresión relativa de los genes que codifican para las isoenzimas OAS TL C y ATPS 1, en el tratamiento Alk+HS con respecto al tratamiento Alk (Fig.2a,2b). Esta disminución podría deberse a la aplicación exógena de una forma reducida de azufre como el NaHS que como producto de las reacciones catalizadas inhibe la expresión de éstas, como afirman algunos autores, la acumulación de formas reducidas de S como el sulfuro de hidrógeno, cisteína o GSH producen una inhibición de la asimilación de sulfato en las primeras etapas del proceso, inhibiendo la expresión y actividad de las enzimas OAS TL, ATPS y APR (Lappartient et al., 1999; Kopriva and Koprivova, 2004). Por ello concluimos que la mejora de la tolerancia mediante la aplicación de NaHS observada en el tratamiento Alk+HS (Fig.1), no se debe a un incremento en la expresión relativa de los genes que codifican las principales enzimas que intervienen en la asimilación del azufre en plantas de *Arabidopsis thaliana* (Fig.2a,2b).

#### **4.4. Implicación del H<sub>2</sub>S en la síntesis de L-ascorbato**

El ácido L-Ascórbato (AsA) es un metabolito multifuncional en plantas. Es un tampón redox y antioxidante fundamental, así como un cofactor enzimático, cumpliendo múltiples roles en el control del crecimiento, señalización redox, metabolismo y en la respuesta de las plantas frente a estreses abióticos y patógenos (Tóth et al. 2013; Hameed et al. 2015). En el presente estudio se analizó la expresión de los genes que codifican las enzimas que intervienen en la síntesis de L-ascorbato y observamos que la única enzima que incrementa su expresión en el tratamiento Alk+HS con respecto al tratamiento AIK fue la enzima GDPME (Fig.3). Es interesante destacar que la aplicación de sulfato en

el tratamiento Alk+SO también incrementó la expresión de GDPME, sin embargo, no se correlaciona en este caso con la mitigación de la pérdida de biomasa observada tras la aplicación de NaHS en plantas sometidas a estrés alcalino (Fig. 3). De hecho, Hou y colaboradores en 2015 observaron una correlación muy débil o incluso negativa entre la expresión de GDPME y el contenido en L-ascorbato en plantas de tomate. Por ello, la implicación de esta enzima en la síntesis de ascorbato podría no ser en algunos casos muy determinante. Por otro lado, estudios previos demuestran que la enzima L-GLDH es crucial para la síntesis de ascorbato afirmando que, entre los genes biosintéticos del AsA, existe una fuerte correlación positiva entre la expresión relativa de la GLDH y la cantidad de AsA total en plantas de tomate (Hou et al. 2015). En el presente estudio la enzima L-GLDH muestra una inhibición significativa de su expresión en todos los tratamientos respecto al control (Fig.3). Por ello concluimos que la tolerancia de las plantas de *Arabidopsis thaliana* observada tras aplicar NaHS a plantas sometidas a estrés alcalino no se correlacionan con un incremento en la expresión de los genes que codifican las enzimas cruciales para la síntesis de ascorbato.

#### **4.5. Implicación del H<sub>2</sub>S en la síntesis de glutatión**

Un componente clave en la red de rutas antioxidantes es el tiol glutatión. El cual se sintetiza a partir de sus componentes aminoacídicos, L-Glu, L-Cis, y Gli, en una reacción catalizada en dos pasos por la enzima  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa  $\gamma$ -ECS (GSH1) y glutatión sintetasa (GSH2) respectivamente (Noctor et al., 2002). Hasta la fecha, dos genes, uno que codifica para  $\gamma$ -ECS (GSH1) y otro putativo de expresión citosólica GSH2 han sido identificados en *Arabidopsis thaliana* y en muchas otras especies (Rawlins et al., 1995; Cobbett

et al., 1998; Noctor et al., 2002). Cabe destacar que la sobreexpresión o inhibición de GSH1 produce en *Arabidopsis* incrementos o disminuciones en los niveles de glutatión respectivamente (Cobbett et al., 1998; Xiang and Oliver, 1998; Vernoux et al., 2000). Por otro lado, la enzima  $\gamma$ -ECS se considera clave en la regulación de la biosíntesis de glutatión y está controlada a nivel de su actividad enzimática, síntesis de proteína y de mRNA (Xiang and Oliver, 1998; Noctor et al., 2002). Sorprendentemente, en el presente estudio, no se encontraron incrementos significativos entre las plantas control y las plantas sometidas a estrés alcalino en cuanto a la expresión relativa de las enzimas  $\gamma$ -ECS (GSH1), GSH2 y GPX7 esenciales para la síntesis de glutatión (Fig.4). Sin embargo, si se produjo un incremento en la expresión de la enzima glutatión peroxidasa cloroplastidial GPX7 en el tratamiento Alk+HS comparado con el tratamiento Alk. Estas enzimas GPXs son importantes para la eliminación de ROS por su gran especificidad por el sustrato y su gran afinidad por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Brigelius-Flohe' y Flohe, 2003). Su principal actividad es catalizar la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroperóxidos lipídicos en agua y alcohol, respectivamente, utilizando el glutatión como dador de electrones (Ursini et al., 1995; Fu et al., 2002). De hecho, Chang y colaboradores en 2009 afirmaron que las enzimas GPXs tienen un papel importante como reguladores y protectores durante la aclimatación a condiciones de estrés oxidativo. Estos mismos investigadores concluyeron que la expresión de AtGPX7 es importante para afinar el metabolismo celular de ROS, la fotosíntesis y la regulación de las respuestas de aclimatación e inmunodefensa frente a estrés abiótico. Por ello, el incremento en la expresión relativa de GPX 7 observado en el presente trabajo, podría estar relacionado con la tolerancia asociada al aporte de NaHS, sin

embargo, observamos un incremento similar de la expresión de GPX7 tras la aplicación de  $\text{SO}_4^{2-}$  a las plantas sometidas a estrés alcalino, de manera que la respuesta de incremento de la expresión de esta enzima no es una reacción específica frente al aporte de NaHS (Fig. 1, Fig.4). Por lo que concluimos que el incremento en la expresión de la enzima GPX7 en el tratamiento Alk+HS con respecto al tratamiento Alk, tampoco supone un mecanismo específico a través del cual el sulfuro de hidrógeno otorga tolerancia frente a estrés alcalino en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

#### 4.6. Ciclo ascorbato-glutati6n

Algunos investigadores sostienen que el ciclo ascorbato-glutati6n juega un papel fundamental en la tolerancia frente al estrés alcalino (Liu et al., 2015). En nuestro estudio las 6nicas isoenzimas del ciclo ascorbato-glutati6n que experimentaron diferencias en su expresi6n relativa al comparar los tratamientos Alk y Alk+HS fueron las isoenzimas SOD 1 y SOD 2. Ambas isoenzimas sufrieron una disminuci6n de la expresi6n relativa en el tratamiento Alk+HS con respecto al tratamiento Alk (Fig. 5a, 5b). La SOD es una de las enzimas clave en la tolerancia de las plantas frente al estr6s, actuando en la primera l6nea de defensa frente al efecto toxico de las especies de ox6geno reactivas (ROS), ya que esta enzima cataliza la reacci6n que dismuta el  $\text{O}_2^-$  en oxigeno molecular y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Gill and Tuteja, 2010). La expresi6n de las diferente isoenzimas SOD suele inducirse en plantas sometidas a diferentes tipos de estreses abi6ticos (Asgher et al.2021), sin embargo en el presente estudio, la expresi6n relativa de las dos isoenzimas SOD 1 y SOD 2 analizadas, no experimentaron diferencias bajo condiciones de estr6s alcalino con respecto al tratamiento control, es m6s, la adici6n de NaHS produjo una inhibici6n de la

expresión de ambas isoenzimas cuando se aplica este compuesto a plantas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a estrés alcalino (Alk+HS) (Fig.5a y 5b). Por otro lado, Montesinos y colaboradores en 2018 observaron una disminución de la actividad SOD en plantas sometidas a estrés alcalino tras aplicar NaHS en plantas de *Brassica oleracea*, por lo que la disminución de la expresión relativa de SOD 1 y SOD 2 observada en *Arabidopsis thaliana*, especie perteneciente a la familia Brassicaceae al igual que *Brassica oleracea*, podría ser indicativa de una mejora del estado redox de las plantas que recibieron NaHS bajo condiciones de estrés alcalino. Por ello concluimos que el incremento de la tolerancia al estrés alcalino observado tras aplicar NaHS (Fig.1) no se correlaciona con un incremento en la expresión de ninguna de las enzimas que intervienen en el ciclo ascorbato glutatión y, por tanto, no justifica la mejora de la tolerancia observada en el tratamiento Alk+SH con respecto al tratamiento Alk (Fig.1).

### **Agradecimientos**

Este trabajo fue cofinanciado entre el grupo de investigación AGR 282 “Fisiología y Fitotecnia de Cultivos para el Desarrollo de una Agricultura Sostenible”, así como por Dep. of Plant Science, Blumwal’s Laboratory, U.C.Davis.

### **5. Conclusión**

En el presente trabajo podemos concluir que la aplicación de 50  $\mu\text{M}$  de NaHS incrementó la tolerancia de las plantas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a estrés alcalino. Este incremento en la tolerancia, no se correlacionó con el incremento en la expresión relativa de ninguno de los genes que codifican para

la biosíntesis de las principales enzimas implicadas en las vías de asimilación del S, la respuesta antioxidante, la síntesis de ascorbato, la síntesis de glutatión y el ciclo ascorbato-glutatión.

## 6. Bibliografía

Aroca, A., Gotor, C., Bassham, D.C., Romero, L.C., 2020. Hydrogen Sulfide: From a Toxic Molecule to a Key Molecule of Cell Life. *Antioxidants (Basel)* 9. <https://doi.org/10.3390/antiox9070621>

Asada, K., 1999. THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 50, 601–639. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.601>

Asgher, M., Ahmed, S., Sehar, Z., Gautam, H., Gandhi, S.G., Khan, N.A., 2021. Hydrogen peroxide modulates activity and expression of antioxidant enzymes and protects photosynthetic activity from arsenic damage in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Hazardous Materials* 401, 123365. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123365>

Blaszczyk, Anna, Brodzik, R., Sirko, A., 1999. Increased resistance to oxidative stress in transgenic tobacco plants overexpressing bacterial serine acetyltransferase. *The Plant Journal* 20, 237–243. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00596.x>

Blaszczyk, A., Brodzik, R., Sirko, A., 1999. Increased resistance to oxidative stress in transgenic tobacco plants overexpressing bacterial serine acetyltransferase. *Plant Journal* 20, 237–243. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00596.x>

Brigelius-Flohé, R., Flohé, L., 2003. Is there a role of glutathione peroxidases in signaling and differentiation? *Biofactors* 17, 93–102. <https://doi.org/10.1002/biof.5520170110>



- Cakmak, I., 2005. The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168, 521–530. <https://doi.org/10.1002/jpln.200420485>
- Chang, C.C.C., Ślesak, I., Jordá, L., Sotnikov, A., Melzer, M., Miszalski, Z., Mullineaux, P.M., Parker, J.E., Karpińska, B., Karpiński, S., 2009. *Arabidopsis* Chloroplastic Glutathione Peroxidases Play a Role in Cross Talk between Photooxidative Stress and Immune Responses. *Plant Physiology* 150, 670–683. <https://doi.org/10.1104/pp.109.135566>
- Christou, A., Manganaris, G.A., Papadopoulos, I., Fotopoulos, V., 2013. Hydrogen sulfide induces systemic tolerance to salinity and non-ionic osmotic stress in strawberry plants through modification of reactive species biosynthesis and transcriptional regulation of multiple defence pathways. *J Exp Bot* 64, 1953–1966. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert055>
- Cobbett, C.S., May, M.J., Howden, R., Rolls, B., 1998. The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in gamma-glutamylcysteine synthetase. *Plant J* 16, 73–78. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00262.x>
- Dawood, M., Cao, F., Jahangir, M.M., Zhang, G., Wu, F., 2012. Alleviation of aluminum toxicity by hydrogen sulfide is related to elevated ATPase, and suppressed aluminum uptake and oxidative stress in barley. *Journal of Hazardous Materials* 209–210, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.12.076>
- Flocco, C.G., Lindblom, S.D., Elizabeth, A.H., Smits, P., 2004. Overexpression of Enzymes Involved in Glutathione Synthesis Enhances

Tolerance to Organic Pollutants in *Brassica juncea*. *International Journal of Phytoremediation* 6, 289–304. <https://doi.org/10.1080/16226510490888811>

Fredeen, A.L., Raab, T.K., Rao, I.M., Terry, N., 1990. Effects of phosphorus nutrition on photosynthesis in *Glycine max* (L.) Merr. *Planta* 181, 399–405. <https://doi.org/10.1007/BF00195894>

Fu, L.-H., Wang, X.-F., Eyal, Y., She, Y.-M., Donald, L.J., Standing, K.G., Ben-Hayyim, G., 2002. A selenoprotein in the plant kingdom. Mass spectrometry confirms that an opal codon (UGA) encodes selenocysteine in *Chlamydomonas reinhardtii* glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 277, 25983–25991. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202912200>

Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>

Gomes, M.P., Duarte, D.M., Carneiro, M.M.L.C., Barreto, L.C., Carvalho, M., Soares, A.M., Guilherme, L.R.G., Garcia, Q.S., 2013. Zinc tolerance modulation in *Myracrodruon urundeuva* plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 67, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.02.018>

Gong, B., Wen, D., VandenLangenberg, K., Wei, M., Yang, F., Shi, Q., Wang, X., 2013. Comparative effects of NaCl and NaHCO<sub>3</sub> stress on photosynthetic parameters, nutrient metabolism, and the antioxidant system in tomato leaves. *Scientia Horticulturae* 157, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.03.032>

Hameed, A., Gulzar, S., Aziz, I., Hussain, T., Gul, B., Khan, M.A., 2015. Effects of salinity and ascorbic acid on growth, water status and antioxidant

system in a perennial halophyte. *AoB PLANTS* 7.

<https://doi.org/10.1093/aobpla/plv004>

Harms, K., Ballmoos, P.V., Brunold, C., Höfgen, R., Hesse, H., 2000.

Expression of a bacterial serine acetyltransferase in transgenic potato plants leads to increased levels of cysteine and glutathione. *The Plant Journal* 22, 335–343. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.2000.00743.x>

Höfgen, R., Kreft, O., Willmitzer, L., Hesse, H., 2001. Manipulation of thiol contents in plants. *Amino Acids* 20, 291–299.

<https://doi.org/10.1007/s007260170045>

Jin, H., Kim, H.R., Plaha, P., Liu, S.K., Park, J.Y., Piao, Y.Z., Yang, Z.H., Jiang, G.B., Kwak, S.S., An, G., Son, M., Jin, Y.H., Sohn, J.H., Lim, Y.P., 2008. Expression profiling of the genes induced by Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and NaCl stresses in leaves and roots of *Leymus chinensis*. *Plant Science* 175, 784–792. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.07.016>

Johnson, S.M., Doherty, S.J., Croy, R.R.D., 2003. Biphasic Superoxide Generation in Potato Tubers. A Self-Amplifying Response to Stress. *Plant Physiology* 131, 1440–1449. <https://doi.org/10.1104/pp.013300>

Kopriva, S., Koprivova, A., 2004. Plant adenosine 5'-phosphosulphate reductase: the past, the present, and the future. *J Exp Bot* 55, 1775–1783. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh185>

Kopriva, S., Mugford, S.G., Matthewman, C., Koprivova, A., 2009a. Plant sulfate assimilation genes: redundancy versus specialization. *Plant Cell Rep* 28, 1769–1780. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0793-0>

Kopriva, S., Mugford, S.G., Matthewman, C., Koprivova, A., 2009b. Plant sulfate assimilation genes: redundancy versus specialization. *Plant Cell Rep* 28, 1769–1780. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0793-0>

Kopriva, S., Rennenberg, H., 2004. Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with N and C metabolism. *J Exp Bot* 55, 1831–1842. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh203>

Krueger, S., Niehl, A., Martin, M.C.L., Steinhauser, D., Donath, A., Hildebrandt, T., Romero, L.C., Hoefgen, R., Gotor, C., Hesse, H., 2009. Analysis of cytosolic and plastidic serine acetyltransferase mutants and subcellular metabolite distributions suggests interplay of the cellular compartments for cysteine biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* 32, 349–367. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01928.x>

Lappartient, A.G., Vidmar, J.J., Leustek, T., Glass, A.D.M., Touraine, B., 1999. Inter-organ signaling in plants: regulation of ATP sulfurylase and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound. *The Plant Journal* 18, 89–95. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00416.x>

LI, R., SHI, F., FUKUDA, K., YANG, Y., 2010. Effects of salt and alkali stresses on germination, growth, photosynthesis and ion accumulation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Soil Science and Plant Nutrition* 56, 725–733. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2010.00506.x>

Li, Z.-G., Yi, X.-Y., Li, Y.-T., 2014. Effect of pretreatment with hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide on heat tolerance in relation to antioxidant system in maize (*Zea mays*) seedlings. *Biologia* 69, 1001–1009. <https://doi.org/10.2478/s11756-014-0396-2>

Liao, D., Pajak, A., Karcz, S.R., Chapman, B.P., Sharpe, A.G., Austin, R.S., Datla, R., Dhaubhadel, S., Marsolais, F., 2012. Transcripts of sulphur metabolic genes are co-ordinately regulated in developing seeds of common bean lacking phaseolin and major lectins. *J Exp Bot* 63, 6283–6295. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers280>

Lisjak, M., Srivastava, N., Teklic, T., Civalo, L., Lewandowski, K., Wilson, I., Wood, M.E., Whiteman, M., Hancock, J.T., 2010. A novel hydrogen sulfide donor causes stomatal opening and reduces nitric oxide accumulation. *Plant Physiol Biochem* 48, 931–935. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.09.016>

Liu, N., Jin, Z., Wang, S., Gong, B., Wen, D., Wang, X., Wei, M., Shi, Q., 2015. Sodic alkaline stress mitigation with exogenous melatonin involves reactive oxygen metabolism and ion homeostasis in tomato. *Scientia Horticulturae* 181, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.10.049>

Logan, H.M., Cathala, N., Grignon, C., Davidian, J.-C., 1996. Cloning of a cDNA Encoded by a Member of the Arabidopsis thaliana ATP Sulfurylase Multigene Family EXPRESSION STUDIES IN YEAST AND IN RELATION TO PLANT SULFUR NUTRITION. *J. Biol. Chem.* 271, 12227–12233. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.21.12227>

Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Trivedi, P.K., 2008. Thiol metabolism and antioxidant systems complement each other during arsenate detoxification in *Ceratophyllum demersum* L. *Aquatic Toxicology* 86, 205–215. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.11.001>

Miyake, C., Miyata, M., Shinzaki, Y., Tomizawa, K., 2005. CO<sub>2</sub> Response of Cyclic Electron Flow around PSI (CEF-PSI) in Tobacco Leaves—Relative Electron fluxes through PSI and PSII Determine the Magnitude of Non-

photochemical Quenching (NPQ) of Chl Fluorescence. *Plant Cell Physiol* 46, 629–637. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci067>

Montesinos-Pereira, D., de la Torre-González, A., Blasco, B., Ruiz, J.M., 2018. Hydrogen sulphide increase the tolerance to alkalinity stress in cabbage plants (*Brassica oleracea* L. 'Bronco'). *Scientia Horticulturae* 235, 349–356. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.021>

Nikiforova, V., Kempa, S., Zeh, M., Maimann, S., Kreft, O., Casazza, A.P., Riedel, K., Tauberger, E., Hoefgen, R., Hesse, H., 2002. Engineering of cysteine and methionine biosynthesis in potato. *Amino Acids* 22, 259–278. <https://doi.org/10.1007/s007260200013>

Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 49, 249–279. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.249>

Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., Foyer, C.H., 2002. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J Exp Bot* 53, 1283–1304. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1283>

Pilon-Smits, E.A.H., Hwang, S., Lytle, C.M., Zhu, Y., Tai, J.C., Bravo, R.C., Chen, Y., Leustek, T., Terry, N., 1999. Overexpression of ATP Sulfurylase in Indian Mustard Leads to Increased Selenate Uptake, Reduction, and Tolerance. *Plant Physiology* 119, 123–132. <https://doi.org/10.1104/pp.119.1.123>

Rawlins, M.R., Leaver, C.J., May, M.J., 1995. Characterisation of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding glutathione synthetase. *FEBS Letters* 376, 81–86. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01253-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01253-1)

- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V., Vivekanandan, M., 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 161, 1189–1202. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.01.013>
- Sade, N., Umnajkitikorn, K., Rubio Wilhelmi, M. del M., Wright, M., Wang, S., Blumwald, E., 2018. Delaying chloroplast turnover increases water-deficit stress tolerance through the enhancement of nitrogen assimilation in rice. *J Exp Bot* 69, 867–878. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx247>
- Saito, K., Kurosawa, M., Tatsuguchi, K., Takagi, Y., Murakoshi, I., 1994. Modulation of Cysteine Biosynthesis in Chloroplasts of Transgenic Tobacco Overexpressing Cysteine Synthase [O-Acetylserine(thiol)-lyase]. *Plant Physiology* 106, 887–895. <https://doi.org/10.1104/pp.106.3.887>
- Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M., Tal, M., 2001. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system. *Physiologia Plantarum* 112, 487–494. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1120405.x>
- Shan, C., Liu, H., Zhao, L., Wang, X., 2014. Effects of exogenous hydrogen sulfide on the redox states of ascorbate and glutathione in maize leaves under salt stress. *Biologia plantarum* 58, 169–173. <https://doi.org/10.1007/s10535-013-0366-5>
- Shan, C., Zhang, S., Li, D., Zhao, Y., Tian, X., Zhao, X., Wu, Y., Wei, X., Liu, R., 2011. Effects of exogenous hydrogen sulfide on the ascorbate and glutathione metabolism in wheat seedlings leaves under water stress. *Acta Physiol Plant* 33, 2533. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0746-4>

- Shi, D., Sheng, Y., 2005. Effect of various salt–alkaline mixed stress conditions on sunflower seedlings and analysis of their stress factors. *Environmental and Experimental Botany* 54, 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.05.003>
- Shi, D., Wang, D., 2005. Effects of various salt-alkaline mixed stresses on *Aneurolepidium chinense* (Trin.) Kitag. *Plant Soil* 271, 15–26. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-1307-z>
- Singh, V.P., Singh, S., Kumar, J., Prasad, S.M., 2015. Hydrogen sulfide alleviates toxic effects of arsenate in pea seedlings through up-regulation of the ascorbate–glutathione cycle: Possible involvement of nitric oxide. *Journal of Plant Physiology* 181, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.03.015>
- Tabé, L., Wirtz, M., Molvig, L., Droux, M., Hell, R., 2010. Overexpression of serine acetyltransferase produced large increases in O-acetylserine and free cysteine in developing seeds of a grain legume. *J Exp Bot* 61, 721–733. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp338>
- Talukdar, D., Talukdar, T., 2014. Coordinated response of sulfate transport, cysteine biosynthesis, and glutathione-mediated antioxidant defense in lentil (*Lens culinaris* Medik.) genotypes exposed to arsenic. *Protoplasma* 251, 839–855. <https://doi.org/10.1007/s00709-013-0586-8>
- Tanji, K.K., 2002. Salinity in the Soil Environment, in: Läuchli, A., Lüttge, U. (Eds.), *Salinity: Environment - Plants - Molecules*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 21–51. [https://doi.org/10.1007/0-306-48155-3\\_2](https://doi.org/10.1007/0-306-48155-3_2)



Tóth, S.Z., Schansker, G., Garab, G., 2013. The physiological roles and metabolism of ascorbate in chloroplasts. *Physiol Plant* 148, 161–175. <https://doi.org/10.1111/ppl.12006>

Tripathi, P., Mishra, A., Dwivedi, S., Chakrabarty, D., Trivedi, P.K., Singh, R.P., Tripathi, R.D., 2012. Differential response of oxidative stress and thiol metabolism in contrasting rice genotypes for arsenic tolerance. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 79, 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.12.019>

Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohé, R., Aumann, K.D., Roveri, A., Schomburg, D., Flohé, L., 1995. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 252, 38–53. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)52007-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)52007-4)

Vernoux, T., Wilson, R.C., Seeley, K.A., Reichheld, J.-P., Muroy, S., Brown, S., Maughan, S.C., Cobbett, C.S., Van Montagu, M., Inzé, D., May, M.J., Sung, Z.R., 2000. The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 Gene Defines a Glutathione-Dependent Pathway Involved in Initiation and Maintenance of Cell Division during Postembryonic Root Development. *Plant Cell* 12, 97–110.

Wang, B.-L., Shi, L., Li, Y.-X., Zhang, W.-H., 2010. Boron toxicity is alleviated by hydrogen sulfide in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. *Planta* 231, 1301–1309. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1134-9>

Wang, H., Wu, Z., Chen, Y., Yang, C., Shi, D., 2011. Effects of salt and alkali stresses on growth and ion balance in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant, Soil and Environment* 57, 286–294. <https://doi.org/10.17221/36/2011-pse>

- Wang, X., Geng, S., Ri, Y.-J., Cao, D., Liu, J., Shi, D., Yang, C., 2011. Physiological responses and adaptive strategies of tomato plants to salt and alkali stresses. *Scientia Horticulturae* 130, 248–255. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.07.006>
- Wang, Y., Li, L., Cui, W., Xu, S., Shen, W., Wang, R., 2012. Hydrogen sulfide enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway. *Plant Soil* 351, 107–119. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0936-2>
- Wang, Y., Ma, H., Liu, G., Xu, C., Zhang, D., Ban, Q., 2008. Analysis of Gene Expression Profile of *Limonium bicolor* under NaHCO<sub>3</sub> Stress Using cDNA Microarray. *Plant Mol Biol Rep* 26, 241–254. <https://doi.org/10.1007/s11105-008-0037-4>
- Watanabe, M., Mochida, K., Kato, T., Tabata, S., Yoshimoto, N., Noji, M., Saito, K., 2008. Comparative Genomics and Reverse Genetics Analysis Reveal Indispensable Functions of the Serine Acetyltransferase Gene Family in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20, 2484–2496. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.060335>
- Wirtz, M., Droux, M., 2005. Synthesis of the sulfur amino acids: cysteine and methionine. *Photosynth Res* 86, 345–362. <https://doi.org/10.1007/s11120-005-8810-9>
- Wirtz, M., Hell, R., 2006. Functional analysis of the cysteine synthase protein complex from plants: Structural, biochemical and regulatory properties. *Journal of Plant Physiology* 163, 273–286. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.11.013>

Xiang, C., Oliver, D.J., 1998. Glutathione Metabolic Genes Coordinately Respond to Heavy Metals and Jasmonic Acid in Arabidopsis. *The Plant Cell* 10, 1539–1550. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.9.1539>

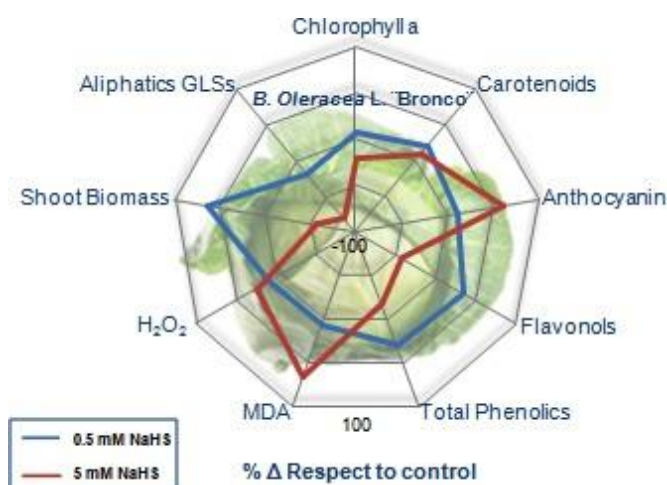
Zhang, H., Hu, S.-L., Zhang, Z.-J., Hu, L.-Y., Jiang, C.-X., Wei, Z.-J., Liu, J., Wang, H.-L., Jiang, S.-T., 2011. Hydrogen sulfide acts as a regulator of flower senescence in plants. *Postharvest Biology and Technology* 60, 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.01.006>



## DISCUSIÓN GENERAL

### 3 Discusión general

Como hemos indicado en los capítulos 1 y 2 esta tesis doctoral, el H<sub>2</sub>S se ha considerado tradicionalmente como una sustancia fitotóxica, ya que aplicado a ciertas dosis puede producir graves problemas en el crecimiento y desarrollo de diferentes especies de plantas cultivables (Thompson y Kats, 1978, Koch y Erskine, 2001). Sin embargo, estudios recientes demuestran que, a ciertas dosis, la aplicación de H<sub>2</sub>S puede estimular los mecanismos de defensa antioxidante de las plantas, así como la absorción de nutrientes, afectando profundamente los procesos de crecimiento y desarrollo de la planta (Gadalla y Snyder, 2010; Dawood et al., 2012). Efectivamente en los capítulos 1 y 2 concluimos que el efecto de la aplicación de NaHS en plantas de *Brassica oleracea* L. 'Bronco' es dosis-dependiente (Esquema1).



**Esquema 1:** Porcentaje de variación de algunos parámetros de calidad nutricional y estrés tras aplicar dosis baja (0,5 mM) y dosis alta (5 mM) de NaHS.

Ya en la década de 1980 se observó que la aplicación de bajas concentraciones de H<sub>2</sub>S (100 mg/L), podía aumentar considerablemente el crecimiento de la alfalfa, la lechuga y la remolacha azucarera (Thompson et al. 1979). En este sentido, Ali y colaboradores en 2014 observaron en hojas de *Brassica napus*, que la aplicación de H<sub>2</sub>S a una concentración de 0,2 mM aumentaba el crecimiento en términos de altura de la planta en un 5% (Ali et al., 2014). De acuerdo con estos resultados, en nuestro trabajo observamos que tras aplicar 0,5 y 1 mM de NaHS a plantas de col (*Brassica oleracea* L. 'Bronco') se produjo un incremento de biomasa de la parte aérea del 64 y 65% respectivamente comparadas con las plantas control (Fig. 1. Cap. 1). Por el contrario, en el tratamiento de 5 mM de NaHS observamos una disminución significativa de la biomasa de la parte aérea (Fig. 1). Cabe destacar que esta disminución de biomasa ya fue descrita anteriormente por otros autores en plantas de *B. oleracea* (Koch y Erskine, 2001; Lamers et al., 2013) y por ello concluimos que el efecto fortificante del NaHS sobre la biomasa de la parte aérea se produce tras aplicar dosis “bajas” (0,5 y 1 mM), mientras que los niveles altos (>5 mM) aplicados inhiben el crecimiento de la planta y la biomasa con pérdidas significativas del 55% (Fig. 1. Cap. 1). Aunque se desconocen los mecanismos fisiológicos que intervienen en los efectos del H<sub>2</sub>S, probablemente los efectos nocivos del H<sub>2</sub>S sobre *B. oleracea* no se producen por una mera perturbación del equilibrio de S en la planta, sino por alteraciones en el metabolismo secundario, en proteínas enzimáticas y en membranas celulares (Nakamura et al. 2009).

Por otra parte, la fitotoxicidad del H<sub>2</sub>S parece ser el resultado de su alta afinidad por los grupos metálicos de las proteínas (Beauchamp et al. 1984).

Tanto el daño a las membranas celulares como la interacción del H<sub>2</sub>S con las enzimas de la célula, podrían explicar la reducción de la biomasa que se produce a 2,5 y 5 mM de NaHS. Aunque como vemos en el capítulo 2, la acumulación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> también podría ser una causa que propiciara la pérdida de biomasa a estas concentraciones de NaHS tan elevadas. Estos resultados están correlacionados respectivamente con los niveles foliares de H<sub>2</sub>S encontrados en cada tratamiento (Fig. 2. Cap. 1). En la misma línea, otros autores también mostraron un aumento de las concentraciones de H<sub>2</sub>S en hojas de Morera después de la aplicación de 0,8 mM de NaHS (Hu et al., 2014).

Continuando con la discusión del capítulo 1, cabe destacar como la aplicación en el rango de 0,5 a 1 mM de NaHS hizo aumentar la biomasa de *B. oleracea*, así como, la producción de compuestos antioxidantes, considerados en nutrición humana como compuestos bioactivos, como son: carotenoides, antocianinas, fenoles, flavonoles y glucosinolatos, por lo que estos resultados comienzan a definir la “dosis óptima” para mejorar el rendimiento y la calidad nutricional de *Brassica oleracea* var. 'Bronco'. Por otra parte, la aplicación de dosis más altas (>2,5 mM de NaHS) podrían considerarse como “tóxicas” según la generación de un exceso de peroxidación lipídica, y pérdidas de clorofila, así como la reducción en el contenido de compuestos bioactivos para la nutrición humana, mostrando estas plantas síntomas evidentes de estrés. Por ello, el estudio realizado en el capítulo 1 nos permitió acotar las dosis para la definición de éstas como “óptimas” entre 0,5 y 1 mM de NaHS, y aquellas causantes de fitotoxicidad >2,5 mM de NaHS.



Con objeto de seguir definiendo que dosis de H<sub>2</sub>S consideramos como “óptimas” y cuales “fitotóxicas” en plantas de *Brassica oleracea*, bajo nuestras condiciones experimentales, en el capítulo 2 abordamos el estudio del efecto de la aplicación de diferentes dosis de NaHS (0.5, 1, 2.5 y 5 mM de NaHS) sobre el metabolismo del N. Ambas vías de asimilación del S y el N están íntimamente coordinadas y se ha demostrado que la deficiencia de un elemento obstruye ampliamente la vía metabólica del otro (Scherer, 2008). Por otro lado, cabe resaltar que el S es un nutriente esencial para la síntesis de aminoácidos azufrados (cisteína y metionina), antioxidantes naturales (glutatión reducido; GSH), coenzimas, grupos protésicos (ferredoxina), vitaminas, metabolitos secundarios, fitoquelatinas (PC) y lípidos (Scherer, 2008). En esta línea observamos que la aplicación de una forma de S reducida como es el H<sub>2</sub>S, modulaba los procesos de asimilación del N (Cap. 2), alterando las concentraciones de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en las plantas de *B. oleracea*. A este respecto observamos en primer lugar que la acumulación excesiva de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> puede ser responsable de la disminución de biomasa en los tratamientos 2,5 y 5 mM de NaSH, ya que el alto contenido de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> generado en la asimilación del NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y la fotorrespiración con dosis de 2,5 y 5 mM debe ser rápidamente asimilado en compuestos orgánicos no tóxicos. Esta asimilación se produce a través del ciclo GS-GOGAT, dando lugar a formas orgánicas como el glutamato (Glu) y la glutamina (Gln). Estos aminoácidos (AAs) son precursores en la síntesis de otros AAs, ácidos nucleicos, clorofilas y hormonas (Oliveira et al., 2001). Con respecto a los tratamientos de NaSH, el único que registró un incremento de la actividad GS correlacionado con un gran incremento de biomasa fue el tratamiento 0,5 mM de NaSH, por lo que para este tratamiento podría existir

una relación directa entre el aumento de la biomasa y el proceso de asimilación de N (Tabla 2 y Fig. 1. Cap. 2).

De hecho, en el tratamiento 0,5 mM de NaSH la actividad GOGAT se mantuvo igual que en las plantas control (Tabla 2. Cap. 2). Este hecho, junto con la intensificación de la actividad de la enzima GS (Tabla 2. Cap. 2) condujo a un incremento en la asimilación de N que se tradujo en un incremento en el contenido de aminoácidos proteínogénicos (Tabla 3. Cap. 2) y concomitantemente en un incremento de proteínas solubles (Tabla 4. Cap. 2). La capacidad de retirar el exceso de  $\text{NH}_4^+$  y asimilarlo en aminoácidos con los que se constituyen proteínas solubles parece estar relacionada con el incremento de biomasa observado en este tratamiento (Cap. 2).

Por otra parte, el tratamiento 1 mM no mostró ninguna diferencia significativa con respecto al control (Tabla 2. Cap. 2), y por lo tanto en este caso la mayor biomasa de la parte aérea podría deberse a la inducción de otro proceso fisiológico tan esencial para el crecimiento de las plantas como la fotosíntesis, aunque más investigación al respecto se debería realizar.

Por lo dilucidado anteriormente, concluimos que la aplicación de 0,5 mM de NaSH podría ser una estrategia beneficiosa para mejorar los procesos implicados en la asimilación del N, acompañada de un aumento de los aminoácidos esenciales (Tabla 3, Cap. 2) así como de la producción de biomasa de los cultivos de hoja fresca (Fig1. Cap. 2).

Para discernir que dosis de  $\text{H}_2\text{S}$  consideraríamos como “óptima” dentro del rango definido con anterioridad en el capítulo 1, en el capítulo 2 observamos que la actividad nitrato reductasa (NR), enzima clave en el proceso de

asimilación de N (Oliveira et al., 2001), se inhibía tras incrementar la dosis de 0,5 a 1 mM. Esto, unido a la mejora significativa de la calidad nutricional (Cap. 1), así como de los procesos que intervienen en la asimilación del N en plantas de *Brassica oleracea* nos llevó a definir la dosis “óptima” como 0,5 mM de NaHS.

En la segunda parte de la presente tesis doctoral (Cap. 3 y 4), y tras haber definido el concepto de “dosis óptima” de NaHS como 0,5 mM, por los efectos observados en los dos primeros trabajos, nos preguntamos si la aplicación de esta dosis de H<sub>2</sub>S (0,5 mM de NaHS) podría ejercer algún efecto bioestimulante en plantas de *Brassica oleracea* L. “Bronco” sometidas a estrés alcalino.

El estrés alcalino se caracteriza por un elevado pH y la acumulación masiva de Na<sup>+</sup> dando lugar a una falta de protones en el medio y a la alteración o inhibición de los gradientes y/o potenciales electroquímicos en las células radicales, alterando muchas funciones fisiológicas, como la captación de agua y de iones (Wang et al., 2011a; Wang et al., 2011b). Debido a estas alteraciones de las funciones fisiológicas de la raíz, el estrés alcalino (pH > 8,5) inhibe el crecimiento y la fotosíntesis. Esta reducción de la ingesta de CO<sub>2</sub>, así como, el exceso de electrones producidos durante la fotosíntesis debido a este tipo de estrés, causa daño oxidativo en las células y altera el metabolismo antioxidante, generando ROS (Cakmak, 2005).

En este sentido, estudios anteriores han demostrado que la aplicación de NaHS puede mejorar el crecimiento de las plantas y la respuesta antioxidante a diferentes tipos de estrés abiótico como el calor, el agua o la salinidad (Shan et

al., 2011; Christou et al., 2013; Li et al., 2014). Sin embargo, hay muy poca información sobre el efecto de la aplicación de NaHS exógeno para fomentar la tolerancia al estrés por alcalinidad. Muchos trabajos muestran que el estrés por alcalinidad deprime el crecimiento y el rendimiento de las plantas (Zhang y Mu, 2009; Paz et al., 2014). En el estudio realizado en el capítulo 3, las plantas de *Brassica oleracea* sometidas a estrés por alcalinidad registraron un 64% menos de biomasa foliar (Fig. 1. Cap. 3). Esta disminución se mitigó después de la aplicación del NaHS, ya que la pérdida de biomasa en el tratamiento de alcalinidad + NaHS fue sólo del 30% con respecto al control (Fig. 1. Cap. 3). Tras observar que el fenotipo de las plantas “fortificadas” con la dosis “óptima” de NaHS (0.5 mM) toleraban las condiciones de estrés alcalino (con un 34 % menos de pérdida de biomasa) mejor que las que no fueron “fortificadas”, nos preguntamos si esto podría deberse a una mejora de la capacidad antioxidante de la planta inducida por H<sub>2</sub>S. Pregunta que justifica el estudio llevado a cabo en el capítulo 3.

En cuanto a los efectos del H<sub>2</sub>S sobre la respuesta antioxidante de *Brassica oleracea*, cabe destacar el papel de la enzima SOD que aunque disminuyó su actividad con respecto al control, aumentó un 65% cuando se añadió NaHS a las plantas en condiciones de alcalinidad, en comparación con el tratamiento alcalino sin NaHS (Tabla 1. Cap. 3). Según estos resultados, el NaHS aplicado redujo el contenido en O<sub>2</sub><sup>-</sup> en un 57% con respecto a las plantas en condiciones de alcalinidad y, por lo tanto, la mayor actividad de SOD después de la aplicación del NaHS desempeña un papel fundamental en la eliminación de esta ROS (Tabla 1. Cap. 3). Estos resultados concuerdan con los de Ali et al. (2014), quienes observaron que bajo el estrés por exceso de Pb la actividad

de SOD disminuyó y el  $O_2^{\cdot-}$  incrementó. Por último, cabe señalar que la disminución en el contenido de  $O_2^{\cdot-}$  después de la aplicación de NaHS se correlacionó directamente con el aumento de la biomasa de este tratamiento (Fig.1. Cap. 3).

Por otro lado, parte del  $O_2^{\cdot-}$  presente en las plantas se genera cuando la enzima LOX cataliza la reacción de oxidación de los ácidos grasos (Lynch y Thompson, 1984). En nuestro estudio, encontramos una mayor actividad LOX, que se correlacionó con el mayor contenido en MDA en condiciones de estrés alcalino con respecto al control (Fig. 2. Cap. 3). Sin embargo, después de aplicar 0,5 mM de NaHS, la actividad LOX y el contenido de MDA disminuyeron significativamente con respecto a las plantas sometidas a estrés alcalino (Fig. 2. Cap. 3). De hecho, otros investigadores también han observado una disminución del contenido de MDA en condiciones de estrés térmico en plantas de maíz cuando se aplicó un pretratamiento de 0,7 mM de NaHS (Li et al., 2014). Estos resultados parecen indicar que el  $H_2S$  podría desempeñar un papel importante tanto en la desintoxicación del ROS en condiciones de estrés alcalino, como en el mantenimiento de la integridad de las membranas celulares.

Uno de los compuestos más importantes para la desintoxicación de ROS es el GSH (Gill y Tuteja, 2010). A este respecto, en el capítulo 3 observamos que la actividad de la enzima  $\gamma$ -ECS, enzima limitante en el proceso de síntesis de GSH, experimentó un aumento en condiciones de alcalinidad tras la aplicación de NaHS (Tabla 2. Cap 3). Resultados similares han sido reportados por Shan et al. (2014), quienes después de aplicar 0,6 mM de NaHS a plantas de maíz sometidas a estrés por salinidad encontraron una mayor actividad de  $\gamma$ -ECS.

En el presente estudio, la actividad de  $\gamma$ -ECS aumentó en un 46% en el tratamiento de alcalino suplementado con NaHS con respecto al tratamiento alcalino. Sin embargo, ya que este aumento se reflejó en un mayor contenido en GSH total, este tratamiento mantuvo los niveles de GSH del tratamiento control (Tabla 3. Cap. 3). Por otro lado, la mayor actividad de  $\gamma$ -ECS se correlacionó con un aumento del 51% en el contenido de GSH reducido observado en el tratamiento de alcalinidad suplementado con NaHS con respecto al tratamiento alcalino (Tablas 2 y 3. Cap. 3). En este sentido, muchos trabajos muestran que la aplicación del  $H_2S$  en cualquiera de sus formas químicas ( $Na_2S$ , NaHS, GYY4137, AP97 y AP105) potencia el contenido reducido de GSH en las plantas y, por tanto, su capacidad antioxidante y su tolerancia a diferentes tipos de estrés como la salinidad, el estrés osmótico o el estrés de metales pesados (Hancock y Whiteman, 2014).

Por otra parte, cabe destacar que el contenido de GSSG en el tratamiento de alcalinidad fue mayor con un aumento del 60% con respecto al control. Sin embargo, el tratamiento de alcalinidad-NaSH no mostró diferencias significativas con respecto al control (Tabla 3. Cap. 3). En consecuencia, el cociente GSH/GSSG aumentó en un 78% después de aplicar NaHS a las plantas sometidas a estrés alcalino en comparación con las plantas sometidas a estrés alcalino sin NaHS (Tabla 3. Cap. 3). Shan et al. (2014) también observaron un aumento del cociente GSH/GSSG en las plantas de maíz después de los pretratamientos con 0.6 mM de NaHS en condiciones de salinidad, lo que sugiere que la aplicación de NaHS podría actuar para mantener el estado redox de la GSH en condiciones de estrés.

Por otro lado, la enzima APX dentro del ciclo AsA-GSH, juega un papel importante en la eliminación del ROS (Gill y Tuteja, 2010). De hecho, en este estudio, encontramos un aumento del 60% en la actividad de APX en el tratamiento de la alcalinidad, así como un aumento del 66% en el tratamiento de la alcalinidad-NaHS con respecto al control (Fig. 3. Cap. 3). Esto nos lleva a sospechar que uno de los principales mecanismos de desintoxicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la *Brassica oleracea* L. 'Bronco' podría ser un incremento de la actividad de la APX, y que la aplicación de NaHS (0,5 mM) promueve dicho incremento. Este agudo pico en la actividad APX podría explicar la disminución del contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se encuentra en los tratamientos de alcalinidad y alcalinidad + NaHS con respecto al control (Fig. 3, Tabla 1. Cap. 3). Estos resultados son coherentes con los reportados por otros autores que han observado una actividad más vigorosa de la APX después de aplicar el NaHS a plantas sometidas a diferentes tipos de estrés abiótico, acompañada de una mejora concomitante de la capacidad antioxidante en las especies estudiadas (Li et al., 2014; Shan et al., 2014; Ali et al. 2014).

Por lo argumentado anteriormente, concluimos, que la aplicación de 0,5 mM de NaHS incrementa la respuesta antioxidante a través de la inducción de los procesos involucrados en la homeostasis de GSH, reduciendo el efecto dañino de las ROS y mitigando significativamente la pérdida de biomasa causada por la alcalinidad. Por ello creemos que la aplicación de NaHS (0,5 mM) podría actuar como fortificante en plantas de *Brassica oleracea* L. cultivadas en suelos con alto contenido en sales alcalinas, aumentando su tolerancia a estas condiciones de estrés.

Por último, el capítulo 4 aborda el objetivo de profundizar en el conocimiento del mecanismo mediante el cual el H<sub>2</sub>S ejerce su efecto “fortificante”, para la consecución de este objetivo, decidimos realizar la estancia de tesis doctoral en el departamento de Plant Sciences de la Universidad de California, Davis, para dilucidar si este compuesto tenía la capacidad de alterar la expresión génica de aquellos genes considerados “targets” tras las conclusiones adquiridas en los dos primeros trabajos de la presente tesis (Cap. 1, 2 y 3).

El estudio fue realizado en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* L., especie perteneciente a la misma familia que *Brassica oleracea* L. (Brassicaceae). Por otra parte, es importante destacar que los genes seleccionados fueron aquellos que codifican para la síntesis de las enzimas esenciales en las vías de asimilación del N y el S, síntesis de compuestos antioxidantes fundamentales como el AsA y el GSH, así como, las enzimas que intervienen en el ciclo de detoxificación de ROS, ascorbato-glutatiión, genes que se encuentran altamente conservados ya que codifican para la síntesis de enzimas esenciales en el crecimiento, desarrollo y defensa de las plantas. (Li, et al. 2010).

Con el objetivo de discernir si la mejora de la tolerancia frente al estrés alcalino experimentada por las plantas de *Arabidopsis* mediante la aplicación de NaHS exógeno (Fig.1. Cap. 4), se debió a una mejora en el estado nutricional de la planta a través de una inducción de la expresión de las enzimas que intervienen en la asimilación del S, en el presente trabajo se midieron las expresiones relativas de los genes que codifican para las principales enzimas que intervienen en las rutas de asimilación del SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>.



Talukdar y Talukdar en 2013 observaron un incremento significativo de la expresión de las proteínas SAT (LcSAT1;1 y LcSAT1;2) y OAS TL, esenciales en el proceso de asimilación del sulfato, tras la aplicación de 10  $\mu$ M de As en plantas de lenteja (*Lens culinaris Medik*). Por lo que la sobreexpresión tanto de SAT como de OAS-TL tienen una gran importancia no solo en el estado nutricional del S y la calidad nutricional de plantas cultivables (Tabe et al. 2010), sino también en la modulación a nivel transcripcional para así aumentar los componentes de las cascadas de tioles en respuesta a diversos estreses abióticos (Liao et al. 2012). Sorprendentemente, en el presente estudio no se observaron diferencias en la expresión relativa de los genes que codifican para las isoenzimas Serat 1,1(SAT), OAS TL A1, OAS TL B, ATPS2, ATPS3, ATPS4 ni APR1, mientras que sí se observó una disminución significativa de la expresión relativa de los genes que codifican para las isoenzimas OAS TL C y ATPS 1, en el tratamiento Alk+HS con respecto al tratamiento Alk (Fig. 2a, 2b. Cap. 4). Esta disminución podría deberse a la aplicación exógena de una forma reducida de azufre como el NaHS que como producto de las reacciones catalizadas inhibe la expresión de éstas. Como afirman varios autores, la acumulación de formas reducidas de S como el sulfuro de hidrógeno, cisteína o GSH producen una inhibición de la asimilación de sulfato en las primeras etapas del proceso, inhibiendo la expresión y actividad de las enzimas OAS TL, ATPS Y APR (Lappartient et al., 1999; Kopriva y Koprivova, 2004). Por ello concluimos que la mejora de la tolerancia mediante la aplicación de NaHS observada en el tratamiento Alk+HS (Fig.1. Cap. 4), no se debe a un incremento en la expresión relativa de los genes que codifican las principales

enzimas que intervienen en la asimilación del azufre en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Como hemos mencionado anteriormente, otro de los “actores” principales en la respuesta antioxidante de las plantas es el ácido ascórbico (AsA). En el presente estudio se analizó la expresión de los genes que codifican las enzimas que intervienen en la síntesis de AsA y observamos que la única enzima que incrementa su expresión en el tratamiento Alk+HS con respecto al tratamiento AIK fue la enzima GDPME (Fig.3. Cap. 4). Es interesante destacar que la aplicación de sulfato en el tratamiento Alk+SO también incrementó la expresión de GDPME, sin embargo, no se correlaciona en este caso con la mitigación de la pérdida de biomasa observada tras la aplicación de NaHS en plantas sometidas a estrés alcalino (Fig. 1 Cap. 4). De hecho, Hou y colaboradores en 2015 observaron una correlación muy débil o incluso negativa entre la expresión de GDPME y el contenido en L-ascorbato en plantas de tomate. Por ello, la implicación de esta enzima en la síntesis de ascorbato podría no ser en algunos casos muy determinante. Por otro lado, estudios previos demuestran que la enzima L-GLDH es crucial para la síntesis de ascorbato afirmando que, entre los genes biosintéticos del AsA, existe una fuerte correlación positiva entre la expresión relativa de la GLDH y la cantidad de AsA total en plantas de tomate (Hou et al. 2015). En el presente estudio la enzima L-GDH muestra una inhibición significativa de su expresión en todos los tratamientos respecto al control (Fig.3. Cap. 4). Por ello concluimos que la tolerancia de las plantas de *Arabidopsis thaliana* observada tras aplicar NaHS a plantas sometidas a estrés alcalino no se correlacionan con un incremento en

la expresión de los genes que codifican las enzimas cruciales para la síntesis de ascorbato.

Un componente clave en la red de rutas antioxidantes es el tiol glutatión (GSH). El cual se sintetiza a partir de sus componentes aminoacídicos, L-Glu, L-Cis, y Gli, en una reacción catalizada en dos pasos por la enzima  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa  $\gamma$ -ECS (GSH1) y glutatión sintetasa (GSH2) respectivamente (Noctor et al. 2002). Sorprendentemente, en el estudio abordado por el capítulo 4, no se encontraron incrementos significativos entre las plantas control y las plantas sometidas a estrés alcalino en cuanto a la expresión relativa de las enzimas  $\gamma$ -ECS (GSH1), GSH2 y GPX7 esenciales para la síntesis de glutatión (Fig.4. Cap. 4). Sin embargo, si se produjo un incremento en la expresión de la isoenzima glutatión peroxidasa cloroplastidial GPX7 en el tratamiento Alk+HS comparado con el tratamiento Alk. Las diferentes isoenzimas GPXs son importantes para la eliminación de las ROS por su gran especificidad por el sustrato y su gran afinidad por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Brigelius-Flohe' y Flohe, 2003).

Estos mismos investigadores concluyeron que la expresión de AtGPX7 es importante para afinar el metabolismo celular de ROS, la fotosíntesis y la regulación de las respuestas de aclimatación e inmunodefensa frente a estrés abiótico. Por ello, el incremento en la expresión relativa de GPX 7 observado en el presente trabajo, podría estar relacionado con la tolerancia asociada al aporte de NaHS, sin embargo, observamos un incremento similar de la expresión de GPX7 tras la aplicación de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> a las plantas sometidas a estrés alcalino, de manera que la respuesta de incremento de la expresión de esta enzima no es una reacción específica frente al aporte de NaHS (Fig. 1 y Fig.4. Cap. 4). Por lo que concluimos que el incremento en la expresión de la enzima

GPX7 en el tratamiento Alk+HS con respecto al tratamiento Alk, tampoco supone un mecanismo específico a través del cual el sulfuro de hidrógeno otorga tolerancia frente a estrés alcalino en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

En los dos apartados anteriores abordamos la discusión sobre la síntesis de dos compuestos esenciales en la respuesta antioxidante de las plantas (AsA y GSH) y ahora discutiremos sobre su papel en el ciclo AsA-Glutatión, también conocido como ciclo de Halliwell Asada, el cual supone uno de los mecanismos más eficientes de eliminación de ROS en plantas (Liu et al., 2015).

Como observamos en el capítulo 4, las únicas isoenzimas del ciclo ascorbato-glutatión que experimentaron diferencias en su expresión relativa al comparar los tratamientos Alk y Alk+HS fueron las isoenzimas SOD 1 y SOD 2. Ambas isoenzimas sufrieron una disminución de la expresión relativa en el tratamiento Alk+HS con respecto al tratamiento Alk (Fig. 5a y 5b. Cap.4). La SOD es una de las enzimas clave en la tolerancia de las plantas frente al estrés, actuando en la primera línea de defensa frente al efecto tóxico de las especies de oxígeno reactivas (ROS), ya que esta enzima cataliza la reacción que dismuta el  $O_2^-$  en oxígeno molecular y  $H_2O_2$  (Gill Y Tuteja, 2010). La expresión de las diferentes isoenzimas SOD suele inducirse en plantas sometidas a diferentes tipos de estrés abiótico (Asgher et al. 2020), sin embargo en el presente estudio, la expresión relativa de las dos isoenzimas SOD 1 y SOD 2 analizadas, no experimentaron diferencias bajo condiciones de estrés alcalino con respecto al tratamiento control, es más, la adición de NaHS produjo una inhibición de la expresión de ambas isoenzimas cuando se aplicó este compuesto a plantas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a estrés alcalino (Alk+HS) (Fig.5a y 5b. Cap.4). Por otro lado, en el capítulo anterior (Cap.3)

observaron una disminución de la actividad SOD en plantas sometidas a estrés alcalino tras aplicar NaHS en plantas de *Brassica oleracea*, por lo que la disminución de la expresión relativa de SOD 1 y SOD 2 observada en *Arabidopsis thaliana*, especie perteneciente a la familia Brassicaceae al igual que *Brassica oleracea*, podría ser indicativa de una mejora del estado redox de las plantas que recibieron NaHS bajo condiciones de estrés alcalino. Por ello concluimos que el incremento de la tolerancia al estrés alcalino observado tras aplicar NaHS (Fig.1. Cap. 4) no se correlaciona con un incremento en la expresión de ninguna de las enzimas que intervienen en el ciclo ascorbato glutatión y, por tanto, no justifica la mejora de la tolerancia observada en el tratamiento Alk+SH con respecto al tratamiento Alk (Fig.1. Cap. 4).

Como hemos visto en los capítulos 1 y 2 de la presente tesis doctoral el H<sub>2</sub>S hizo aumentar la producción de compuestos antioxidantes como carotenoides, antocianinas, fenoles totales, flavonoles y glucosinolatos, junto con un aumento de biomasa en las dosis de 0,5 a 1 mM de NaHS (Cap.3). Unido a esto, también vimos como la aplicación de 0,5 mM de NaSH podría ser una estrategia beneficiosa para mejorar los procesos implicados en la asimilación del N, acompañada de un aumento de los aminoácidos esenciales y proteínas solubles (Cap. 2). A continuación, observamos en el capítulo 3, como estas mejoras fisiológicas y agronómicas conferían tolerancia frente a estrés alcalino en plantas de *Brassica oleracea* tras aplicar la dosis definida como “optima” (0.5 mM). Por último, el estudio molecular de la expresión relativa de los genes considerados como “targets” por su implicación en las rutas metabólicas de nutrición y defensa de la planta *Arabidopsis thaliana*, planta de la familia Brassicaceae al igual que nuestra planta objeto de estudio *Brassica oleracea*,

nos permite hipotetizar que el efecto del H<sub>2</sub>S en la tolerancia al estrés alcalino, parece no estar relacionado con un incremento en la expresión de las enzimas objeto de estudio. Dicho de otro modo y aunque no deja de ser una mera hipótesis pendiente de confirmarse, no parece que la aplicación de NaHS ejerza su efecto potenciador de la tolerancia frente a estrés alcalino a través de ejercer una influencia directa en la transcripción de los considerados genes fundamentales que intervienen en la defensa de la planta. A la luz de los resultados alcanzados en la presente tesis, así como la aportada por otros autores, nuevas hipótesis sobre el mecanismo de actuación de esta sorprendente molécula se van abriendo paso y aunque los mecanismos subyacentes de la acción del H<sub>2</sub>S siguen siendo poco conocidos, a día de hoy, se ha aceptado ampliamente que un gran número de los procesos controlados por el H<sub>2</sub>S son causados por una modificación postraducciona de los residuos de cisteína llamada persulfidación (Filipovic et al. 2015; Mustafa et al. 2011; Nishida et al. 2012). La persulfidación o la también llamada persulfuración de proteínas es una modificación oxidativa postraducciona de los residuos de cisteína causada por el H<sub>2</sub>S, en la que un grupo tiol (-SH) se transforma en un grupo persulfuro (-SSH). Las especies de azufre sulfúrico, los persulfuros y los polisulfuros son más nucleófilos que el H<sub>2</sub>S y, por lo tanto, más reactivos en la persulfidación (Toohey, 2011). Debido a la inestabilidad intrínseca de los persulfuros y a su mayor reactividad que los tioles, los persulfuros proteínicos siguen estando poco estudiados. No obstante, en el último decenio, el estudio de esta modificación de la proteína ha cobrado mayor relevancia para los investigadores porque puede afectar a la función de la proteína, la localización dentro de las células, la estabilidad y la resistencia al estrés oxidativo (Paul y

Snyder, 2012; Aroca et al. 2015; Aroca et al 2017; Kimura et al 2012; Mustafa et al. 2009). La amplia importancia fisiológica de la persulfidación sólo ha empezado a surgir recientemente; un análisis proteómico reveló que aproximadamente entre el 10 y el 25% de las proteínas hepáticas contienen esta modificación (Paul y Snyder, 2012), y al menos el 5-10% de todo el proteoma puede ser objeto de persulfuración en plantas (Aroca et al . En los últimos años se han desarrollado varios métodos de detección basados en la característica nucleofílica de los grupos persulfuros. Por el contrario, debido a su inestabilidad y similitud con los grupos tioles, el desarrollo de un método específico para la detección de persulfuros se ha convertido en un reto. Esos métodos de detección se han examinado recientemente, y se han dado nuevas explicaciones sobre las reacciones y los procedimientos (Cuevasanta et al. 2017; Aroca et al. 2018; Filipovic et al. 2018). Con esos métodos, los investigadores han podido descifrar el mecanismo de acción del H<sub>2</sub>S mediante la persulfidación en varias enfermedades, como el cáncer, las enfermedades de degeneración neuronal o la lesión por isquemia-reperfusión. En mamíferos, el mecanismo de acción del H<sub>2</sub>S ha sido profundamente estudiado desde 2009, cuando Mustafa y colaboradores, describieron este nuevo mecanismo de modificación de proteínas (Mustafa et al. 2019). En cambio, la persulfidación en el sistema vegetal se ha descrito más recientemente (Aroca et al. 2015), pero se ha demostrado que un mayor número de proteínas sufren esta modificación en plantas (Aroca et al. 2017). Se encontró que un total de 3.147 proteínas se persulfuraban en las hojas de Arabidopsis en condiciones fisiológicas normales, lo que sugiere que este número podría ser mucho mayor en ciertas condiciones de estrés (Aroca et al. 2017). Estas proteínas participan

principalmente en importantes vías biológicas, como el ciclo del ácido tricarbóxico, la glucólisis, el ciclo de Calvin, la fotorrespiración y la autofagia. Es necesario realizar más estudios fisiológicos de estas proteínas para descifrar el papel de la persulfuración en estas vías biológicas. No obstante, los estudios iniciales en plantas demostraron que la persulfidación regula la actividad enzimática de la glutamina sintetasa cloroplástica (GS2), la ascorbato peroxidasa citosólica (APX1) y la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa citosólica (GapC1) [60]. La persulfidación regula la localización citosólica/nuclear de la GapC1, permitiéndole actuar probablemente como factor de transcripción (Aroca et al. 2017). El citoesqueleto de actina y el crecimiento de pelos radicales se regulan también mediante la persulfidación. Además, la biosíntesis del etileno se regula mediante la persulfidación de la oxidasa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACO1) en el tomate (Jia et al. 2018). Recientemente, un estudio del proteoma peroxisomal en *Arabidopsis* reveló que la interacción entre diferentes PTMs (modificaciones postraduccionales), como la s-nitrosación, la nitración, la persulfidación y la acetilación, regula la señalización redox para proteger las proteínas contra el daño oxidativo (Sandalio et al. 2019). Desde un punto de vista evolutivo, es razonable suponer que las bacterias purpuras y verdes del S, al vivir en una atmósfera rica en H<sub>2</sub>S, desarrollaron procesos de señalización mediados por H<sub>2</sub>S para resistir el estrés oxidativo. De manera similar a como el peróxido (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) produce las ROS, el persulfuro (H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>) produce RSS (especies de sulfuro reactivo), pero con la diferencia de que el persulfuro puede ser producido por varias moléculas de azufre (S<sub>x</sub>) y además estos pueden ser almacenados (Orson, 2019).



Esta hipótesis se describió en un estudio reciente, en el que una evaluación proteómica de *Estafilococcus aureus* mostró que muchas proteínas reguladas por la persulfidación estaban involucradas en el metabolismo de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) en respuesta al estrés y que la virulencia bacteriana estaba regulada por la persulfidación del regulador transcripcional tipo HTH MgrA, un regulador de virulencia global (Peng et al. 2017).

Todos estos datos sugieren que la persulfidación es un mecanismo conservado de señalización del H<sub>2</sub>S en todos los reinos de la vida.

### 3.1 Bibliografía

Ali, B., Gill, R.A., Yang, S., Gill, M.B., Ali, S., Rafiq, M.T., Zhou, W., 2014. Hydrogen sulfide alleviates cadmium-induced morpho-physiological and ultrastructural changes in *Brassica napus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 110, 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.08.027>

Aroca, A., Gotor, C., Romero, L.C., 2018. Hydrogen Sulfide Signaling in Plants: Emerging Roles of Protein Persulfidation. *Front Plant Sci* 9, 1369. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01369>

Aroca, A., Schneider, M., Scheibe, R., Gotor, C., Romero, L.C., 2017. Hydrogen Sulfide Regulates the Cytosolic/Nuclear Partitioning of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase by Enhancing its Nuclear Localization. *Plant Cell Physiol* 58, 983–992. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx056>

Aroca, Á., Serna, A., Gotor, C., Romero, L.C., 2015. S-Sulfhydration: A Cysteine Posttranslational Modification in Plant Systems. *Plant Physiology* 168, 334–342. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00009>

Asgher, M., Ahmed, S., Sehar, Z., Gautam, H., Gandhi, S.G., Khan, N.A., 2021. Hydrogen peroxide modulates activity and expression of antioxidant enzymes and protects photosynthetic activity from arsenic damage in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Hazardous Materials* 401, 123365. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123365>

Beauchamp, R.O., Bus, J.S., Popp, J.A., Boreiko, C.J., Andjelkovich, D.A., 1984. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Crit Rev Toxicol* 13, 25–97. <https://doi.org/10.3109/10408448409029321>

Brigelius-Flohé, R., Flohé, L., 2003. Is there a role of glutathione peroxidases in signaling and differentiation? *Biofactors* 17, 93–102. <https://doi.org/10.1002/biof.5520170110>

Cuevasanta, E., Möller, M.N., Alvarez, B., 2017. Biological chemistry of hydrogen sulfide and persulfides. *Archives of Biochemistry and Biophysics, The Chemistry of Redox Signaling* 617, 9–25. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.09.018>

Dawood, M., Cao, F., Jahangir, M.M., Zhang, G., Wu, F., 2012. Alleviation of aluminum toxicity by hydrogen sulfide is related to elevated ATPase, and suppressed aluminum uptake and oxidative stress in barley. *Journal of Hazardous Materials* 209–210, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.12.076>

Filipovic, M.R., 2015. Persulfidation (S-sulfhydration) and H<sub>2</sub>S, in: Moore, P.K., Whiteman, M. (Eds.), Chemistry, Biochemistry and Pharmacology of Hydrogen Sulfide, Handbook of Experimental Pharmacology. Springer International Publishing, Cham, pp. 29–59. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-18144-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-18144-8_2)

Gadalla, M.M., Snyder, S.H., 2010. Hydrogen Sulfide as a Gasotransmitter. *J Neurochem* 113, 14–26. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06580.x>

Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>

Hou, X., Feng, L., Liu, G., Saeed, D.A., Li, H., Zhang, Y., Ye, Z., 2015. The influence of growth media pH on ascorbic acid accumulation and biosynthetic gene expression in tomato. *Scientia Horticulturae* 197, 637–643. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.031>

Hu, H., Shen, W., Li, P., 2014. Effects of hydrogen sulphide on quality and antioxidant capacity of mulberry fruit. *International Journal of Food Science & Technology* 49, 399–409. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12313>

Jia, H., Chen, S., Liu, D., Liesche, J., Shi, C., Wang, J., Ren, M., Wang, X., Yang, J., Shi, W., Li, J., 2018. Ethylene-Induced Hydrogen Sulfide Negatively Regulates Ethylene Biosynthesis by Persulfidation of ACO in Tomato Under Osmotic Stress. *Front. Plant Sci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01517>

Koch, M.S., Erskine, J.M., 2001. Sulfide as a phytotoxin to the tropical seagrass *Thalassia testudinum*: interactions with light, salinity and temperature. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 266, 81–95. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(01\)00339-2](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00339-2)

Kopriva, S., Koprivova, A., 2004. Plant adenosine 5'-phosphosulphate reductase: the past, the present, and the future. *J Exp Bot* 55, 1775–1783. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh185>

Lamers, L.P.M., Govers, L.L., Janssen, I.C., Geurts, J.J., Van der Welle, M.E., Van Katwijk, M.M., Van der Heide, T., Roelofs, J.G., Smolders, A.J., 2013. Sulfide as a soil phytotoxin—a review. *Front. Plant Sci.* 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00268>

Lappartient, A.G., Vidmar, J.J., Leustek, T., Glass, A.D.M., Touraine, B., 1999. Inter-organ signaling in plants: regulation of ATP sulfurylase and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound. *The Plant Journal* 18, 89–95. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00416.x>

Li, J., Chen, S., Wang, X., Shi, C., Liu, H., Yang, J., Shi, W., Guo, J., Jia, H., 2018. Hydrogen Sulfide Disturbs Actin Polymerization via S-Sulfhydration Resulting in Stunted Root Hair Growth. *Plant Physiology* 178, 936–949. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00838>

Liao, D., Pajak, A., Karcz, S.R., Chapman, B.P., Sharpe, A.G., Austin, R.S., Datla, R., Dhaubhadel, S., Marsolais, F., 2012. Transcripts of sulphur metabolic genes are co-ordinately regulated in developing seeds of common

bean lacking phaseolin and major lectins. *J Exp Bot* 63, 6283–6295.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/ers280>

Liu, N., Jin, Z., Wang, S., Gong, B., Wen, D., Wang, X., Wei, M., Shi, Q., 2015. Sodic alkaline stress mitigation with exogenous melatonin involves reactive oxygen metabolism and ion homeostasis in tomato. *Scientia Horticulturae* 181, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.10.049>

Mustafa, A.K., Gadalla, M.M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S.K., Barrow, R.K., Yang, G., Wang, R., Snyder, S.H., 2009a. H<sub>2</sub>S Signals Through Protein S-Sulfhydration. *Sci. Signal.* 2, ra72–ra72.  
<https://doi.org/10.1126/scisignal.2000464>

Mustafa, A.K., Gadalla, M.M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S.K., Barrow, R.K., Yang, G., Wang, R., Snyder, S.H., 2009b. H<sub>2</sub>S signals through protein S-sulfhydration. *Sci Signal* 2, ra72. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000464>

Mustafa Asif K., Sikka Gautam, Gazi Sadia K., Steppan Jochen, Jung Sung M., Bhunia Anil K., Barodka Viachaslau M., Gazi Farah K., Barrow Roxanne K., Wang Rui, Amzel L. Mario, Berkowitz Dan E., Snyder Solomon H., 2011. Hydrogen Sulfide as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Sulfhydrates Potassium Channels. *Circulation Research* 109, 1259–1268.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.240242>

Nakamura, M., Kuramata, M., Kasugai, I., Abe, M., Youssefian, S., 2008. Increased thiol biosynthesis of transgenic poplar expressing a wheat O-acetylserine(thiol) lyase enhances resistance to hydrogen sulfide and sulfur dioxide toxicity. *Plant Cell Rep* 28, 313. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0635-5>

Nishida, M., Sawa, T., Kitajima, N., Ono, K., Inoue, H., Ihara, H., Motohashi, H., Yamamoto, M., Suematsu, M., Kurose, H., van der Vliet, A., Freeman, B.A., Shibata, T., Uchida, K., Kumagai, Y., Akaike, T., 2012. Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. *Nature Chemical Biology* 8, 714–724. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1018>

Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., Foyer, C.H., 2002. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J Exp Bot* 53, 1283–1304. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1283>

Oliveira, I.C., Brenner, E., Chiu, J., Hsieh, M.-H., Kouranov, A., Lam, H.-M., Shin, M.J., Coruzzi, G., 2001. Metabolite and light regulation of metabolism in plants: lessons from the study of a single biochemical pathway. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34, 567–575. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2001000500003>

Olson, K.R., 2019. Hydrogen sulfide, reactive sulfur species and coping with reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine, Early Life on Earth and Oxidative Stress* 140, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.020>

Paul, B.D., Snyder, S.H., 2012. H<sub>2</sub>S signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 499–507. <https://doi.org/10.1038/nrm3391>

Peng, H., Zhang, Y., Palmer, L.D., Kehl-Fie, T.E., Skaar, E.P., Trinidad, J.C., Giedroc, D.P., 2017. Hydrogen Sulfide and Reactive Sulfur Species Impact Proteome S-Sulfhydration and Global Virulence Regulation in

Staphylococcus aureus. ACS Infect. Dis. 3, 744–755.  
<https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00090>

Sandalio, L.M., Gotor, C., Romero, L.C., Romero-Puertas, M.C., 2019. Multilevel Regulation of Peroxisomal Proteome by Post-Translational Modifications. International Journal of Molecular Sciences 20, 4881.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20194881>

Scherer, H.W., 2008. Impact of Sulfur on N<sub>2</sub> Fixation of Legumes, in: Khan, N.A., Singh, S., Umar, S. (Eds.), Sulfur Assimilation and Abiotic Stress in Plants. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 43–54. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-76326-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-540-76326-0_3)

Tabé, L., Wirtz, M., Molvig, L., Droux, M., Hell, R., 2010. Overexpression of serine acetyltransferase produced large increases in O-acetylserine and free cysteine in developing seeds of a grain legume. J Exp Bot 61, 721–733.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erp338>

Thompson, C., Kats, G., Lennox, R., 1979. Effects of fumigating crops with hydrogen sulfide or sulfur dioxide. Hilgardia 33, 9–10.

Thompson, C.R., Kats, G., 1978. Effects of continuous H<sub>2</sub>S [hydrogen sulfide] fumigation on crop and forest plants [Injuries]. Environmental Science and Technology (USA).

Toohey, J.I., 2011. Sulfur signaling: is the agent sulfide or sulfane? Anal Biochem 413, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.01.044>

## CONCLUSIONES/CONCLUSIONS





## 4 Conclusiones

1. El efecto de la aplicación de NaHS en las plantas de *Brassica oleracea* L. 'Bronco' es dosis dependiente, ya que la aplicación en el rango de 0,5 a 1 mM de NaHS aumenta la producción de compuestos antioxidantes como carotenoides, antocianinas, fenoles totales, flavonoles y glucosinolatos. Esto acompañado de un incremento de la biomasa nos permite definir este rango de concentración como 'óptimo' para mejorar el rendimiento y la calidad nutricional de la *Brassica oleracea* L. 'Bronco'.
2. La aplicación de dosis elevadas de NaHS ( $\geq 2,5$  mM de NaHS) podría considerarse como 'tóxica' ya que promueve la generación de un exceso de peroxidación lipídica, disminución de la biomasa de la parte aérea, pérdidas de clorofila y reducción de compuestos bioactivos como son los compuestos fenólicos y glucosinolatos, reduciéndose así la calidad nutricional y fitoquímica
3. La aplicación de 0,5 mM de NaSH podría ser una estrategia beneficiosa para mejorar los procesos implicados en la asimilación del N, que se traduce en un aumento del contenido en aminoácidos esenciales y proteínas solubles, incrementando la producción de biomasa de los cultivos de *Brassica oleracea* L. 'Bronco'. Por otro lado, la acumulación excesiva de  $\text{NH}_4^+$  podría ser responsable de la disminución de biomasa observada tras aplicar 2,5 y 5 mM de NaSH en esta especie.

4. Bajo condiciones de estrés alcalino, la aplicación de 0,5 mM de NaHS aumentó la respuesta antioxidante a través de la inducción de los procesos involucrados en la homeostasis de GSH, reduciendo el efecto dañino de las ROS y mitigando significativamente la pérdida de biomasa causada por la alcalinidad. Por ello, la aplicación de una dosis de 0,5 mM de NaHS podría actuar como fortificante en plantas de *Brassica oleracea* L. 'Bronco' cultivadas en suelos con un alto contenido en sales alcalinas, aumentando su tolerancia a estas condiciones de estrés.
5. Por otro lado, podemos concluir que la aplicación de 50  $\mu$ M de NaHS incrementó la tolerancia de las plantas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a estrés alcalino. Este incremento en la tolerancia, no se correlacionó con el incremento en la expresión relativa de ninguno de los genes que codifican para la biosíntesis de las principales enzimas implicadas en las vías de asimilación del S y la respuesta antioxidante, como la síntesis de ascorbato, la síntesis de glutatión y el ciclo ascorbato-glutatión. Por lo que parece que en el mecanismo que subyace al efecto fortificante aportado por el H<sub>2</sub>S bajo condiciones de estrés alcalino, no media una activación de la transcripción de los genes implicados en la asimilación del S y la respuesta antioxidante.

## 5 Conclusions

1. The effect of the application of NaHS in *Brassica oleracea* L. 'Bronco' plants is dose-dependent, given that production of antioxidant compounds such as carotenoids, anthocyanins, total phenols, flavonols

and glucosinolates increases within the margins of application ranging from 0,5 to 1 mM of NaHS. This allows us, along with an increase in biomass, to define this range of concentration as 'optimal' to improve yield and nutritional quality of *Brassica oleracea* L. 'Bronco'.

2. The application of high dose of NaHS ( $\geq 2,5$  mM of NaHS) may be considered 'toxic', as it promotes the generation of an excess of lipid peroxidation, decrease in shoot biomass, loss of chlorophyll and fall in bioactive compounds, such as phenolic compounds and glucosinolates good for nutritional quality and phytochemistry.
  
3. The application of 0,5 mM of NaHS could be a profitable strategy to improve the processes involved in N assimilation, which translates into an increase in the content of essential amino acid and soluble proteins, increasing the production of crop biomass of *Brassica oleracea* L. 'Bronco'. On the other hand, the excessive accumulation of  $\text{NH}_4^+$  could be responsible for the decrease in biomass observed after applying 2.5 and 5 mM of NaSH in this species.
  
4. Under alkaline stress conditions, the application of 0,5 mM of NaHS increased the antioxidant response through the induction of the processes involved in GSH homeostasis, reducing the damaging effect of ROS and significantly mitigating the loss of biomass caused by alkalinity.

Therefore, the application of 0,5 mM dose of NaHS could act as a fortifier in *Brassica oleracea* L. 'Bronco' plants cultivated in soils with a high content of alkaline salts, increasing their tolerance to these kinds of stress conditions.

5. On the other hand, we can conclude that the application of 50  $\mu$ M of NaHS increased the tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants subjected to alkaline stress. This increase in tolerance was not correlated with the increase in the relative expression of any genes that code for the biosynthesis of the main enzymes involved in the S assimilation pathways and the antioxidant response, such as the synthesis of ascorbate, the glutathione synthesis and the ascorbate-glutathione cycle. Therefore, it appears that the mechanism underlying the fortifying effect provided by H<sub>2</sub>S under alkaline stress conditions, does not mediate an activation of the transcription of the genes involved in the assimilation of S and the antioxidant response.