

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estrés oxidativo y otras respuestas fisiológicas inducidas
por alpeorajo transformado por hongos
saprobios en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)**

Memoria que presenta la Licenciada en Biología
Mercedes García Sánchez
para aspirar al grado de Doctor

Fdo. Mercedes García Sánchez

VºBº
El Director

VºBº
El Director

Fdo. Inmaculada García Romera
Doctora en Ciencias Biológicas
Investigador Científico del CSIC

Fdo. Elisabet Aranda Ballesteros
Doctora en Biología
Contratada Doctor

Granada, 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Mercedes García Sánchez
D.L.: GR 47-2013
ISBN: 978-84-9028-018-8



**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN**

**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS**

**Estrés oxidativo y otras respuestas fisiológicas inducidas
por alpeorujo transformado por hongos
saprobios en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)**

Mercedes García Sánchez

**TESIS DOCTORAL
2011**

El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Grupo de Microorganismos rizosféricos que promueven el crecimiento y desarrollo vegetal del Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, con la ayuda de una beca del programa de Itinerario Integrado de Inserción Profesional del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (I3P, CSIC, 2007). Durante el periodo de disfrute de dicha beca se realizaron dos estancias breves, financiadas por el CSIC, en la Universidad de Extremadura (España) en el Departamento de Biología Vegetal, Ecología y CC. de la Tierra bajo la dirección del Dr. Francisco Espinosa Borreguero y en la Universidad de Bari (Italia) en el Departamento de Biología y Patología Vegetal bajo la dirección de la Dra. Laura De Gara y M^a Concetta de Pinto.

Parte de los resultados presentados en esta tesis Doctoral han sido publicados en las siguientes revistas internacionales:

Sampedro, I., Aranda, E., Díaz, R., **García-Sánchez, M.**, Ocampo, J.A., García-Romera, I. 2008. Saprobe fungi decreased the sensitivity to the toxic effect of dry olive mill residue on arbuscular mycorrhizal plants. *Chemosphere* 70: 1383-1389.

Aranda, E., Sampedro, I., Díaz, R., **García-Sánchez, M.**, Ocampo, J.A., García-Romera, I. Transformación de residuos procedentes del olivo mediante cepas fúngicas. "Tópicos sobre diversidad y biotecnología de hongos microscópicos". (Ed. G. Heredia), CYTED, Universidad de Xalapa, México. pp. 299-317, 2008.

Aranda, E., Sampedro, I., Díaz, R., **García-Sánchez, M.**, Arriagada, C.A., Ocampo, J.A., García-Romera, I. 2009. The effects of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus deserticola* on growth of tomato plants grown in the presence of olive mill residues modified by treatment with saprophytic fungi. *Symbiosis* 47: 133-140.

Garrido, I., **García-Sánchez, M.**, Casimiro, I., Casero, P.J., García-Romera, I., Ocampo, J.A. (2011). Effects of aqueous dry olive-mill residue on oxidative activities in axenic sunflower seedling roots. *J. of Plant Physiology* (Enviado a publicar).

García-Sánchez, M., Paradiso, A., De Gara, L., García-Romera, I., Ocampo, J.A., de Pinto, M.C. (2011). Effects of aqueous extract from Dry Olive Residue (ADOR) on the physiology of tomato plants: Oxidative stress and changes in the antioxidants systems (En elaboración).

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

- XIII Simposium Científico-Técnico de EXPOLIVA (Jaén, Mayo de 2007).
- International Conference of new technologies for the treatment and valorization of agro by-products (Terni, Octubre de 2007).
- COST meeting 870: New scientific perspectives and technological approaches for mycorrhizal application (Calella, Marzo de 2009).
- XVIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (SEFV). (Zaragoza, Septiembre de 2009).
- I Congreso Tecnológico del tomate para industria. (Badajoz, Noviembre de 2009).
- XVII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB). (Valencia, Julio de 2010).
- II Congress of Società Italiana di Biologia Vegetale. (Roma, Julio de 2010).

INTERÉS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO	3
INTRODUCCIÓN.....	7
1. Agricultura sostenible	7
1.1. Uso de residuos orgánicos como enmendantes.....	8
1.2. Microorganismos en la agricultura sostenible.....	9
1.2.1. Hongos formadores de micorrizas	9
1.2.2. Micorrizas y estrés	10
2. Residuos del olivar: “alpeorujó”.....	12
2.1. Origen	14
2.2. Composición y características agroquímicas del alpeorujó.....	16
2.3. Problemática medioambiental del alpeorujó.....	18
2.4. Valorización del alpeorujó.....	19
2.4.1. Hongos saprobios en biorremediación.....	20
<i>Hongos saprobios de la madera.....</i>	<i>21</i>
<i>Hongos saprobios del suelo.....</i>	<i>22</i>
2.4.2. Biorremediación del alpeorujó con hongos.....	23
3. Estrés oxidativo y metabolismo antioxidante.....	24
3.1. Especies reactivas del oxígeno (ROS).....	24
3.2. Sistemas antioxidantes en las células vegetales.....	24
3.2.1. Antioxidantes enzimáticos	25
<i>Superóxido dismutasa.....</i>	<i>25</i>
<i>Catalasa.....</i>	<i>26</i>
<i>Peroxidasa.....</i>	<i>27</i>
<i>Ascorbato peroxidasa.....</i>	<i>27</i>
<i>Monodehidroascorbato reductasa.....</i>	<i>27</i>
<i>Dehidroascorbato reductasa.....</i>	<i>28</i>
<i>Glutación reductasa.....</i>	<i>29</i>
<i>Glutation-S-transferasa.....</i>	<i>29</i>
3.2.2. Antioxidantes no enzimáticos.....	30
<i>Ascorbato.....</i>	<i>30</i>
<i>Glutation.....</i>	<i>31</i>
<i>Fenoles.....</i>	<i>31</i>
<i>Carotenoides.....</i>	<i>31</i>
4. Papel de los compuestos fenólicos en las plantas.....	33
4.1. Fenoles en la fisiología de las plantas.....	37
4.2. ROS y los compuestos fenólicos.....	37

Índice

MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
1. Alpeorujó seco y extractado.....	37
1.1. Características del alpeorujó.....	37
1.2. Extracción acuosa del alpeorujó.....	37
2. Hongos saprobios.....	38
2.1. Tipos y características de los hongos saprobios utilizados	38
2.2. Medios y condiciones de cultivo de los hongos saprobios.....	39
3. Hongos arbusculares	39
4. Transformación del extracto acuoso de alpeorujó por hongos saprobios.....	40
4.1. Obtención de inóculos	40
4.2. Medios y condiciones para la transformación del extracto acuoso de alpeorujó.....	40
4.3. Determinación de los compuestos fenólicos del extracto acuoso de alpeorujó transformado por hongos saprobios.....	41
4.3.1. Cuantificación de fenoles.....	41
4.3.2. Determinación cualitativa y cuantitativa de los fenoles simples del extracto acuoso de alpeorujó transformado por hongos saprobios.....	42
4.4. Determinaciones enzimáticas del extracto acuoso de alpeorujó.....	44
4.4.1. Actividades ligninolíticas	44
<i>Lacasa</i>	44
<i>Manganeso peroxidasa</i>	45
<i>Lignina peroxidasa</i>	45
4.4.2. Actividades hidrolíticas.....	46
5. Efecto del extracto acuoso de alpeorujó transformado por hongos saprobios en la germinación de semillas de tomate.....	47
6. Efecto del extracto acuoso de alpeorujó transformado por hongos saprobios en el crecimiento de plantas de tomate.....	49
6.1. Cultivo en macetas	49
6.2. Tinción y cuantificación de las micorrizas en raíces.....	52
7. Determinaciones fisiológicas.....	53
7.1. Porcentaje de germinación e índice de germinabilidad.....	53
7.2. Biomasa.....	53
7.3. Crecimiento relativo.....	54
7.4. Contenido hídrico relativo.....	54
7.5. Eficiencia fotosintética.....	54
7.6. Análisis morfológico de la raíz.....	55

7.7. Detección histoquímica del $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2	55
8. Determinación de actividades enzimáticas.....	56
8.1. Obtención de extractos enzimáticos.....	56
8.2. Superóxido dismutasa.....	57
8.2.1. Actividad total.....	57
8.2.2. Actividad isoenzimática.....	58
8.2. Catalasa.....	58
8.3. Ascorbato peroxidasa.....	58
8.4. Glutation reductasa.....	59
8.5. Dehidroascorbato reductasa.....	59
8.6. Monodehidroascorbato reductasa.....	59
8.7. Glutación-S-transferasa.....	60
8.8. Peroxidasas.....	60
9. Otras determinaciones bioquímicas.....	61
9.1. Peroxidación lipídica (MDA).....	61
9.2. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).....	62
9.3. Actividad antioxidante total: Test FRAP, DPPH y TEAC.....	62
9.4. Contenido de ascorbato y glutation.....	63
9.5. Clorofilas y carotenoides.....	65
9.6. Determinación de fenoles.....	65
9.7. Lignina.....	66
9.8. Determinación de proteínas totales.....	66
10. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas (EPGA).....	67
10.1. Detección de actividades isoenzimáticas de SOD.....	67
11. Análisis estadístico	68
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	73
I. Transformación del alpeorujó por hongos saprobios.....	73
Objetivo.....	73
Metodología.....	73
Resultados.....	74
Cultivo de hongos saprobios en medio MB.....	74
Actividad ligninolítica.....	74
Cultivo de hongos saprobios en ADOR.....	65
Actividades ligninolíticas e hidrolíticas.....	75
Contenido fenólico.....	75

Índice

Discusión.....	77
II. Germinación de semillas en presencia de extracto acuoso.....	82
1. Efecto del ADOR sobre la germinación de las semillas de tomate.....	91
Objetivo	91
Metodología.....	91
Resultados.....	92
2. Respuesta oxidativa inducida por el extracto acuoso de alpeorujó en la germinación de las semillas de tomate.....	93
Objetivo.....	93
Metodología.....	93
Resultados.....	94
2.1. Germinación.....	94
2.2. Contenido en MDA.....	95
2.3. Determinación “in vivo” del O ²⁻ y H ₂ O ₂ por microscopía de fluorescencia.....	95
2.4. Enzimas antioxidantes.....	97
2.5. Contenido en fenoles totales y actividad peroxidasa.....	99
2.6. Antioxidantes totales.....	100
Discusión.....	101
III. Efecto de la aplicación del extracto acuoso de alpeorujó en la fisiología de plantas de tomate.....	113
1. Análisis de la fitotoxicidad del ADOR en plantas de tomate.....	113
Objetivo.....	113
Metodología.....	113
Resultados.....	114
2. Respuestas fisiológicas inducidas en plantas de tomate cultivadas en presencia del ADOR.....	115
Objetivo.....	115
Metodología.....	116
Resultados.....	116
2.1. Parámetros fisiológicos.....	116
2.1.1 Análisis del crecimiento.....	116
2.1.2. Análisis morfológico de la raíz de tomate.....	118
2.1.3. Contenido hídrico.....	121
2.1.4. Eficiencia fotosintética.....	122
2.1.5. Clorofilas y carotenoides.....	123

2.2. Marcadores de estrés oxidativo.....	125
2.3. Respuesta antioxidante.....	127
2.3.1. Enzimas antioxidantes.....	127
2.3.2. Antioxidantes totales.....	133
2.3.3. Ascorbato y glutatión.....	134
2.4. Parámetros de lignificación.....	138
2.4.1. Contenido en lignina y fenoles totales.....	138
2.4.2. Actividad peroxidasa.....	140
Discusión.....	143
IV. Papel de las micorrizas sobre la fisiología de las plantas de tomate expuestas al extracto acuoso de alpeorujó.....	159
Objetivo.....	159
Metodología.....	159
Resultados.....	160
1. Parámetros fisiológicos.....	160
1.1. Análisis del crecimiento.....	160
1.2. Contenido hídrico.....	161
1.3. Eficiencia fotosintética.....	162
1.4. Micorrización.....	163
2. Marcadores de estrés oxidativo.....	164
3. Respuesta antioxidante.....	166
3.1. Enzimas antioxidantes.....	166
Discusión.....	171
DISCUSIÓN GENERAL.....	179
CONCLUSIONES.....	197
BIBLIOGRAFÍA.....	201
GLOSARIO.....	229

Interés y objetivos generales

INTERÉS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

El desarrollo de prácticas agrícolas intensivas durante las últimas décadas y el uso de fertilizantes químicos han favorecido el incremento en la producción y rendimiento de los cultivos. Sin embargo, la explotación intensiva de los suelos ha desencadenado la pérdida masiva de su materia orgánica dando lugar a procesos de erosión y desertificación, principalmente en la cuenca del Mediterráneo. Por este motivo, se ha hecho necesaria la búsqueda de nuevas alternativas como la agricultura sostenible, cuyo objetivo principal es la conservación de las características naturales del suelo evitando su degradación mediante el uso de microorganismos que promuevan el crecimiento y desarrollo vegetal, que confieran resistencia frente a factores ambientales adversos o que participen en el ciclado de nutrientes. Además, se pretende reducir el uso de fertilizantes químicos fomentando el uso de enmiendas o fertilizantes orgánicos derivados de prácticas agrícolas y/o industriales que supongan una forma de aportar la materia orgánica necesaria para los suelos. Por esta razón, el uso del residuo que se genera tras la extracción de aceite de oliva denominado alpeorujos como fertilizante orgánico, supondría una estrategia efectiva para la conservación de los suelos y con ello la sostenibilidad del sistema agrícola. Sin embargo, este residuo posee un elevado poder tóxico para el suelo y los cultivos vegetales, por lo que no se puede aplicar directamente, ya que supone un grave problema medioambiental. Por ello se han desarrollado métodos y estrategias de valorización del alpeorujos mediante tratamientos biológicos con hongos saprobios, los cuales poseen la maquinaria enzimática idónea para degradar sustancias de naturaleza muy diversa, y entre ellos, los compuestos fenólicos, que son los principales responsables de la toxicidad del residuo en las plantas y en la microbiota del suelo. Sin embargo, estos sistemas de valorización del alpeorujos requieren de periodos largos de incubación con los hongos, por lo que se ha propuesto métodos combinados mediante fraccionamiento físico y posterior tratamiento biológico. El fraccionamiento físico permite la extracción de los compuestos tóxicos que son más accesibles y directamente asimilables por las plantas facilitando la acción detoxificadora del hongo y reduciendo el tiempo de tratamiento. Hasta la fecha, solo se han realizado estudios con residuos extractados con distintos solventes y transformados con hongos saprobios, sobre la germinabilidad de semillas y crecimiento de diversas especies vegetales. Por ello y debido a la importancia que puede tener el uso del alpeorujos como un posible fertilizante orgánico, el objetivo general de la presente Memoria Doctoral es estudiar las principales respuestas fisiológicas y de defensa que la planta desencadena ante la aplicación del extracto acuoso de dicho residuo transformado por ciertas especies fúngicas. De esta forma, se

Objetivos generales

podrían conocer los mecanismos y/o procesos que permiten el crecimiento y desarrollo de las plantas frente a una situación de estrés generada tras la aplicación del alpeorujo, así como la efectividad de los tratamientos de biorremediación por hongos saprobios realizados hasta la fecha en nuestro laboratorio. Este objetivo general se abordará con los siguientes objetivos específicos:

- I. Estudiar los cambios en la composición fenólica y los mecanismos implicados en el proceso de biorremediación del extracto acuoso de alpeorujo por los hongos saprobios.
- II. Determinar el impacto del extracto acuoso de alpeorujo transformado por los hongos saprobios sobre parámetros fisiológicos relacionados con el crecimiento y desarrollo vegetal de plantas de tomate.
- III. Determinación del efecto del extracto acuoso transformado por los hongos saprobios sobre el metabolismo oxidativo y antioxidante de plantas de tomate.
- IV. Análisis del efecto bioprotector de las micorrizas arbusculares sobre plantas de tomate cultivadas en presencia de extracto acuoso de alpeorujo transformado por hongos saprobios.

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. Agricultura sostenible

La agricultura intensiva ha supuesto durante los últimos años un incremento en la producción de los cultivos gracias al desarrollo tecnológico (Revolución Verde), reflejado en la aplicación de semillas mejoradas, fertilizantes químicos, biocidas... etc. El incremento en el rendimiento de los cultivos se explica por la amplia e intensiva utilización de fertilizantes químicos sintéticos, cuyo uso, a nivel mundial se incrementó 10 veces entre 1950 y 1992. Los fertilizantes que se producen en cantidades enormes debido a su coste relativamente bajo, se aplican de forma fácil y uniforme satisfaciendo los requerimientos nutricionales esenciales de las plantas a corto plazo pero, sin embargo, afectan a las propiedades del suelo y por tanto a la fertilidad del mismo a largo plazo. Además, los componentes minerales de los fertilizantes sintéticos son fácilmente lixiviados causando la eutrofización de ríos, lagos, acuíferos, alimentos e incluso la atmósfera (Conway y Pretty, 1991). La explotación intensiva del suelo, además, favorece un descenso de la materia orgánica del mismo contribuyendo de esta forma a la pérdida de la fertilidad y estructura del suelo. Todas las prácticas de manejo usadas en la agricultura intensiva tienden a favorecer la alta productividad a corto plazo sin embargo, en el decenio pasado, todos los países que adoptaron las prácticas de la “revolución verde” han experimentado una reducción en el crecimiento anual del sector agrícola.

Debido a los innumerables inconvenientes que ocasiona la agricultura intensiva, la agricultura sostenible surge como una alternativa, favoreciendo las propiedades y la fertilidad del suelo y obteniendo beneficios a nivel de productividad. La agricultura sostenible, también conocida como agricultura alternativa, regenerativa, biológica, orgánica, biodinámica o agroecológica, se define como la agricultura que pretende la conservación de las propiedades del suelo y la regeneración de los sistemas agrícolas degradados (Pretty, 1995). Para conseguir un desarrollo sostenible hay que garantizar la producción de hoy, sin poner en riesgo la disponibilidad de recursos para mañana. Los principales objetivos que propone la agricultura sostenible son utilizar los procesos naturales como el ciclado de nutrientes del suelo por microorganismos del suelo y el establecimiento de asociaciones con microorganismos que mejoren la nutrición vegetal o confieran un efecto protector a las prácticas agrícolas, con el fin de incrementar la

productividad y de esta forma reducir el uso de fertilizantes sintéticos. Además, promueve el uso del potencial biológico y genético de las especies animales y vegetales con objeto de una máxima producción agrícola. Por otra parte, en la agricultura sostenible también se contempla el uso de enmiendas orgánicas tanto de origen vegetal como animal para favorecer la estructura del suelo y el ciclo biogeoquímico de los nutrientes.

1.1. Uso de residuos orgánicos como enmendantes

La degradación de los suelos, ha sido una de las consecuencias más importantes ocasionadas por la agricultura intensiva. Actualmente, el abandono de suelos degradados es una de las prácticas más habituales en los países del mediterráneo y especialmente en España. El programa de acción nacional contra la desertificación del Ministerio de Medio Ambiente español señala que el 6% de los suelos españoles están degradados de forma irreversible, mientras que el 33% presentan serios problemas de degradación. La restauración de los suelos degradados se lleva a cabo mediante prácticas que aportan una fuente exógena de materia orgánica (Kirchmann y Bernal, 1997). El aporte de materia orgánica mejora la estructura física del suelo, que a su vez facilita las labores de labrado, aumenta la capacidad de almacenar agua, reduce la erosión del suelo, y favorece el desarrollo del sistema radical de las plantas. También beneficia a la biomasa microbiana del suelo que depende de la materia orgánica como fuente de alimento y energía, contribuyendo, de esta forma, a una mejor fertilidad del suelo. Algunos autores como Costa *et al.* (1991) y Ros *et al.* (2003), proponen que el uso de residuos orgánicos como enmendantes supone una estrategia eficiente en la recuperación de suelos degradados, especialmente en los países desarrollados, donde cada vez se generan más toneladas de residuos y su manejo supone serios problemas.

Las actividades de la sociedad moderna y el desarrollo industrial junto con el crecimiento demográfico, han determinado un aumento en la producción de residuos de naturaleza orgánica e inorgánica. Los residuos pueden clasificarse en función del sector productivo que los origina, lo cual nos permite establecer dos grandes grupos: los residuos derivados del sector primario procedente de actividades como la agricultura, ganadería, así como actividades forestales y extractivas; residuos procedentes del sector secundario y terciario formado básicamente por residuos agroindustriales (industria azucarera, vitivinícola, oleícola etc.) y urbanos (RSU, lodos de depuración de aguas residuales). La producción de

dichos residuos se ha incrementado de forma exponencial en las últimas décadas, siendo los de naturaleza orgánica o biodegradable los más importantes y los que muestran un enorme potencial como fuente de materia orgánica.

1.2. Microorganismos en la agricultura sostenible

Uno de los principales retos que propone la agricultura sostenible es el establecimiento de asociaciones con microorganismos del suelo que mejoren la nutrición vegetal o confieran un efecto bioprotector a las plantas a fin de potenciar la máxima productividad y reducir de esta forma el uso de fertilizantes sintéticos. Estos microorganismos pueden ser considerados como biofertilizantes o abonos biológicos puesto que benefician la nutrición y el crecimiento de las plantas mediante un aumento en la disponibilidad de nutrientes para la planta que puede ser directo o indirecto a través de la producción de fitohormonas que estimulan el desarrollo vegetal.

Existen una gran variedad de microorganismos rizosféricos que dan lugar a relaciones beneficiosas para las plantas, entre los que podemos destacar los hongos micorrícicos que forman la asociación simbiótica mutualista denominada *micorriza*, una de las simbiosis mutualistas más conocidas e importantes por su aplicabilidad como biofertilizante.

1.2.1. Hongos formadores de micorrizas

La simbiosis micorrícica tiene gran importancia debido a su ubicuidad y a los numerosos beneficios que supone para la planta, principalmente mejorando su nutrición mineral e incrementando su resistencia a estreses bióticos y abióticos. Más del 97% de las plantas superiores se asocian con algún tipo de hongo micorrícico, y en la mayoría de los casos, el principal órgano de captación de agua y nutrientes es el hongo (Smith y Read, 2008).

Las asociaciones micorrícicas son muy variadas en estructura y función pero las más extendidas en la naturaleza y las de mayor distribución entre las plantas (angiospermas, gimnospermas, briófitos y helechos) son las micorrizas arbusculares (MA). Los hongos que participan en esta simbiosis pertenecen a la división *Glomeromycota* (Schüßler *et al.*, 2001). La característica principal de las MA es la formación de estructuras fúngicas intrarradicales llamadas arbusculos. Los

arbusculos son de gran importancia para el funcionamiento de la simbiosis ya que es donde tiene lugar el flujo bidireccional de los nutrientes entre la planta y el hongo (Smith y Read, 2008). La principal función de la simbiosis MA es mejorar la nutrición de las plantas a través de un aumento en la captación de fósforo a cambio de recibir carbono de los fotosintetizados de las plantas hospedadoras (Jakobsen, 1995).

1.2.2. Micorrizas y estrés

Además del efecto beneficioso en la nutrición mineral de las plantas, se ha descrito que las MA son capaces de incrementar el desarrollo y crecimiento de plantas micorrizas respecto a plantas no micorrizadas bajo determinadas situaciones de estrés biótico y abiótico (Miransari, 2010). Esta tolerancia es debida, en la mayoría de los casos, a la combinación de efectos físicos, nutricionales, fisiológicos y celulares. De hecho algunos estudios han demostrado la capacidad de las micorrizas de incrementar la producción de enzimas antioxidantes que alivian la situación de estrés en plantas (Avery, 2001; Ruiz-Lozano, 2003; Porcel y Ruiz-Lozano, 2004).

Las MA son capaces de incrementar el desarrollo y crecimiento de las plantas bajo situación de estrés salino. Las micorrizas confieren tolerancia a la salinidad mediante diferentes mecanismos como el incremento de los procesos de respiración y transpiración, el aumento del intercambio de dióxido de carbono y agua y la producción de osmolitos tales como carbohidratos y electrolitos en las raíces de las plantas. De forma similar al estrés salino, las micorrizas confieren resistencia bajo condiciones de sequía por medio de cambios en el potencial osmótico gracias a la acumulación de sustancias osmorreguladoras en raíces, regulación de canales proteicos de intercambio de agua y solutos, además de facilitar el transporte de agua hacia la planta (Aroca *et al.*, 2009, Auge, 2001; Tian *et al.*, 2004).

Además, las micorrizas aportan resistencia a las plantas en suelos contaminados por metales pesados (Chaudhry *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 2000). El efecto bioprotector que ejerce la MA frente a estos elementos viene determinado por la concentración y el tipo de metal, además de por la planta y las condiciones de crecimiento de la misma (Hildebrandt *et al.*, 1999; Turnau y Mesjasz-Przybylowicz, 2003). Se ha observado que especies de MA como *Glomus intraradices* son capaces de incrementar la tolerancia de plantas a metales pesados (Arriagada *et al.*, 2010; Hildebrandt *et al.*, 2007). Algunos estudios revelan que la tolerancia de las plantas micorrizadas a los metales pesados puede venir determinado por un incremento en

la captación de nutrientes y agua por el sistema radical, favoreciendo su capacidad de supervivencia y desarrollo (Miransari, 2010). También se ha puesto de manifiesto la expresión de genes que codifican proteínas conocidas como metalotioninas implicadas en la tolerancia a metales pesados que se inducen en presencia de elevadas concentraciones de Zn y Cd (Rivera-Becerril *et al.*, 2005). Además, se ha descrito la capacidad de las MA para llevar a cabo procesos de fitoestabilización y fitoextracción de contaminantes. La simbiosis arbuscular incrementa la habilidad de las plantas para inmovilizar metales pesados del suelo mediante la adsorción de los mismos en las hifas del hongo micorrícico evitando de esta forma su traslocación a las raíces o la parte aérea de la planta, además de favorecer los procesos de fitoextracción gracias a la presencia de transportadores específicos (González-Guerrero *et al.*, 2010). Estos procesos son importantes en suelos contaminados, ya que permite incrementar el crecimiento de las plantas así como la productividad de los cultivos.

Son diversos los estudios que han puesto de manifiesto el efecto sinérgico de las MA junto con ciertos microorganismos del suelo en la protección de las plantas frente a metales pesados. Se ha demostrado la estimulación que ejercen los hongos saprobios *Fusarium*, *Trichoderma koningii*, *Corioloopsis rigida* y *Trametes versicolor* en la colonización de las raíces por MA, en la protección frente a metales pesados como al Cd, Pb, Al, Cu y As y en ciertos casos en la fitoextracción de metales como el As (Arriagada *et al.*, 2004, 2005, 2007a,b, 2009a, 2010). Otros estudios revelan que la inoculación conjunta de MA y hongos saprobios del suelo incrementa el crecimiento de plantas de eucalipto en presencia de residuos urbanos que poseen metales pesados en su composición (Arriagada *et al.*, 2009b).

Existen algunas especies micorrícicas implicadas en la disipación de contaminantes orgánicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) por medio de procesos de fitodegradación que se realizan mediante la estimulación de la microflora asociada a la rizosfera (Joner *et al.*, 2001). También cabe destacar la tolerancia que presentan las plantas micorrizadas frente a determinados pesticidas (Wang *et al.*, 2011).

Además de la resistencia que ejercen las MA frente a diversos contaminantes, se ha descrito el papel beneficioso de las micorrizas en la utilización como enmendantes orgánicos de los residuos agroindustriales y urbanos biorremediados con hongos saprobios. Así, en residuos procedentes de la extracción del aceite de oliva y de la caña de azúcar tratados con hongos saprobios solubilizadores de fósforo como *Aspergillus niger*, los hongos micorrícicos favorecieron el crecimiento y

nutrición de las plantas, además de incrementar la colonización micorrícica (Medina *et al.*, 2004a,b). También se ha descrito que la aplicación de dichos residuos tratados con *A. niger* y MA incrementa la tolerancia de las plantas frente a metales pesados como el Cd (Medina *et al.*, 2005; 2010). Por otra parte, estudios realizados por Martín *et al.* (2002), han puesto de manifiesto que la aplicación de alpeorujos a plantas micorrizadas no tuvo ningún efecto negativo en la colonización de la planta por parte de *G. mosseae* y *G. deserticola* pero sí en el crecimiento de la misma, por lo que podemos afirmar que el hongo micorrícico potencia el efecto fitotóxico del alpeorujos. Sin embargo, la aplicación de alpeorujos biorremediados con hongos saprobios a plantas de tomate y alfalfa micorrizadas se tradujo en un incremento significativo del crecimiento y desarrollo de las plantas, así como en niveles elevados de porcentaje de micorrización (Sampedro *et al.*, 2008; Aranda *et al.*, 2009).

2. Residuos del olivar: “alpeorujos”

2.1. Origen

La industria oleícola está en constante crecimiento en todo el mundo y en particular en los países de la Cuenca del Mediterráneo que producen más del 98% de la producción mundial de aceite de oliva. Dicha producción se estima que es de 2,5 millones de toneladas por año, de la cual, el 76% corresponde a la Unión Europea y un pequeño porcentaje a nuevos productores como África (12,5%), Asia (10,5%) y América (0,9%). España está considerada como uno de los principales países productores de aceite de oliva con un 35,2% de la producción mundial (1.398.300 toneladas en la campaña 2009-2010, según los datos de la AAO del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). Andalucía es la comunidad con mayor producción ya que representa un 80% de la producción española y más del 40% de la europea.

Los países productores se enfrentan a graves problemas ecológicos debido a la gran cantidad de residuos que se generan tras la extracción del aceite de oliva. En España, el proceso de extracción del aceite de oliva ha sufrido muchas transformaciones, desde el antiguo **sistema de prensado** hasta el actual **sistema de extracción continuo** que permite una mejor extracción del aceite. Inicialmente este sistema continuo era el de 3 fases ya que se generaban 3

fracciones: el aceite de oliva, un residuo líquido denominado *alpechín* y un residuo sólido denominado *orujo* (restos de huesos y pulpa de la aceituna). A principios de los 90, este sistema empezó a sustituirse progresivamente por el sistema continuo de 2 fases en el que se produce por un lado el aceite de oliva y por otro un residuo de consistencia semisólida, húmedo y con algo de aceite denominado *alpeorujo húmedo* (Figura 1). Este residuo puede secarse y someterse a un proceso de extracción con solventes orgánicos para obtener el aceite de orujo, de baja calidad, y un residuo seco denominado *alpeorujo seco y extractado*.

La ventaja del sistema de 2 fases con respecto al de 3 fases es el ahorro energético e hídrico, ya que con el sistema de 3 fases se requiere de la aplicación suplementaria de agua para fluidificar la pasta de la aceituna durante el batido. El residuo generado no es líquido con lo cual es más fácilmente manipulable y además el aceite obtenido es de mayor calidad debido al elevado contenido en polifenoles. Sin embargo, en ambos sistemas, el residuo generado se considera un serio problema ecológico debido a su elevado poder contaminante, por lo que se requieren métodos de tratamiento y revalorización (Roig *et al.*, 2006).

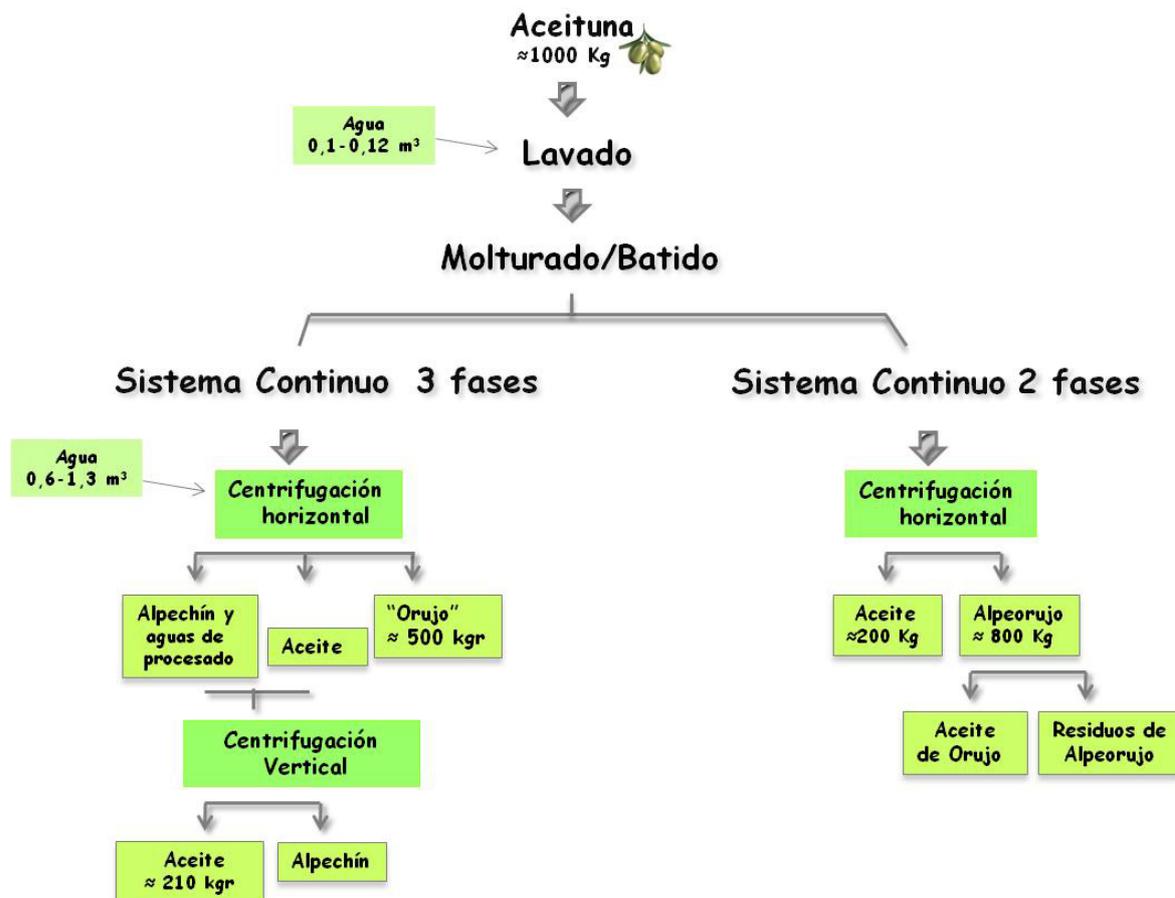


Figura 1. Sistemas de extracción de aceite de oliva.

2.2. Composición y características agroquímicas del alpeorujo

El alpeorujo que se obtiene tras la obtención del aceite de oliva puede considerarse como una mezcla compleja constituida por restos de pulpa, piel y huesos de la aceituna.

Entre las características agroquímicas del alpeorujo cabe destacar su alto contenido en agua (56%) que junto con la presencia de pequeñas partículas y su baja porosidad hace que sea un sustrato poco apropiado para compostar debido a su susceptibilidad de compactación (Alburquerque *et al.*, 2004).

El alpeorujo presenta un pH ligeramente ácido (5,32) y un elevado contenido en sales minerales, características que determinan su posible uso como fertilizante inorgánico para las plantas. Uno de los nutrientes minerales que encontramos en mayor proporción en el alpeorujo es el K, característica común entre los residuos y subproductos del olivar. Sin embargo, este residuo presenta valores bajos en P, Ca y Mg con respecto a los procedentes de sólidos urbanos (Cegarra *et al.*, 1996) (Tabla 1). El nitrógeno presente en el alpeorujo está en forma orgánica y a niveles más bajos que los encontrados en los residuos sólidos urbanos. En cuanto a la proporción de micronutrientes, encontramos niveles elevados de Fe mientras que presenta un contenido mucho más bajo de elementos como el Cu, Mn y Zn. El alpeorujo presenta un elevado contenido en materia orgánica y la mayor parte de los constituyentes orgánicos de este residuo son de naturaleza lignocelulósica lo que determina que el alpeorujo sea un material fácilmente degradable por determinados microorganismos a través de sus maquinarias enzimáticas. Otro constituyente importante de la fracción orgánica del alpeorujo son las grasas (13% de la materia orgánica), carbohidratos solubles (10%) y proteínas (8%) que lo hace un sustrato favorecedor del crecimiento de microorganismos (Díaz, 2010).

Aparte de la fracción mineral y de la orgánica, se han identificado sustancias fenólicas (1,5% de la materia orgánica total aproximadamente). La composición de la fracción soluble fenólica es compleja y variable dependiendo del método de extracción, variedad y grado de maduración de la aceituna. Los primeros estudios sobre la composición fenólica del alpeorujo indicaron que los fenoles mayoritarios eran hidroxitirosol y p-tirosol. Estudios posteriores, han revelado la presencia de compuestos como hidroxitirosol glucósido, tirosol glucosilado, oleuropeina, rutina y luteolina 7-glucósido en un extracto metanol-agua del alpeorujo (Sampedro *et al.*, 2004b). Determinaciones realizadas en diferentes extractos orgánicos (acetato de etilo, propanol, metanol y agua) han puesto de manifiesto la presencia de otros

fenoles como el ácido protocatecuico, ácido vainílico, ácido p-cumárico, ácido tetramandélico, ácido elenoico y también se han identificado algunos compuestos más de tipo flavonoide (Aranda *et al.*, 2007b).

Estas sustancias fenólicas junto con la fracción lipídica y los restos de paredes celulares son los principales responsables de los efectos fitotóxicos y antimicrobianos del alpeorujó (González *et al.*, 1990; Bucheli *et al.*, 1990; Sampedro *et al.*, 2004a). Por ello, este residuo no puede ser desechado sin sufrir una transformación previa para evitar efectos nocivos en el medio ambiente.

Tabla 1. Composición agroquímica del alpeorujó (Díaz-Rodríguez 2010).

Características Agroquímicas del alpeorujó seco y extractado	
pH	5,20
CE (dS*m ⁻¹)	4,12
COT (g*kg ⁻¹)	94,80
C/N (g*kg ⁻¹)	57,90
NT(g*kg ⁻¹)	8,90
P (g*kg ⁻¹)	1,10
K (g*kg ⁻¹)	25,30
Na (g*kg ⁻¹)	n.d.
Ca (g*kg ⁻¹)	1,70
Mg (g*kg ⁻¹)	0,80
Fe (mg*kg ⁻¹)	201,00
Cu (mg*kg ⁻¹)	16,00
Mn (mg*kg ⁻¹)	5,00
Zn (mg*kg ⁻¹)	13,00
Lípidos (%)	n.d.
Fenoles (%)	1,60
Carbohidratos (%)	6,30

2.3. Problemática medioambiental del alpeorujo

El desecho indebido de los residuos de la industria del olivar ha supuesto durante años la contaminación de aguas y suelo. Se estima que cada año, tras la extracción del aceite de oliva, se generan 10-30 millones de toneladas de alpeorujo con un elevado poder contaminante (Niaounakis y Halvadakis, 2006).

Una aplicación directa del alpeorujo al suelo provoca efectos negativos en la nutrición de las plantas y la actividad microbiana del suelo. Muchos investigadores atribuyen la toxicidad del alpeorujo fundamentalmente a los compuestos fenólicos, principalmente monoméricos (Capasso *et al.*, 1995; Sampedro *et al.*, 2004a), a la fracción lipídica (González *et al.*, 1990) y a restos de paredes celulares (Bucheli *et al.*, 1990). De hecho, diversos estudios han revelado que el alpeorujo induce un incremento en la fracción lipídica de capas superficiales del suelo. Este acumulo de grupos hidrofóbicos provoca una menor acumulación de agua en el suelo (Tarchitzky *et al.*, 2007) e incrementa la salinidad en suelos de tipo anfiol debido a los iones sodio por desplazamiento del Ca y el K al complejo de cambio y la disminución del Mg asequible a las plantas por efecto antagónico con el K (Paredes *et al.*, 1999). Esta salinidad provoca la compactación del suelo y afecta a las propiedades físicas del mismo reduciendo la infiltración de agua y aire (Choudhary *et al.*, 2006; Walker y Bernal 2008). La acidez del alpeorujo también determina un descenso del pH del suelo (Morisot y Tournier, 1986; Zenjari y Nejmeddine, 2001) que afecta negativamente a los cultivos provocando daño radicular y disminuyendo la captación de nutrientes (Tan *et al.*, 1992). Asimismo la elevada relación C/N del alpeorujo dificulta su aplicación directa a los cultivos ya que provoca una deficiencia de N en los mismos (Cabrera *et al.*, 2005).

La toxicidad de los compuestos fenólicos se ha correlacionado con su estructura (Aresta *et al.*, 2003) y carácter lipofílico (Wang *et al.*, 2001). Algunos fenoles como el ácido p-cumárico y el ácido ferúlico presentan efectos fitotóxicos debido a la alteración que provocan en determinados procesos fisiológicos de la planta (Li *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 2004). Sin embargo, existen algunas hipótesis sobre las posibles transformaciones que pueden sufrir los fenoles en el suelo como la adsorción (Sierra *et al.*, 2007), migración a capas profundas del mismo (Mekki *et al.*, 2007), y transformación de estos en productos menos tóxicos mediante reacciones de oxidación y polimerización (Colarieti *et al.*, 2006; Greco *et al.*, 2006). Se ha sugerido que la polimerización de los fenoles podría reducir su toxicidad, ya que al convertirse en moléculas de elevado peso molecular estas no podrían atravesar las membranas citoplasmáticas de las células vegetales (Casa *et al.*, 2003). Además estos

productos de polimerización fenólicos muestran propiedades similares a las sustancias húmicas del suelo y podrían actuar como precursores de los ácidos húmicos del suelo (Saiz-Jiménez *et al.*, 1987).

El alpeorujo también puede afectar a las poblaciones microbianas presentes en el suelo. Se ha observado que el alpeorujo provoca un incremento en la respiración del suelo y en el número de unidades formadoras de colonias (Paredes *et al.*, 1987; Mekki *et al.*, 2006), sin embargo, a elevadas dosis, el número viable de microorganismos se reduce significativamente (Mekki *et al.*, 2006) y se inhiben ciertas actividades enzimáticas como fosfatasas y β -glucosidasas (Piotrowska *et al.*, 2006). Son numerosos los trabajos que han estudiado la capacidad de resistencia de los hongos saprobios al alpeorujo (Sampedro *et al.*, 2004a; Aranda *et al.*, 2007a,b), sin embargo, la modificación de las condiciones del suelo por dicho residuo induce cambios en la distribución de las poblaciones microbianas afectando así al ciclado de nutrientes del suelo (Mechri *et al.*, 2007). Así, el alpeorujo afecta a las bacterias nitrificantes del suelo incrementando el número de microorganismos desnitrificantes, bacterias fijadoras de nitrógeno como *Azotobacter* y microorganismos solubilizadores de fosfatos (Paredes *et al.*, 1987; Balis *et al.*, 1996; Oved *et al.*, 2001; Mendum y Hirsch, 2002).

Sin embargo, pese a poseer efectos negativos en el suelo, plantas y microorganismos, numerosos autores han propuesto el uso del alpeorujo como un fertilizante orgánico debido a la elevada cantidad de materia orgánica que aporta al suelo (Cegarra *et al.*, 1996; Nogales *et al.*, 1999). Este aporte de materia orgánica mejora la estructura del suelo, incrementa el contenido en nutrientes favoreciendo la fertilidad del suelo, evita pérdidas de agua por evaporación (Cabrera *et al.*, 1996; Mellouli *et al.*, 1998) y reduce la porosidad del suelo. Por tanto, la utilización de alpeorujo u otros residuos como enmendantes supone una estrategia efectiva para la recuperación de suelos degradados, así como una alternativa económica al uso de fertilizantes químicos (Kowaljow y Julia Mazzarino, 2007). Esto, unido a que la mayor producción de aceite se concentra en los países de la cuenca del Mediterráneo, que son los que presentan mayores problemas de desertificación (Araus, 2004), hace que el uso del alpeorujo como un enmendante en agricultura represente uno de los métodos más efectivos para resolver el problema que genera la elevada producción de dicho residuo y la recuperación de los ecosistemas Mediterráneos (Tomati *et al.*, 1995; Cegarra *et al.*, 1996; Paredes *et al.*, 2005).

Pese a las numerosas ventajas que plantea el uso del alpeorujó como un fertilizante orgánico en el suelo, se hace necesario el desarrollo de tecnologías que disminuyan la toxicidad del alpeorujó para su posible valorización (Ramos-Cormenzana *et al.*, 1995; Roig *et al.*, 2006; Morillo *et al.*, 2009). La composición química del alpeorujó es variable, en función de la variedad de aceituna, condiciones climáticas del cultivo, y del método de extracción del aceite. La heterogeneidad del alpeorujó puede ser considerada como uno de los factores limitantes a la hora de desarrollar metodologías efectivas para su valorización, y en muchos casos, también debido a razones económicas y técnicas (Rozzi y Malpei, 1996).

2.4. Valorización del alpeorujó

El alpeorujó es un residuo que resulta tóxico para las plantas y animales por lo que se han realizado numerosos estudios encaminados al aprovechamiento de dicho residuo.

Son numerosos los métodos que se han propuesto para la reutilización del alpeorujó a fin de disminuir los componentes contaminantes y mejorar sus propiedades. Estos tratamientos pueden ser **físico-químicos** mediante procesos de precipitación/floculación, ultrafiltración y ósmosis indirecta, adsorción, oxidación por procesos químicos e intercambio iónico. De los procesos físico-químicos se obtienen aceite de orujó, compuestos de interés farmacológico, pienso para rumiantes e incluso se puede llegar a generar energía calorífica y eléctrica. También el alpeorujó se puede someter a tratamientos **biológicos** mediante procesos aeróbicos, anaeróbicos y/o compostaje de los que se obtienen biogás, alcoholes y abono orgánico. También puede someterse el residuo a combinaciones de tratamientos físico-químicos y biológicos.

La aplicación de procesos biológicos aeróbicos o anaeróbicos para la detoxificación de contaminantes se conoce como **biorremediación** (Gianfreda y Rao, 2004). La biorremediación se realiza a través de organismos como plantas (fitorremediación), animales que puedan desarrollarse en medios con gran toxicidad (lombrices o microorganismos) o mediante degradación enzimática (Gianfreda y Rao, 2004). En la biorremediación por microorganismos, estos eliminan los componentes de los residuos que resultan tóxicos debido a que los usan como materia prima para su crecimiento, provocando su degradación, oxidación y, por tanto, transformación en componentes menos tóxicos. Algunas de las ventajas de los procesos de biorremediación es que son tratamientos más baratos que los métodos convencionales y suelen ser soluciones permanentes (Wood, 2008).

2.4.1. Hongos saprobios en biorremediación

Hongos saprobios de la madera

Los hongos saprobios de la madera, hongos de la podredumbre u hongos ligninolíticos, se caracterizan fundamentalmente por su capacidad de crecer en la madera y se clasifican en *hongos de la podredumbre blanda, parda y blanca* de acuerdo a la naturaleza de su desarrollo y al tipo de deterioro que ocasionan.

Los hongos de la *podredumbre blanda* atacan muy poco o casi nada a la lignina teniendo preferencia por sustratos celulósicos y hemicelulósicos, por lo que aparecen en las fases tempranas de la pudrición de la madera. Dentro de estos cabe destacar los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* (Anselmo y Novais 1992; Carnicero *et al.*, 1992).

Los hongos de la *podredumbre parda* degradan fundamentalmente celulosas, hemicelulosas y residuos de naturaleza lignocelulósica produciendo acumulación de lignina oxidada que representa una fuente de compuestos aromáticos en la materia orgánica del suelo. Estas reacciones originan un color pardo en la madera, hecho al que deben su nombre (Martínez *et al.*, 2005).

Los hongos de la *podredumbre blanca* tienen gran importancia puesto que degradan fundamentalmente la lignina, produciendo acumulación de celulosa y hemicelulosa que origina color blanco, de ahí su nombre. Como hongos de la podredumbre blanca, cabe destacar las especies *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor*, los cuales degradan de forma no selectiva, además de lignina, la celulosa y hemicelulosa, mientras que *Poria subvermispora* y *Phlebia tremellosa* tienen preferencia por la lignina. Este grupo de hongos no solo están directamente relacionados con la degradación de la lignina, sino también se ha descrito su papel como degradadores de compuestos xenobióticos (Scheibner *et al.*, 1997; Pointing, 2001), tintes (Pasti-Grigsby *et al.*, 1992; Spadaro *et al.*, 1992), DDT (Bumpus *et al.*, 1985), clorofenoles (Joshi y Gold, 2001) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Bezalel *et al.*, 1996a; Collins *et al.*, 1996).

Hongos saprobios del suelo

Los hongos saprobios del suelo son componentes fundamentales de la rizosfera y la rizoplanea del suelo de donde obtienen importantes beneficios nutricionales en forma de compuestos inorgánicos, exudados y mucílago de raíces vivas, así como de células muertas (Finlay y Soderstrom, 1992). El papel que desempeñan los hongos saprobios en el suelo es bastante importante, puesto que participan en la movilización de nutrientes, degradan sustancias fitotóxicas, producen sustancias que promueven o inhiben el crecimiento de otros microorganismos de la rizosfera, aportan biomasa microbiana al suelo y además, contribuyen al uso óptimo de nutrientes por parte de las plantas (Dix y Webster 1995; Fracchia *et al.*, 2000).

Los hongos saprobios tienen la capacidad de utilizar una gran variedad de fuentes carbonadas, desde azúcares simples como hexosas o pentosas, hasta moléculas de difícil degradación como ácidos orgánicos, pectinas, celulosas y ligninas. El nitrógeno que utilizan procede principalmente del amonio o nitrato, aunque también lo pueden usar de proteínas, ácidos nucleicos, u otros compuestos nitrogenados. Estos hongos pueden producir una amplia gama de enzimas para la degradación como amilasas, proteasas, ligninasas y xilanasas, quitinasas, cutinasas, fitasas y fosfatasas implicadas en los procesos de degradación de la materia orgánica, aunque también se ha observado la capacidad productora de pectinasas, celulasas y xiloglucanasas por ciertas especies de hongos saprobios (Tribak *et al.*, 2002).

Algunos hongos saprobios del suelo, al igual que los hongos de la podredumbre blanca, tienen la capacidad de mineralizar la lignina mediante la producción de enzimas ligninolíticas (lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasas) así como enzimas productoras de H₂O₂ (Norris, 1980; Regalado *et al.*, 1997).

Este tipo de microorganismos y sus enzimas se emplean en procesos biotecnológicos de biodegradación de residuos agrícolas, agroindustriales o de la industria de la alimentación (Kapoor *et al.*, 1978; Petre *et al.*, 1999), así como en el tratamiento de efluentes nitrocelulósicos (Souza *et al.*, 1995), en la industria papelera mediante la producción de enzimas hidrolíticas (Das *et al.*, 1997), o bien mediante el blanqueo de fibras textiles o de papel (Bruhlmann *et al.*, 1994). Algunos autores han determinado la capacidad de ciertas especies del género *Penicillium* para degradar fenoles (Hofrichter y Scheibner, 1993; Hofrichter *et al.*, 1995).

2.4.3. Biorremediación del alpeorujo con hongos

Los estudios iniciales sobre biorremediación de residuos oleícolas se realizaron con bacterias y se puso de manifiesto la capacidad detoxificadora de ciertas bacterias como *Bacillus pumilus* (Ramos-Cormenzana *et al.*, 1996) y *Azotobacter vinelandii* (Ehalotis *et al.*, 1999), concretamente, se observó una reducción del 50% de los compuestos fenólicos. Sin embargo son numerosos los estudios que demuestran que los hongos de la madera presentan una mejor capacidad degradadora de estos residuos que las bacterias debido a las enzimas ligninolíticas que son capaces de degradar monómeros de la lignina, compuesto muy similar en estructura a los componentes fenólicos fitotóxicos (anillo aromático) del alpeorujo. De hecho el uso de los hongos en la biorremediación del alpeorujo viene determinado por su capacidad de transformar los fenoles monoméricos del residuo (Sampedro *et al.*, 2004a, 2005; Aranda *et al.*, 2006, 2007a,b), a través de la producción de enzimas como lacasas y peroxidases que polimerizan los compuestos fenólicos monoméricos (D'Annibale *et al.*, 2004). Numerosos estudios han puesto de manifiesto la efectividad de diferentes especies de hongos del género *Pleurotus* en la biorremediación de alpechines (Sanjust *et al.*, 1991; Martirani *et al.*, 1996; Tsioulpas *et al.*, 2002; Fountoulakis *et al.*, 2002). Otros autores han observado una reducción de casi el 90% del contenido fenólico en el alpeorujo seco y extractado por los hongos ligninolíticos *Pl. ostreatus* y *Pl. pulmonarius*, *Poria subvermispora* y *Corioloopsis rigida* (Saavedra *et al.*, 2006; Sampedro *et al.*, 2007a). Por otro lado se ha descrito una correlación entre la producción de actividad lacasa por los hongos *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* y la reducción del contenido fenólico y la toxicidad de este residuo en plantas de tomate (Aranda *et al.*, 2006).

Los hongos saprobios del suelo, al igual que los hongos ligninolíticos, son capaces de utilizar la lignina y la celulosa y degradan sustancias tóxicas incluidas las de tipo fenólico por lo que juegan un papel importante en procesos de biorremediación (Regalado *et al.*, 1997; D'Annibale *et al.*, 1998). Numerosos estudios han puesto de manifiesto la capacidad de ciertos hongos saprobios del suelo para disminuir el contenido fenólico del alpeorujo, además se ha observado una correlación entre el descenso del contenido fenólico del alpeorujo y la disminución de la fitotoxicidad en plantas de tomate, soja y alfalfa (Sampedro *et al.*, 2004a, 2005, 2007a,b). Aparte de los fenoles, se sabe que hay otros compuestos que pueden estar implicados en la toxicidad del alpeorujo. Se ha sugerido que las paredes celulares así como algunos de sus componentes, como oligosacáridos y glucoproteínas de restos celulares, pueden resultar tóxicos para las plantas (Bucheli *et al.*, 1990). Se ha descrito la capacidad de ciertos hongos saprobios del suelo para

crecer en alpeorujos y producir enzimas hidrolíticas implicadas en la descomposición de la materia orgánica y paredes celulares del residuo y así utilizar las fuentes de carbono procedentes de la descomposición para su nutrición. Estudios realizados por Aranda *et al.* (2004) ponen de manifiesto la producción de enzimas hidrolíticas, fundamentalmente endocelulasas, endoxiloglucanasas y endopolimetilgalacturonasas por el hongo *Penicillium chrysogenum* cultivado en extractos acuosos de alpeorujos, que provocan una disminución del efecto fitotóxico de dicho extracto en plantas de tomate.

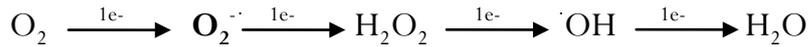
Pese a que los tratamientos biológicos son considerados como uno de los métodos más económicos y compatibles con el medio ambiente (Mantzavinos y Kalogerakis 2005), la biorremediación del alpeorujos por hongos requiere de elevados tiempos de incubación (Sampedro *et al.*, 2007a,b). Por esta razón, se han desarrollado estudios que reducen el tiempo necesario para la detoxificación de los fenoles del alpeorujos mediante el uso de soportes que inmovilizan el hongo y favorece una mejor colonización del mismo. Concretamente Sampedro *et al.* (2009) observaron como la incubación de los hongos *Panus tigrinus* y *Phlebia sp* en paja y esponja de poliuretano incrementó el grado de eliminación de fenoles disminuyendo un periodo de tiempo menor. Otros estudios han señalado la efectividad de la combinación de varios tratamientos secuenciales físico-químicos y biológicos (Mantzavinos y Kalogerakis 2005). Aranda *et al.* (2007b), han observado que un fraccionamiento químico seguido de un tratamiento con los hongos ligninolíticos *Corioloropsis rigida*, *Pycnoporus cinnabarinus* y *Trametes versicolor* redujo significativamente el contenido fenólico del alpeorujos a corto tiempo.

3. Estrés oxidativo y metabolismo antioxidante

3.1. Especies reactivas del oxígeno (ROS)

A excepción de los organismos anaeróbicos, la mayoría de las formas de vida necesitan O_2 para la producción de energía. La reducción del O_2 a H_2O aporta la energía necesaria para el desarrollo y crecimiento de las plantas, sin embargo, este proceso de reducción genera la aparición de formas reducidas extremadamente reactivas provocando daños a nivel del DNA, proteínas, carbohidratos, lípidos y en último caso pueden producir la muerte celular (Foyer y Noctor 2005).

La reducción completa del O₂ a una molécula de agua sucede en cuatro pasos, sin embargo, esta reducción puede ocurrir en pasos univalentes, dando lugar a la aparición de ROS (Hippeli *et al.*, 1999). La reducción del oxígeno molecular requiere del aporte de cuatro electrones para su reducción completa y conlleva la aparición de radicales libres como el radical superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y radical hidroxilo (•OH):



Las ROS son producidas en diferentes compartimentos celulares (cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas, apoplastos y pared celular) como consecuencia del metabolismo normal de las plantas durante procesos fisiológicos como la fotosíntesis y/o respiración o bien generados por acción enzimática (xantina oxidasa, glicolato oxidasa, oxalato oxidasa y NADPH oxidasas) (Halliwell y Gutteridge, 2000). Sin embargo el equilibrio entre la producción y degradación de los ROS puede verse alterado bajo determinadas situaciones ambientales como la salinidad, sequía, temperatura, metales pesados, radiación UV, compuestos xenobióticos, déficit de nutrientes, patógenos o incluso la luz (Dat *et al.*, 2000). El desequilibrio provocado entre la excesiva producción y la poca degradación de las ROS por las células vegetales genera una situación de estrés oxidativo en las plantas.

A pesar de que la producción de ROS (O₂^{•-}, H₂O₂, •OH) en las células vegetales se producen de manera continua como consecuencia de procesos metabólicos, se ha observado como la producción de las ROS a bajos niveles pueden actuar como moléculas señal bajo situaciones normales o de estrés (Bolwell, 1999). El O₂^{•-} y H₂O₂ actúan directamente tanto en situaciones de defensa como en la transducción de señales (Vranová *et al.*, 2002). Concretamente se ha observado que el H₂O₂ puede actuar como segundo mensajero en procesos de crecimiento y desarrollo celular, muerte celular programada, señalización hormonal, regulación de la fotosíntesis así como en respuestas celulares frente a estrés biótico y/o abiótico (Miller *et al.*, 2008), por tanto la producción de ROS es necesaria para inducir procesos de defensa de la planta. Estudios realizados con mutantes en diferentes enzimas antioxidantes que regulan el estado redox de las ROS han puesto de manifiesto la relación que existe entre las ROS y procesos de crecimiento, desarrollo, apertura del estoma y respuestas a estreses bióticos y abióticos (Pnueli *et al.*, 2003; Torres y Dangl, 2005; Miller *et al.*, 2007).

3.2. Sistemas antioxidantes en las células vegetales

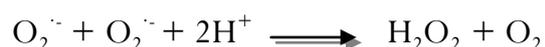
La exposición de las plantas a condiciones ambientales desfavorables tales como temperaturas extremas, metales pesados, sequía, disponibilidad de agua, contaminantes, déficit de nutrientes, salinidad y compuestos fenólicos, pueden incrementar la producción de ROS y por tanto provocar un estrés oxidativo en las células vegetales ($^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$). Por esta razón, las células y orgánulos vegetales (cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas) han desarrollado sistemas antioxidantes de defensa. Son numerosos los autores que han revelado que la inducción de la maquinaria antioxidante es un mecanismo importante para las plantas como sistema de defensa frente al estrés (Khan *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2008).

Los principales mecanismos de detoxificación de ROS de las plantas son las enzimas catalasa (CAT; EC 1.11.1.6), superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1), peroxidasa (PODs; EC 1.11.1.7) y varias enzimas implicadas en el ciclo del ascorbato (ASC) y glutatión (GSH) como la ascorbato peroxidasa (APX; EC. 1.11.1.11), monodehidroascorbato reductasa (MDAHR; EC. 1.6.5.4), dehidroascorbato reductasa (DHAR; EC. 1.8.5.1) y glutatión reductasa (GR; EC 1.6.4.2) además de metabolitos antioxidantes no enzimáticos como el ascorbato y glutatión (Mittler, 2002).

3.2.1. Antioxidantes enzimáticos

Superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1)

Representa una de las enzimas más importantes como mecanismo detoxificador que poseen las plantas, ya que constituye la primera línea de defensa frente a los efectos tóxicos de la elevada producción de ROS. Su función es eliminar el radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) transformándolo en H_2O_2 .



En situaciones de estrés el radical superóxido se produce en elevadas concentraciones. La SOD, enzima clave en el sistema de defensa de las plantas frente a los ROS, elimina el radical superóxido evitando de esta forma la formación de otras especies más reactivas del oxígeno como son el radical hidroxilo o el oxígeno singlete, los cuales presentan una reactividad mayor y cuyos mecanismos

detoxificadores para eliminarlos aún no han sido identificados. Se ha descrito un incremento en la producción de SOD en situación de estrés oxidativo generado por diversos factores abióticos como fotodinámicos, térmicos, daños por ozono, herbicidas, sequía, anoxia y factores bióticos como patógenos (Apel y Hirt, 2004).

Por otra parte, el H_2O_2 generado tras la dismutación del radical superóxido por la acción de la SOD, es eliminado del medio celular por la acción enzimática de la CAT, y las peroxidasas (Mittler, 2002).

Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6)

Su principal función de la es catalizar la reacción de conversión del H_2O_2 en H_2O y O_2 (Halliwell y Gutteridge, 2000).



Se ha descrito como una enzima indispensable para la detoxificación de las ROS generadas en situaciones de estrés (Garg y Manchanda, 2009) por metales pesados, concretamente por Cd (Hasan *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2008), por estrés salino (Eyidogan y Oz, 2007), estrés por sequía (Simova-Stoilova *et al.*, 2010) así como por radiaciones UV-B (Agarwal *et al.*, 2007).

Peroxidasas (PODs; EC 1.11.1.7)

La detoxificación del H_2O_2 puede ocurrir por medio de las PODs que a diferencia de las CAT degradan el H_2O_2 oxidando una amplia variedad de sustratos.



Además, las PODs están implicadas en otros procesos fisiológicos como la síntesis de lignina y suberina en las paredes celulares vegetales (Quiroga *et al.*, 2000; Pomar *et al.*, 2002), intervienen en la síntesis de metabolitos secundarios (Awad *et al.*, 2000; Sottoy Mayor y Ros Barceló, 2004) y en el metabolismo de ROS y de especies reactivas del nitrógeno (RNS). Estas enzimas participan en el sistema de defensa frente a patógenos, heridas y otros estreses bióticos (McLusky *et al.*, 1999; Bolwell *et al.*, 2002; Ros-Barceló *et al.*, 2003).

Ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11)

La APX representa un mecanismo importante de eliminación de H_2O_2 utilizando como sustrato el ascorbato (ASC). Esta enzima cataliza la transformación del H_2O_2 en H_2O mediante la oxidación del ASC a monodehidroascorbato (MDA).



La APX junto con otro grupo de enzimas como la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR), glutatión reductasa (GR) y el ascorbato y glutatión, forma parte del ciclo del ascorbato-glutatión o ciclo de Halliwell-Asada-Foyer (Smirnov, 2000) (Figura 2) y están implicados en la detoxificación de H_2O_2 (Noctor y Foyer, 1998; De Gara y Tommasi, 1999) principalmente en aquellos compartimentos celulares donde no existe CAT, como el citosol, las mitocondrias y los cloroplastos.

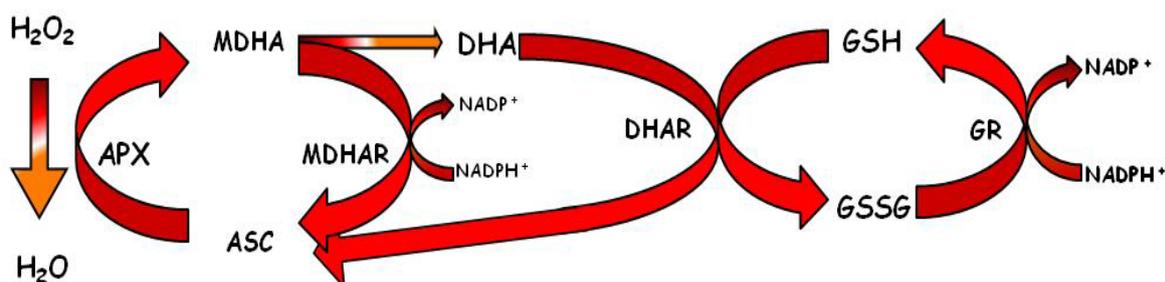


Figura 2. Ciclo del Ascorbato-Glutatión o Ciclo de Halliwell-Asada-Foyer (Smirnov, 2000).

La APX juega un papel similar a la CAT, sin embargo, estas dos enzimas difieren en la afinidad por el H_2O_2 siendo superior en la APX, con una constante K_m del orden micromolar (Miyake y Asada 1992; De Gara y Tommasi, 1999). Esta afinidad elevada por el H_2O_2 determina que la APX regule correctamente los niveles de ROS incluso cuando estas se presentan en bajas concentraciones.

Son numerosos los trabajos que han descrito el incremento en la producción de APX en situaciones de estrés abiótico por Cd (Mobin y Khan 2007; Singh *et al.*, 2008), o estrés salino e hídrico (Srivastava *et al.*, 2005; Zlatev *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2008).

Monodehidroascorbato reductasa (MDHAR; EC 1.6.5.4)

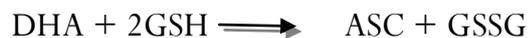
La MDHAR cataliza la reacción de reducción del MDHA a ASC utilizando NAD(P)H como donador de electrones. Es la única enzima antioxidante que usa un radical orgánico como sustrato.



Esta enzima, junto con la APX, actúa en la eliminación del H₂O₂ ya que forma parte del ciclo del ascorbato-glutation (Figura 2). Aparte de esta función, se ha descrito que la MDHAR actúa en la regeneración del ASC a partir del MDHA y en la reducción del dioxígeno a radical superóxido en los cloroplastos (Miyake *et al.*, 1998).

Dehidroascorbato reductasa (DHAR; EC 1.8.5.1)

Es otra enzima encargada de la regeneración del ASC oxidado, regulando de esta forma el estado redox de las células vegetales, el cual es crucial para la tolerancia de las ROS producidos por diferentes estreses abióticos. Concretamente, esta enzima cataliza la reducción del DHA (forma oxidada del ASC) a ASC mediante la oxidación del GSH reducido a GSH oxidado (GSSG).



La DHAR se ha identificado como otra de las enzimas integrantes del ciclo ascorbato-glutation (Figura 2).

Glutación reductasa (GR; EC 1.6.4.2)

Cataliza la reducción del GSSG a GSH utilizando el NADPH como donador de electrones.



Esta actividad interviene en procesos metabólicos vitales para la célula y es crucial para el mantenimiento de su capacidad antioxidante (defensa frente estrés oxidativo), además junto con la APX, MDHAR y la DHAR forma parte del ciclo del ascorbato-glutation (Figura 2).

Esta enzima es importante en la protección frente a diferentes estreses producidos por herbicidas, contaminantes atmosféricos, bajas temperaturas, estrés fotooxidativo, estrés hídrico y estrés por metales pesados (Gill y Tuteja 2010).

Glutación-S-transferasas (GSTs; EC 2.5.1.18)

Son un grupo diverso de enzimas que catalizan la conjugación del grupo –SH del glutatión sobre substratos xenobióticos. Esta enzima está implicada en una serie de procesos fisiológicos como la regulación hormonal, captación de antocianinas en vacuolas, metabolismo de la tirosina, regulación de la apoptosis y en la respuesta de las plantas a estreses bióticos y abióticos (Dixon *et al.*, 2010). Cabe destacar el papel de las GSTs en la conjugación de compuestos tóxicos tales como los herbicidas al GSH transformándolos en compuestos menos tóxicos de esta forma se previene el daño oxidativo que pueden ocasionar los herbicidas a biomoléculas tales como proteínas, DNA y RNA (Cole, 1994; Knörzer *et al.*, 1996). Aparte se ha observado la versatilidad que poseen las GSTs para actuar como peroxidasas (GPOX) reduciendo compuestos orgánicos como los hidroxiperoxilos formados tras la peroxidación lipídica de membranas a consecuencia del daño oxidativo causado por los herbicidas en productos con menor potencial citotóxico (Roxas *et al.*, 1997; Dixon *et al.*, 1998). Además, algunas GSTs a través de su acción como peroxidasas reducen el ASC a partir de la forma DHA o en el catabolismo de las tirosinas (Thom *et al.*, 2001).

Las GSTs se inducen durante procesos de estrés que propician la producción de ROS en plantas como son la toxicidad por metales pesados, la exposición al Cd (Dixit *et al.*, 2001; Moons *et al.*, 2003), el ataque por patógenos y la producción de etileno y ozono (Marrs, 1996; Alfenito *et al.*, 1998).

3.2.2. Antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes no enzimáticos representan una segunda línea de defensa frente a las ROS generadas en situación de estrés. Estos son metabolitos de bajo peso molecular entre los que podemos encontrar al ascorbato (ASC), glutathion (GSH), prolina, α -tocoferol (vitamina E), carotenoides y fenoles.

Ascorbato (ASC)

El ASC es una molécula orgánica (L-treo-hexenon-1,4-lactona) comúnmente conocido como L-ácido ascórbico o vitamina C. Las células utilizan el ASC como donador de electrones y el primer producto de su oxidación es una semiquinona denominada monodehidroascorbato (MDHA). El MDHA es un radical libre de baja reactividad que generalmente está considerado como el menos destructivo (Navas y Gómez-Díaz, 1995). El MDHA, de forma espontánea, puede transformarse en ASC con la consiguiente generación de dehidroascorbato (DHA), otra de las formas oxidadas del ASC que mediante su reducción dará lugar a la generación de forma irreversible del ASC.

El papel fisiológico más importante del ASC es el de actuar como un potente antioxidante sobre todo en los tejidos fotosintéticos (Foyer *et al.*, 1983; Smirnoff, 2000). Se ha descrito su papel en procesos relacionados con la fotosíntesis eliminando las ROS generadas ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2) en los cloroplastos a través de las SODs y APXs (Miyake *et al.*, 1992; Foyer *et al.*, 1994). El ASC está implicado en el ciclo del ascorbato-glutathion o ciclo de Halliwell-Asada-Foyer, que representa un sistema antioxidante exclusivo de plantas, importante en la eliminación del H_2O_2 y que está localizado en compartimentos celulares como el citosol, cloroplastos, mitocondrias, fundamentalmente donde no existe CAT (Doullis *et al.*, 1997; Halliwell y Gutteridge, 2000). El ASC también interviene en la eliminación de ROS producidos en otros compartimentos celulares como son las mitocondrias durante la fotorrespiración, los peroxisomas a nivel de la glicolato oxidasa y del apoplasto eliminando el ozono (Kelly *et al.*, 1995; Dietz, 1997).

Glutación (GSH)

El GSH es un tripéptido (gamma-Glu-Cys-Gly) formado por los aminoácidos glutamina, cisteína y glicina. El GSH está implicado en reacciones de defensa en situaciones de estrés oxidativo, actuando como un potente antioxidante. Los niveles de GSH en las células vegetales se incrementan bajo condiciones desfavorables fortaleciendo la capacidad de defensa de la planta frente a la producción de ROS. El glutation aumenta su producción en respuesta tanto al incremento de ROS como a una inhibición de otros antioxidantes implicados en el sistema de defensa de la planta. El GSH, al igual que el ASC, está implicado en la eliminación de H₂O₂ intracelular a través del ciclo del ascorbato-glutation (Noctor *et al.*, 2002), y actúa directamente como donador de electrones en reacciones catalizadas por la glutation peroxidasa (GPOX). Además, puede reaccionar directamente con el ¹O₂ y los radicales [•]OH y proteger a las proteínas contra la desnaturalización causada por la oxidación de los grupos tioles durante situaciones de estrés dando lugar a la formación de GSSG (Gechev *et al.*, 2002) y eliminando radicales libres por vías no enzimáticas. Además, el glutation también participa en los procesos de detoxificación de metales pesados y compuestos xenobióticos que son conjugados al GSH y translocados al interior de vacuolas (Foyer y Noctor, 2001).

Fenoles

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en las plantas y frecuentemente localizados en hojas, flores y polen. Se consideran los metabolitos secundarios más bioactivos producidos por las plantas, y tienen un papel importante como moléculas antioxidantes formando parte del sistema de defensa de las plantas frente a las ROS, al igual que el ASC (Hernández *et al.*, 2009). Los fenoles actúan como detoxificadores de ROS, debido a su localización celular y de esta forma protegen a las células del daño que producen las ROS bajo condiciones ambientales adversas (Løvdal *et al.*, 2010). Su habilidad para actuar como moléculas antioxidantes depende en gran medida de la capacidad reductora y la accesibilidad de los grupos hidroxilo que forman parte de su estructura.

Carotenoides

Son pigmentos producidos por plantas y microorganismos, habiéndose descrito alrededor de 600 compuestos distintos. Estos se caracterizan por ser antioxidantes de naturaleza lipídica que poseen numerosas funciones en la fisiología de las plantas, incluyendo la de protección frente a estrés oxidativo. Los carotenoides actúan absorbiendo un rango de luz comprendido entre 400-550 nm y la transfieren a las moléculas clorofílicas; evitan la acumulación de la energía de excitación en las moléculas de clorofila y de esta manera la formación del $^1\text{O}_2$, por lo que se protegen a las células del daño que ocasiona la producción de ROS durante la fotosíntesis (Mittler *et al.*, 2004). Además, se le ha atribuido el papel de moléculas antioxidantes puesto que participan en la detoxificación de ROS en situaciones de estrés y contribuyendo así a evitar los daños provocados por las ROS como la peroxidación lipídica.

4. Papel de los compuestos fenólicos en las plantas

Numerosos autores han propuesto que, bajo concentraciones y condiciones apropiadas los compuestos fenólicos, principalmente los ácidos fenólicos, pueden resultar tóxicos para las plantas (Inderjit, 1996; Blum *et al.*, 1999). Concretamente, se ha estudiado el papel de una gran variedad de compuestos de naturaleza fenólica como el ácido cafeico, ferúlico, p-cumárico, hidroxibenzoico, protocatecuico, sinápico, siringico, vainílico y ftálico en la fisiología de las plantas (Baziramakenga *et al.*, 1995; Rama Devi y Prasad, 1996; Yu *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2007; Bai *et al.*, 2009). El efecto dañino o fitotóxico de los compuestos fenólicos está considerado como un estrés biótico denominado *estrés aleloquímico* (Cruz-Ortega *et al.*, 2002; Pedrol *et al.*, 2006).

4.1. Fenoles en la fisiología de la planta

Son numerosos los estudios que revelan el efecto o modo de acción que presentan los compuestos fenólicos en las plantas. Así se ha observado el efecto inhibitorio de los compuestos fenólicos en la germinación y crecimiento de semillas de sorgo, trigo, girasol y centeno (Wu *et al.*, 2000; Inderjit y Duke, 2003; Weston y Duke, 2003). La inhibición de semillas de girasol y de pepino se observó en presencia de los alcaloides presentes en el extracto de estramonio (Levitt *et al.*, 1984; Maffei *et al.*, 1999) y del ácido benzoico. Además se ha observado que los

ácidos 3,4-dimetoxibenzoico y vainílico disminuyen la actividad de la enzima isocitrato liasa implicada en los procesos de germinación de las semillas (Maffei *et al.*, 1999). Por otro lado, se ha descrito que la germinación de semillas de berro se redujo significativamente en presencia de extractos de alpeorajo con elevado contenido en compuestos fenólicos monoméricos, ácidos fenólicos o flavonoides (Aranda *et al.*, 2007b).

Otro proceso fisiológico que sufre el efecto fitotóxico de los compuestos fenólicos es la fotosíntesis, y lo hace concretamente a nivel del fotosistema II localizado en el interior de las membranas tilacoidales de los cloroplastos interrumpiendo el transporte electrónico. Los compuestos aromáticos como las benzoquinonas han sido descritos como compuestos inhibidores de la fotosíntesis (Czarnota *et al.*, 2001). Se ha descrito también que análogos de sesquiterpenos disminuyen la síntesis de clorofilas y carotenoides en hojas de lechuga (Dayan *et al.*, 1999), y compuestos como la juglona reducen el contenido clorofílico del maíz y la soja (Jose, 2002).

La respiración oscura o mitocondrial, también es susceptible al efecto tóxico de los fenoles, además de ser uno de los mecanismos que se sugiere como responsables de la germinación. Se ha observado que las cumarinas afectan negativamente a la respiración mitocondrial en raíces de cebolla (Kupidlowska *et al.*, 1994). La quercitina afecta a la actividad respiratoria de las mitocondrias inhibiendo la oxidación de sustratos debido a su acción directa sobre la cadena de transporte electrónico. También se ha descrito que puede actuar provocando el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa durante la respiración mitocondrial.

Por otro lado, los compuestos fenólicos disminuyen la producción de ATP en células radicales lo que afecta a los procesos que requieran de fuente de energía como la fotosíntesis y la respiración. La reducción del crecimiento por la inhibición de la captación de iones es uno de los procesos en las células vegetales que más energía consumen (van der Werf *et al.*, 1988). Se ha observado que exudados de raíces de *Cucumis sativus*, ricos en compuestos aromáticos, inhiben la captación de iones como NO_3^- , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , BO_3^{3-} (Yu y Matsui, 1997). Los ácidos p-hidroxicinámico, vainílico y ferúlico afectan a la captación de fostatos (H_2PO_4^-) por las raíces (Lyu *et al.*, 1990). Además la reducción del crecimiento vegetal en presencia de fenoles también puede estar relacionada con la inhibición de la mitosis celular.

4.2. ROS y compuestos fenólicos

El efecto de los compuestos fenólicos en la fisiología de la planta se produce por medio de un incremento en la producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Así, muchas quinonas y fenoles pueden ser tóxicas para la planta ya que dan lugar a la formación de radicales de semiquinonas que actúan donando electrones al oxígeno molecular (O_2) y formando radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Testa, 1995). El radical superóxido puede transformarse en otras especies reactivas de oxígeno mucho más peligrosas y dañinas como son el radical hidroxilo ($\cdot OH$) o el radical hidroperoxilo (HO_2^{\cdot}) (Hammond-Kosak y Jones, 1996). Son numerosos los estudios que han puesto de manifiesto la potencialidad de las ROS para provocar un estrés oxidativo y como consecuencia inducir un daño oxidativo (Sánchez-Moreiras y Reigosa, 2005; Romero-Romero *et al.*, 2005; Abenavoli *et al.*, 2006). Además, se ha descrito que algunos compuestos fenólicos son capaces de despolarizar y permeabilizar membranas, inducir peroxidación lipídica y pueden llegar a provocar la muerte celular programada (Zeng *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2003).

Estudios realizados con 2(3H)-benzoxazolinona (BOA), compuesto aromático producido por centeno y otras especies de gramíneas, han puesto de manifiesto como afectan negativamente determinados procesos fisiológicos (Fotosíntesis, PSII y captación de agua) y enzimáticos al igual que inhibidas las actividades (SOD y PODs) en plantas de lechuga (Virtanen *et al.*, 1957; Sánchez-Moreiras y Reigosa, 2005). Estas enzimas son clave en procesos de detoxificación de ROS para prevenir del daño oxidativo (Zeng *et al.*, 2001), ya que su desactivación determina una acumulación de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y $\cdot OH$ y provoca la peroxidación de lípidos, altera la permeabilidad de las membranas, y por tanto determina la senescencia celular. Por otro lado, se ha descrito que un elevado acumulo de H_2O_2 extracelular puede reducir la expansión celular por acción de las PODs asociadas a la pared celular (Bacon, 1999). El radical $O_2^{\cdot-}$ junto con el H_2O_2 , pueden actuar como moléculas señal o segundos mensajeros en la cascada de traducción de señales de las plantas activando los mecanismos antioxidantes o detoxificadores para contribuir a la resistencia de la planta frente a los compuestos fenólicos, es decir, determinando la supervivencia o la muerte de la misma (Bradley *et al.*, 1992; Jabs *et al.*, 1997).

Estudios realizados en plantas como *Festuca idahoensis*, *Koeleria micrantha* y *Arabidopsis thaliana* en presencia de (-)-catequina han puesto de manifiesto un incremento en la producción de ROS, acompañado de una inhibición de la germinación y del crecimiento (Bais *et al.*, 2003). Además, se ha observado que tras

la exposición a compuestos fenólicos, se induce la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo, así como genes que codifican proteínas relacionadas con la vía de los fenilpropanoides y terpenoides (Bais *et al.*, 2003). Abenavoli *et al.* (2001) observan la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo en plantas de trigo en respuesta a un tratamiento con cumarina. Estudios realizados en raíces de tomate en presencia de compuestos fenólicos señalan un incremento en la producción de radicales libres que origina un daño oxidativo de membrana a consecuencia de la elevada producción de H_2O_2 , efecto que va acompañado de un aumento de las actividades NADPH oxidasas, CAT y GST (Cruz-Ortega *et al.*, 2002, 2007, 2008). Este incremento en las actividades enzimáticas indica la activación de mecanismos implicados en la detoxificación de las ROS. En pepino se ha observado que la exposición de raíces al ácido p-cumárico y ferúlico incrementa el nivel de H_2O_2 , afecta a la apertura estomática, transpiración y fotosíntesis, e incrementa significativamente las actividades PODs y SOD (Yu *et al.*, 2003; Politycka y Bednarski, 2004). Este hecho se traduce en una conversión de los O_2^- a H_2O_2 por medio de la SOD y la degradación del H_2O_2 por medio de la POD. Por otro lado, la exposición de pepino a ácidos cinámicos induce un estrés oxidativo determinado por la producción de ROS que provocan daños en las membranas e inhiben la actividad H^+ -ATPasa. Como consecuencia de esta exposición se observa la activación de antioxidantes enzimáticos como SOD, PODs, CAT (Ding *et al.*, 2007). La inducción de estrés oxidativo frente a compuestos aromáticos, también se ha observado en semillas de *Sinapis alba* mediante un incremento de los niveles de H_2O_2 , O_2^- y peroxidación de lípidos, así como la activación de enzimas antioxidantes como la CAT, APX, SOD y GR y un aumento de la actividad CAT (Bogatek *et al.*, 2002).

Por otro lado se ha descrito una respuesta de “burst oxidativo” de las células vegetales tras la exposición a compuestos fenólicos, que sucede de forma similar a la reacción oxidativa que desencadena el ataque de un patógeno o un estrés abiótico (McDowel y Dangel, 2000; Van Breusegem *et al.*, 2001; Hüchelhoven y Kogel, 2003). Así, algunos trabajos han puesto de manifiesto que la generación de ROS en raíces de *Arabidopsis thaliana* se produce tras 10 segundos de contacto con (-)-catequina. Estudios posteriores han observado como la aplicación exógena de ascorbato bloquea la generación de ROS, apoyando la hipótesis de que el aumento o la activación de los antioxidantes probablemente sea un efecto secundario de muchos compuestos fenólicos. Por tanto, la producción de ROS se puede considerar como el efecto primario de los compuestos fenólicos que conduce a la activación del sistema antioxidante.

Material y Métodos

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Alpeorujo seco y extractado

1.1. Características del alpeorujo seco y extractado

Se ha utilizado el alpeorujo seco y extractado procedente de la empresa oleícola Sierra Sur S.A. (Granada) obtenido por un sistema de extracción continuo de dos fases, el cual, se seca con aire caliente a 400 °C y se somete a una segunda extracción con n-hexano generando, por un lado aceite de orujo y por otro alpeorujo seco y extractado.

Antes de su utilización, el alpeorujo se esterilizó mediante autoclave. Se realizaron 3 ciclos de 20 min a 120 °C y se conservó a 4 °C hasta su posterior uso.

1.2. Extracción acuosa del alpeorujo

Se realizó una extracción acuosa del alpeorujo mediante un extractor rotativo orbital. Para ello, se mezclaron 300 g de alpeorujo seco y extractado con 600 ml de agua (1:2 p/v) durante 8 h obteniéndose un extracto acuoso (**ADOR**) y un sólido extractado. Tras el proceso de extracción, la mezcla se filtró a través de una gasa, se centrifugó a 8.000 xg durante 10 min y el sobrenadante se filtró con papel de filtro. El extracto acuoso resultante se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso.

El ADOR presenta las características analíticas descritas a continuación:

Composición	Concentración (g/l)
COT	55,7
P	0,39
Ca	0,87
K	7,7
Mg	0,22
Na	0,043
S	0,16
B	0,0083
Cu	0,0015
Fe	0,025
Mn	0,0034
Zn	0,0046
pH	5,3

2. Hongos saprobios

2.1. Tipos y características de los hongos saprobios utilizados

Para los ensayos, se seleccionaron 4 especies de hongos en base a su hábitat natural: hongos saprobios del suelo y hongos saprobios de la madera. Como hongo saprobio del suelo se utilizó: *Penicillium chrysogenum-10* y los hongos de la madera fueron: *Coriopsis rigida*, *Trametes versicolor* y *Pycnoporus cinnabarinus*.

Especie/cepa	Procedencia	Referencias
<i>P. chrysogenum-10</i>	Aislado de suelo de castañar	Thom, 1910/EEZ 10
<i>C. rigida</i>	Aislado de madera de haya	Berk y Mont.Murill,1908/CECT 20449
<i>T. versicolor</i>	Aislado de madera de haya	(L.) Lloyd, 1921/A 136
<i>P. cinnabarinus</i>	Aislado de madera de haya	(Jacq.) Fr. 1881/CECT 20448

2.2. Medios y condiciones de cultivo de los hongos saprobios

El cultivo de hongos saprobios se efectuó en medios de cultivo esterilizados en autoclave a 120 °C durante 20 min. Los hongos saprobios se inocularon en placas Petri con medio MEA (Extracto de Malta) al que se le añadió estreptomicina (5 µg/l) y tetraciclina (2,5 µg/l) previamente esterilizados con filtros Millipore® de 0,2 µm de tamaño de poro. Las placas inoculadas se incubaron a 28 °C en oscuridad durante una semana aproximadamente y posteriormente se guardaron a 4 °C hasta su uso.

Medio MEA	
Composición	Concentración g/l
Extracto de Malta	2
Peptona	2
Glucosa	1
Agar	0,125
pH	4,7

3. Hongos arbusculares

Como hongo micorrícico arbuscular (MA) se empleó la especie *Glomus mosseae*, cuya procedencia y referencias se expone a continuación:

Especie	Procedencia	Referencia
<i>Glomus mosseae</i>	Rothamsted Experimental Station (UK)	(Nicol. and Gerd.) Gerdemann and Trappe (BEG 12)

El inóculo utilizado estaba formado por una mezcla de suelo, esporas, micelio y fragmentos de raíces micorrizadas. El inóculo presentó: 25-30 esporas/g y 60-75% de longitud de raíz infectada. La inoculación se realizó añadiendo 8 g de inóculo por maceta y mezclándolo de forma homogénea con el sustrato.

4. Transformación del extracto acuoso de alpeorujó por hongos saprobios

4.1. Obtención de inóculos

Los hongos saprobios se cultivaron en matraces de 250 ml que contenían 70 ml de Extracto de Malta Broth. Los medios se esterilizaron a 120 °C durante 20 min y cada matraz se inoculó con 2 cuadrados 0,5×0,5 cm de medio MEA con los hongos objeto de estudio, y se dejaron crecer a 28 °C durante 7 días en agitación a 80 rpm. Transcurrido ese tiempo, el micelio del hongo se trituró por medio de un homogeneizador Ultra turrax (Ika-Weir, Alemania) y la suspensión obtenida se centrifugó a 8.000 xg durante 20 min. Tras la centrifugación se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 25 ml de agua estéril. La incubación de los extractos de alpeorujó con los hongos objeto de estudio se realizó con 2,5 ml de este inóculo.

4.2. Medios y condiciones para la transformación del extracto acuoso de alpeorujó

Matraces de 250 ml que contenían 70 ml de Medio Basal (MB) (Czapek-Dox modificado) estéril se inocularon con 2,5 ml del inóculo anteriormente descrito. A los 3 días de cultivo a cada matraz se le añadió una solución de CuSO₄ (500 µM concentración final) con objeto de inducir la producción de enzimas ligninolíticas, fundamentalmente lacasas, y se dejó crecer a 28 °C durante 15 días en agitación a 80 rpm. Tras los 15 días de crecimiento de los hongos saprobios en el medio MB, el cultivo se suplementó con 70 ml del extracto acuoso de alpeorujó y se mantuvo a 28 °C durante 15 días en agitación a 80 rpm.

Finalizado el proceso de incubación, el medio de cultivo fúngico con extracto acuoso de alpeorujó se filtró por medio de filtros estériles de papel a fin de eliminar el micelio de los hongos. El sobrenadante obtenido se autoclavó durante 20 min a 120 °C y posteriormente se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Medio Basal

Composición	Concentración g/l
Glucosa	10
Tartrato amónico	2
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
KCl	0,5
Extracto de levadura	1
Peptona	1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,125
Solución mineral	1 m/l

Solución mineral

Composición	Concentración g/l
B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	100
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	70
FeSO ₄ ·7H ₂ O	50
CuSO ₄ ·5H ₂ O	10
MnSO ₄ ·4H ₂ O	10
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	10

4.3. Determinación de los compuestos fenólicos del extracto acuoso de alpeorujó transformado por hongos saprobios

4.3.1. Cuantificación fenoles totales

El contenido de fenoles totales del extracto acuoso de alpeorujó (ADOR) se realizó mediante una determinación colorimétrica por el método de Ribereau-Gayon (1968) basado en la reducción en medio alcalino de una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfowolfrámico (Reactivo de Folin-Ciocalteu) por los compuestos fenólicos y la consiguiente formación de óxidos azules de wolframio y molibdeno que absorben luz en una franja de 620 a 750 nm.

La cuantificación de fenoles del ADOR se llevó a cabo en tubos Eppendorf con 245 μl de agua a los que se le añadieron 5 μl del extracto del alpeorujó o de la solución de ácido tánico utilizada como curva patrón (0 a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La reacción se inició añadiendo 125 μl de reactivo de Folin-Ciocalteu y 650 μl de Na_2CO_3 al 20% (p/v). Tras 35 min de incubación a temperatura ambiente se midió la absorbancia de la mezcla de reacción en el espectrofotómetro a 725 nm. Los datos obtenidos se expresaron en g de fenoles por kg de alpeorujó.

4.3.2. Determinación cualitativa y cuantitativa de los fenoles simples del extracto acuoso de alpeorujó transformado por hongos saprobios

Se determinó la composición fenólica cualitativa y cuantitativa del extracto acuoso de alpeorujó mediante un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrofotómetro de masas. Para la identificación de los fenoles del extracto acuoso se utilizaron columnas de extracción en fase sólida (SPE) C18 (Waters) y se siguió el método descrito por Guillén *et al* (1997). Para ello, se hizo pasar 1,5 ml de la muestra acuosa que posteriormente se eluyó en 500 μl de metanol para poder ser analizada por el cromatógrafo de gases. A continuación, la muestra se secó en corriente de N_2 puro y en campana de gases hasta tener la certeza de que no existía traza alguna de metanol. Posteriormente a la muestra se le añadió 100 μl de acetato de etilo (Panreac (PAR) PAI) y 100 μl de reactivo de derivatización 99% N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoro-acetamida con 1% trimetil-clorosilano (Sigma-Aldrich 10 x 1 ml). Se agitó durante 2 min (en vial cerrado para evitar la humedad atmosférica) para que se produzcan los compuestos derivados (TMS) y posteriormente se trasladó a un vial para su inyección en el GC-MS.

Los análisis se realizaron en la unidad de cromatografía de gases de los Servicios de Instrumentación Científica de la Estación Experimental del Zaidín. Para el análisis cualitativo y cuantitativo se utilizó un equipo de Cromatografía de Gases con detector de Espectrometría de Masas CG modelo Varian 450-GC con inyector modelo 1079. El espectrómetro de masas utilizado fue de trampa de iones modelo Varian 240-IT MS con ionización por impacto electrónico (EI) e ionización química (CI +). El cromatógrafo de gases está equipado con una columna capilar Factor VF-5ms 30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm . Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las siguientes: el volumen de inyección fue de 1 μl en modo splitless durante

5 min y la temperatura del inyector se seleccionó a 250 °C. El programa de temperatura empleado fue el siguiente: una rampa inicial de 6 °C por min en un intervalo de temperatura de 90-220 °C durante 5 min. Se continuó con una rampa de 10 °C por min en un intervalo de 220-290 °C manteniéndolo durante 1,23 min y finalmente una rampa de 40 °C en un intervalo de 290 °C-310 °C durante 7,5 min. Como gas portador se empleó Helio a flujo constante de 1 ml/min. La detección de masas se realizó en modo ionización interna por Impacto Electrónico (IE). La temperatura de la línea de transferencia se seleccionó a 280 °C y la de la trampa a 240 °C. El registro de masas se realizó en modo Full Scan en el rango de 70 a 600 m/z. Posteriormente, para la confirmación de las estructuras químicas y para la cuantificación se trabajó sobre los cromatogramas en modo SIM con las masas y los tiempos de retención que se muestran a continuación.

Compuesto derivado (TMS)	Tiempo retención (min)	m/z
Tirosol	18,30	17
Hidroxitirosol	21,94	267, 370
Acido vainílico	22,03	297, 312
Acido protocatecuico	22,95	193,2; 370,3
Acido p-cumárico	25,05	219,2; 293,3; 249,2; 308,3
Acido gálico	25,19	281,3; 458,4
Acido siríngico	24,31	253,3; 297,3; 312,3; 327,3; 2,3
Acido cafeico	27,97	219,2; 396,4

4.4. Determinaciones enzimáticas del extracto acuoso de alpeorajo

4.4.1. Actividades ligninolíticas

Lacasa

La actividad lacasa (EC 1.10.3.2) se midió según el método propuesto por Saparrat *et al.* (2000) usando como sustrato el 2,6-dimetoxifenol (DMF).

Esta actividad se valoró midiendo la oxidación de dicho sustrato como el incremento lineal de la absorbancia en un espectrofotómetro a 469 nm ($\epsilon_{469}=27.500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

La actividad se expresó en unidades internacionales por ml definiendo la unidad enzimática como la cantidad de enzima producida por μmol de sustrato consumido por min.

La mezcla de reacción por orden de aplicación contenía:

Actividad lacasa		
Composición	Concentración	μl
Tampón acetato sódico pH 5	200 mM	500 μl
DMF	50 mM	100 μl
Muestra		100 μl
Agua		380 μl

Manganeso peroxidasa

La actividad Mn peroxidasa (EC 1.11.1.13) se determinó por el método descrito por Périé y Gold (1991) modificado. Esta enzima cataliza la reacción de oxidación del Mn^{2+} a Mn^{3+} dependiente de H_2O_2 oxidando así una amplia variedad de compuestos de naturaleza fenólica y no fenólica.

La mezcla de reacción para la determinación de la actividad contenía:

Actividad Mn peroxidasa		
Composición	Concentración	μl
Tampón malonato sodico pH 4.5	100 mM	500 μ l
Mn^{2+}	0.1 mM	10 μ l
Muestra		50 μ l
Agua		415 μ l
H_2O_2	10 mM	10 μ l

Esta actividad midió la oxidación del Mn^{2+} como el incremento lineal de absorbancia a 270 nm. La actividad se expresó en unidades internacionales por ml definiendo la unidad enzimática como la cantidad de enzima producida por μ mol de sustrato consumido por min y se utilizó el coeficiente de extinción molar para el Mn^{3+} ($\epsilon_{270} = 11,59 M^{-1} cm^{-1}$).

Lignina peroxidasa

La determinación de la actividad Li peroxidasa (EC 1.11.1.14) se llevó a cabo por el método descrito por Tien y Kirk (1983). Esta enzima es una oxido-reductasa que cataliza la oxidación del alcohol veratrílico a alcohol veratraldehído dependiente de H_2O_2 . La mezcla de reacción contenía la siguiente mezcla:

Actividad Li peroxidasa		
Composición	Concentración	µl
Tampón tartrato pH 3	100 mM	500 µl
Alcohol veratrílico	0.5 mM	100 µl
Muestra		100 µl
Agua		290 µl
H ₂ O ₂	10 mM	10 µl

La reacción se midió a 310 nm y la actividad enzimática se expresó en unidades internacionales por ml definiendo la unidad enzimática como la cantidad de enzima producida por µmol de sustrato consumido por min y se utilizó el coeficiente de extinción molar para el alcohol veratrílico ($\epsilon_{310} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.4.2. Actividades hidrolíticas

Para la determinación de las actividades enzimáticas endohidrolíticas se utilizó el método de viscosimetría de Rejón-Palomares *et al.* (1996), basado en la valoración de la pérdida de viscosidad de la mezcla de la reacción como consecuencia de la acción hidrolítica del enzima en las partes internas de las cadenas, que causan una despolimerización y por lo tanto una pérdida de viscosidad.

La reacción se llevó a cabo a 37 °C en un volumen de reacción de 1 ml de los diferentes sustratos para cada una de las distintas actividades y 200 µl de muestra. Como sustratos enzimáticos se emplearon pectina cítrica (Sigma-Aldrich), carboximetilcelulosa de alta viscosidad (Sigma-Aldrich) y xiloglucano (Rejón-Palomares *et al.*, 1996) respectivamente para la determinación de las actividades endopolimetilgalacturonasa (endo-PMG; EC 3.2.1.15), endoglucanasa (endo-GN; EC 3.2.1.4) y endoxiloglucanasa (endo-XG). Estos sustratos se disolvieron en tampón cítrico fosfato 50 mM a pH 5 en proporciones 0,5% para las actividades endoglucanasa y endoxiloglucanasa y 1% para la actividad endopolimetilgalacturonasa. La reacción se inició contabilizando la pérdida de viscosidad de la mezcla de reacción a tiempo 0 y transcurridos 30 min. La viscosidad se midió en una jeringa de 1 ml y se contabilizó el tiempo que tardaba en bajar 500 µl de la mezcla de la reacción. La actividad enzimática se calculó en base al porcentaje de disminución de la viscosidad de la disolución del sustrato respecto al

tiempo. Esta actividad se expresó en unidades internacionales, definida como la actividad relativa (A.R.) por g de alpeorujos a los 30 min de reacción. El cálculo de actividad relativa se realizó en función de las siguientes relaciones matemáticas y de las medidas de T_0 y T_x .

$$A.R = \frac{1}{T_{50}} \cdot 1000$$

$$T_{50} = \frac{50 \cdot T_x}{\%X}$$

$$\%X = \frac{T_0 - T_x}{T_0} \cdot 100$$

Donde:

$\%X$ = pérdida de viscosidad de la mezcla de reacción a un tiempo x de reacción.

T_0 = viscosidad de la mezcla de reacción a tiempo 0.

T_x = viscosidad de la mezcla de reacción a tiempo 30 min.

T_{50} = tiempo necesario para alcanzar un pérdida de viscosidad de la mezcla de reacción del 50% a 30 min.

5. Efecto del extracto acuoso de alpeorujos transformado por hongos en la germinación de semillas de tomate

Se utilizaron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. var. Muchamiel) esterilizadas previamente en superficie con alcohol etílico de 96 ° durante 4 min y en agitación. Transcurrido este tiempo se lavaron con abundante agua destilada para eliminar los posibles restos de alcohol y se sumergieron de nuevo en una solución de hipoclorito sódico al 20% durante 20 min. Posteriormente, se realizaron varios lavados con agua destilada y se dejaron en imbibición (agitación y aireación) durante aproximadamente 1-2 h.

Tras la esterilización de las semillas, se transfirieron a placas Petri de 14 cm de diámetro con papel de filtro humedecido con 10 ml de agua usada como control o extracto acuoso de alpeorujos a dosis del 1,25, 2,5 y 5% (v/v). Las semillas se germinaron en una estufa a 27 °C en oscuridad durante 72 h. La germinación se

realizó en presencia del extracto acuoso de alpeorajo sin transformar y transformado con los siguientes los hongos saprobios: *P. chrysogenum-10*, *C. rigida*, *T. versicolor* y *P. cinnabarinus*. Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento.

Tras la germinación de las semillas, se determinaron parámetros de crecimiento, así como localizaciones mediante técnicas microscópicas. Posteriormente las raíces se cortaron, congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso para la realización de determinaciones analíticas y bioquímicas.

Parámetros de crecimiento:

- % de germinación
- Índice de germinabilidad

Técnicas microscópicas:

- Localización de O_2^- y H_2O_2 en raíces intactas “*in vivo*”
- Fluorescencia endógena de raíces

Marcadores de estrés oxidativo y sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos:

- Peroxidación de lípidos (MDA)
- Actividad superóxido dismutasa (SOD)
- Actividad catalasa (CAT)
- Actividad ascorbato peroxidasa (APX)
- Actividad glutatión reductasa (GR)
- Actividad glutatión-S-transferasa (G-S-T)
- Actividad peroxidasa (PODs)
- Actividad coniferil alcohol peroxidasa (CAPOD)
- Fenoles totales
- Capacidad Antioxidante: FRAP y DPPH.

6. Efecto del extracto acuoso de alpeorujó transformado por hongos en el crecimiento de plantas de tomate

6.1. Cultivos en macetas

Se utilizaron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. var. Muchamiel) esterilizadas tal y como se detalla en el apartado anterior, y germinadas a 27 °C en oscuridad. Las semillas germinadas se transfirieron a semilleros con vermiculita y se crecieron en un invernadero bajo condiciones ambientales controladas (70%-80% de humedad relativa, temperaturas día/noche de 25/15 °C, un fotoperiodo de 16 h y una intensidad luminosa de 460 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) durante aproximadamente 15 días. Tras los 15 días de crecimiento, las plántulas de tomate seleccionadas en base a la homogeneidad de tamaño se trasplantaron a macetas de 300 ml de capacidad con una mezcla suelo:arena en una proporción 2:3 (v/v). El suelo utilizado como soporte para el cultivo, procedió de la finca experimental de la EEZ con sede en Armilla, CSIC, Granada, con las siguientes características físico-químicas:

Características analíticas del suelo empleado	
Composición	Concentración
Arena	35,8%
Arcilla	20,6%
Limo	43,6%
Materia orgánica	1,8%
Nitrógeno	0,3 mg/kg
Fósforo	6,2 mg/kg
Potasio	132 mg/kg
pH	8,1

Este suelo, antes de ser utilizado se tamizó dos veces; en el primer tamizado se utilizó una criba de 1 cm de luz de maya para eliminar las partes más gruesas, y en el segundo se utilizó una de 4 mm de luz de maya, obteniendo un suelo en condiciones óptimas para el cultivo de las plantas. Posteriormente, el suelo se mezcló con arena de cuarzo, previamente lavada, en una relación 2:3 (v/v) y a continuación, la mezcla se esterilizó por autoclave mediante 3 ciclos de 20 min a 120 °C. Al suelo empleado para los tratamientos control del experimento de micorrización, se aplicó un filtrado de una suspensión acuosa de suelo procedente del inóculo de hongos MA para restituir el componente biológico del suelo libre de propágulos de micorrizas.

Durante todo el crecimiento, las plantas recibieron un aporte semanal de 10 ml de solución nutritiva Hewitt (Hewitt, 1966). La composición varió en función del tratamiento, así para los tratamientos con micorrizas la cantidad de fósforo añadido fue menor (0,5 g/l) que para los controles no inoculados. La composición de la solución nutritiva es la siguiente:

Composición	Concentración (g/l)	ml/l solución
KNO ₃	30,3	10
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	70,8	10
MgSO ₄ ·7H ₂ O	18,4	20
Fe(II)-EDTA	2,5	10
MnSO ₄ ·7H ₂ O	2,2	1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,4	0,1
ZnSO ₄ ·2H ₂ O	2,9	0,1
H ₃ BO ₃	18,9	0,1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,3	0,1
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	20,8	10
pH		7

Las plantas de tomate se trataron con extracto acuoso de alpeorujó a los 2 ó 3 días después del trasplante de las plantas del semillero a la maceta, y se mantuvieron durante 4, 10 y 30 días de cultivo. En el caso de plantas de tomate micorrizadas la exposición al extracto acuoso fue de 45 días. El extracto sin transformar y transformado con los hongos saprobios *P. chrysogenum-10* y *C. rigida* se aplicó a la dosis del 5%. El diseño experimental consistió en un bloque aleatorio de cuatro tratamientos y 10 plantas por tratamiento dispuestas en macetas independientes.

Finalizada la exposición de las plantas de tomate al extracto acuoso de alpeorujó, la raíz y las hojas se cosecharon y parte de este material se destinó a realizar determinaciones fisiológicas. El resto del material se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C hasta su uso para las determinaciones bioquímicas. En los experimentos con micorrizas parte del material radical se destinó a la tinción para la cuantificación del % de micorrización.

Parámetros fisiológicos:

- Biomasa
- Crecimiento relativo
- Eficiencia fotosintética
- Clorofilas y carotenoides
- Contenido hídrico
- Análisis morfológico en raíz
- Contenido en lignina

Marcadores de estrés oxidativo y sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos:

- Peroxidación de lípidos (MDA)
- H₂O₂
- Actividad superóxido dismutasa (SOD)
- Actividad catalasa (CAT)
- Actividad ascorbato peroxidasa (APX)
- Actividad dehidroascorbato reductasa (DHAR)
- Actividad monodehidroascorbato reductasa (MDHAR)
- Actividad glutatión reductasa (GR)
- Actividad glutatión-S-transferasa (G-S-T)
- Actividad peroxidasa (PODs)

- Actividad coniferil alcohol peroxidasa (CAPODs)
- Actividad ferúlico peroxidasa (FePODS)
- Ascorbato y Glutation
- Capacidad Antioxidante: TEAC
- Fenoles totales y solubles

6.2. Tinción y cuantificación de las micorrizas en raíces

Las raíces micorrizadas se tiñeron mediante el método desarrollado por Phillips y Hayman (1970). Para ello, las raíces lavadas y troceadas se sumergieron en una solución de KOH al 10% durante 30 min a 100 °C al baño maría. Este tratamiento permite la digestión de las paredes y cubiertas celulares de la raíz. A continuación se lavaron las raíces con abundante agua corriente para eliminar los restos de KOH y se sumergieron en HCl 0,1 N durante 3 min a temperatura ambiente con objeto de neutralizar y preparar las raíces para la entrada del colorante. Finalmente, las raíces se tiñeron con una solución de fuscina al 0,05% en ácido láctico durante 10 min a 100 °C. La fuscina, es un colorante que tiñe las estructuras que contienen quitina, principal componente de las paredes celulares de algunos hongos, como los hongos MA, observándose los componentes fúngicos en el interior de la raíz sin que ésta se coloree. Una vez teñidas las raíces, se les eliminó el exceso de colorante y se conservaron en ácido láctico para su posterior evaluación en una lupa binocular.

La cuantificación de la colonización micorrízica se realizó usando la técnica descrita por Giovannetti y Mosse (1980). Para ello, los fragmentos de las raíces teñidas se extienden al azar sobre una placa dividida en 10 cuadrículas de 1,3 cm observándose a la lupa el número de intersecciones de las raíces micorrizadas y no micorrizadas con las cuadrículas de la placa. El porcentaje de micorrización se define como el porcentaje de intersecciones que presentan micorrización respecto al total de las intersecciones.

7. Determinaciones fisiológicas

7.1. Porcentaje de germinación e índice de germinabilidad

Para la determinación del porcentaje de germinación se realizó un recuento del número de semillas germinadas y no germinadas. El porcentaje de germinación se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ germinación} = \frac{\text{N}^\circ \text{ semillas germinadas (extracto)}}{\text{N}^\circ \text{ semillas germinadas (control)}} \times 100$$

Para determinar el índice de germinabilidad (IG) se contabilizó el número de semillas germinadas por placa y se determinó la longitud de las raíces mediante un escalímetro.

El porcentaje del índice de germinación (IG), se determinó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{IG} = \frac{\text{Porcentaje de germinación} \times \text{Longitud radicular (extracto)}}{\text{Porcentaje de germinación} \times \text{Longitud radicular (control)}} \times 100$$

Donde:

G y G₀ = n° semillas germinadas en el extracto y el control

L y L₀ = es la medida de la longitud radicular en el extracto y en el control.

7.2. Biomasa

Tras la cosecha del material vegetal, se separó el sistema radical de la parte aérea. Ambas partes se lavaron con abundante agua corriente y posteriormente se les determinó tanto el peso húmedo como el seco. Para la determinación del peso seco se secó la raíz y parte aérea a 70 °C durante 48 h.

7.3. Crecimiento relativo

La tasa de crecimiento relativo (RGR) se determinó utilizando el incremento de peso seco de las plantas, tanto de raíz como de hoja, a lo largo del tiempo desde el inicio hasta el final del experimento. Para ello se empleó la siguiente ecuación (Bellaoui y Brown, 1998):

$$\text{RGR} = \frac{\ln \text{Ps final} - \ln \text{Ps inicial}}{T_{\text{final}} - T_{\text{inicial}}}$$

7.4. Contenido hídrico relativo

El contenido hídrico relativo (CHR) en la parte aérea y raíz de las plantas, se determinó en el momento de la cosecha siguiendo el método de Barrs y Weatherley (1962). Para ello, se pesaron las plantas (PF), y posteriormente, se depositaron en una placa Petri con agua destilada durante 3 h bajo una luz fluorescente de 40 W a 25 °C y transcurrido este tiempo se tomaron los pesos turgentes (PT). Finalmente, se secaron las plantas en un horno a 60 °C durante 24 h para así obtener los pesos secos (PS). El contenido relativo de agua se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{CHR} = \frac{\text{PF} - \text{PS}}{\text{PT} - \text{PS}}$$

7.5. Eficiencia fotosintética

El método utilizado para determinar la eficiencia fotosintética fue el descrito por Oxborough y Baker (1997). Este método cuantifica la eficiencia del fotosistema II (PS 680) mediante la emisión de fluorescencia emitida por la excitación de la clorofila *a* por los fotones de luz. La captación de la fluorescencia de la clorofila *a* es recogida mediante un fluorímetro FluorPen FP100 (Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic). Este fluorímetro nos permite conocer la eficiencia máxima del fotosistema II (PSII) a través del parámetro QY (Photosystem II quantum yield). El parámetro QY es extrapolado a partir de la relación entre (Fv/Fm) en muestras adaptadas a la luz.

Donde:

- $F_v = F_m - F_o$
- F_m , corresponde con la máxima intensidad de fluorescencia emitida por la clorofila *a*.
- F_o , es la intensidad de fluorescencia emitida a 50 μ s por la clorofila.

Se realizaron de 2-3 determinaciones por maceta por cada uno de los tratamientos. Estas determinaciones, siempre se efectuaron en las mismas hojas.

7.6. Análisis morfológico de la raíz

Para analizar el sistema radical, las raíces de cada una de las plantas se separaron de la parte aérea y se lavaron con abundante agua corriente hasta que quedaron sin restos de partículas. Posteriormente, se digitalizó la imagen del sistema radical al completo en un escáner (EPSON V700/V750 1.8 V.3.4). Esta se procesó mediante un analizador de imágenes denominado WinRhizo. A partir de este software se obtuvieron los parámetros de: longitud, volumen, área, n° de ápices y diámetro radical.

7.7. Detección histoquímica del $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2

La visualización celular del H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ se llevó a cabo mediante el método descrito por Rodríguez-Serrano *et al.* 2006 basado en la detección de las ROS mediante el uso de fluorocromos específicos como el DCF-DA (peróxido de hidrógeno) y DHE (radical superóxido) que son capaces de atravesar las membranas biológicas y reaccionar con dichas ROS produciendo fluorescencia. Para llevar a cabo este método se cortaron fragmentos de raíces de aproximadamente 20 cm desde el ápice y posteriormente se incubaron durante 30 min a 37 °C y en oscuridad con 30 μ M de DCF-DA y 15 μ M DHE en 10 mM de tampón Tris-HCl pH 7.4. Posteriormente, las raíces se lavaron durante 10 min con el mismo tampón de incubación y tras el lavado se visualizaron las ROS mediante un microscopio de fluorescencia (Axioplan-Zeiss microscope). Como control negativo las raíces se

incubaron previamente durante 1 h y en oscuridad con 1 mM de ASC (actúa eliminando todo el H₂O₂) y 1 mM de TMP (elimina todo el radical superóxido).

8. Determinación de actividades enzimáticas

8.1. Obtención de extractos enzimáticos

Tras la germinación de las semillas de tomate, las raíces se separaron del hipocotilo con un bisturí y se trituraron en un mortero hasta que el tejido presentó un aspecto homogéneo. Las raíces se mezclaron con un tampón de extracción a 4 °C en una relación 1:2 (p/v). La composición del tampón de extracción fue: tampón fosfato-potásico 50 mM pH 6,0, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, β-mercaptoetanol 1 mM y PVPP 1% (p/v). Tras la homogenización, los extractos se filtraron con capas de nailon y se centrifugaron a 30.000 xg durante 30 min a 4 °C. Con el sobrenadante obtenido se realizaron las distintas determinaciones bioquímicas.

El material vegetal (raíz y hoja) se homogeneizó en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido hasta que el tejido presentó un aspecto homogéneo. El material se mezcló con tampón de extracción en una relación 1:3 (p/v) para las hojas y de 1:2 (p/v) en el caso de la raíz. La composición del tampón fue: tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,8, albúmina 1% y cisteína 0,5%. Tras la homogenización, los extractos se filtraron con capas de nailon y se centrifugaron a 20.000 xg durante 20 min a 4 °C.

Con el sobrenadante obtenido se llevaron a cabo las distintas determinaciones bioquímicas.

Las distintas determinaciones bioquímicas se realizaron utilizando los siguientes equipos espectrofotométricos: Beckman modelo UV-1700 Shimadzu, Beckman modelo DU 700 y Beckman modelo UV-1603 Shimadzu.

8.2. Superóxido dismutasa (SOD; EC 1.11.1.11)

8.2.1. Actividad total

La actividad SOD se midió según el método espectrofotométrico de McCord y Fridovich (1969) que se fundamenta en la medida de la tasa de inhibición, debida a la actividad SOD, de la reducción del citocromo *c* por los radicales O_2^- generados por el sistema xantina–xantina oxidasa. La reacción se llevó a cabo a 25 °C durante 2-3 min y la medida de la densidad óptica se efectuó a 550 nm con un espectrofotómetro.

La reacción se realizó en un volumen final de 1,5 ml de mezcla de reacción que contenía: tampón fosfato 50 mM, pH 7,8, citocromo *c* 13,5 μ M, Na_2EDTA 0,1 mM, xantina 96,7 μ M, 4-15 μ l de xantina oxidasa (XOD) (Roche: 20 U/ml; dil 1:50) y 25-100 μ l de muestra. En primer lugar se midió el estado de oxidación del citocromo *c*. Para ello, se añadió una pequeña cantidad de ditionito sódico a la mezcla de reacción sin XOD y se midió la absorbancia de la solución a 550 nm, que debe estar comprendida entre 0,20-0,24 unidades de absorbancia. Después se realizó la reacción control, con objeto de estimar el volumen de XOD necesario para lograr un incremento de densidad óptica de 0,025 unidades/min. Finalmente, se llevó a cabo la reacción problema, a la que se le añadió la muestra junto con la cantidad de XOD determinada en la reacción control, y se determinó el cambio de absorbancia a 550 nm durante 2 min.

Para calcular la actividad SOD total de la muestra en unidades SOD/ml, se aplicó la siguiente expresión, donde 1 unidad de actividad SOD es la cantidad de enzima necesaria para producir una inhibición del 50% en la tasa de reducción del citocromo *c* determinada en la reacción control (McCord y Fridovich, 1969).

$$\text{Unidades SOD/ml} = \frac{\% \text{ Inhibición}}{50 \%} \times \text{factor de dilución}$$

La actividad enzimática se expresó en U SOD por mg^{-1} de proteína.

8.2.2. Actividad isoenzimática

Para la separación e identificación de las isoenzimas SOD se aplicó el método fotoquímico de Beuchamp y Fridovich (1971), basado en la inhibición que la SOD produce en la reducción del NBT a azul de formazano por los radicales O_2^- . La separación de las isoenzimas se realizó mediante geles de poliacrilamida en condiciones nativas, tal y como se explica en el apartado 10.1.

8.3. Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6.)

Se empleó el método espectrofotométrico descrito por Beaumont *et al.* (1990) basado en la medida de la disminución de la absorbancia del H_2O_2 a 240 nm debido a su descomposición por efecto de la catalasa.

En una cubeta de cuarzo se añadieron 20-100 μ g de proteína a una mezcla formada por tampón fosfato 0,1 M a pH 7,0 y H_2O_2 18 mM. La reacción se midió durante 1 min a 25 °C en un espectrofotómetro. La actividad enzimática se expresó en nmol de H_2O_2 por mg^{-1} de proteína, calculándose a partir de la velocidad inicial de la reacción y de un coeficiente de extinción molar para el H_2O_2 de $\epsilon_{240}=23,5$ $mM^{-1} cm^{-1}$.

8.4. Ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11)

Para la determinación de la actividad APX se utilizó el método espectrofotométrico descrito por De Gara *et al.* (2003) basado en la medida de la oxidación a 290 nm del ascorbato (ASC) en presencia del H_2O_2 . La reacción se llevó a cabo a 25 °C en un volumen de reacción de 1 ml formado por tampón Tris-acetato 0,1 M pH 6,4, ascorbato 350 μ M, H_2O_2 170 μ M y 50-100 μ g de proteína.

La reacción se inició añadiendo H_2O_2 y se siguió el descenso de la absorbancia con un espectrofotómetro durante 1 min. La actividad enzimática, expresada en nmol de ácido ascórbico oxidado por mg^{-1} de proteína, se calculó aplicando un coeficiente de extinción molar para el ácido ascórbico de $\epsilon_{290}=2,75$ $mM^{-1} cm^{-1}$.

8.5. Glutation reductasa (GR; EC 1.6.4.2)

Se siguió el método de De Gara *et al.* (2003) que estima la actividad GR a través de la medida de la tasa de oxidación del NADPH necesaria para transformar el glutatión oxidado (GSSG) en glutatión reducido (GSH).

La reacción se llevó a cabo a 25 °C en un volumen de reacción de 1 ml con la siguiente composición: tampón fosfato 0,1 mM pH 7,2, GSSG 1 mM, NADPH 0,1 mM y 50-100 µg de proteína. La reacción se siguió durante 1 min midiendo la caída de la absorbancia del NADPH a 340 nm con un espectrofotómetro. La actividad enzimática expresada en nmol de NADPH oxidado por mg⁻¹ de proteína, se calculó a partir de la máxima pendiente obtenida y aplicando un coeficiente de extinción molar para el NADPH a 340nm $\epsilon_{340}=6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

8.6. Dehidroascorbato reductasa (DHAR; EC 1.8.5.1)

La actividad DHAR se determinó siguiendo el método descrito por De Gara *et al.* (2003), basado en la determinación del incremento de absorbancia a 265 nm debido a la formación del ascorbato (ASC) por medio de la DHAR durante 1 min con un espectrofotómetro.

La mezcla de reacción se llevó a cabo en 1 ml y a 25 °C con tampón fosfato 0,1 M pH 6,4, GSH 1 mM, dehidroascorbato (DHA) 1 mM y 50-100 µg de proteína. La actividad enzimática se expresó en nmol de DHA reducido a ASC por mg⁻¹ de proteína, aplicando el coeficiente de extinción molar para el DHA a 265 nm $\epsilon_{265}=14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

8.7. Monodehidroascorbato reductasa (MDHAR; EC 1.6.5.4)

Para el ensayo de la enzima MDHAR se siguió el método de De Gara *et al.* (2003), determinando la oxidación del NADPH a NADP⁺ a 340 nm, acoplada a la reacción de reducción del MDHA a ASC.

La mezcla de reacción se llevó a cabo en 1 ml y estaba formada por: tampón Tris-HCl 50 mM pH 8, NADH 0,1 mM, ASC 1 mM, 10 µl de ascorbato oxidasa comercial (Roche: 1653 U/mg proteína; 1,6 U en la mezcla de reacción) y 50-100

μg de proteína. La reacción se siguió durante 1 min en un espectrofotómetro. La actividad enzimática se expresó en nmol de NADH oxidado por mg^{-1} de proteína utilizando un coeficiente de extinción molar para el NADH a 340nm $\epsilon_{340}=6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

8.8. Glutation-S-transferasa (GST; EC 2.5.1.8)

Se siguió el método de Habig *et al.* (1974), que está basado en la determinación del complejo formado por el glutatión (GSH) y el compuesto 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB).

La reacción se llevó a cabo a 30 °C en un volumen de reacción de 1 ml formado por tampón fosfato 0,1 mM pH 7,8, GSH 1 mM, 50-100 μg de proteína y CDNB 1 mM preparado en etanol puro. La reacción se siguió durante 2 min midiendo la caída de la absorbancia del NADPH a 340 nm con un espectrofotómetro. La actividad enzimática se expresó en nmol del complejo GSH-CDNB por mg^{-1} de proteína, y se calculó a partir de la máxima pendiente obtenida y aplicando un coeficiente de extinción molar para dicho complejo a 340 nm $\epsilon_{340}=9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

8.9. Peroxidasas (POD; EC 1.11.1.7)

Para la determinación de la actividad peroxidasa (POD) se aplicó el método de Ferrer *et al.* (1990), consistente en registrar el incremento de absorbancia a 652 nm debido a la oxidación del TMB (3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina) en presencia de H_2O_2 por acción de las peroxidasas celulares.

La reacción se llevó a cabo a 25 °C y se desencadenó mediante la adición de H_2O_2 a una mezcla de reacción de 1 ml con tampón acetato sódico 50 mM pH 5, TMB 2 mg/ml, 50-100 μg de proteína y H_2O_2 0,1 mM. La reacción se registró durante 1 min utilizando un espectrofotómetro y la actividad enzimática, expresada en nmoles de TMB oxidado por mg de proteína, se calculó aplicando un coeficiente de extinción molar para el TMB oxidado de $\epsilon_{652}=26,9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

La coniferil alcohol peroxidasa PODs (CAPOD) y ferúlico peroxidasa (FePOD) se determinaron según los métodos propuestos por Quiroga *et al.*, 2001 y Sánchez *et al.*, 1996. Para ello se utilizaron los sustratos específicos de dichas

peroxidasas, el alcohol coniferílico y el ácido ferúlico, y se determinó su oxidación a 265 nm y 310 nm respectivamente.

Para la determinación de la CAPODS el volumen total de la mezcla de reacción fue de 3 ml y estaba formada por: tampón fosfato 50 mM pH 6, alcohol coniferílico 100 μ M, H₂O₂ 0,5 mM y 50-100 μ g de proteína. La reacción se registró durante 5 min utilizando un espectrofotómetro. La actividad enzimática se expresó en nmoles por mg⁻¹ de proteína utilizando un coeficiente de extinción molar para el alcohol coniferílico de $\epsilon_{652}=7,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La actividad FePODs se llevó a cabo en 1 ml de reacción y la mezcla estaba formada por: tampón fosfato 50 mM pH 4, ácido ferúlico 20 μ M, H₂O₂ 0,5 mM y 50-100 μ g de proteína. La actividad enzimática se expresó en nmoles por mg de proteína utilizando un coeficiente de extinción molar para el alcohol coniferílico de $\epsilon_{652}=11,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

9. Otras determinaciones bioquímicas

9.1. Peroxidación lipídica (MDA)

Se siguió el método de Buege y Aust (1978), basado en la cuantificación espectrofotométrica del complejo formado entre el ácido tiobarbitúrico y el malondialdehído (MDA) que resulta de la degradación de los ácidos grasos poliinsaturados a causa de su peroxidación.

Para el ensayo, se añadieron 200 μ l de muestra a 1 ml de mezcla de reacción con la siguiente composición: ácido tricloroacético 15% (p/v), ácido tiobarbitúrico 0,375 % (p/v), butilhidroxitolueno (BHT) 0,01% (p/v) y HCl 0,25 N. Los reactivos se prepararon en agua Milli-Q y el ensayo se llevó a cabo en tubos de cristal. La mezcla de la muestra con la solución reactiva se calentó a 100 °C durante 15 min. Una vez fría, la mezcla se centrifugó a 5.500 $\times g$, durante 5 min y se midió la absorbancia del sobrenadante a 535 nm utilizando un espectrofotómetro. Para determinar el contenido de MDA de las muestras en nmoles por mg⁻¹ de proteína, se preparó una curva patrón de MDA a partir de una solución madre de malondialdehído bis-dimetilacetal 100 μ M en agua ultrapura (Milli-Q) con las siguientes concentraciones: 0,1, 0,25, 1, 5 y 10 μ M. La concentración en MDA de las muestras problema se calculó interpolando los valores de absorbancia obtenidos a 535 nm, en la recta de regresión lineal obtenida con la curva patrón de MDA.

9.2. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Se siguió el método de Frew *et al.* (1983), que se basa en la cuantificación del H₂O₂ a través de la oxidación de la 4-aminoantipirina catalizada por una peroxidasa.

El ensayo se llevó a cabo en un volumen de reacción de 1 ml que estaba compuesto por 400 µl de solución reactiva, 5 µl de muestra y 595 µl de agua Milli-Q. La solución reactiva estaba compuesta por fenol al 0,234% (p/v), 4-aminoantipirina 0,1% (p/v), peroxidasa de rábano 20 nM, H₂O₂ 2,5 µM y tampón fosfato-potásico 0,1 M pH 6,9. Esta solución se incubó con las muestras (o con las distintas concentraciones de H₂O₂ de la curva patrón) a temperatura ambiente durante 5 min, y a continuación se midió la absorbancia a 505 nm frente a un blanco formado por solución reactiva y agua Milli-Q. Los resultados se extrapolaron a partir de una curva patrón de H₂O₂ (0, 4,75, 9,5, 14,25 y 19 µM) y se expresaron en µg por mg⁻¹ de proteína.

9.3. Actividad antioxidante total: Test FRAP, DPPH y TEAC

La actividad antioxidante no enzimática total se midió mediante los test: FRAP (Ferric Reducing Ability Plasma), DPPH (Dipicril-hidrazina) y TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).

Para la realización del **test del FRAP**, se añadieron 0,2 ml del extracto (0,2 g raíz/1 ml de metanol al 80%) a 2 ml de reactivo de FRAP (1 mM de 2,4,6-Tripiridil-2-triazina y 20 mM de cloruro férrico en 0,25 M de acetato sódico pH 3,6). Una vez realizada la mezcla se agitó en un vortex y se dejó incubar durante 5 min a temperatura ambiente, a continuación se midió la absorbancia a 593 nm. Los datos se extrapolaron a partir de una curva patrón de 25-1600 µM de ión ferroso (Rosales *et al.*, 2006) y se expresaron en µmol por g de pf.

El **test DPPH o de efecto detoxificador de ROS** se realizó según el método de Hsu *et al.* (2003). Se mezcló una alícuota de 0,5 ml de extracto con 2,5 ml de DPPH 0,1 mM (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) que se incubó durante 60 min en oscuridad y en frío. Transcurrido el tiempo de incubación se determinó la absorbancia a 517 nm. La cantidad de poder reductor se expresó directamente en unidades de absorbancia aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Efecto detoxificador (\%/gpf)} = [1 - (A_{517} \text{ muestra} / A_{517} \text{ blanco})] \times 100 \times (V_f / V_{\text{alícuota}} \text{ por g}^{-1} \text{ pf})$$

El **TEAC** se cuantificó mediante el método de Teow *et al.* (2007), para ello, se preparó una solución que contenía 7 mM de ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) con 2,45 mM de persulfato potásico con el fin de producir el catión $ABTS^+$. Esta mezcla se incubó durante 16 h en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente, la solución se diluyó con etanol hasta conseguir una absorbancia comprendida entre 0,2-0,9 a 730 nm de longitud de onda. Una alícuota de 20 μ l de muestra (extracto de hoja: 1 g/8 ml de metanol acidificado al 80%; extracto de raíz: 1 g/3 ml de metanol acidificado al 80%) se mezcló con 980 μ l de la mezcla de $ABTS^+$ obtenida, se agitó vigorosamente y tras 30 seg de incubación se registró la absorbancia a 730 nm. Los resultados se extrapolaron de una curva patrón de 0-15 μ M de trolox y se expresaron en μ moles por g^{-1} pf.

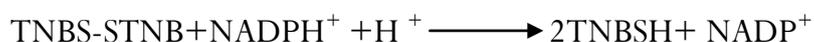
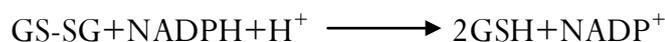
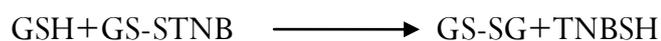
9.4. Contenido de ascorbato y glutatión

La determinación del contenido de ascorbato y glutatión se llevó a cabo utilizando el método colorimétrico descrito por de Pinto *et al.* (1999). A fin de obtener extractos desproteinizados, las muestras se homogeneizaron utilizando como tampón de extracción ácido metafosfórico al 5% a 4 °C a fin de evitar la oxidación del ascorbato y del glutatión. Los homogeneizados se centrifugaron a 18.000 $\times g$ durante 20 min y a 4 °C.

Para la determinación del **ascorbato total** (ASC+DHA) se prepararon dos series de tubos Eppendorf (1,5 ml), una serie destinada a la determinación del ASC y otra para la medida del DHA. La mezcla de reacción estaba formada por: 250 μ l de tampón fosfato-Na 150 mM pH 7,4, EDTA 5 mM y 100 μ l de extracto. A los tubos Eppendorf destinados a la medida del DHA se les añadió 50 μ l de DTT (Ditiotreitol) 10 mM, con el objeto de reducir todo el DHA presente en la muestra a ASC. Esta mezcla se agitó y se dejó incubar durante 15 min, transcurrido los cuales se añadieron otros 50 μ l de NEM (N-etilmaleimida) al 0,5% para eliminar los restos de DTT. A la otra serie destinada a la medida del ASC se le añadieron 100 μ l de agua destilada a fin de compensar el volumen. A las dos series de tubos Eppendorf se le añadieron 150 μ l de TCA al 10% (ácido tricloroacético), 200 μ l de ácido ortofosfórico al 44%, 200 μ l de α - α' dipiridil al 4% disuelto en etanol al 70% y 50 μ l de $FeCl_3$ disuelto en TCA al 10%. La mezcla de reacción se dejó incubar durante 40 min a 40 °C y posteriormente se realizó la lectura del ASC y DHA a 525 nm utilizando un espectrofotómetro. Para la cuantificación de ASC, los resultados se extrapolaron de una curva patrón de ácido ascórbico comercial (10-60 μ M). El contenido de DHA se obtuvo de la diferencia del ascórbico total y el valor de

ascorbato reducido obtenido y los resultados se expresaron como nmoles de ASC por g^{-1} pf.

Para la determinación del contenido de **glutation** se utilizó un método basado en la progresiva oxidación del glutatión en presencia del compuesto 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico) (TNBS-STNB) y la sucesiva reducción del glutatión a GSH en presencia de NADPH por medio de la glutatión reductasa como se explica en la siguiente reacción:



El compuesto TNBSH absorbe a 412 nm, y en el transcurso de la reacción espectrofotométrica se observa un incremento de la absorbancia que es proporcional a la concentración de GSH+GSSG presente en el extracto.

Al igual que para la determinación del ascorbato, para la determinación del glutatión se prepararon dos series de tubos Eppendorf (1,5 ml), una serie destinada a la medida del glutatión oxidado (GSSG) y otra serie para el glutatión total (GSH+GSSG). Para ello 400 μl de muestra se mezclaron con 600 μl de tampón fosfato 0,5 M pH 7,5. Para la determinación del GSSG, las muestras se derivatizaron añadiendo 20 μl de vinilpiridina y se incubaron durante 1 h. La vinilpiridina es un compuesto que se une a los grupos -SH bloqueándolos, por lo que imposibilita la lectura del GSH a esa longitud de onda y detecta solo el GSSG. A la otra serie de tubos Eppendorf se les añadió 20 μl de agua para compensar el volumen. El contenido de glutatión se determinó en 1 ml de mezcla de reacción que contenía: 100 μl de la muestra, tampón fosfato-Na 0,143 M pH 7,5, NADPH 0,2 mM, EDTA 5 mM, DTNB 0,6 mM y 3 U/ml de glutatión reductasa comercial (Sigma-Aldrich). Los resultados se expresaron como nmoles de GSH por g^{-1} pf.

9.5. Clorofilas y carotenoides

Para la determinación del contenido en clorofilas y carotenoides, las hojas se homogeneizaron con acetona al 80% utilizando una relación 1:8 (p/v) y la mezcla se centrifugó a 4.000 xg durante 20 min. Tras la centrifugación, 0,5 ml del sobrenadante se diluyó en agua destilada hasta un volumen final de 3 ml y a continuación se midió la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro a las longitudes de onda 663, 648 y 470 nm. Para la determinación de la concentración de clorofilas y carotenoides se aplicaron las siguientes fórmulas:

$$\text{Clorofila a (Chl a)} = (12,25 \times \text{Abs } 663) - (2,79 \times \text{Abs } 648)$$

$$\text{Clorofila b (Chl b)} = (21,50 \times \text{Abs } 648) - (5,10 \times \text{Abs } 663)$$

$$\text{Carotenoides} = \frac{(1000 \times \text{Abs } 470) - (1,82 \times \text{Chl a}) - (85,02 \times \text{Chl b})}{198}$$

Los resultados obtenidos se expresaron en μg por g^{-1} pf.

9.6. Determinación de fenoles

La determinación del contenido total de fenoles en raíz y en hoja, se realizó mediante colorimetría usando el método de Riberau-Gayon modificado (1968).

El material vegetal se homogeneizó con la ayuda de nitrógeno líquido y se extrajeron los compuestos fenólicos con metanol acidificado al 80% utilizando una relación 1:3 (p/v) para la raíz y 1:8 (p/v) para las hojas. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10.000 xg durante 20 min a 4 °C. Tras la centrifugación, se recogió el sobrenadante y una alícuota de 50 μl de muestra se mezcló con 100 μl de bicarbonato sódico al 5% (p/v) y con 50 μl de reactivo de Folin-Ciocalteu. La mezcla se dejó incubar durante 60 min en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se procedió a la lectura espectrofotométrica de los fenoles a 730 nm. El contenido total de fenoles se extrapolaró a partir de una curva patrón con ácido gálico (0-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se expresó como μg de ácido gálico por g^{-1} pf.

9.7. Lignina

La lignina se extrajo y cuantificó utilizando el método de Bruce y West (1989). Se homogeneizó el material vegetal con metanol acidificado al 80% en proporción 1:3 (p/v) para la raíz y 1:8 (p/v) para la hoja. El extracto se centrifugó a 4.000 xg durante 20 min y el pellet obtenido se transfirió a placas petri donde se dejó secar durante una noche a 4 °C. Se introdujeron 0,1 g de la muestra seca en tubos Eppendorf a los que se añadió 100 μ l de ácido tioglicólico y 1 ml de HCl 2 mM. Los tubos se sellaron y se incubaron durante 4 h a 100 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se enfriaron súbitamente en hielo, y el contenido se centrifugó a 14.000 xg durante 10 min. Tras la centrifugación, el sobrenadante se desechó y el pellet se lavó con 1 ml de agua destilada y de nuevo se centrifugó a 14.000 xg durante 10 min. Finalizado el proceso de lavado, el pellet se resuspendió en 1 ml de NaOH 0,5 M y la muestra se incubó en agitación y a temperatura ambiente durante toda la noche. Tras la incubación, la muestra se centrifugó a 14.000 xg durante 10 min y al sobrenadante se le añadió 200 μ l de HCl, a fin de precipitar el complejo lignina formado, y se incubó durante 4 h a 4 °C. Finalizada la incubación, la muestra se centrifugó a 14.000 xg durante 10 min y el pellet obtenido se resuspendió en 1 ml de NaOH 0,5 M y se procedió a la determinación espectrofotométrica de la lignina a 280 nm. El contenido de lignina se calculó en base al coeficiente de absorción molar del ácido tioglicólico ($\epsilon_{280}=17,87 \text{ g}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$) y se expresó en μ moles de ácido tioglicólico por g^{-1} pf.

9.8. Determinación de proteínas totales

Las proteínas totales se determinaron por el método espectrofotométrico de Bradford (1976) utilizando el reactivo comercial de Bio-Rad y albúmina de suero bovina como proteína de referencia para preparar la curva patrón. Los resultados se expresaron en μ g de proteína por ml de muestra.

10. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas (EPGA)

10.1. Detección de las actividades isoenzimáticas de SOD

Para la separación e identificación de las isoenzimas de la SOD se prepararon geles de 1,5 mm de grosor al 10% (p/v) de acrilamida y se sometieron a electroforesis en condiciones no desnaturizantes (Davies, 1964). La composición de los geles fue la siguiente:

Componentes	Gel Separador (2 geles)
Tampón Tris HCl 377 mM pH 8,9	16,7 ml
Acrilamida:Bisacrilamida 30%	8,3 ml
APS 7%	0,25 ml
TEMED	0,01 ml

La mezcla de acrilamida:bisacrilamida se desgasificó previamente, ya que el oxígeno puede actuar como agente inhibidor de la polimerización de la acrilamida, durante aproximadamente 10 min antes de añadir los inductores (APS y TEMED) de la polimerización del gel.

El tampón de electroforesis utilizado fue:

Componentes	Concentración
Tris HCl pH 8,2	5 mM
Glicina	38 mM

Las muestras se prepararon con glicerol al 10% y se cargaron directamente en el gel añadiendo 1 μ l de azul de bromofenol al 0,006% (p/v) a cada muestra.

La electroforesis se efectuó en una cubeta Mini-Protean II de Bio-Rad a 4 °C. Se utilizó una intensidad de 10 mA durante los primeros 30 min, y posteriormente 20 mA hasta que el azul de bromofenol alcanzó prácticamente el final del gel. Terminada la electroforesis, se procedió al revelado de los geles. Los geles se incubaron en oscuridad durante 20 min en NBT 2,45 mM preparado en tampón fosfato 50 mM pH 7,8. Después se incubaron en una solución de riboflavina 28 μ M y TEMED 28 mM en el mismo tampón fosfato durante 15 min también en oscuridad. Finalmente los geles en tampón fosfato 50 mM a pH 7,8 se expusieron a luz blanca durante 10-15 min hasta visualizar las bandas acromáticas en el gel de fondo azul.

11. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los distintos experimentos realizados se sometieron a un análisis de normalidad y homogeneidad de varianza (ANOVA). Los datos expresados en porcentaje se transformaron en el arco seno de su raíz cuadrada. Las barras de error en las gráficas representan la desviación estándar y las letras representan valores estadísticamente distintos entre tratamientos a lo largo del tiempo de exposición mediante el test de Tukey HSD para comparaciones múltiples ($p \leq 0.05$) y ** y * las diferencias significativas de los tratamientos respecto al control para cada tiempo de exposición según el test de Dunnett ($P < 0,01$ y $P < 0,01$ respectivamente).

Resultados

Capítulo I

Transformación del
alpeorrujo por hongos saprobios

Transformación del alpeorujó por hongos saprobios

Objetivo

Se ha puesto de manifiesto que el efecto fitotóxico del alpeorujó se debe principalmente a la presencia de compuestos fenólicos monoméricos aunque también se han encontrado indicaciones de que pueden estar implicados los restos de paredes celulares (Sampedro *et al.*, 2004b; Aranda *et al.*, 2004). Estudios realizados en nuestro laboratorio han señalado la capacidad biorremediadora del alpeorujó que presentan ciertas especies de hongos (Sampedro *et al.*, 2004a).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se planteó como objetivo de este capítulo el estudio de la implicación de algunos de los mecanismos enzimáticos que pueden estar implicados en la eliminación de la fitotoxicidad del alpeorujó después de su incubación con los hongos saprobios. Además se va a estudiar los cambios producidos en la composición fenólica del alpeorujó tras su transformación por los hongos saprobios. Para ello se utilizará el extracto acuoso de alpeorujó, ya que el fraccionamiento del mismo constituye una herramienta básica muy útil para realizar estudios sobre el efecto que pueden tener sus constituyentes tóxicos.

Metodología

Para llevar a cabo este experimento, se realizó una extracción sólido-líquido de alpeorujó seco y extractado mediante un extractor rotativo orbital con agua durante 8 h en una proporción 1:2 (p/v), previamente optimizado por Aranda, 2006. Tras la extracción, se obtuvo el extracto acuoso de alpeorujó (ADOR) que se utilizó para suplementar el medio de cultivo de los diferentes hongos seleccionados: *C. rigida*, *T. versicolor*, *P. cinnabarinus* y *P. chrysogenum*-10. Estos hongos se cultivaron inicialmente en extracto de malta durante 7 días a fin de obtener un preinóculo con una cantidad abundante de micelio fúngico. Este preinóculo sirvió para inocular matraces con medio MB a los que se añadió Cu, tras 3 días de cultivo, como inductor de la maquinaria enzimática necesaria para la reducción del contenido fenólico del ADOR, principalmente de la actividad lacasa (Díaz-Rodríguez, 2010). Tras 22 días de cultivo a 28 °C en agitación, el medio filtrado se empleó para el análisis de las actividades enzimáticas ligninolíticas lacasa (Lac), manganeso peroxidasa (MnP) y lignina peroxidasa (LiP). A los 18 días de cultivo de los hongos el medio MB se suplementó con 70 ml de ADOR y se mantuvo el cultivo durante 15 días en agitación. Durante este tiempo se realizaron extracciones periódicas del

ADOR incubado con los hongos para analizar la producción enzimática, tanto de las actividades ligninolíticas Lac, MnP y LiP como de las hidrolíticas endopolimetilgalacturonasa (endo-PMG), endoglucanasa (endo-GN) y endoxiloglucanasa (endo-XG). Además, se determinó el contenido fenólico por el método colorimétrico de Riberau-Gayón y por cromatografía de gases masas. Todas las determinaciones enzimáticas y de fenoles se realizaron siguiendo la metodología descrita en el capítulo general de Material y métodos.

Resultados

Cultivo de los hongos saprobios en medio MB

Actividad ligninolítica

En primer lugar se analizó la actividad ligninolítica de los hongos saprobios ensayados en medio basal a lo largo de su incubación para establecer el tiempo de producción máxima de dichas enzimas. Tras la incubación de los hongos saprobios en MB con Cu, como medio inductor de enzimas ligninolíticas, se detectó actividad lacasa en los hongos *C. rigida*, *T. versicolor* y *P. cinnabarinus*. La actividad de la enzima Lac incrementó a lo largo del tiempo aunque los niveles fueron diferentes para cada hongo ensayado. A los 10 días de incubación *C. rigida* ya mostró un incremento significativo en la producción de Lac con respecto al resto de los hongos, además, el nivel de actividad máxima tras 18 días de incubación fue de 13,40 U ml⁻¹, mientras *T. versicolor* y *P. cinnabarinus* alcanzaron valores de 2 y 0,68 U ml⁻¹ respectivamente. Cabe destacar que no se observó actividad lacasa en cultivos de *P. chrysogenum*-10. A partir de los 18 días de incubación se observó un descenso en la actividad Lac en todos los hongos estudiados (datos no mostrados), por lo que los 18 días de incubación se consideró como el tiempo óptimo para iniciar la fase de transformación del ADOR debido a la máxima actividad enzimática Lac detectada en los hongos. No se detectaron actividades MnP ni LiP en los medios de cultivo de los hongos *C. rigida*, *T. versicolor*, *P. cinnabarinus* y *P. chrysogenum*-10 (datos no mostrados).

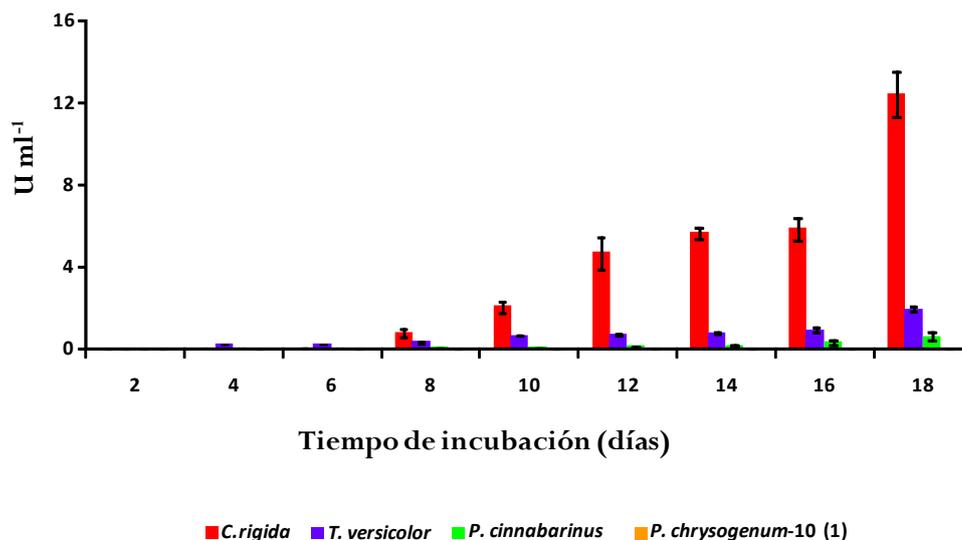


Figura 1. Actividad lacasa de los hongos *C. rigida*, *T. versicolor*, *P. cinnabarinus* y *P. chrysogenum-10* crecidos en MB. Los datos se representan como el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar. (1) = actividad Lac no detectada.

Cultivo de los hongos saprobios en ADOR

Actividades ligninolíticas e hidrolíticas

Tras añadir ADOR al medio MB e incubarlo durante 15 días con los hongos seleccionados se determinaron las actividades ligninolíticas (Lac, MnP y LiP) e hidrolíticas (endo-PMG, endo-GN y endo-XG), representadas en la Fig. 2 (a y b). Los resultados muestran la actividad de Lac en el extracto acuoso de alpeorujos por los hongos *C. rigida*, *T. versicolor* y *P. cinnabarinus*, aunque el nivel de actividad fue sensiblemente menor que el observado en medio MB. Al igual que ocurría en el medio MB, *C. rigida* crecido en presencia de ADOR durante 15 días fue el que mostró mayores niveles de actividad Lac, en torno a las 2 U ml⁻¹, respecto a la producción de *T. versicolor* y *P. cinnabarinus*, que fue de 0,04 y 0,23 U ml⁻¹ respectivamente. No se detectó actividad Lac por parte de *P. chrysogenum-10*. Cabe destacar que la incubación de los hongos en el ADOR no determinó un incremento de actividad lacasa en el tiempo, a diferencia de lo observado en el cultivo de los hongos en medio MB. Al igual que en medio MB no se detectó producción de actividad MnP ni LiP en ninguno de los hongos utilizados en presencia de extracto acuoso de alpeorujos (datos no mostrados).

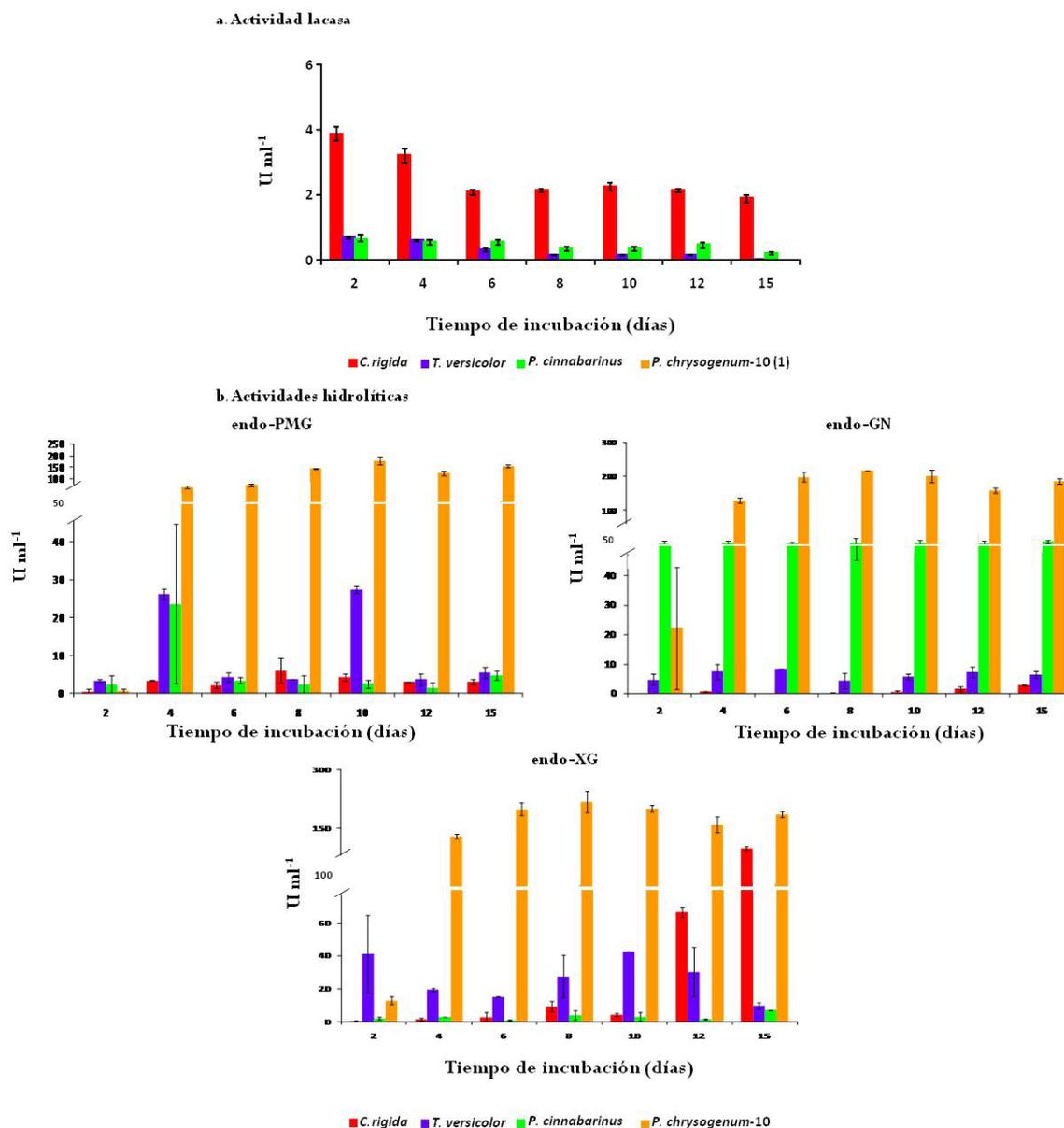


Figura 2. Actividades ligninolíticas lacasa (Lac) (a) (1)= actividad no detectada; e hidrolíticas: endopolimetilgalacturonasa (endo-PMG), endoglucanasa (endo-GN) y endoxiloglucanasa (endo-XG)) en medio con extracto acuoso de alpeorujo incubado con los hongos *C. rigida*, *T. versicolor*, *P. cinnabarinus* y *P. chrysogenum-10* (b). Los datos se representan como el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

La determinación de enzimas hidrolíticas puso de manifiesto la presencia de actividad endo-PMG, endo-GN y endo-XG por parte de los hongos *C. rigida*, *T. versicolor*, *P. cinnabarinus* y *P. chrysogenum-10* (Fig. 3b), aunque los niveles de actividad enzimática observados fueron diferentes según el tipo de enzima y la especie de hongo. Así, la actividad enzimática determinada en los hongos *C. rigida*, *T. versicolor* y *P. cinnabarinus* reveló niveles de endo-PMG bajos, entre 3 y 5,5 U ml⁻¹, frente a las 154 U ml⁻¹ observadas por *P. chrysogenum-10*. En cambio, la enzima

endo-GN mostró un patrón diferente ya que fueron los hongos *P. cinnabarinus* y *P. chrysogenum*-10 los que presentaron niveles de actividad mayores (150 y 92 U ml⁻¹ respectivamente) a los producidos por *C. rigida* y *T. versicolor*. La incubación de *P. chrysogenum*-10 en medio con ADOR dio lugar a una actividad endo-XG elevada, al igual que ocurre con las otras dos enzimas hidrolíticas ensayadas, mientras que *C. rigida*, *T. versicolor* y *P. cinnabarinus* mostraron menor actividad endo-XG. Cabe destacar el caso de *C. rigida*, que estimula la actividad endo-XG tras 12 días de incubación.

Contenido fenólico

El contenido total de fenoles del ADOR fue de 33 g por kg de alpeorujo, tal y como se muestra en la Fig. 3. La incubación del extracto acuoso de alpeorujo sin inocular durante 15 días a 28 °C no modificó significativamente su contenido fenólico, sin embargo, la inoculación del ADOR con los hongos saprobios ensayados lo disminuyó significativamente. Así, tras 15 días de incubación se observó una reducción del 75% del contenido fenólico por los hongos *C. rigida*, *T. versicolor*, *P. cinnabarinus* y de un 54% por *P. chrysogenum*-10. Cabe destacar que, a los 6 días de incubación, ya se comienza a ver un descenso significativo de fenoles por los hongos *C. rigida*, *T. versicolor* y *P. cinnabarinus* mientras que *P. chrysogenum*-10 necesitó 8 días para alcanzar valores similares de reducción.

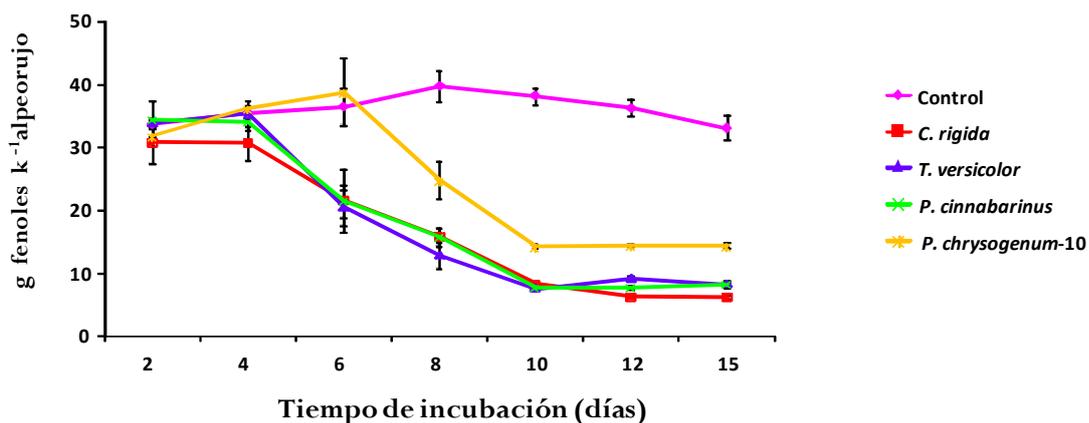


Figura 3. Contenido fenólico del extracto acuoso de alpeoruj no transformado (Control) y transformado por los hongos *C. rigida*, *T. versicolor*, *P. cinnabarinus* y *P. chrysogenum-10*. Los datos se representan como el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

La determinación del contenido de fenoles simples del extracto acuoso de alpeoruj, realizada por cromatografía de gases (GC-MS), puso de manifiesto la presencia de 10 compuestos (Fig. 4a). Los fenoles monoméricos identificados según su tiempo de retención fueron los siguientes: ácido hidroxibenzoico (1), tirosol (2), ácido vainílico (3), hidroxitirosol (4), ácido protocateuico (5), ácido p-cumárico (6), ácido gálico (7), ácido cafeico (8), ácido ferúlico (9) y ácido siríngico (10). La tabla 1 muestra la fórmula química, peso molecular y los tiempos de retención de los fenoles identificados en el ADOR. Paralelamente a la determinación cualitativa de los compuestos fenólicos presentes en el extracto acuoso de alpeoruj se analizó la composición cuantitativa mediante GC-MS de cada uno de los fenoles (Fig. 5).

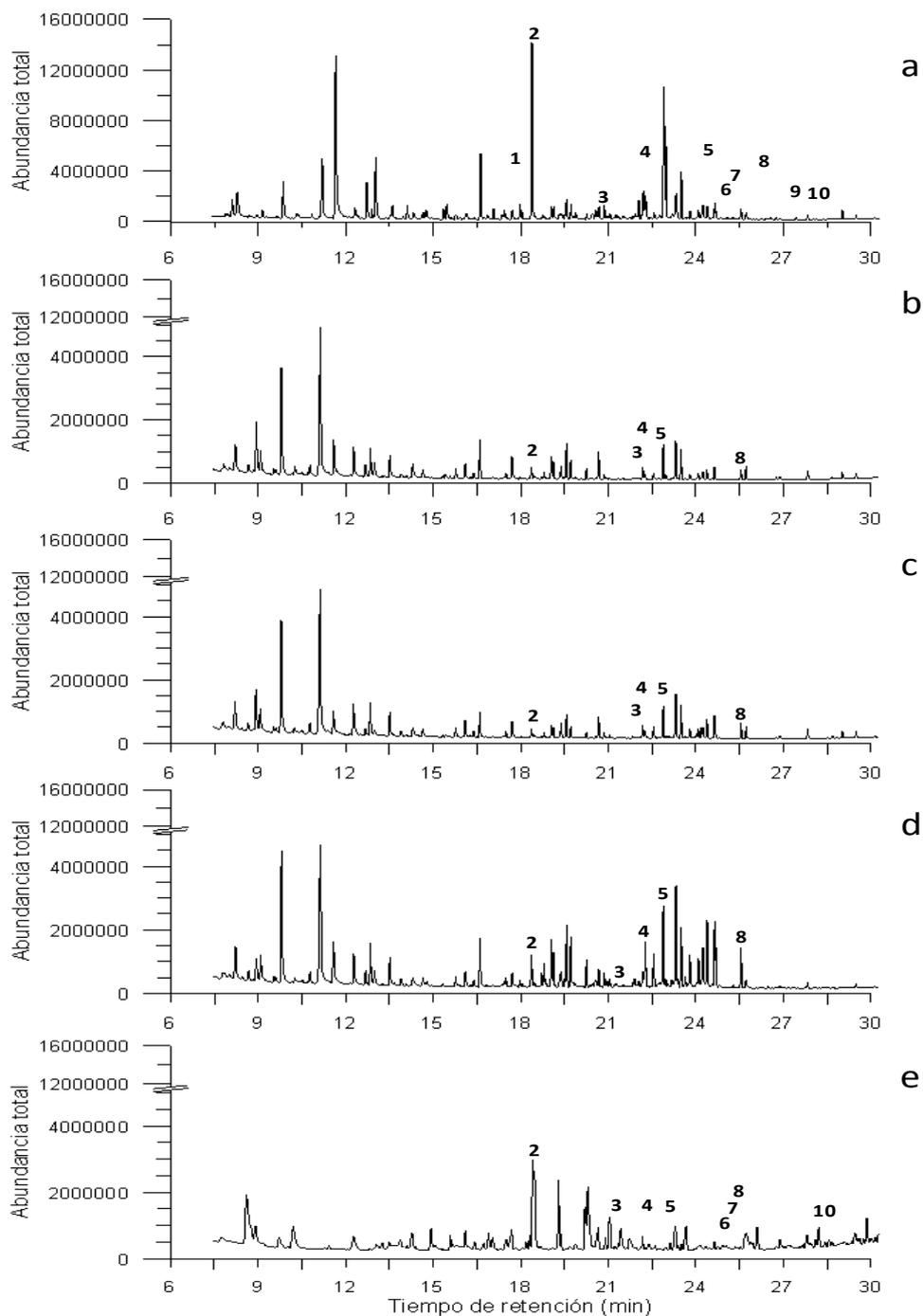
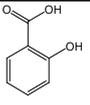
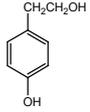
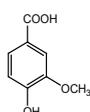
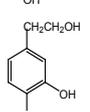
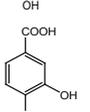
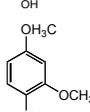
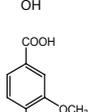
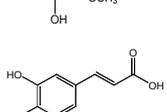
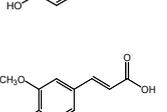
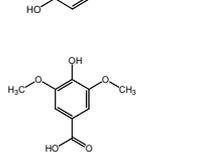


Figura 4. Cromatograma GC-MS del extracto acuoso de alpeorujos sin transformar (a) y del extracto de alpeorujos transformado por los hongos *C. rigida* (b), *T. versicolor* (c), *P. cinnabarinus* (d) y *P. chrysogenum*-10 (e). Picos: (1) ácido hidroxibenzoico, (2) tirosol, (3) ácido vainílico, (4) hidroxitirosol, (5) ácido protocatecuico, (6) ácido p-cumárico, (7) ácido gálico, (8) ácido cafeico, (9) ácido ferúlico y (10) ácido siríngeo.

Capítulo I

Tabla 1. Nombre común, estructura química, peso molecular y tiempo de retención de los compuestos fenólicos identificados en el extracto acuoso de alpeorajo (ADOR) por GC-MS.

Nombre común	Estructura química	Peso molecular	Tiempo de retención
1. Ácido hidroxibenzoico		138	18,29
2. Tiroso		138,16	18,38
3. Ácido vainílico		168	18,29
4. Hidroxitiroso		154,16	22,19
5. Ácido protocatecuico		154	22,98
6. Ácido p-cumárico		164	25,07
7. Ácido gálico		170	25,23
8. Ácido cafeico		180	25,48
9. Ácido férulico		194,18	28
10. Ácido siríngico		198,17	28,85

Cuando el ADOR se incubó con los diferentes hongos se produjeron cambios drásticos en la composición fenólica del residuo (Fig. 4 a,b,c,d,e y Fig. 5). La incubación del extracto acuoso de alpeorujó con los hongos *C. rigida*, *T. versicolor* y *P. cinnabarinus* provocó la desaparición de los ácidos hidroxibenzoico, p-cumárico, gálico, ferúlico y siríngico, así como la drástica reducción del tirosol, hidroxitirosol y los ácidos protocatecuico, vainílico y cafeico. Concretamente, se observaron niveles de reducción del 97, 98 y 100% en el tirosol y los ácidos protocatecuico y cafeico, respectivamente, tras la incubación del ADOR con los hongos *C. rigida*, *T. versicolor* y *P. cinnabarinus*. La reducción del contenido en ácido vainílico del ADOR transformado por *C. rigida* y *T. versicolor* fue del 94%, mientras que *P. cinnabarinus* lo disminuyó en un 84%. La incubación del extracto acuoso de alpeorujó con *C. rigida* y *T. versicolor* redujo los niveles del hidroxitirosol al 75%, mientras que con *P. cinnabarinus* la disminución fue menor. Por otro lado, tras la incubación del extracto acuoso con *P. chrysogenum*-10, el perfil cromatográfico resultante fue diferente respecto al resto de hongos saprobios e incluso al ADOR sin incubar, ya que se observó la aparición de nuevos picos no identificados. Además, a diferencia del resto de los hongos, la incubación del ADOR con el hongo *P. chrysogenum*-10 no afectó al contenido de los ácidos siríngico, p-cumárico y cafeico y la reducción del contenido en tirosol, ácido protocatecuico y vainílico fue del 82, 80 y 63% respectivamente, mientras que, para el hidroxitirosol y ácido gálico, la efectividad en la disminución fue menor.

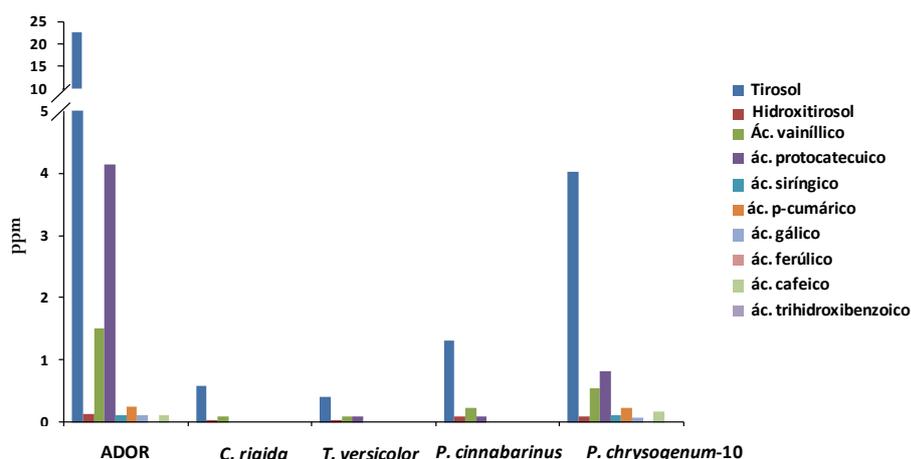


Figura 5. Determinación cuantitativa por GC-MS de los compuestos fenólicos presentes en el extracto acuoso de alpeorujos sin transformar y transformado por los hongos *C. rigida*, *T. versicolor*, *P. cinnabarinus* y *P. chrysogenum-10*.

Discusión

El alpeorujos es un residuo que presenta elevado contenido en materia orgánica y nutrientes inorgánicos lo que posibilita su uso como enmendante y/o fertilizante (Sampedro *et al.*, 2007a). Sin embargo, la presencia de compuestos de naturaleza fenólica imposibilita su uso sin una previa estabilización, ya que estos son los principales responsables de las propiedades tóxicas del alpeorujos en plantas y microorganismos (Sampedro *et al.*, 2005; Saparrat *et al.*, 2010). Trabajos previos realizados en nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto la capacidad que presentan ciertos hongos saprobios para la biorremediación del alpeorujos (Sampedro *et al.*, 2004a), sin embargo, esta capacidad detoxificadora de los hongos requiere largos periodos de incubación por lo que se hace necesario optimizar este proceso. Un tratamiento integral mediante un fraccionamiento físico y posterior tratamiento biológico del alpeorujos puede suponer una alternativa efectiva en la valorización de dicho residuo. De hecho, estudios realizados en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto la efectividad de ciertas especies de hongos en la reducción

de la fitotoxicidad del extracto acuoso de alpeorujó. Se ha detectado un descenso del 73% del contenido fenólico tras la incubación del ADOR con hongos saprobios durante sólo 20 días (Aranda *et al.*, 2006; 2007a,b). Por otro lado, nuestros estudios también han puesto de manifiesto que el extracto acuoso de alpeorujó es la fracción más representativa del alpeorujó, ya que, en su composición están presentes los componentes más solubles del residuo y directamente asimilables por las plantas. Por tanto, la extracción acuosa del alpeorujó supone una herramienta óptima en estudios tanto de reducción de los compuestos tóxicos del residuo por los hongos saprobios como de fitotoxicidad.

Los hongos saprobios, concretamente los hongos ligninolíticos, han desarrollado un complejo sistema enzimático basado en la producción de lacasas y peroxidasas, metabolitos de bajo peso molecular y ROS capaces de degradar la lignina así como otros compuestos xenobióticos orgánicos como los hidrocarburos policíclicos aromáticos responsables de contaminaciones medioambientales como suelos (Schoemaker *et al.*, 1991). En nuestro estudio hemos utilizado los hongos ligninolíticos *C. rigida*, *T. versicolor* y *P. cinnabarinus*, ya que, estudios previos realizados en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto la producción de lacasas por parte de estos hongos en el extracto acuoso de alpeorujó (Aranda, 2006). El hongo *C. rigida*, junto con *P. cinnabarinus*, son hongos de la podredumbre blanca principalmente implicados en la degradación de compuestos policíclicos aromáticos y/o compuestos fenólicos debido a la producción durante su metabolismo primario de lacasa como única enzima ligninolítica (Díaz-Rodríguez, 2010; Eggert *et al.*, 1996). También se ha descrito la producción de diversas enzimas ligninolíticas como lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa por parte del hongo *T. versicolor* durante procesos degradativos de la lignina así como de otros compuestos recalcitrantes (Hattaka, 1994). Además, también se utilizó en nuestros ensayos el hongo saprobio del suelo *P. chrysogenum*-10 debido a su capacidad productora de lacasa y de metabolizar compuestos fenólicos (Hofrichter y Scheibner, 1993; Hofrichter *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 2005).

Se sabe que la producción de lacasa puede incrementarse mediante el uso de compuestos inductores. Así, en estudios realizados con etanol, nitrógeno y Cu, se ha observado un aumento de la producción de lacasa en los hongos *T. versicolor*, *C. rigida* y *P. cinnabarinus* (Collins y Dobson, 1997; Saparrat *et al.*, 2002; Meza *et al.*, 2007). En nuestros ensayos, se observa como *C. rigida*, *T. versicolor* y *P. cinnabarinus* crecidos en medio basal con Cu como inductor de la actividad lacasa produjeron un incremento en dicha actividad tras 18 días de incubación, alcanzándose valores de

12 U ml⁻¹ principalmente en el hongo *C. rigida*. Sin embargo, no se detectó actividad lacasa por parte del hongo *P. chrysogenum*-10, pese a que se ha descrito esta capacidad dentro de especies del género *Penicillium*. Los niveles de producción de lacasa por los hongos saprobios ensayados disminuyeron en presencia de extracto acuoso de alpeorujó, probablemente debido a la presencia de compuestos fenólicos solubles que inhiben su producción o bien a la ausencia en el ADOR de inductores como el Cu que estimulen dicha actividad (Díaz *et al.*, 2010). Se sabe que la fitotoxicidad del alpeorujó no solo se debe a la presencia de compuestos fenólicos monoméricos, ya que se ha descrito que otras sustancias como fragmentos de paredes celulares y glucoproteínas pueden tener efectos fitotóxicos en las plantas (Bucheli *et al.*, 1990). Se ha estudiado la implicación de las enzimas hidrolíticas producidas por ciertos hongos saprobios en la degradación de las paredes celulares implicadas en la toxicidad del alpeorujó (Benítez *et al.*, 2002). Además, se ha descrito la participación de pectinasas, celulasas y hemicelulasas producidas por ciertas especies de hongos saprobios en la degradación de las paredes celulares vegetales (Tribak *et al.*, 2002). Los niveles de producción de las distintas actividades hidrolíticas ensayadas por *P. chrysogenum*-10 fueron significativamente elevados en comparación a las del resto de hongos debido a la capacidad productora de enzimas hidrolíticas que poseen todos los hongos filamentosos del suelo. Además, la elevada actividad enzimática hidrolítica detectada podría deberse a la gran cantidad de sustancias orgánicas y nutrientes presentes en el ADOR que favorecería el desarrollo fúngico estimulando la actividad de dichas enzimas ya que, como es sabido, los hongos saprobios se nutren de materia orgánica utilizando los azúcares y componentes orgánicos como fuente de carbono y energía (Fell *et al.*, 2001). Por tanto, la detección de las actividades enzimáticas ligninolíticas e hidrolíticas en el extracto acuoso de alpeorujó tras la incubación con los hongos podría implicar la participación de dichas enzimas en los procesos degradativos de los compuestos tóxicos presentes en el residuo.

Se puso de manifiesto la capacidad defenolizadora del extracto acuoso de alpeorujó por los hongos saprobios ensayados ya que se observó una reducción drástica del contenido fenólico del residuo tras 15 días de incubación. Los hongos ligninolíticos y filamentosos utilizados produjeron en el ADOR una serie de enzimas (lacasa e hidrolíticas) con un papel importante en la degradación de compuestos fenólicos en residuos del aceite de oliva. Aranda *et al.*, (2004; 2006; 2007a,b) han puesto de manifiesto una relación positiva entre la reducción del contenido fenólico y la actividad tanto lacasa como de los enzimas hidrolíticos de los hongos saprobios. Este hecho pone de manifiesto que la reducción del contenido fenólico del extracto

acuoso de alpeorujos tras su incubación con los hongos saprobios probablemente pueda ser debida a la acción de la lacasa y las enzimas hidrolíticas. Nuestros estudios muestran que la incubación del ADOR con los hongos *C. rigida*, *T. versicolor* y *P. cinnabarinus* durante 15 días produjeron una mayor reducción del contenido fenólico que la observada por *P. chrysogenum*-10. La capacidad reductora del contenido fenólico por los hongos ligninolíticos se ha atribuido principalmente a la polimerización de los compuestos fenólicos solubles por las lacasas (Díaz *et al.*, 2010). En cambio, en el caso del hongo saprobio de suelo *P. chrysogenum*-10, donde no se detectó actividad lacasa, solo actividad hidrolítica por lo que la reducción del contenido fenólico posiblemente pueda ser atribuida también a la actuación de otras enzimas como las enzimas de membrana, cuya participación en procesos de detoxificación ha sido extensamente demostrada (Van den Brink *et al.*, 1998). Por otro lado, al igual que ocurre en el alpeorujos, se podría asumir que la transformación del ADOR por los hongos saprobios reduce la toxicidad del alpeorujos en las plantas, ya que, al polimerizar los fenoles, éstos se transforman en compuestos de elevado peso molecular y no podrían atravesar las membranas citoplasmáticas de las plantas (Casa *et al.*, 2003).

La composición cualitativa y cuantitativa del extracto acuoso de alpeorujos, puso de manifiesto que los compuestos mayoritarios presentes en el ADOR fueron el tirosol y los ácidos protocatecuico y vainílico. Además, se detectó la presencia de hidroxitirosol y los ácidos p-cumárico, gálico, siríngico y cafeico en menor concentración. Cabe destacar la presencia de otros dos compuestos fenólicos, el ácido hidroxibenzoico y ferúlico, que, aunque se identificaron no se pudieron cuantificar debido a la técnica empleada. Los compuestos fenólicos identificados coincide con los detectados por otros autores como Sampedro *et al.* (2004b) y Aranda *et al.* (2006; 2007a; 2007b) que observan la presencia de tirosol, hidroxitirosol y los ácidos protocatecuico, vainílico y p-cumárico, entre otros fenoles, y/o flavonoides como compuestos mayoritarios de extractos orgánicos de alpeorujos. En muchos casos, la ausencia o presencia de determinados tipos de compuestos fenólicos en el alpeorujos se debe en gran medida a la gran variabilidad de dicho residuo, determinada por las condiciones climáticas del cultivo, variedad y grado de maduración de la aceituna, prácticas agronómicas y/o proceso de extracción (Morelló *et al.*, 2004). La determinación cuantitativa realizada por el GC-MS puso de manifiesto que el compuesto fenólico mayoritario del ADOR fue el tirosol. Algunos autores han observado que el tirosol muestra una gran fitotoxicidad de forma inespecífica y además puede provocar efectos sinérgicos con otros fenoles potenciando su poder fitotóxico (Capasso *et al.*, 1992). Por otro lado, algunos

estudios han señalado que la toxicidad de los compuestos fenólicos se debe fundamentalmente al peso molecular del mismo, así, aquellos que presentan un peso molecular bajo entorno a los 350 Da poseen un elevado poder fitotóxico como es el caso del catecol, hidroxitirosol y ácidos cinámicos (Della Greca *et al.*, 2001; Isidori *et al.* 2005). Numerosos compuestos fenólicos derivados de ácidos benzoicos y cinámicos han sido identificados como inhibidores del crecimiento y desarrollo de las plantas (Rice, 1984; Vaughan y Ord, 1991). Los ácidos protocatecuico, siríngico, gálico y vainílicico podrían considerarse como derivados benzoicos, mientras que los ácidos cafeico, ferúlico y p-cumárico derivados cinámicos, justificando de esta forma el carácter fitotóxico del ADOR.

La cuantificación del contenido fenólico total por colorimetría puso de manifiesto la capacidad defenolizadora del extracto acuoso de alpeorujos por parte de los hongos saprobios ensayados. A fin de conocer el efecto de los hongos sobre cada uno de los compuestos fenólicos presentes en el ADOR se realizó el análisis cualitativo y cuantitativo del residuo transformado con los hongos saprobios por GC-MS. Cabe destacar que el método cromatográfico reveló una mayor reducción del contenido fenólico por parte de los hongos *C. rigida* y *T. versicolor* que *P. cinnabarinus* y *P. chrysogenum*-10. Estos resultados contrastan con los obtenidos en la determinación de fenoles totales, donde se observó un poder reductor similar en *P. cinnabarinus*, *C. rigida* y *T. versicolor*, hecho atribuible a la baja resolución y posibles limitaciones de las técnicas colorimétricas en comparación a las cromatográficas.

La incubación del ADOR con los hongos ligninolíticos *C. rigida*, *T. versicolor* y *P. cinnabarinus* provocó la eliminación de los ácidos p-cumárico, gálico y siríngico y redujo significativamente los niveles de tirosol, hidroxitirosol y los ácidos protocatecuico, vainílicico y cafeico. Sin embargo, cabe destacar que la eficiencia en la defenolización de dichos compuestos fue diferente según el hongo utilizado. Así, *C. rigida* y *T. versicolor* mostraron una mayor afinidad en la conversión de compuestos como el ácido vainílicico y el hidroxitirosol que *P. cinnabarinus*. No obstante, la efectividad en la disminución del tirosol, ácido protocatecuico y ácido cafeico no fue diferente entre los distintos hongos ligninolíticos estudiados. Las diferencias de afinidad fenólica observadas en los hongos durante la incubación en ADOR puede atribuirse a que *C. rigida* produce niveles elevados de lacasa responsable de la defenolización y en *T. versicolor* principalmente a la producción de otras actividades enzimáticas, aparte de lacasas, como aril alcohol oxidasas o glioxal-oxidasas, implicadas en los procesos de degradación de la lignina y enzimas de membrana como la piranosas oxidasa y las citocromo P 450 incluso al sistema redox transmembrana descrito en *T. versicolor* y por tanto, con posibilidad para degradar compuestos fenólicos (Hatakka 1994; Hirai *et al.* 1995; Peláez *et al.*, 1995; Bezalel

et al., 1996b). En cambio, la transformación del ADOR por *P. chrysogenum*-10 no fue capaz de eliminar completamente los ácidos p-cumárico, cafeico y siríngico, y a pesar de disminuir el resto de componentes fenólicos esta reducción fue menor que la observada por los hongos ligninolíticos, indicando una menor preferencia a la conversión de fenoles por parte de los saprobios del suelo. La menor capacidad reductora de los compuestos fenólicos por *P. chrysogenum*-10 probablemente sea debida a su maquinaria enzimática, de hecho, se ha detectado la producción de enzimas hidrolíticas como pectinasas, celulasas y xiloglucanasas, las cuales no estarían directamente relacionadas con la conversión fenólica pero sí parecen tener una notable participación en los procesos degradativos llevados a cabo por dicho hongo en el extracto acuoso como ya pusieron de manifiesto Aranda *et al.*, 2004. Sin embargo, no cabe descartar la participación de otra batería enzimática implicada en la degradación fenólica pero de menor efectividad en el proceso de defenolización con respecto a la enzima Lac producida por los hongos ligninolíticos.

Capítulo II

Germinación de semillas de
tomate en presencia del extracto
acuoso de alpeourujo

Germinación de semillas de tomate en presencia del extracto acuoso de alpeorujo

1. Efecto del ADOR sobre la germinación de semillas de tomate

Objetivo

Diversos estudios realizados con extractos acuosos y orgánicos de alpeorujo han puesto de manifiesto el marcado carácter fitotóxico que posee dicho residuo sobre la germinación de semillas, además también se ha descrito cómo este efecto se ve reducido o eliminado mediante la transformación de los extractos por hongos saprobios (Aranda *et al.*, 2006, 2007a,b). Mediante este ensayo se pretende analizar el efecto del extracto acuoso de alpeorujo y su transformación con los hongos saprobios *C. rigida*, *T. versicolor*, *P. cinnabarinus* y *P. chrysogenum*-10 sobre la germinación de semillas de tomate con objeto de seleccionar aquella dosis que posea un marcado poder fitotóxico para posteriormente llevar a cabo estudios sobre los aspectos fisiológicos inducidos por el residuo en las semillas.

Metodología

Para llevar a cabo dicho experimento las semillas de tomate se esterilizaron en superficie con alcohol etílico tal y como se describe en el apartado 5 del capítulo general de Material y Métodos y se dejaron en imbibición durante 2 h con el fin de favorecer la pre-germinación. A continuación, las semillas se transfirieron a placas Petri de 14 cm de diámetro con papel de filtro humedecido con 10 ml de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida*, *T. versicolor*, *P. cinnabarinus* y *P. chrysogenum*-10 a dosis del 0, 1,25, 2,5 y 5%. En el caso de los controles, se añadió agua destilada estéril. Las semillas se germinaron durante 72 h a 27 °C en oscuridad y posteriormente se determinó su porcentaje de germinación.

Resultados

La incubación de las semillas de tomate con ADOR puso de manifiesto el marcado efecto fitotóxico del residuo sobre su germinación (Fig. 1). Se observó que el ADOR no afectó al porcentaje de germinación de las semillas a la menor dosis aplicada, por el contrario, lo redujo drásticamente en un 45 y un 72% a las dosis del 2,5 y 5% respectivamente.

El tratamiento de las semillas con 1,25% de ADOR transformado por los hongos no modificó significativamente su germinación, al igual que lo observado en el tratamiento con el residuo, mientras que a la dosis del 2,5% el ADOR transformado incrementó el porcentaje de germinación igualándolo al control excepto en el tratamiento con *P. chrysogenum*-10. La transformación del extracto acuoso de alpeorujos a la dosis del 5% con todos los hongos ensayados disminuyó significativamente su fitotoxicidad aunque en ningún caso alcanzó los valores de germinación del tratamiento control.

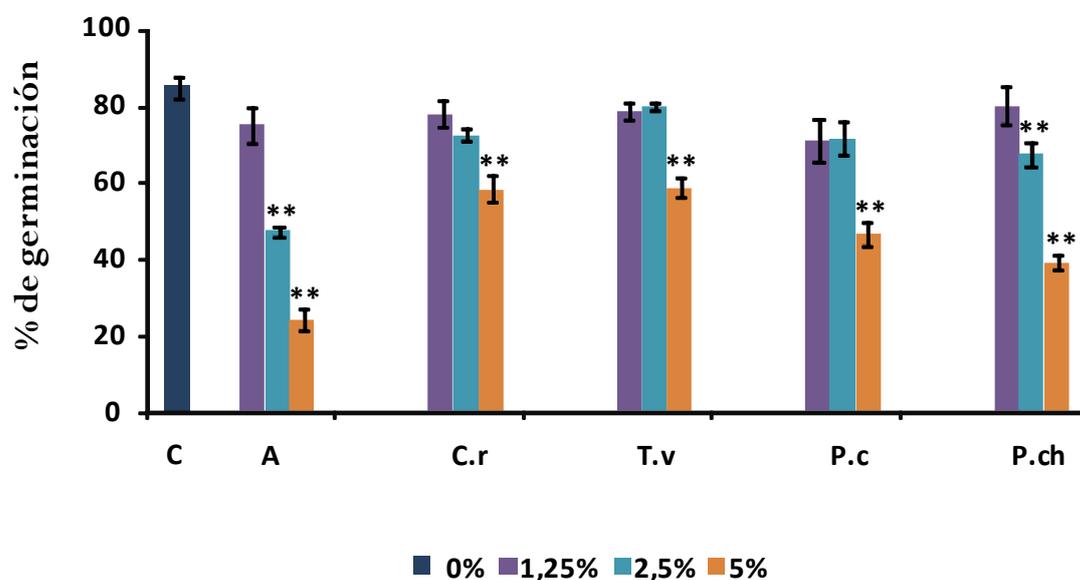


Figura 1. Porcentaje de germinación de semillas de tomate en presencia de agua (C) y distintas concentraciones de ADOR (A) transformado o no por los hongos *C. rigida* (C.r), *T. versicolor* (T.v), *P. cinnabarinus* (P.c) y *P. chrysogenum*-10 (P.ch). Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=12). Las diferencias significativas de las diferentes dosis del extracto acuoso de alpeorujos en cada tratamiento respecto del control (0%) vienen reflejadas por ** y * según el test de Dunnett ($P < 0,01$ y $P < 0,05$ respectivamente).

Este estudio señaló que la dosis de ADOR que inducía un mayor efecto inhibitor de la germinación de semillas de tomate fue la del 5% por lo que se seleccionó esta concentración para los ensayos posteriores.

2. Respuesta oxidativa inducida por el extracto acuoso de alpeorujó en la germinación de semillas de tomate

Objetivo

Estudios recientes sobre la germinación de semillas de berro en presencia del extracto acuoso de alpeorujó han puesto de manifiesto, tanto su carácter fitotóxico, como la capacidad biorremediadora de dicho residuo por ciertas especies fúngicas (Aranda *et al.*, 2007b). Por ello la transformación del extracto acuoso de alpeorujó mediante el uso de hongos saprobios supone una herramienta clave en los procesos de biorremediación de dicho residuo para su utilización con fines agronómicos.

Por tanto, teniendo en cuenta estos antecedentes se planteó analizar los cambios fisiológicos que se generan durante la germinación de las semillas de tomate en presencia del ADOR transformado por los hongos saprobios. Además se pretende estudiar el posible estrés oxidativo inducido durante la germinación de las semillas tras la aplicación del extracto acuoso, así como la respuesta antioxidante desencadenada.

Metodología

Para abordar este estudio, las semillas de tomate previamente esterilizadas se germinaron en presencia de ADOR sin transformar y transformado por los hongos saprobios *C. rigida*, *T. versicolor*, *P. cinnabarinus* y *P. chrysogenum*-10 a la dosis del 5% durante 72 h en oscuridad a 27 °C. Tras la incubación de las semillas, con parte del material se procedió al análisis de los parámetros fisiológicos: índice de germinabilidad y longitud radical. El resto del material se utilizó para las determinaciones bioquímicas y enzimáticas, tal y como se describe en el apartado general de Material y Métodos 7 y 8. También se realizó la determinación “*in situ*” de algunas ROS como el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno mediante técnicas de fluorescencia.

Resultados

2.1. Germinación

Los resultados de la figura 1a, muestran como el ADOR fue muy tóxico para las semillas de tomate ya que el índice de germinabilidad (IG) no superó el 25%. El IG se determinó en base al porcentaje de germinación y al crecimiento radical de las semillas germinadas en presencia de agua (controles). La aplicación del ADOR transformado por *C. rigida*, *T. versicolor*, *P. cinnabarinus* y *P. chrysogenum*-10 incrementó significativamente el IG respecto al residuo sin tratar aunque no se observó diferencias entre el efecto remediator de los distintos hongos (Fig. 1a).

En cuanto al crecimiento radicular de las semillas, se observó que tras la germinación en presencia de ADOR sin transformar y transformado por todos los hongos ensayados se inhibió significativamente en torno a un 50% en todos los tratamientos (Fig. 1b).

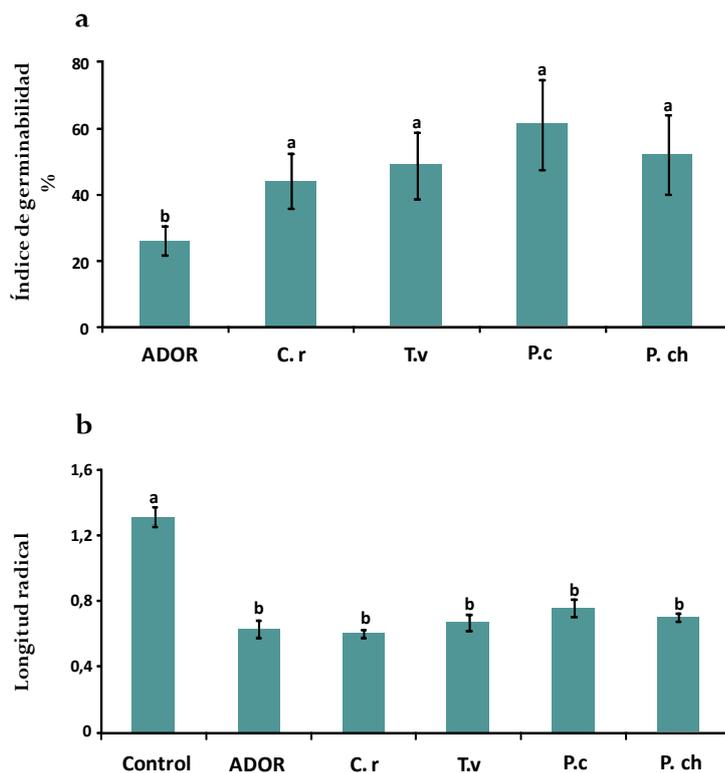


Figura 1. Índice de germinabilidad (a) y longitud radicular (b) de semillas de tomate germinadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* (C.r), *T. versicolor* (T.v), *P. cinnabarinus* (P.c) y *P. chrysogenum*-10 (P.ch). Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=9). En cada tratamiento las letras representan diferencias significativas de los tratamientos respecto del control según el test de Tukey-HSD (P<0,05).

2.2. Contenido de MDA

El contenido en MDA incrementó un 126% en la raíz de semillas germinadas durante 72 h en presencia del ADOR a la dosis del 5%. La germinación en presencia del ADOR transformado por los hongos *C. rigida*, *T. versicolor*, *P. cinnabarinus* y *P. chrysogenum*-10 no modificó el contenido en MDA de la raíz respecto al tratamiento de las semillas con o sin residuo.

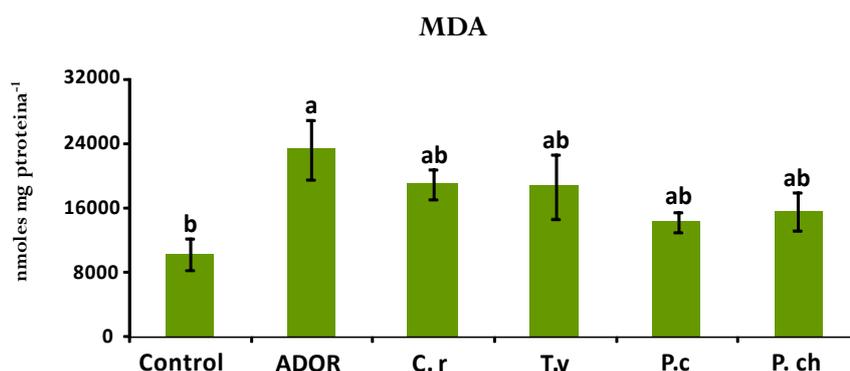


Figura 2. Determinación del contenido en MDA de raíz de semillas de tomate germinadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* (C.r), *T. versicolor* (T.v), *P. cinnabarinus* (P.c) y *P. chrysogenum*-10 (P.ch). Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=9). En cada tratamiento las letras representan diferencias significativas de los tratamientos respecto del control según el test de Tukey-HSD ($P < 0,05$).

2.3. Determinación “in vivo” del $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 por microscopía de fluorescencia

La detección “in vivo” de las ROS, $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 se llevó a cabo mediante el uso de los fluorocromos específicos DHE y DCF-DA tal y como se describe en el apartado general de Material y Métodos 7.7. La imagen reveló como la semilla germinada en presencia del ADOR presentó mayor fluorescencia a lo largo de todo el ápice radicular que la raíz control sin residuo lo que indicó el incremento de la producción del radical superóxido en este tratamiento. La transformación del extracto acuoso por los hongos saprobios ensayados en general redujo la fluorescencia de la raíz respecto al tratamiento con ADOR aunque esta disminución fue diferente según el hongo utilizado. Así, el extracto acuoso de alpeorujó tratado con *T. versicolor* y *P. cinnabarinus* redujo la fluorescencia del fluorocromo en mayor proporción que los tratamientos con ADOR transformado por *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10.

La visualización de la fluorescencia emitida por el fluorocromo DCF-DA dependiente de H_2O_2 puso de manifiesto en las raíces germinadas en presencia del ADOR un incremento de la misma respecto del control lo que indicó una mayor acumulación de peróxido. La germinación de las semillas en presencia de ADOR transformado por *T. versicolor* redujo la acumulación de H_2O_2 en raíz ya que la fluorescencia emitida fue menor respecto del resto de tratamientos. Sin embargo, la transformación del residuo por *P. cinnabarinus*, *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 provocó una mayor fluorescencia y por tanto un mayor acumulo de H_2O_2 respecto tanto del tratamiento control como del de ADOR.

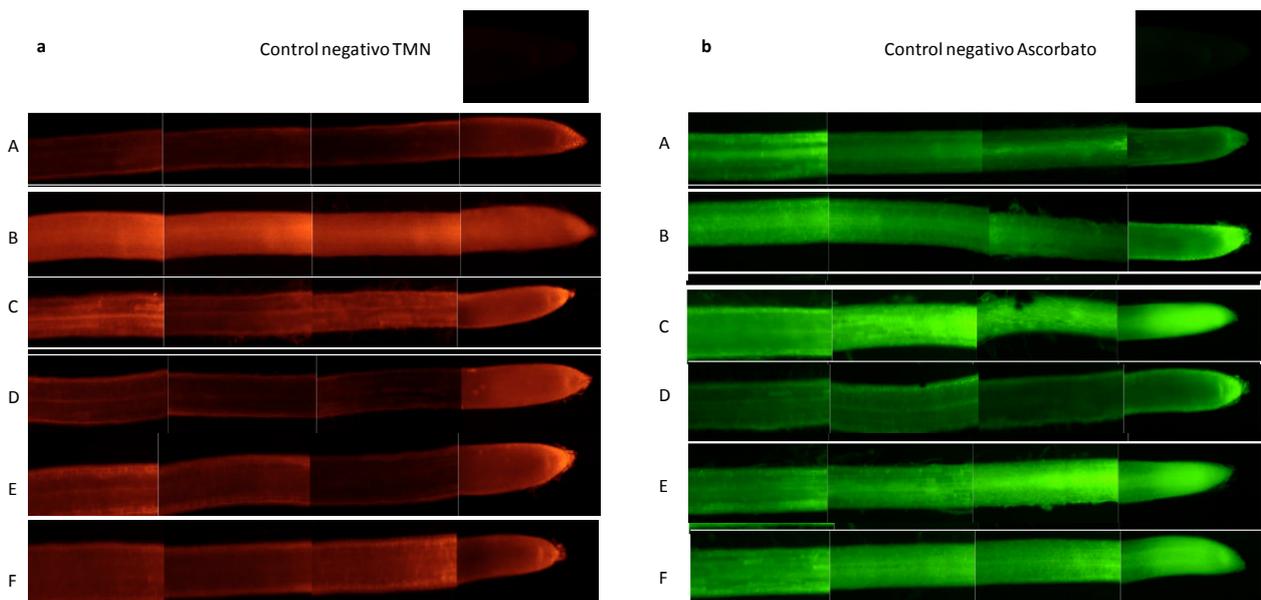


Figura 3. Visualización *in vivo* del $O_2^{\cdot-}$ (a) y H_2O_2 (b) en secciones de 2 cm de ápices de raíz de tomate control (A) y germinadas en presencia de ADOR (B) transformado o no por los hongos *C. rigida* (C), *T. versicolor* (D), *P. cinnabarinus* (E) y *P. chrysogenum*-10 (F). Las imágenes son reconstrucciones obtenidas por el microscopio de fluorescencia, donde la fluorescencia roja corresponde a la reacción del DHE con el $O_2^{\cdot-}$ y la fluorescencia verde a la reacción del DCF-DA con el H_2O_2 . La raíz control negativo se incubó con TMN y ASC para la eliminación del $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 respectivamente.

2.4. Enzimas antioxidantes

La figura 4 representa las actividades enzimáticas antioxidantes SOD, CAT, APX, GR, y GST implicadas en la respuesta de defensa desencadenada en las semillas de tomate germinadas en presencia del ADOR transformado o no por los hongos saprobios.

La determinación enzimática puso de manifiesto que la aplicación del ADOR sin transformar y transformado por *C. rigida*, *T. versicolor*, *P. cinnabarinus* y *P. chrysogenum*-10 no modificó las actividades CAT y APX (Fig. 4). Sin embargo, la actividad SOD incrementó en la raíz de semillas germinadas un 39% tras la aplicación del extracto acuoso de alpeorujó. La transformación del ADOR por los hongos *T. versicolor* y *P. cinnabarinus* produjo un aumento en la SOD similar al del extracto acuoso de alpeorujó sin transformar. Cabe destacar que la raíz de las semillas de tomate en presencia del ADOR transformado por *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 mostraron una actividad SOD menor a la de las semillas germinadas en presencia del residuo sin tratar o transformado por *P. cinnabarinus*. La determinación isoenzimática de la SOD mediante EPGA-Nativa puso de manifiesto la aparición de 2 bandas correspondientes a las isoenzimas Cu/Zn-SODs denominadas SOD-3 y SOD-1. La actividad de la isoenzima SOD-3 en las raíces de semillas germinadas fue mayor que la de SOD-1 en todos los tratamientos (Fig. 4.1).

La actividad GR se incrementó significativamente en la raíz de semillas germinadas en presencia de ADOR. La transformación del extracto acuoso de alpeorujó con los hongos *T. versicolor*, *P. cinnabarinus* y *P. chrysogenum*-10 no redujo la actividad GR mientras que el ADOR transformado por *C. rigida* produjo una disminución importante de la actividad respecto a la observada en el residuo sin tratar. Cabe destacar que el ADOR transformado con *P. cinnabarinus* fue el tratamiento que mostró un mayor incremento de la actividad GR. Por otro lado, la enzima GST también mostró un aumento en su actividad tras la exposición al ADOR transformado o no por los hongos, no observándose diferencias en el incremento entre los distintos tratamientos ensayados.

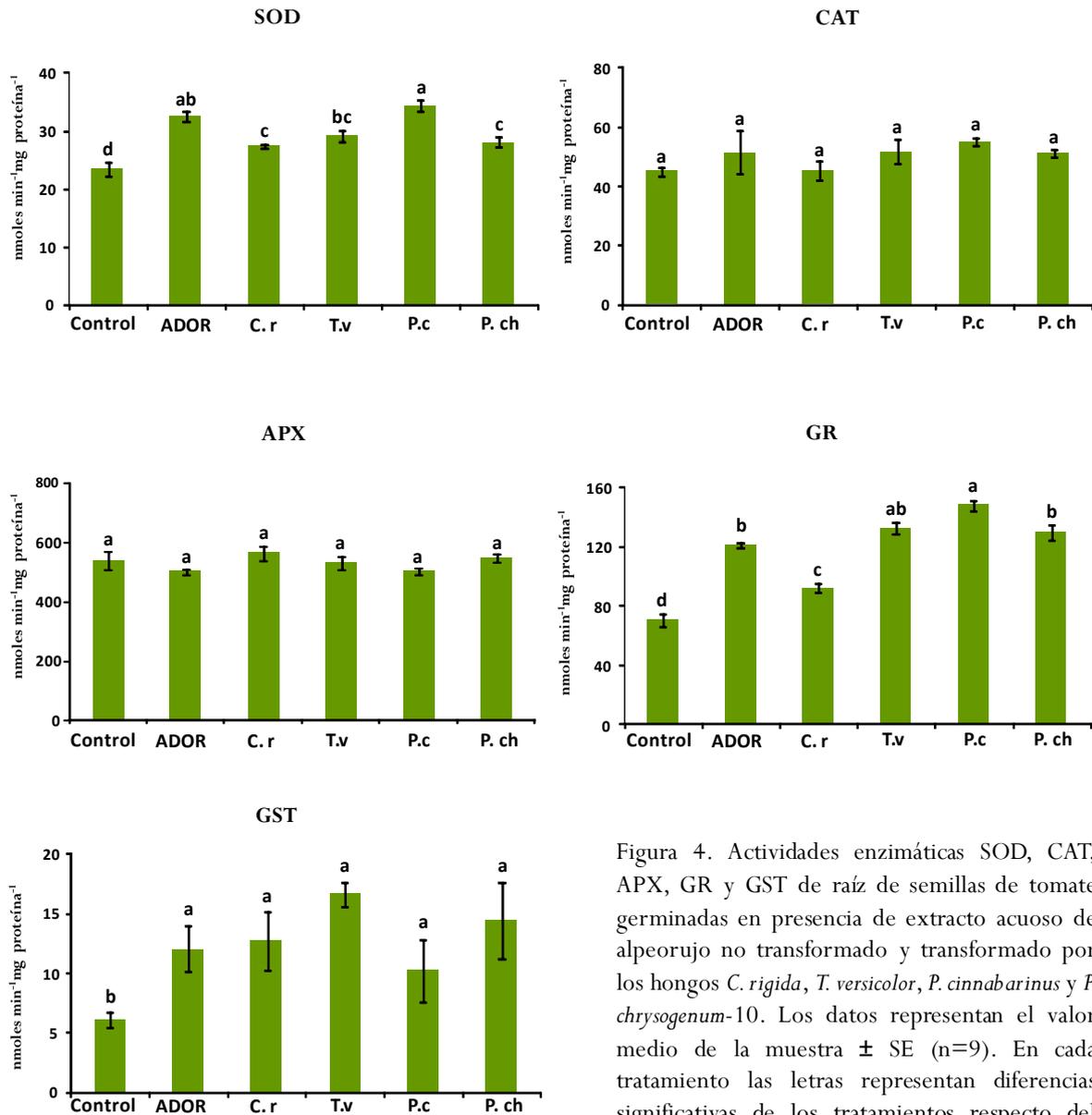


Figura 4. Actividades enzimáticas SOD, CAT, APX, GR y GST de raíz de semillas de tomate germinadas en presencia de extracto acuoso de alpeorajo no transformado y transformado por los hongos *C. rigida*, *T. versicolor*, *P. cinnabarinus* y *P. chrysogenum*-10. Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=9). En cada tratamiento las letras representan diferencias significativas de los tratamientos respecto del control según el test de Tukey-HSD (P<0,05).

EPGA-Nativa

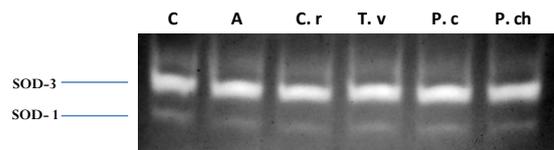


Figura 4.1. Actividad isoenzimática superóxido dismutasa de la raíz de semillas de tomate (C) germinadas en presencia de ADOR (A) transformado o no por los hongos *C. rigida* (C.r), *T. versicolor* (T.v), *P. cinnabarinus* (P.c) y *P. chrysogenum*-10 (P.ch).

2.5. Contenido en fenoles totales y actividad peroxidasa

El contenido de fenoles observado en la raíz de semillas de tomate reveló un incremento significativo respecto de la raíz control tras la aplicación del ADOR (Fig. 5). La transformación del extracto acuoso por los hongos saprobios incrementó el contenido de fenoles totales de la raíz germinada generalmente de forma similar al observado en presencia del ADOR salvo en el caso de *P. cinnabarinus*, cuyo aumento fue menor al del tratamiento con el residuo.

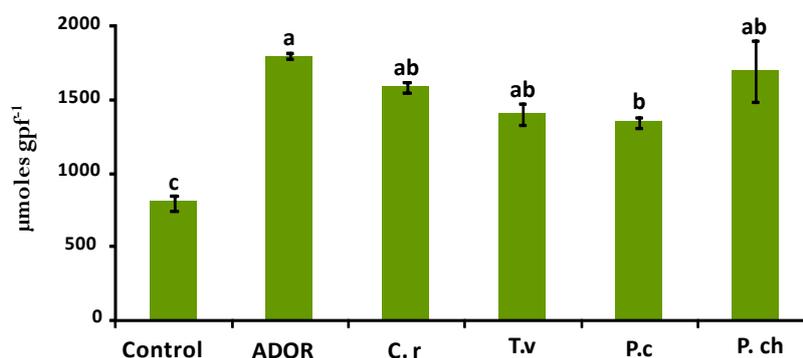


Figura 5. Contenido en fenoles totales de la raíz de semillas de tomate germinadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* (C.r), *T. versicolor* (T.v), *P. cinnabarinus* (P.c) y *P. chrysogenum*-10 (P.ch). Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=9). En cada tratamiento las letras representan diferencias significativas de los tratamientos respecto del control según el test de Tukey-HSD ($P < 0,05$).

No se observó un aumento de actividad peroxidasa total tras la incubación de las semillas de tomate con ADOR transformado o no con los hongos *C. rigida*, *T. versicolor*, *P. cinnabarinus* y *P. chrysogenum*-10, sin embargo, si se produjo un espectacular incremento de la actividad CAPOD en raíces expuestas a ADOR, llegando a alcanzarse valores de $1.27 \text{ nmoles min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ (Fig. 6). Es importante destacar que en los tratamientos con ADOR transformado por los hongos se redujo sensiblemente la actividad CAPOD llegando a igualarse al control sin residuo.

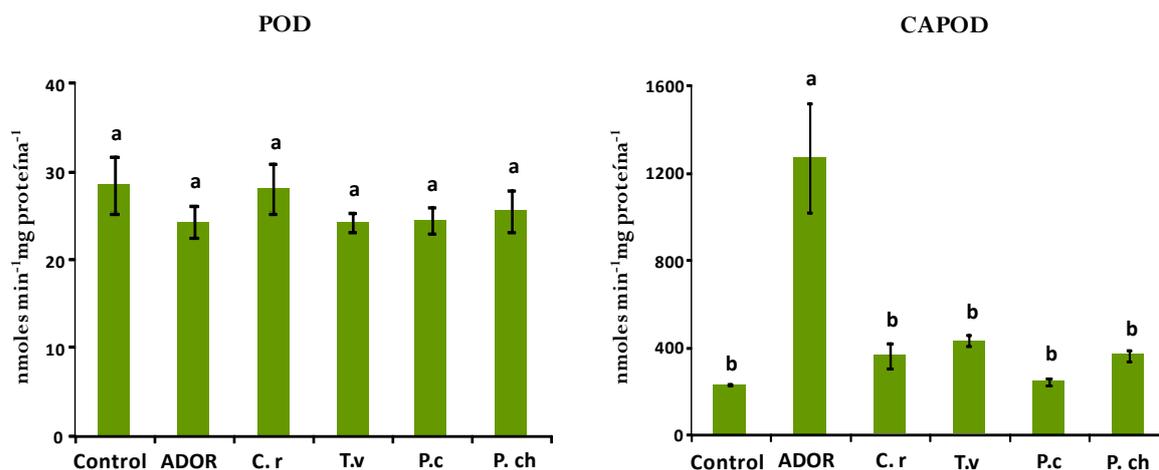


Figura 6. Actividades POD y CAPOD de la raíz de semillas de tomate germinadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* (C.r), *T. versicolor* (T.v), *P. cinnabarinus* (P.c) y *P. chrysogenum*-10 (P.ch). Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=9). En cada tratamiento las letras representan diferencias significativas de los tratamientos respecto del control según el test de Tukey-HSD (P<0,05).

2.6. Antioxidantes totales

Se determinó la capacidad antioxidante total, no enzimática, en la raíz utilizando los métodos analíticos FRAP y el DPPH tal y como se refleja en la figura 7 a y b.

La capacidad antioxidante determinada por el método FRAP alcanzó los 2.300 μ moles gpf^{-1} en la raíz germinada en presencia de ADOR, valor significativamente elevado respecto de los controles sin residuo. Sin embargo, la exposición de las semillas al ADOR transformado con cualquiera de los hongos estudiados produjo un descenso significativo en la capacidad antioxidante respecto del ADOR, aunque el tratamiento que provocó una menor reducción fue el del residuo transformado por *P. cinnabarinus*. El test DPPH, al igual que el FRAP, produjo un incremento en la capacidad antioxidante total de la raíz de semillas de tomate germinadas en presencia del ADOR. Sin embargo, en este caso la transformación por los hongos saprobios del ADOR no produjo descenso de esta capacidad antioxidante en las semillas, sino que se mantuvieron los mismos niveles que los del residuo sin tratar.

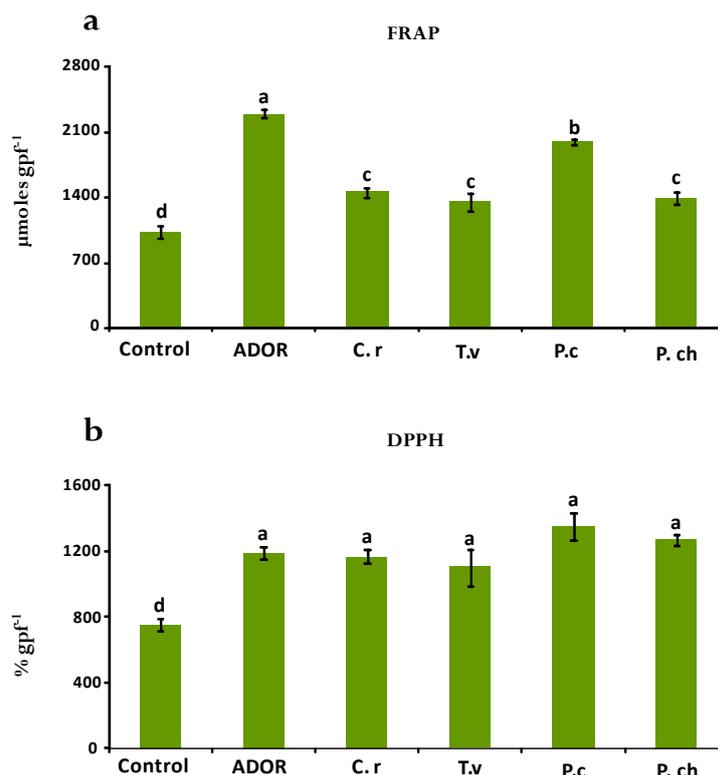


Figura 7. Capacidad antioxidante total (FRAP y DPPH) de la raíz de semillas de tomate germinadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* (C.r), *T. versicolor* (T.v), *P. cinnabarinus* (P.c) y *P. chrysogenum*-10 (P.ch). Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=9). En cada tratamiento las letras representan diferencias significativas de los tratamientos respecto del control según el test de Tukey-HSD ($P < 0,05$).

Discusión

La inhibición del porcentaje de germinación de las semillas de tomate en presencia del extracto acuoso de alpeorujos puso de manifiesto el carácter fitotóxico de dicho residuo. Las distintas dosis ensayadas del ADOR produjeron diferentes efectos sobre el porcentaje de germinación de las semillas. Nuestros resultados mostraron una relación lineal entre la dosis de residuo aplicada y el porcentaje de germinación, de forma que la dosis del 1,25% que contiene 2,12 μg de fenoles no afectó negativamente a la germinación de las semillas de tomate, mientras que concentraciones de 4,25 y 8,5 μg de fenoles (dosis del 2,5 y 5% respectivamente) fueron fitotóxicas. Algunos autores han identificado una gran variedad de compuestos de naturaleza fenólica, fundamentalmente ácidos fenólicos, los cuales poseen un elevado potencial tóxico en las plantas (Harborne, 1980; Rice, 1984). Además, se ha observado que el efecto fitotóxico de dichos compuestos se debe principalmente a que diversos procesos como la expansión celular, permeabilidad

de las membranas, captación de nutrientes y agua, fotosíntesis, respiración, germinación de semillas y/o el crecimiento y desarrollo vegetal se ven afectados negativamente tras su exposición (Sánchez-Moreiras y Reigosa, 2005; Lara-Núñez *et al.*, 2006). El ADOR es un residuo que presenta una mezcla compleja de compuestos fenólicos, como ya se ha descrito en el capítulo I de la presente memoria de Tesis Doctoral. Esta mezcla está formada por diferentes tipos de ácidos fenólicos como el ácido hidroxibenzoico, p-cumárico, vainílico, cafeico, ferúlico, siríngico, protocatecuico y gálico, a los cuales se les atribuye la fitotoxicidad del ADOR. La germinación de semillas de diferentes especies vegetales como el trigo, tomate, girasol o *Plantago lanceolata* se inhiben tras la exposición a algunos de estos compuestos fenólicos (Abenavoli *et al.*, 2006; Lara-Núñez *et al.*, 2006; Abdulghader *et al.*, 2008; Dudai *et al.*, 2009). Sin embargo, no cabe descartar que la mezcla compleja de fenoles del ADOR pueda tener también efecto sinérgico sobre la germinación de semillas (Reigosa *et al.*, 1999; Reigosa y Pazos-Malvido, 2007). La transformación del ADOR por los hongos saprobios, en general, redujo la inhibición del porcentaje de germinación de las semillas producida por el residuo a dosis altas. Así, el crecimiento de las semillas en presencia de ADOR transformado por *C. rigida* y *T. versicolor* a dosis elevadas produjo niveles más altos de germinabilidad que en los tratamientos de extracto acuoso de alpeorujos transformado o no por *P. cinnabarinus* y *P. chrysogenum*-10. Estas diferencias en el porcentaje de germinación entre los distintos tratamientos con ADOR transformado por los hongos se relacionan directamente con el contenido fenólico presente en los diferentes extractos de ADOR, ya que, según los datos del capítulo I, la reducción del contenido de fenoles simples fue más efectiva en el ADOR tratado con *C. rigida* y *T. versicolor* que con *P. cinnabarinus* y *P. chrysogenum*-10. Este hecho se corrobora con trabajos realizados por Aranda *et al.* (2007a,b) donde se ha observado que el efecto fitotóxico de diferentes extractos orgánicos de alpeorujos sobre la germinación de semillas de berro se debe principalmente a la presencia de compuestos fenólicos y que la incubación del extracto con los hongos saprobios alivia o reduce en cierta medida la inhibición de la germinación.

En general, los resultados de IG obtenidos indican que el ADOR inhibe tanto la germinación como el crecimiento radicular de semillas de tomate, sin embargo, la transformación del residuo por los hongos reduce de forma significativa el crecimiento radicular mientras que no afecta a la germinación de las semillas. Este resultado parece indicar que el crecimiento radicular de las semillas de tomate es más susceptible a la exposición al ADOR que la germinación. Además, no se ha encontrado una relación positiva entre la reducción de la concentración fenólica de

los extractos transformados y el crecimiento radicular, lo que reafirmaría la mayor sensibilidad del estadio emergente radicular a la presencia de determinados compuestos fenólicos a diferentes concentraciones. Efectos similares se han observado en ciertas especies vegetales como *Rumex cypripus*, *Amaranthus retroflexus* y *Solanum nigrum* donde la inhibición del crecimiento radicular llegó a ser hasta del 100% tras la exposición a determinados ácidos fenólicos como el ácido hidroxibenzoico, p-cumárico y ferúlico (Reigosa *et al.*, 1999). Sin embargo, este resultado no descarta la posibilidad de que existan otras sustancias de naturaleza polisacáridica en la matriz del ADOR, además de los compuestos fenólicos, que posean un efecto inhibitorio sobre el crecimiento radicular tal y como han observado Aranda *et al.* (2004).

En las distintas fases que acontecen durante la germinación de semillas se producen una serie de cambios y transformaciones metabólicas necesarias para que ésta se lleve a cabo, como el incremento de actividades glucolíticas íntimamente ligadas a la respiración (Podesta y Plaxton, 1994). La actividad glucolítica es necesaria para movilizar las fuentes carbonadas almacas, y así proporcionar el NADH, ATP y metabolitos carbonados necesarios para la formación de la raíz y parte aérea durante la fase emergente de la semilla. Se ha descrito en semillas de berro de jardín y judía expuestas a diferentes extractos fenólicos, una inhibición de la enzima α -amilasa responsable de la ruptura del almidón necesario para la obtención de sustratos que participan en la respiración mitocondrial (Kato-Naguchi y Macias, 2004; Lara-Núñez *et al.*, 2009). Otros estudios han mostrado la inhibición de enzimas como la isocitrato liasa implicada en la movilización de lípidos (McLaughlin y Smith, 1994). En nuestro caso, cabe suponer que principalmente los compuestos fenólicos del ADOR podrían ser los causantes de originar ciertos desequilibrios durante las diferentes fases de la germinación de las semillas y por tanto podrían estar relacionados con la inhibición del crecimiento de la raíz.

Las membranas celulares y sus biomoléculas representan uno de los principales sitios de actuación de las ROS bajo una situación de estrés ambiental (Mittler, 2002). Uno de los parámetros más estudiados bajo situación de estrés y que mejor reflejan la acción de las ROS sobre las membranas celulares, es la acumulación del MDA tras la peroxidación de lípidos que se observa bajo diferentes tipos de estreses abióticos y bióticos (Smirnoff, 1995; Apel y Hirt, 2004; Paradiso *et al.*, 2008). Nuestros resultados han puesto de manifiesto que se incrementa los niveles de MDA tras la germinación de las semillas de tomate en presencia de ADOR con respecto a los controles, hecho que nos indica que la aplicación del

residuo induce una situación de estrés oxidativo en este proceso. Estudios llevados a cabo durante la germinación de semillas de tomate y *Sinapis alba* han señalado un incremento en el contenido en MDA tras la exposición a extractos fenólicos (Cruz-Ortega *et al.*, 2002; Lara-Núñez *et al.*, 2006; Oracz *et al.*, 2007). Los compuestos fenólicos del ADOR pueden provocar el daño en las membranas de forma directa, a través de una interacción con alguno de sus constituyentes, de forma indirecta como consecuencia de la modificación de procesos metabólicos que son necesarios para el mantenimiento de la función de las membranas, o mediado por acción de las ROS. Este daño en las membranas provoca la alteración en la permeabilidad de las mismas, dando lugar a la pérdida de la integridad celular y por tanto a la inducción de una situación de estrés oxidativo.

Por otro lado, el ADOR transformado por los hongos saprobios *C. rigida*, *T. versicolor*, *P. cinnabarinus* y *P. chrysogenum*-10 provocó una acumulación de MDA en semillas de tomate sin diferencias significativas a la observada tanto con el extracto acuoso de alpeorujo como con el control. Este resultado podía indicar que probablemente la transformación del ADOR no esté induciendo una situación de estrés oxidativo tan patente como la del residuo sin transformar. Sin embargo, a pesar de no observarse daño oxidativo en las membranas de las semillas de tomate, se detectó la alteración de otros patrones indicadores de estrés como fue la acumulación de ROS. Estos hechos nos hacen pensar que, probablemente, los tratamientos con los hongos podrían provocar una respuesta de defensa de la semilla más rápida y efectiva que la del residuo, detoxificando las ROS del medio celular, disminuyendo de esta forma el daño oxidativo.

El efecto tóxico de las ROS se debe principalmente al daño que provocan en el DNA, proteínas y en membranas celulares dando lugar a la peroxidación lipídica. Cruz-Ortega *et al.* (2007) propone que los compuestos fenólicos pueden ser agentes inductores de un estrés oxidativo mediado por el incremento en la producción de ROS. La toxicidad de muchos fenoles y quinonas puede atribuirse a la formación de radicales de estos compuestos que actúan donando un electrón al oxígeno molecular y da lugar a radicales superóxido, los cuales serán transformados a H₂O₂ de forma espontánea o a través de la SOD. Existen trabajos que han observado en raíz de plantas expuestas a compuestos fenólicos un incremento en la concentración de ROS como el H₂O₂ (Politycka, 1996; Bais *et al.*, 2003). La determinación de ROS realizada por visualización “*in vivo*” del radical O₂^{·-} y del H₂O₂ mediante microscopia de fluorescencia, reflejó que la raíz en presencia del ADOR acumuló una mayor cantidad del radical O₂^{·-} tras la germinación, mientras que el tratamiento del residuo

con los hongos en general, redujo los niveles de dicho radical. Cabe destacar que la cantidad de radical superóxido detectado en el caso del tratamiento con *T. versicolor* y *P. cinnabarinus* fue menor respecto del de *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10. Así mismo, los niveles de H_2O_2 detectados, indican una mayor acumulación en la raíz germinada en presencia del ADOR, respecto del control. El residuo transformado por *T. versicolor* fue el tratamiento que redujo el contenido en peróxido, mientras que con *C. rigida*, *P. cinnabarinus* y *P. chrysogenum*-10 provocó un incremento en la concentración de H_2O_2 , mayor incluso que el tratamiento con el ADOR. La variabilidad en los patrones de acumulación de radical $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 observada tras la germinación de las semillas nos indica las diferencias en el grado de estrés oxidativo provocado por los distintos tratamientos así como en la respuesta de defensa inducida por el ADOR transformado o no, en la que parece estar directamente involucrada la concentración fenólica de los extractos. Además, hay que destacar que la acumulación de estas ROS observada en cada tratamiento podría ser debido a la mayor o menor participación de la SOD que actuaría eliminando los niveles de $O_2^{\cdot-}$ hacia H_2O_2 .

La determinación de las actividades de antioxidantes enzimáticos en la raíz de semillas de tomate germinadas evidenció un incremento de las SOD, GR y GST respecto al control sin residuo en los tratamientos con ADOR transformado o no por los hongos, sin embargo, las actividades CAT y APX no se modificaron. La presencia de extractos fenólicos durante la germinación de semillas inducen estrés oxidativo y generan una respuesta de defensa mediada por un incremento en la actividad de antioxidantes enzimáticos (Lara-Núñez *et al.*, 2006; Oracz *et al.*, 2007; Abdulghader *et al.*, 2008). Las SODs son enzimas clave en la regulación celular de la concentración de radicales superóxido a fin de mantener el estado redox celular óptimo. Se observó un aumento significativo de la actividad SOD en semillas tratadas con ADOR mientras que la transformación del extracto acuoso realizada por los hongos consiguió reducir el incremento de la SOD observado por el extracto acuoso de alpeorajo, excepto en el caso del hongo *P. cinnabarinus*. La determinación de las isoenzimas de la SOD mediante EPGA-Nativa puso de manifiesto la presencia de dos isoenzimas, SOD-3 y a la SOD-1 correspondientes a las Cu/Zn-SOD. En plantas de tomate se ha señalado que la SOD-3 presenta una localización citoplasmática (Perl-Treves *et al.*, 1990), lo cual podría indicar el incremento de la SOD-3 sobre la SOD-1 en nuestros ensayos para evitar el acúmulo de $O_2^{\cdot-}$ principalmente en dichas zonas citoplasmáticas.

El incremento de actividad SOD observado se debería a la respuesta de defensa desencadenada por la raíz de semillas germinadas en presencia de los diferentes extractos acuosos transformados o no, en función de los niveles de superóxido producidos como consecuencia del estrés ocasionado. Así, la presencia del ADOR durante la germinación de las semillas incrementó la actividad SOD como consecuencia del elevado contenido en radical superóxido detectado en la raíz. Sin embargo, el aumento de actividad SOD no fue suficiente para eliminar todo el O_2^- producido tras la germinación, probablemente el ADOR esté generando una situación de estrés grave que determina una producción elevada de dicho radical que la SOD no pueden controlar lo que provoca un incremento del contenido en MDA y por tanto mayor daño celular. La situación que desencadena la germinación de las semillas con ADOR transformado por los hongos es diferente, ya que observamos como los extractos incubados con *T. versicolor* y *P. cinnabarinus* con menor concentración de fenoles que la del extracto acuoso de alpeorujos incrementan la SOD de forma similar al ADOR. En este caso la actividad es suficiente para eliminar la producción de superóxidos generados tras la germinación, hecho que se corresponde con los bajos niveles de O_2^- detectados en los tratamientos con ADOR transformado por estos hongos. Por otro lado, la transformación del extracto acuoso realizada por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 indujo menor actividad SOD que la del resto de los tratamientos y por tanto provocó mayor acumulación de radicales superóxido, aunque bastante inferior a la observada en el caso del ADOR ya que los daños celulares fueron menores. La actuación de la SOD también contribuiría a la formación del H_2O_2 determinando su mayor o menor acumulación en la raíz germinada de tomate. Se sabe que los niveles de peróxido están directamente relacionados con la actuación de las CAT y APX ya que estas están implicadas en su detoxificación. En nuestros resultados no observamos cambios en la actividad de dichas enzimas tras la germinación de las semillas de tomate en presencia del ADOR transformado o no. Sin embargo, observamos que la raíz en presencia de ADOR sin transformar o transformado incrementaron en general los niveles de peróxido respecto de los controles, el tratamiento con el residuo transformado por *T. versicolor* fue el único donde se observó una reducción del contenido de H_2O_2 acumulado respecto al del extracto acuoso de alpeorujos. Este resultado indica que probablemente se esté induciendo otra respuesta de detoxificación del H_2O_2 distinta de la acción enzimática de la CAT o APX.

La GR es otra enzima que junto con la APX y formando parte del conocido ciclo del ascorbato-glutation o ciclo de Halliwell-Asada-Foyer está implicada en el proceso de detoxificación de ROS como el H_2O_2 en las células vegetales (Smirnoff, 2000). Los extractos acuosos de alpeorujos sin transformar y transformado por todos los hongos produjeron un aumento de la actividad GR de la raíz de tomate germinada respecto al control sin residuo. La transformación del residuo y su exposición durante la germinación de semillas produjo en la mayoría de los tratamientos incrementos de actividad similar o incluso superiores a los producidos por el ADOR en cambio, *C. rigida* fue el único que mostró niveles menores de actividad GR. Estos resultados parecen indicar que probablemente la GR esté actuando en la regeneración del GSH oxidado a GSH reducido regulando de esta forma el estado redox celular mediante el proceso de detoxificación del H_2O_2 por la acción directa del GSH, ya que no se observan indicios de la posible participación del ciclo del ascorbato-glutation en el proceso de detoxificación de ROS (Goel *et al.*, 2003). El hecho de que las semillas crecidas en presencia de ADOR tratado con *C. rigida* produjesen menor actividad GR, probablemente pueda ser debido a que el estrés oxidativo generado en dichas semillas es menor respecto del resto de tratamientos, por lo que genera una producción de ROS más baja y la respuesta de defensa inducida mediante la actividad GR también es menor.

En cuanto a la enzima GST, se observó como el ADOR sin transformar y transformado por los hongos saprobios incrementó en gran medida los niveles de dicha actividad. La GST es una enzima implicada en procesos de detoxificación de compuestos xenobióticos mediante procesos de conjugación al GSH y se ha descrito su participación en respuesta a numerosos estreses abióticos y bióticos (Marrs, 1996; Dixon *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 2000). El incremento de dicha enzima en nuestros ensayos podría deberse a su actuación detoxificando los compuestos fenólicos tanto del ADOR transformado como no transformado, probablemente mediante el almacenamiento de estos en vacuolas a fin de reducir los posibles daños celulares ocasionados por los mismos. Sin embargo, se ha puesto de manifiesto la versatilidad de la GST como glutatión peroxidasas que actúa eliminando el exceso de H_2O_2 generado tras el estrés y así evitar daños celulares (Cummins y Edwards, 1999). Cruz-Ortega *et al.* (2002) ponen de manifiesto la aparición de las GSTs en raíz de tomate expuestas a extractos fenólicos, las cuales, junto con el incremento de la actividad CAT, suponen un mecanismo de defensa de la propia raíz frente al daño celular ocasionado por el incremento de las ROS. En nuestro caso y en base a los resultados, la GST podría estar actuando como enzimas clave en la respuesta de

defensa inducida en las semillas tras la exposición al ADOR, bien como enzima detoxificadora de los fenoles o mediante la eliminación del H_2O_2 .

La determinación de la fracción soluble de proteínas mostró que la actividad de la POD no sufrió variación entre los distintos tratamientos. Normalmente la actividad POD se suele cuantificar sobre la fracción soluble de proteínas (Tahlil *et al.*, 1999), pero no hay que olvidar que las PODs también se encuentran formando parte de las paredes celulares unidas a estas mediante enlaces iónicos o covalentes. Por ello, en nuestro caso cabría la posibilidad de que pudiéramos haber observado un aumento en la actividad de la POD unida a la pared celular en presencia del ADOR. Por otro lado, sabemos que una de las funciones que se les atribuye a las PODs es su participación en los procesos de lignificación de las paredes celulares (Almagro *et al.*, 2009). El alcohol coniferílico, p-cumarílico y sinapílico, precursores de la lignina, son substratos que, por acción de las PODs, son oxidados e incorporados a la matriz de la pared celular contribuyendo de esta forma a su lignificación. La oxidación de los distintos fenoles por acción de las peroxidasas necesita H_2O_2 procedente del metabolismo de las propias PODs o bien de las NADPH oxidasas localizadas en las membranas citoplasmáticas (Lee *et al.*, 2007). Las PODs aniónicas y catiónicas presentan gran afinidad por los sustratos precursores de la lignina (Quiroga *et al.*, 2000). La determinación de la CAPOD en la raíz de semillas germinadas en presencia de ADOR puso de manifiesto un aumento en dicha actividad. Este resultado podría indicar que, la propia raíz, como mecanismo de defensa frente al estrés por el ADOR, esté induciendo un proceso de lignificación por medio de ciertas peroxidasas solubles aniónicas que presentan gran afinidad por los precursores de la lignina tal y como ha descrito previamente dos Santos *et al.* (2008). Además, se sabe que el ácido ferúlico presente en el ADOR podría ser absorbido por la raíz e incorporado a los polisacáridos de la pared, contribuyendo de esta forma al reforzamiento o endurecimiento de las paredes celulares radicales creando una barrera física de defensa frente al estrés. Por otro lado, el proceso de lignificación está relacionado con una disminución de la plasticidad de las paredes celulares y por tanto determina una inhibición del crecimiento vegetal (Schützendübel *et al.*, 2001; Schützendübel y Polle, 2002). Este acontecimiento explicaría en gran medida la reducción de la longitud radicular observada en la raíz de semillas de tomate expuestas al ADOR. Además, el aumento de la actividad CAPOD podría estar también relacionado con el incremento de los fenoles totales detectados en nuestros ensayos. La ruta de biosíntesis y metabolismo de fenoles así como de lignificación puede estar activada en semillas en respuesta al ADOR. Algunos autores han observado un aumento en las actividades fenilalanina

amonio liasa y polifenol oxidasa determinando un incremento de los fenoles totales en diversas especies vegetales tras la exposición a compuestos fenólicos y metales pesados (Rama Devi y Prasad, 1996; Rivero *et al.*, 2001; Cervilla *et al.*, 2009).

Los tratamientos con ADOR transformado por hongos saprobios no mostraron un incremento de la actividad CAPOD en la raíz de semillas de tomate por lo que probablemente el estrés ocasionado por estos tratamientos no haya sido tan severo como para que la raíz desencadene una respuesta de defensa basada en la lignificación. Sin embargo, la determinación de los fenoles totales en semillas germinadas en presencia de ADOR no transformado y transformado por los hongos saprobios puso de manifiesto un aumento que podría estar relacionado con la función detoxificadora de las ROS por medio de los compuestos fenólicos.

La determinación de la capacidad antioxidante de semillas de tomate por el método FRAP reveló un aumento manifiesto en los tratamientos con ADOR transformado o no aunque en el caso de los extractos tratados por los hongos el incremento fue menor que el ocasionado por el residuo. Este resultado nos indica una relación positiva entre el contenido fenólico del residuo y la capacidad antioxidante de las semillas de tomate germinadas en presencia del ADOR transformado por los diferentes hongos. Por el contrario, el DPPH reveló un aumento similar en la capacidad antioxidante de la raíz expuesta a los diferentes tratamientos indicando una menor sensibilidad de este método en la detección de la capacidad antioxidante.

Capítulo III

Efecto de la exposición del extracto acuoso de alpeorrujo en la fisiología de plantas de tomate

Efecto de la aplicación del extracto acuoso de alpeorujó en la fisiología de plantas de tomate

1. Análisis de la fitotoxicidad del ADOR en plantas de tomate

Objetivo

Diversos estudios han puesto de manifiesto la toxicidad del alpeorujó y de su extracto acuoso (ADOR) sobre el crecimiento de plantas de tomate cultivadas, tanto en condiciones controladas como en campo (Sampedro *et al.*, 2004a; Aranda *et al.*, 2004; 2006). Hasta la fecha, todos los ensayos realizados en este ámbito en invernadero han analizado el efecto de dicho residuo sobre la fitotoxicidad de la planta después de un mes de crecimiento. Sin embargo, para analizar el papel del ADOR en la fisiología de las plantas de tomate se planteó como primer objetivo de este capítulo determinar el efecto de dicho residuo a lo largo del crecimiento de la planta. De esta manera, podremos establecer las condiciones de fitotoxicidad del ADOR en base a la dosis y al tiempo de exposición para los posteriores estudios fisiológicos. Así mismo, para conocer la eficacia de la transformación del residuo por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 se procedió al análisis de la fitotoxicidad del ADOR transformado con ambos hongos en las mismas condiciones de dosis y tiempo de exposición.

Metodología

Para llevar a cabo este estudio se emplearon semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) esterilizadas en superficie y pregerminadas en semillero. Cuando alcanzaron el tamaño adecuado se transfirieron a macetas de 300 ml de capacidad que contenían una mezcla de suelo:arena (2:3) (v:v) esterilizada. El extracto acuoso de alpeorujó se incubó, usando las condiciones descritas en el apartado general de Material y Métodos, con los hongos saprobios *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10, seleccionados en el Capítulo I en base a su maquinaria enzimática y poder de transformación fenólica. Las plantas se trataron con ADOR sin transformar y transformado con los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 a las dosis de 0, 2,5 y 5% a los 3 días del trasplante y se mantuvieron durante 1, 2, 4, 7, 10 y 30 días de cultivo en condiciones controladas de luz, humedad y temperatura. Transcurrido el

tiempo de exposición al residuo se cosecharon las plantas y se pesó el material fresco de raíz y parte aérea.

Resultados

Tras 1 y 2 días de exposición al extracto acuoso de alpeorujó las plantas de tomate no sufrieron variación de peso fresco respecto a las controles sin residuo (Fig. 1). El peso de la raíz y la parte aérea de tomate se redujo a los 4 días de exposición al 5% de ADOR, mientras que la dosis del 2,5% no afectó negativamente al crecimiento de las plantas. Sin embargo, tras 7 días en presencia del residuo, ambas dosis mostraron un efecto fitotóxico claro ya que redujeron sensiblemente el peso fresco de la raíz y parte aérea de la planta. Tras la exposición de las plantas al ADOR durante 10 días se observaron las mayores inhibiciones del crecimiento, llegando a alcanzarse descensos del 60% a la dosis más alta de residuo utilizada. En base a estos resultados, se seleccionó la dosis del 5% y los tiempos 4 y 10 días como las mejores condiciones para estudiar el efecto del ADOR en la fisiología de la planta.

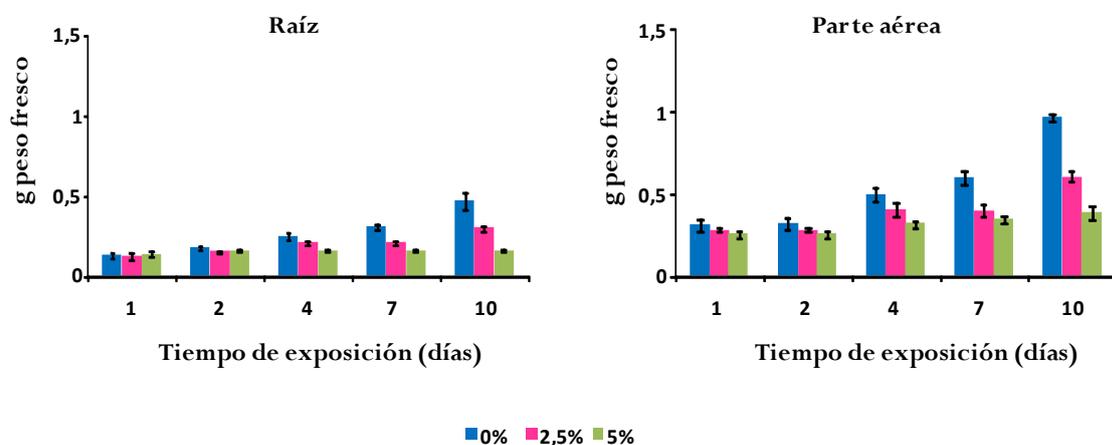


Figura 1. Peso fresco de raíz y parte aérea de plantas de tomate cultivadas en presencia de ADOR a las dosis de 0, 2,5 y 5% durante 1, 2, 4, 7 y 10 días. Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=10).

Como muestra la figura 2 y como ya se había descrito anteriormente, el peso fresco de la planta de tomate se redujo de forma significativa tras 4 días de exposición al residuo, aunque este efecto fue mayor en la parte aérea que en la raíz. Los resultados pusieron de manifiesto que el efecto fitotóxico del ADOR incremento conforme aumentaba el tiempo de crecimiento de las plantas en presencia del residuo. La aplicación de ADOR transformado por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 produjo incremento del peso de las plantas tras 4 días de exposición respecto al de la plantas sin residuo. El peso fresco de las plantas de tomate cultivadas en presencia del ADOR transformado por los hongos se incrementó respecto al de plantas expuestas al residuo sin transformar, llegando a igualar en la mayoría de los casos a los controles.

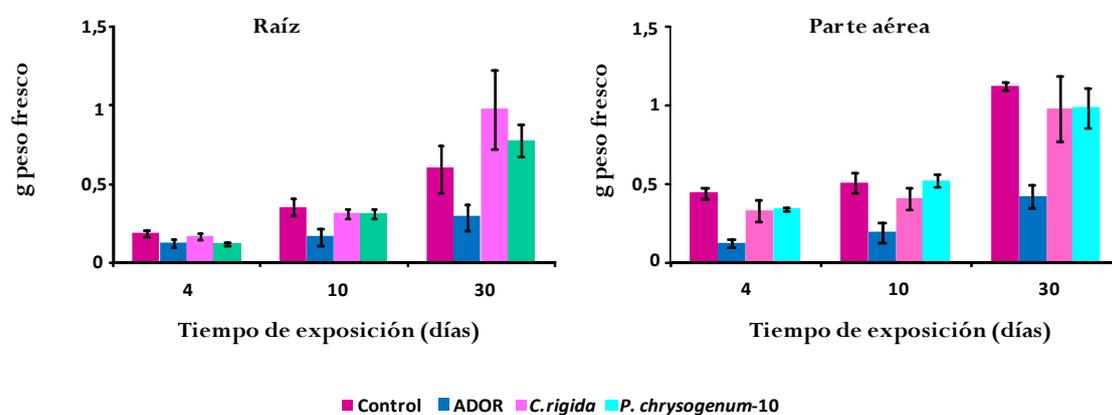


Figura 2. Peso fresco de raíz y parte aérea de plantas de tomate cultivadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 durante 4, 10 y 30 días. Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=10).

2. Respuestas fisiológicas inducidas generadas en plantas de tomate cultivadas en presencia del ADOR

Objetivo

El objetivo del tratamiento biológico del alpeorujó con hongos saprobios es su posible uso como fertilizante orgánico en agricultura. Sin embargo hasta la fecha, solo se han realizado estudios del efecto del alpeorujó sobre el crecimiento de diferentes especies vegetales. Por esta razón, se planteó como objetivo de este capítulo abordar un estudio en profundidad sobre algunos de los procesos fisiológicos que pueden verse afectados tras el cultivo de las plantas en presencia de

ADOR, y analizar si el residuo induce estrés oxidativo, así como la respuesta de defensa generada en la planta tras la exposición del mismo.

Metodología

Para llevar a cabo este estudio se cultivaron plantas de tomate, tal y como se ha descrito en el apartado anterior, durante 4, 10 y 30 días en presencia de ADOR a la dosis del 5% (v:v), incubado o no con los hongos saprobios *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10. El diseño experimental consistió en un bloque aleatorio de cuatro tratamientos y 10 plantas por tratamiento dispuestas en macetas independientes. Durante el cultivo de las plantas se determinó la eficiencia fotosintética de las hojas. Finalizado el cultivo de la planta de tomate en presencia de extracto acuoso de alpeorujo, la raíz y las hojas se cosecharon y parte de este material se destinó al análisis del crecimiento y otras determinaciones fisiológicas. El resto del material se congeló y se utilizó para realizar el estudio enzimático y bioquímico, tal y como se describe en los apartados 8 y 9 del capítulo general de Material y Métodos.

Resultados

2.1. Parámetros fisiológicos

2.1.1. Análisis del crecimiento

La exposición de las plantas de tomate al ADOR redujo significativamente su peso seco (PS) y tasa de crecimiento relativo (RGR) en raíz y hoja (Fig. 3). Cuando se aplicó extracto acuoso de alpeorujo sin tratar, no se observaron diferencias significativas en el peso seco (PSR) y RGR_R de la raíz de plantas cultivadas en presencia del residuo durante 4 días de exposición (Fig. 3a y c). Sin embargo, la raíz de tomate disminuyó drásticamente su peso y crecimiento relativo tras 10 y 30 días de exposición de la planta al residuo. La incubación del ADOR con los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10, incrementó significativamente el PSR y el RGR_R de la raíz de plantas a las que se les añadió ADOR durante 10 y 30 días respecto a las tratadas con ADOR. Cabe destacar que a los 10 días de crecimiento de la planta en presencia del residuo transformado por *P. chrysogenum*-10 el aumento del peso de la raíz respecto a las tratadas con ADOR fue mayor. Tras 30 días de exposición, el residuo transformado por los hongos incrementó el peso seco y el crecimiento de la

raíz respecto del tratamiento con ADOR llegando incluso a alcanzar valores similares a los controles.

La parte aérea de las plantas de tomate sufrió los efectos fitotóxicos del ADOR de forma similar a la raíz (Fig. 3b y d). La exposición de las plantas al ADOR sin tratar se tradujo en una reducción del peso seco de la parte aérea (PSPA) del 34 y 54% a los 10 y 30 días respecto al control. De la misma forma, se observó una disminución del RGR_{PA} del 85 y 57% a los 10 y 30 días de exposición de las plantas al residuo. La aplicación del ADOR incubado con *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 a las plantas provocó un incremento del PSPA y RGR_{PA} respecto de las tratadas con ADOR sin transformar, llegando a obtener valores similares a las plantas control tras 10 y 30 días de exposición.

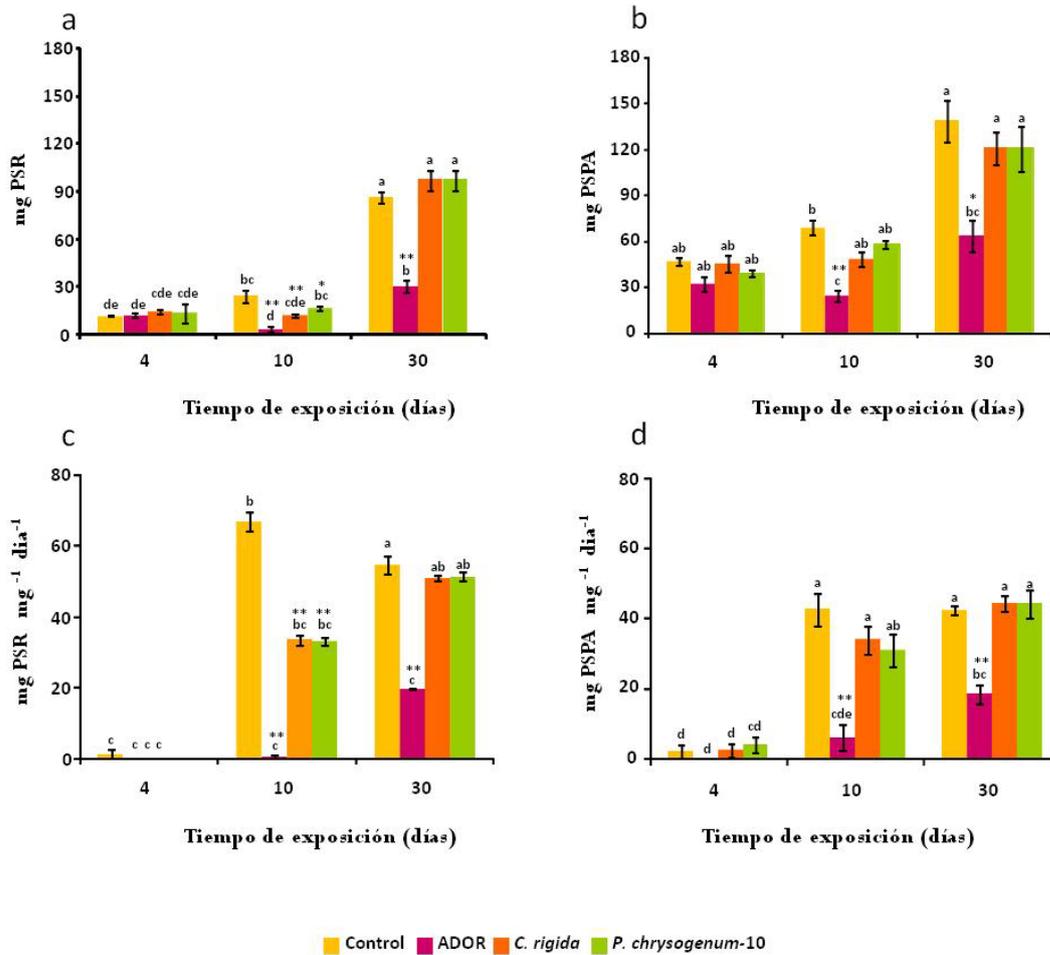


Figura 3. Peso seco de raíz (PSR) (a) y parte aérea (PSPA)(b) e índice de crecimiento relativo en raíz (RGR_R)(c) y parte aérea (RGR_{PA}) (d) en plantas de tomate cultivadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum-10* durante 4, 10 y 30 días. Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=4). En cada tiempo de exposición * y ** representan las diferencias significativas respecto al control según el test de Dunnett ($P < 0,05$ y $P < 0,01$ respectivamente). Las letras indican las diferencias significativas de cada tratamiento a lo largo del tiempo de exposición según el test de Tukey-HSD ($P < 0,05$).

2.1.2. Análisis morfológico de la raíz de tomate

Paralelamente al estudio realizado del peso seco y crecimiento relativo de las plantas de tomate cultivadas en presencia de los diferentes tratamientos de ADOR, se realizó un análisis morfológico de la raíz mediante el analizador de imágenes WinRhizo por el que se determinó la longitud, área, diámetro, volumen y número de puntas radiculares (Tabla 1 y Fig. 4).

La exposición de las plantas al ADOR durante 4 días redujo la longitud, volumen y número de puntas radiculares mientras que a los 10 días disminuyó el

área radicular además de la longitud y el número de puntas. Cabe destacar que a los 30 días de cultivo de las plantas en presencia de extracto acuoso de alpeorujó solo se observó una reducción del volumen de la raíz ya que se restablecieron el resto de los parámetros morfológicos radicales que estaban disminuidos a tiempos cortos de exposición al residuo. El diámetro radicular no sufrió cambios durante los distintos periodos de exposición de las plantas al ADOR.

Por otro lado, el efecto de la aplicación a las plantas del ADOR transformado por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 produjo, a los 4 y 10 días de exposición, el incremento de la longitud, el área, el volumen y el números de puntas radicales, parámetros que se vieron afectados tras la exposición de la planta al extracto acuoso de alpeorujó. No se observaron efectos negativos del ADOR transformado sobre la raíz de tomate, salvo en el caso del extracto transformado por *P. chrysogenum*-10, que provocó la reducción de la longitud y del área radicular a los 10 días, parámetro que se recuperó a los 30 días de exposición alcanzado niveles similares al de las plantas control.

Tabla 1. Parámetros morfológicos: longitud, área, diámetro, volumen y número de puntas radicales de la raíz de plantas de tomate cultivadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 durante 4, 10 y 30 días. Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=4). En cada tiempo de exposición * y ** representan las diferencias significativas respecto al control según el test de Dunnett ($P < 0,05$ y $P < 0,01$ respectivamente). Las letras indican las diferencias significativas de cada tratamiento a lo largo del tiempo de exposición según el test de Tukey-HSD ($P < 0,05$).

Tratamientos	Tiempo exposición	Longitud	Área	Diámetro	Volumen	Nº puntas
Control	4	90,50 \pm 9,20 cd	20,00 \pm 7,08 bc	0,46 \pm 0,03 c	0,30 \pm 0,06 c	116,66 \pm 9,82 cde
	10	184,40 \pm 6,97 b	28,16 \pm 1,65 b	0,47 \pm 0,01 c	0,34 \pm 0,03 c	224,66 \pm 12,54 b
	30	465,74 \pm 44,46 a	125,49 \pm 6,09 a	0,84 \pm 0,05 ab	2,85 \pm 0,07 a	426,66 \pm 16,25 a
ADOR	4	44,36 \pm 4,85 d**	7,03 \pm 1,28 bc	0,50 \pm 0,06 c	0,06 \pm 0,03 c*	71,00 \pm 7,26 de**
	10	30,80 \pm 8,41 d**	4,98 \pm 1,09 c**	0,57 \pm 0,02 bc	0,20 \pm 0,14 c	47,30 \pm 8,19 e**
	30	451,25 \pm 12,72 a	107,23 \pm 8,82 a	0,72 \pm 0,04 a	1,99 \pm 0,27 b*	396,00 \pm 8,32 a
<i>C. rigida</i>	4	95,10 \pm 2,49 cd	13,36 \pm 1,86 bc	0,50 \pm 0,04 c	0,26 \pm 0,07 c	151,33 \pm 10,41 bcd
	10	156,50 \pm 8,87 bc	22,88 \pm 42,71 b	0,53 \pm 0,04 c	0,30 \pm 0,01 c	194,33 \pm 36,22 bc
	30	433,61 \pm 12,08 a	120,59 \pm 5,34 a	0,90 \pm 0,02 a	2,79 \pm 0,19 a	412,00 \pm 19,42 a
<i>P. chrysogenum</i> -10	4	77,53 \pm 1,89 d	14,06 \pm 1,40 bc	0,53 \pm 0,03 c	0,20 \pm 0,004 c	137,66 \pm 17,25 bcde
	10	70,67 \pm 5,20 d**	14,25 \pm 21,80 bc**	0,51 \pm 0,04 c	0,19 \pm 0,03 c	147,00 \pm 30,92 bcd
	30	479,97 \pm 15,02 a	126,28 \pm 3,64 a	0,81 \pm 0,02 a	2,74 \pm 0,19 a	405,30 \pm 33,17 a
HSD		21,81	6,17	0,048	0,17	25,06
p-valor		***	***	***	***	***

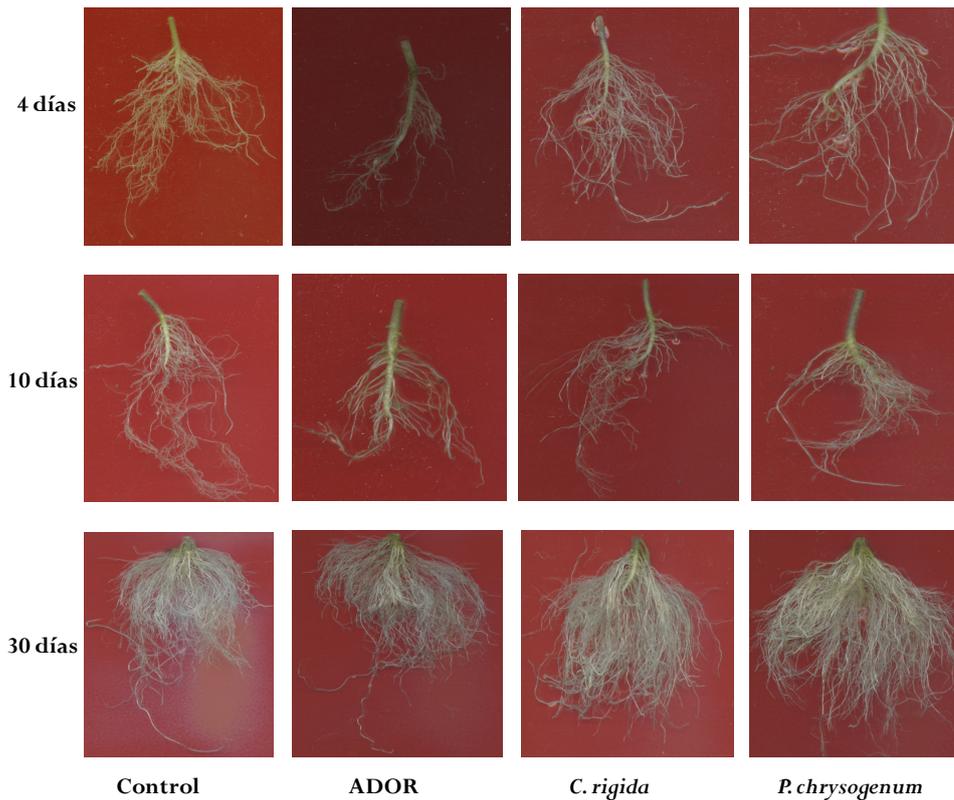


Figura 4. Imágenes de la raíz de plantas de tomate cultivadas en presencia del ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 durante 4, 10 y 30 días realizadas con el analizador de imágenes WhinRhizo.

2.1.3. Contenido hídrico

El análisis del contenido hídrico relativo (CHR) en plantas de tomate en presencia de ADOR reveló su reducción en la raíz y parte aérea tras la exposición al residuo (Fig. 5). Así, en la raíz, el CHR disminuyó significativamente un 32 y 18% tras 4 y 10 días de cultivo de las plantas en presencia de ADOR. De igual forma, el ADOR afectó negativamente al CHR de la parte aérea, observándose una reducción del 32 y 40% tras 4 y 10 días de exposición de las plantas respectivamente. En cambio, tras 30 días de cultivo en presencia de ADOR, el contenido hídrico de la raíz y de la parte aérea no se afectó. Cabe resaltar que la transformación del ADOR por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 incrementó, respecto al extracto no transformado, el contenido hídrico de la raíz y parte aérea tras 4 y 10 días de exposición de la planta al ADOR igualándolo al de las controles.

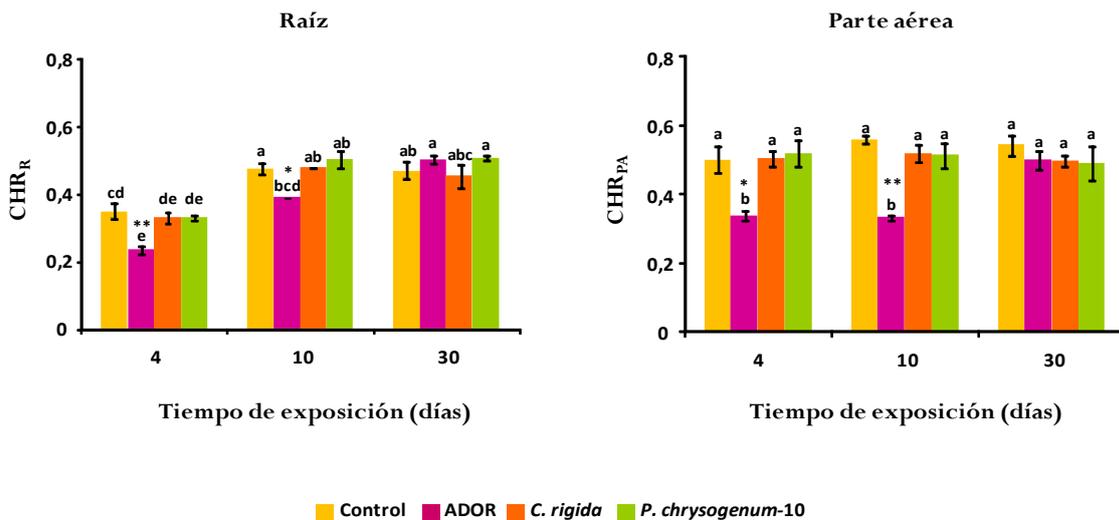


Figura 5. Contenido hídrico relativo (CHR) en la raíz y parte aérea de plantas de tomate cultivadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum-10* durante 4, 10 y 30 días. Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=4). En cada tiempo de exposición * y ** representan las diferencias significativas respecto al control según el test de Dunnett ($P < 0,05$ y $P < 0,01$ respectivamente). Las letras indican las diferencias significativas de cada tratamiento a lo largo del tiempo de exposición según el test de Tukey-HSD ($P < 0,05$).

2.1.4. Eficiencia fotosintética

El crecimiento de las plantas de tomate en presencia de ADOR redujo la eficiencia del PSII durante la fotosíntesis en un 59 y 68% respecto a las plantas control a los 4 y 10 días de exposición (Fig. 6). A los 30 días de exposición al extracto acuoso de alpeorujó se observó que las plantas tenían valores similares de eficiencia del PSII que las crecidas en ausencia del residuo. Las plantas de tomate que crecieron en presencia de ADOR transformado por los hongos saprobios *C. rigida* y *P. chrysogenum-10* incrementaron la eficiencia fotosintética respecto a plantas en presencia de ADOR no transformado alcanzando valores similares a las controles sin residuo.

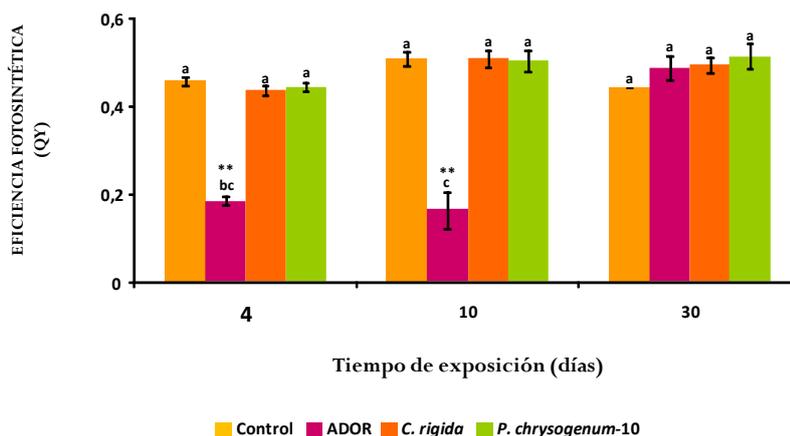


Figura 6. Eficiencia fotosintética de las plantas de tomate cultivadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum-10* durante 4, 10 y 30 días. Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=4). En cada tiempo de exposición * y ** representan las diferencias significativas respecto al control según el test de Dunnett ($P < 0,05$ y $P < 0,01$ respectivamente). Las letras indican las diferencias significativas de cada tratamiento a lo largo del tiempo de exposición según el test de Tukey-HSD ($P < 0,05$).

2.1.5. Clorofila y carotenoides

El análisis del contenido en clorofila a y b, así como de los compuestos carotenoides presentes en las hojas de plantas de tomate, mostró que la aplicación del ADOR a las plantas solo afectó negativamente al contenido de clorofila a y b tras 10 días de exposición (Fig. 7). La transformación del extracto acuoso de alpeorujó con los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum-10* provocó en la planta un aumento del contenido en clorofila a respecto al tratamiento del ADOR aunque no pudo igualar al de las plantas control. Sin embargo, en plantas en presencia del residuo transformado por los hongos, los niveles de clorofila b se mantuvieron similares a los de las plantas cultivadas en ausencia de ADOR. El contenido de carotenoides de las plantas de tomate no se modificó significativamente en ninguno de los tratamientos ensayados. En general, se observó un descenso del contenido en pigmentos clorofílicos y carotenoides a los 30 días de cultivo tanto en plantas control como en los tratamientos con ADOR transformado o no.

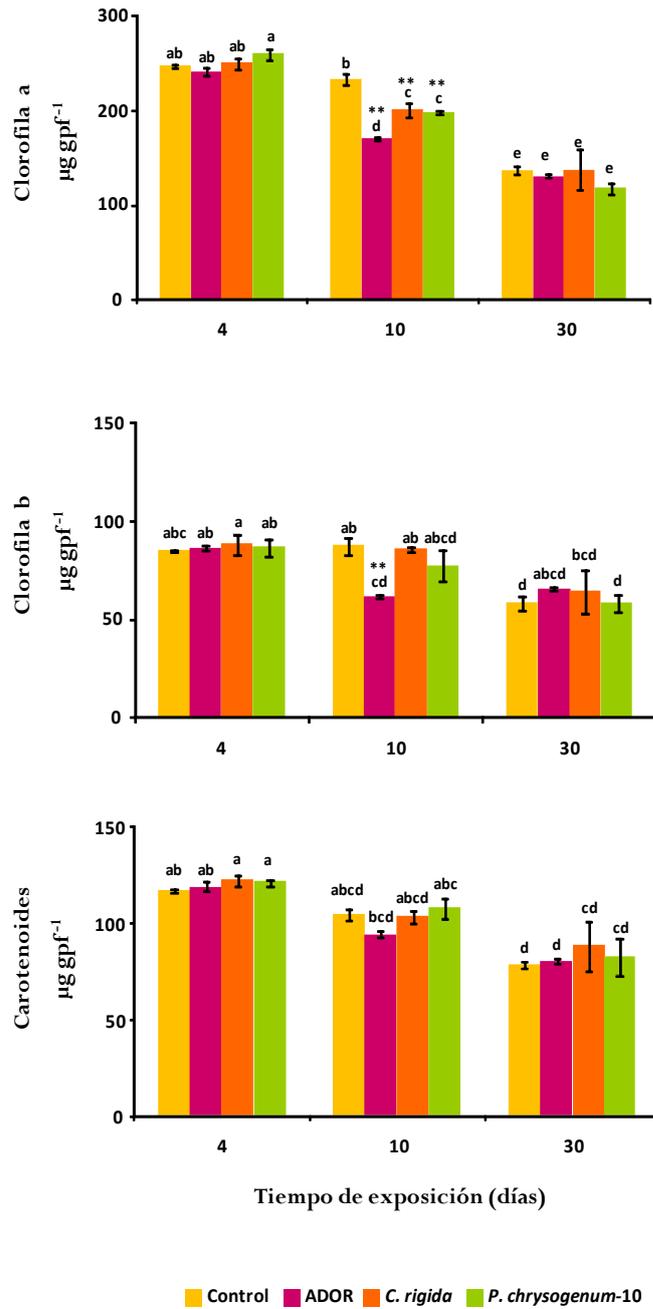


Figura 7. Contenido de clorofila a, b y carotenoides en hojas de plantas de tomate cultivadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum-10* durante 4, 10 y 30 días. Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=4). En cada tiempo de exposición * y ** representan las diferencias significativas respecto al control según el test de Dunnnett ($P < 0,05$ y $P < 0,01$ respectivamente). Las letras indican las diferencias significativas de cada tratamiento a lo largo del tiempo de exposición según el test de Tukey-HSD ($P < 0,05$).

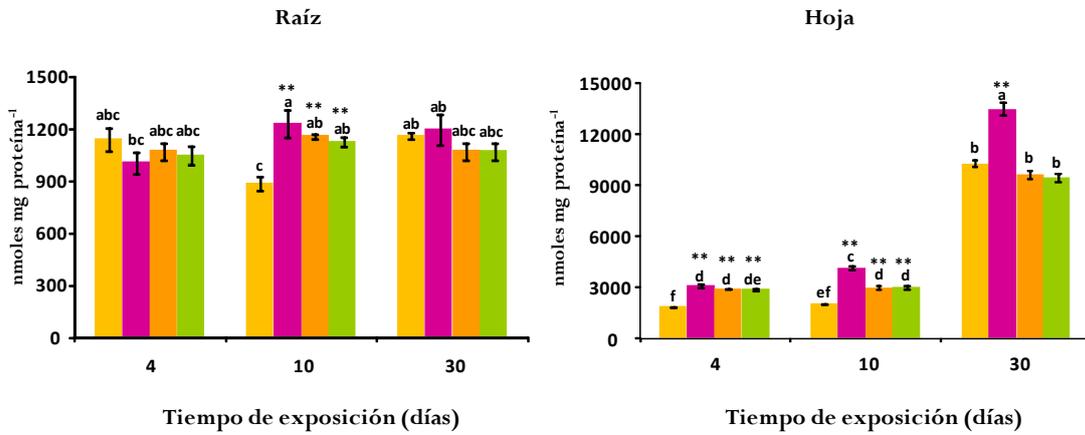
2.2. Marcadores de estrés oxidativo

Como indicadores de estrés oxidativo se determinó el contenido en MDA y H_2O_2 tal y como se refleja en la figura 8.

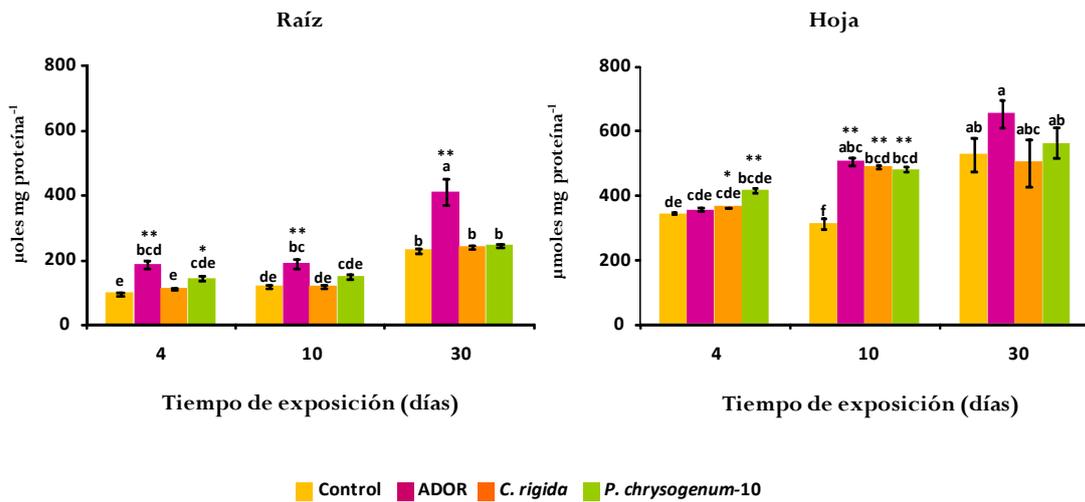
La raíz de plantas de tomate cultivadas en presencia de ADOR sin transformar y transformado por *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 incrementó el contenido en MDA a los 10 días de exposición alcanzando valores de 1200 nmoles mg^{-1} proteína, mientras que a los 4 y 30 días los niveles de MDA fueron similares a la raíz control (Fig. 8a). Por otro lado, la exposición de las plantas al ADOR no transformado aumentó significativamente el contenido en MDA en hoja en todos los tiempos de exposición ensayados. A los 4 días de crecimiento de las plantas en presencia de ADOR transformado por los dos hongos se observó un incremento del contenido de MDA similar al descrito con el residuo sin transformar. Sin embargo, la exposición de plantas durante 10 días con el residuo transformado aumentó los niveles de MDA aunque en menor proporción que el del extracto acuoso de alpeorujó. Cabe destacar que la transformación del ADOR con *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 a los 30 días de exposición en plantas redujo los contenidos de MDA en hoja hasta alcanzar niveles similares a los controles.

Pudimos observar el incremento del contenido de H_2O_2 en raíz de plantas de tomate tras su exposición al ADOR durante 4, 10 y 30 días (Fig. 8b). Cabe resaltar que la transformación del ADOR realizada por *C. rigida* no incrementó el contenido en peróxido de hidrógeno en raíz tras su aplicación a plantas de tomate respecto al control sin residuo. La raíz de plantas crecidas en presencia de ADOR transformado por *P. chrysogenum*-10 aumentó el contenido en H_2O_2 respecto a las plantas sin residuo tras 4 días de exposición, mientras que tras 10 y 30 días mantuvo los niveles similares a los controles. La aplicación de ADOR transformado o no a plantas, provocó en hoja un incremento del 61% de la producción de H_2O_2 a los 10 días de exposición. Sin embargo a los 4 días de crecimiento de la planta se produjo un aumento de H_2O_2 en presencia de ADOR transformado por *C. rigida* menor que el observado tras la aplicación del extracto transformado por *P. chrysogenum*-10. Tras 30 días, el contenido en H_2O_2 en hoja de plantas tratadas con ADOR transformado o no fue similar al de plantas control.

a. Contenido en MDA



b. Contenido en H₂O₂



■ Control ■ ADOR ■ *C. rigida* ■ *P. chrysogenum-10*

Figura 8. Contenido en MDA (a) y H₂O₂ (b) en la raíz y hoja de plantas de tomate cultivadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum-10* durante 4, 10 y 30 días. Los datos representan el valor medio de la muestra ±SE (n=9). En cada tiempo de exposición * y ** representan las diferencias significativas respecto al control según el test de Dunnett (P<0,05 y P<0,01 respectivamente). Las letras indican las diferencias significativas de cada tratamiento a lo largo del tiempo de exposición según el test de Tukey-HSD (P<0,05).

2.3. Respuesta antioxidante

2.3.1. Enzimas antioxidantes

La aplicación del ADOR a plantas de tomate indujo cambios significativos en su sistema antioxidante enzimático (Figuras 9 y 10).

El crecimiento de plantas en presencia de ADOR solo supuso en la raíz un incremento de las actividades SOD, CAT, GR y GST a los 4 días de exposición, mientras que la enzima APX incrementó su actividad a lo largo de todo el periodo ensayado. En cambio, las actividades DHAR y MDHAR no sufrieron alteración ninguna en presencia del residuo (Fig. 9). A los 4 días de exposición al ADOR, en raíz de tomate se observó un incremento del 42% de la actividad SOD, mientras que a los 10 y 30 días los niveles de esta actividad fueron similares a los de las plantas control. La transformación del ADOR por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 redujo los niveles de actividad SOD en raíz con respecto al residuo sin transformar en plantas expuestas 4 días, igualándolos a los de plantas normales, en cambio en plantas en presencia del residuo durante 10 y 30 días, esta transformación por los hongos no modificó los niveles de SOD. El análisis isoenzimático de la actividad SOD mediante EGPA-Nativa (Figura 9.1) reveló la presencia de dos isoenzimas de la SOD: SOD-3 y SOD-1, designadas así por su creciente movilidad a lo largo del gel y que corresponden a las Cu/Zn-SODs. Se observó un incremento de actividad SOD-3 respecto a la SOD-1 en la raíz de plantas de tomate tanto expuestas como no al ADOR sin transformar y transformado por los hongos saprobios durante 4, 10 y 30 días.

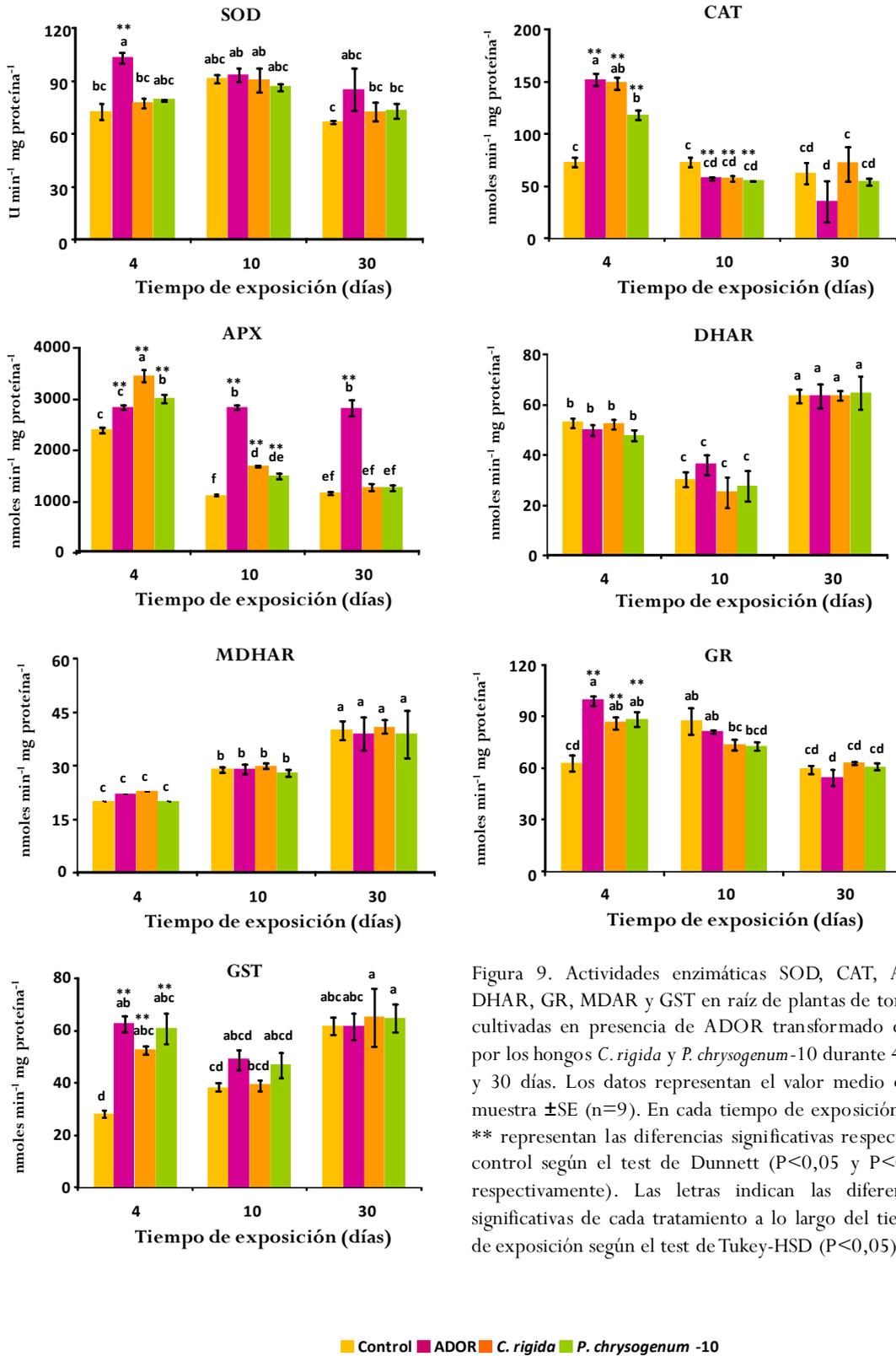


Figura 9. Actividades enzimáticas SOD, CAT, APX, DHAR, GR, MDAR y GST en raíz de plantas de tomate cultivadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 durante 4, 10 y 30 días. Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=9). En cada tiempo de exposición * y ** representan las diferencias significativas respecto al control según el test de Dunnett (P<0,05 y P<0,01 respectivamente). Las letras indican las diferencias significativas de cada tratamiento a lo largo del tiempo de exposición según el test de Tukey-HSD (P<0,05).

EPGA-NATIVA

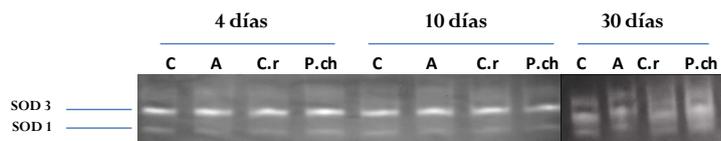


Figura 9.1. Actividad isoenzimática superóxido dismutasa en la raíz de plantas de tomate (C) cultivadas en presencia de ADOR (A) transformado o no por los hongos *C. rigida* (C.r) y *P. chrysogenum*-10 (P.ch) durante 4, 10 y 30 días.

En la raíz de tomate de plantas cultivadas en presencia de ADOR durante 4 días se incrementó la actividad CAT (Fig. 9). La transformación del residuo por *C. rigida* y su exposición a plantas produjo en la raíz niveles similares de actividad catalasa a la descrita con el ADOR, mientras que el tratamiento del residuo con *P. chrysogenum*-10 redujo dicha actividad levemente. La actividad CAT disminuyó respecto al control, en la raíz de plantas expuestas durante 10 días al residuo transformado o sin transformar, mientras que a los 30 días no se observaron diferencias significativas de actividad entre los distintos tratamientos. La APX mostró un comportamiento diferente al resto de las enzimas antioxidantes ya que se observó un incremento de su actividad en presencia de ADOR sin transformar a lo largo del tiempo de crecimiento de la planta. La transformación del residuo realizada por los hongos provocó un aumento de la actividad de la raíz en plantas crecidas durante 4 y 10 días respecto al control, aunque a los 10 días este incremento fue significativamente menor que el causado por el ADOR. Cabe destacar que a los 30 días de exposición de las plantas al ADOR transformado, los niveles de actividad APX de la raíz fueron similares a los del control sin residuo. Las actividades de las enzimas DHAR y MDHAR en raíz de plantas de tomate no mostraron cambios tras su exposición al ADOR transformado o no por los hongos saprobios. La enzima GR aumentó significativamente su actividad en la raíz de plantas expuestas al ADOR transformado o no por los hongos saprobios durante 4 días, mientras que a los 10 y 30 días de exposición no se modificó su actividad respecto a las plantas control (Fig. 9). Solo observó un elevado incremento de actividad GST en la raíz de plantas en presencia de ADOR no transformado y transformado por *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 durante cuatro días.

En hojas de plantas de tomate, se observaron incrementos significativos en las actividades SOD, CAT, APX y GR tras la exposición de las mismas al ADOR, sin embargo, no se detectaron variaciones en las enzimas MDHAR, DHAR y GST (Fig. 10). Tras la aplicación del ADOR a plantas, la enzima SOD aumentó su actividad en hoja a los 4, 10 y 30 días. Cuando la planta se cultivó en presencia del extracto acuoso de alpeorujó transformado por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 durante 4 días, la actividad SOD de hoja mostró valores similares a los observados con el ADOR, sin embargo, a los 10 y 30 días el tratamiento con hongos redujo la actividad significativamente respecto del ADOR llegando a igualarse al control en plantas expuestas 30 días. La actividad isoenzimática de la SOD (Fig. 10.1) determinada mediante EGPA-Nativa, tal y como se describe en el capítulo general de Material y Métodos, puso de manifiesto la aparición de tres bandas correspondientes a las tres isoenzimas de la SOD: la SOD-2 que corresponde a la Fe-SOD y las SOD-3 y SOD-1 a las Cu/Zn-SODs. En general, se observó mayor intensidad de la banda correspondiente a la isoenzima SOD-1 en todos los tratamientos ensayados. En plantas tratadas durante 4 días con ADOR no transformado y transformado por los hongos saprobios se observó en hoja un incremento en la actividad SOD-2 con respecto a las control, mientras que a los 10 días el extracto no transformado incrementó la actividad SOD-3, SOD-2 y SOD-1, efecto que se redujo en el caso de los tratamientos con ADOR transformado por los hongos. No se observaron diferencias en la actividad en hoja de las 3 isoenzimas de la SOD en ninguno de los tratamientos ensayados a los 30 días de exposición del residuo.

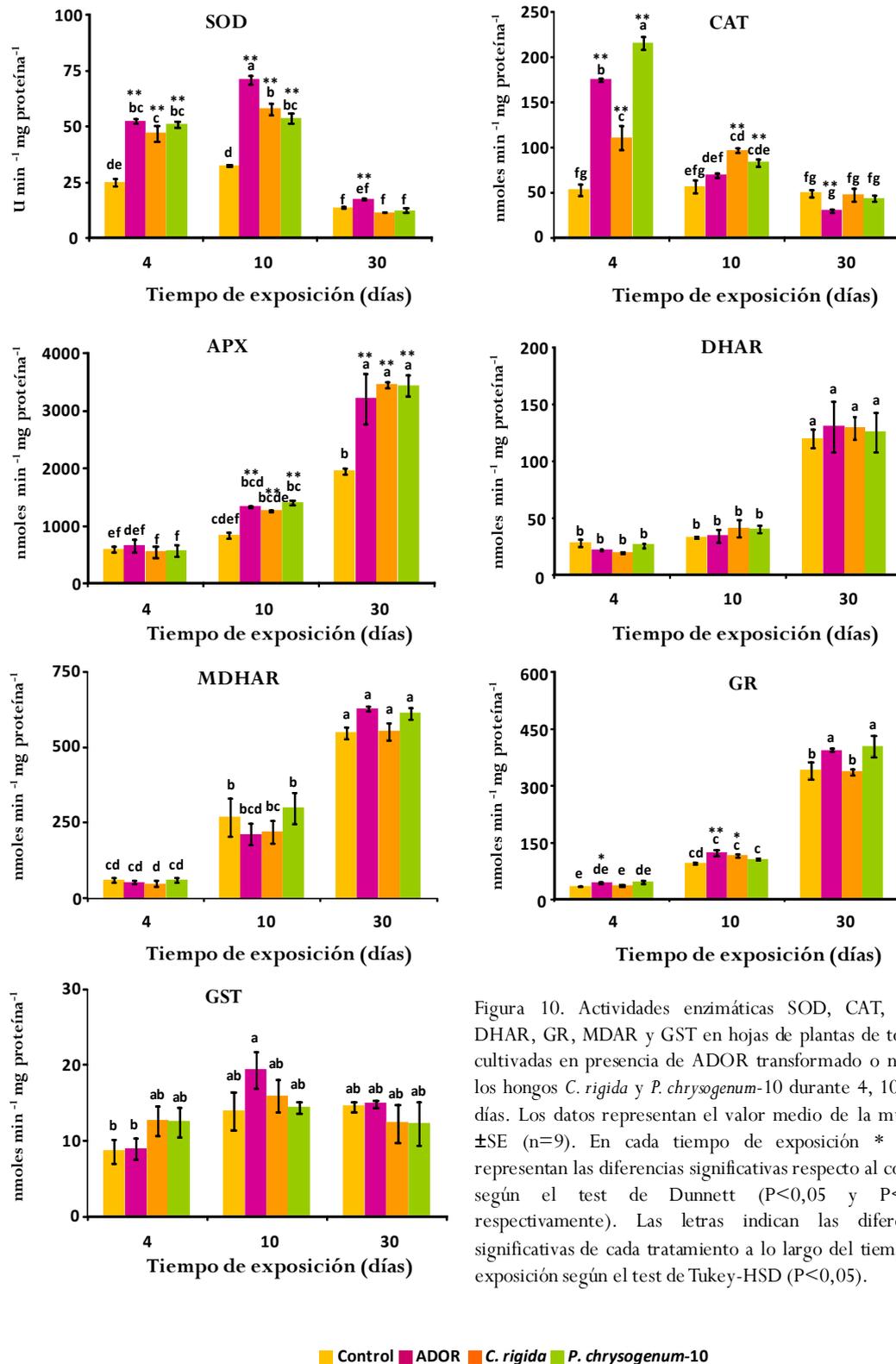


Figura 10. Actividades enzimáticas SOD, CAT, APX, DHAR, GR, MDAR y GST en hojas de plantas de tomate cultivadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum-10* durante 4, 10 y 30 días. Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=9). En cada tiempo de exposición * y ** representan las diferencias significativas respecto al control según el test de Dunnett (P<0,05 y P<0,01 respectivamente). Las letras indican las diferencias significativas de cada tratamiento a lo largo del tiempo de exposición según el test de Tukey-HSD (P<0,05).

EPGA-NATIVA

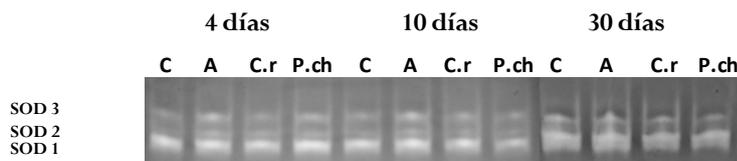


Figura 10.1. Actividad isoenzimática superóxido dismutasa en la hoja de plantas de tomate (C) cultivadas en presencia de ADOR (A) transformado o no por los hongos *C. rigida* (C.r) y *P. chrysogenum*-10 (P.c) durante 4, 10 y 30 días.

Solo a los 4 días de exposición de las plantas al ADOR, se observó un incremento significativo en la actividad del enzima CAT en la hoja de tomate (Fig. 10). El tratamiento del residuo con hongos y su exposición a plantas a los 4 y 10 días produjo un aumento en la actividad CAT de hoja respecto del ADOR aunque en el caso del extracto incubado con *C. rigida* este incremento fue inferior al observado en el residuo sin transformar a los 4 días. A los 30 días, en plantas tratadas con ADOR se observó una reducción de la actividad enzimática CAT en hojas. La actividad APX en hojas se incrementó tras 10 y 30 días de exposición de las plantas de tomate al ADOR transformado o no por los hongos saprobios, aumento que fue significativamente mayor a los 30 días. Las hojas de plantas de tomate cultivadas durante 4 y 10 días en presencia de ADOR no transformado incrementaron su actividad GR mientras que tras 30 días los niveles fueron similares a los de plantas control. En cambio, el ADOR transformado no provocó aumentos en la actividad de dicha enzima en hoja salvo en el caso de la exposición de la planta durante 10 días al residuo tratado con *C. rigida*. La determinación cuantitativa de las enzimas DHAR, MDHAR y GST en hoja tras la aplicación del ADOR transformado y no transformado por los hongos saprobios a plantas no mostró variación respecto a las plantas control.

2.3.2. Antioxidantes totales

En la raíz de tomate, la cantidad de antioxidantes totales no se modificó tras la exposición de la planta al ADOR durante 4 días, mientras que en presencia del residuo transformado por los hongos saprobios, si se observó un incremento de dicho contenido (Fig. 11). La exposición del residuo durante 10 días si provocó un incremento de antioxidantes totales aunque en este caso el tratamiento de los hongos redujo los niveles de antioxidantes respecto de la raíz tratada con ADOR hasta niveles similares a los controles sin residuo. A los 30 días de exposición de las plantas a los distintos tratamientos no se produjo una variación significativa del contenido de antioxidantes totales.

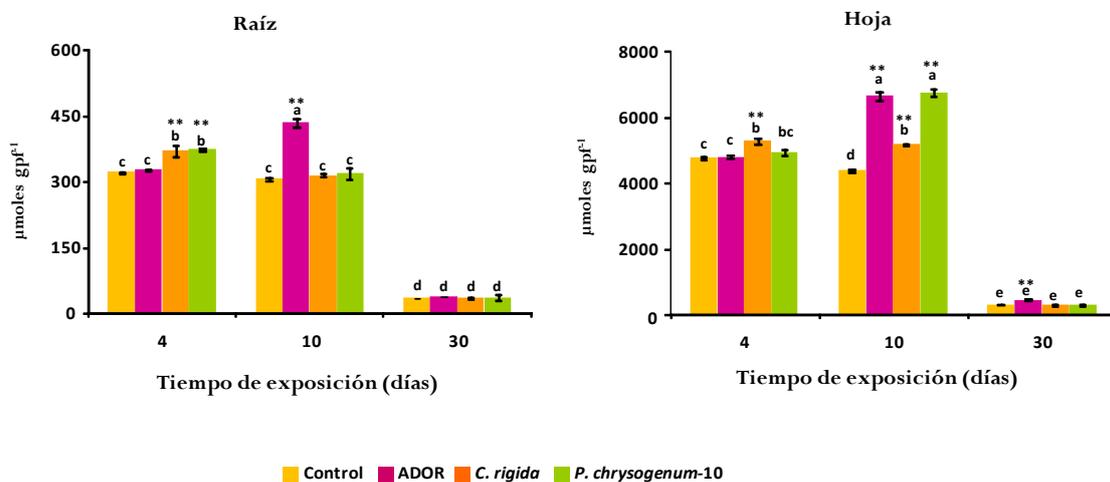


Figura 11. Contenido en antioxidantes totales en plantas de tomate cultivadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum-10* durante 4, 10 y 30 días. Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=4). En cada tiempo de exposición * y ** representan las diferencias significativas respecto al control según el test de Dunnett ($P < 0,05$ y $P < 0,01$ respectivamente). Las letras indican las diferencias significativas de cada tratamiento a lo largo del tiempo de exposición según el test de Tukey-HSD-HSD ($P < 0,05$).

En hoja, solo se observó un incremento significativo del contenido de antioxidantes totales a los 10 días de exposición de las plantas de tomate al ADOR. La transformación del residuo por *C. rigida* incrementó los niveles de antioxidantes totales tras 4 días de exposición del mismo a las plantas, sin embargo tras 10 días, el extracto transformado por *P. chrysogenum-10* incrementó el nivel de antioxidantes totales de forma similar que el ADOR, mientras que *C. rigida*, a pesar de provocar un incremento, este fue menor al del extracto acuoso de alpeorujó. La exposición

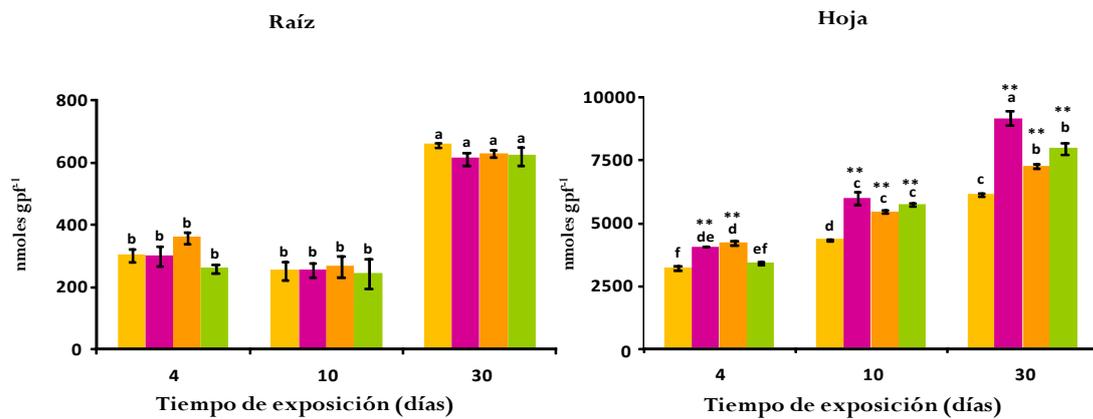
de las plantas al ADOR durante 30 días produjo un aumento en el contenido en antioxidantes totales de las hojas respecto al control, sin embargo los extractos transformados por los hongos redujeron significativamente el incremento ocasionado por el residuo.

2.3.3. Ascorbato y glutatión

Se determinó el contenido en ascorbato y glutatión total, así como el estado redox en raíz y hoja tal y como puede observarse en la figura 12 y 13.

El contenido en ascorbato total no se incrementó en la raíz de plantas de tomate cultivadas en presencia de ADOR transformado o no durante 4, 10 y 30 días (Fig. 12 a). El estado redox de ASC en raíz mostró una reducción tras 4 días de exposición de la planta al residuo sin transformar y transformado con los hongos objeto de estudio, mientras que a los 30 días el descenso en los niveles se detectó solamente en el tratamiento con ADOR (Fig 12 b). A diferencia de la raíz, el crecimiento de plantas con extracto acuoso de alpeorujó produjo en la hoja un aumento del contenido en ascorbato total a todos los tiempos ensayados, tal y como se muestra en la figura 12 a. A los 4 días de exposición de la planta al residuo, se observó como el contenido en ascorbato total en hoja incrementó un 30% con respecto al control en los tratamientos ADOR sin tratar y tratado por *C. rigida*, sin embargo, la transformación del extracto acuoso por *P. chrysogenum*-10 redujo dicho contenido alcanzando valores similares al control. En cambio, a los 10 días de crecimiento de la planta en presencia del residuo, la transformación de los hongos no redujo los niveles de ascorbato total respecto al control. A los 30 días de exposición de las plantas al ADOR no transformado, la hoja de tomate aumentó el contenido en ascorbato total en un 50% con respecto al control, en cambio, el tratamiento con *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 provocó un incremento aunque menor que el del residuo sin transformar. En cuanto al estado redox del ASC en hoja, este aumentó durante todo el periodo de crecimiento de las plantas de tomate en presencia de ADOR. El tratamiento del residuo con los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 a los 4 días redujo el estado redox del ASC hasta alcanzar valores similares a los de la planta control sin residuo, mientras que a los 10 y 30 días se observó un incremento de este parámetro similar al producido por el ADOR no transformado (Fig. 12 b).

a. Contenido en ASC total



b. Estado redox ASC

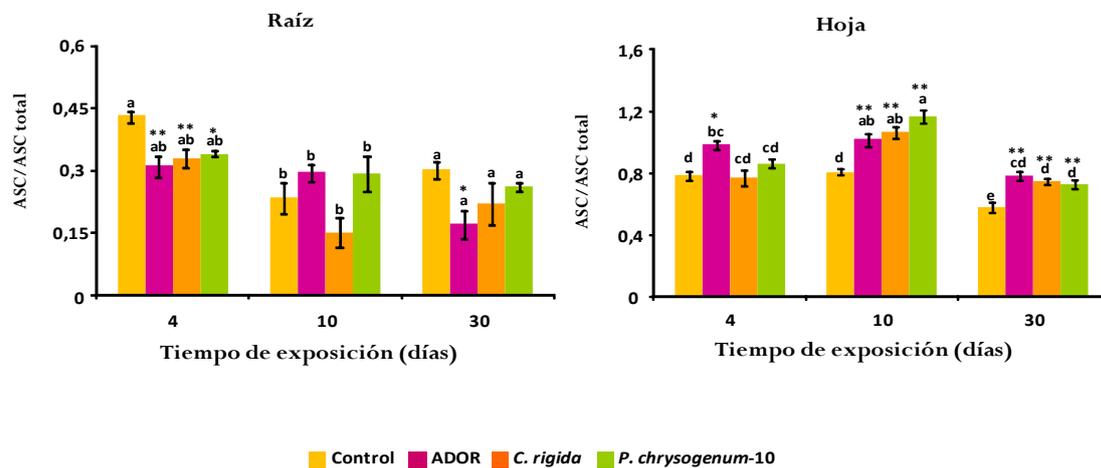
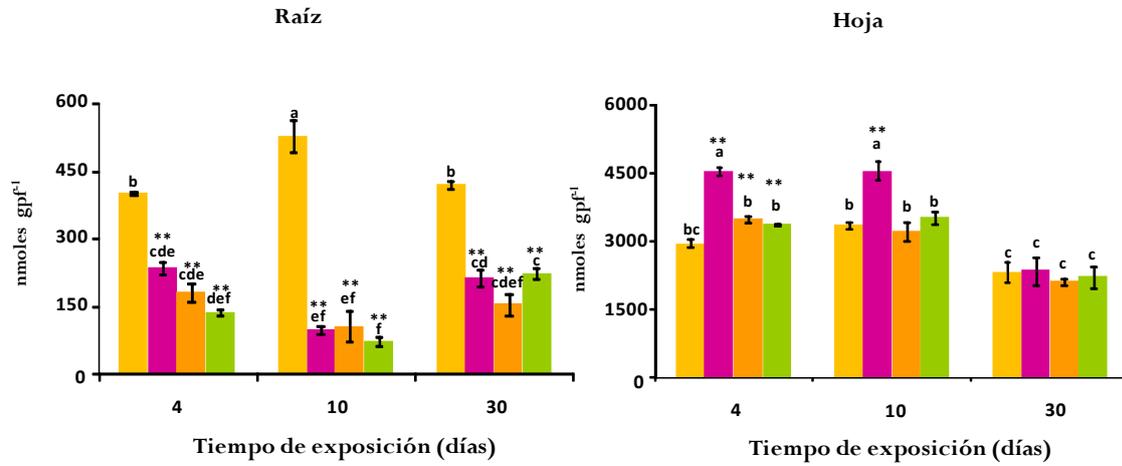


Figura 12. Contenido de ASC total (a) y estado redox (b) en raíz y hoja de plantas de tomate cultivadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum-10* durante 4, 10 y 30 días. Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=9). En cada tiempo de exposición * y ** representan las diferencias significativas respecto al control según el test de Dunnett ($P < 0,05$ y $P < 0,01$ respectivamente). Las letras indican las diferencias significativas de cada tratamiento a lo largo del tiempo de exposición según el test de Tukey-HSD ($P < 0,05$).

En la figura 13 se refleja el contenido en glutatión total así como el estado redox del GSH de raíz y hoja. Los tratamientos de las plantas de tomate con el ADOR transformado o no por los hongos saprobios durante 4, 10 y 30 días redujeron significativamente el GSH total de la raíz. El estado redox del GSH se redujo en la raíz de plantas crecidas durante 4 y 10 días en presencia de ADOR sin transformar y transformado con los hongos saprobios, sin embargo, a los 30 días de exposición se observaron en todos los tratamientos niveles del estado redox del GSH similares al de las plantas control.

El contenido de la hoja en glutatión total incrementó en un 50 y 30% a los 4 y 10 días de crecimiento de las plantas en presencia de ADOR, mientras que a los 30 días de exposición al residuo el GSH no se modificó. En hoja de plantas en presencia de ADOR tratado con *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 aumentó el contenido de GSH a los 4 días de exposición, sin embargo este incremento fue menor al observado en las plantas tratadas con ADOR. El tratamiento del ADOR con los hongos objeto de estudio produjo niveles de glutatión total similares al control sin residuo en plantas expuestas durante 10 días al residuo. La exposición de plantas al residuo durante 30 días no provocó el incremento del contenido de GSH en la hoja de plantas de tomate. No se observaron diferencias significativas en el estado redox del GSH en hoja a lo largo del crecimiento de la planta en ninguno de los tratamientos ensayados.

a. Contenido en GSH total



b. Estado redox GSH

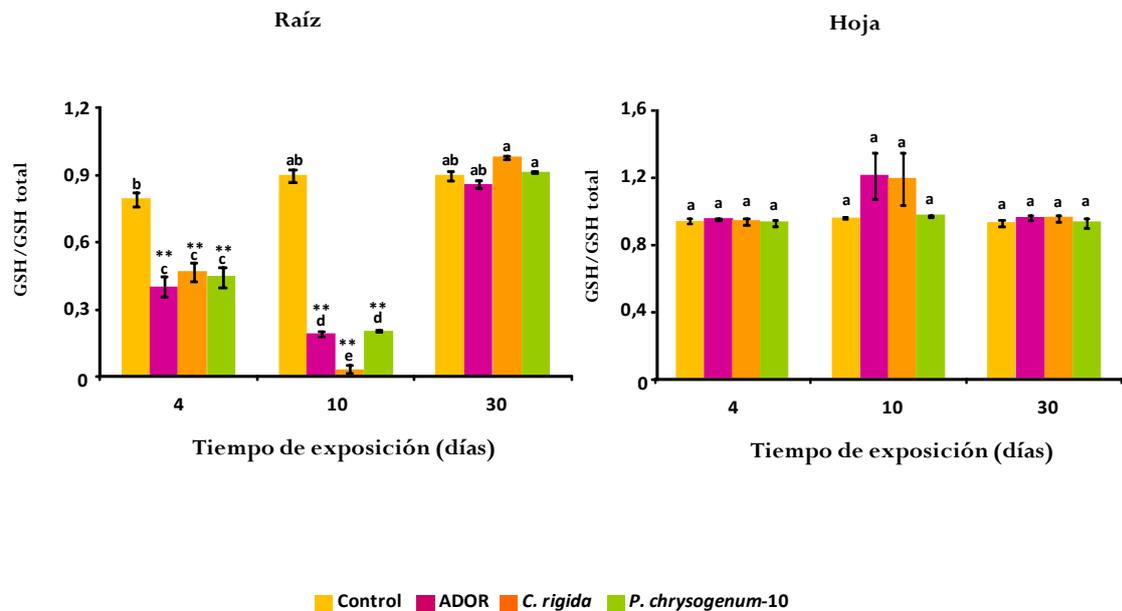


Figura 13. Contenido en glutatión total (a) y estado redox de glutatión (b) en la raíz y hoja de plantas de tomate cultivadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum-10* durante 4, 10 y 30 días. Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=9). En cada tiempo de exposición * y ** representan las diferencias significativas respecto al control según el test de Dunnett ($P < 0,05$ y $P < 0,01$ respectivamente). Las letras indican las diferencias significativas de cada tratamiento a lo largo del tiempo de exposición según el test de Tukey-HSD ($P < 0,05$).

2.4. Parámetros de lignificación

2.4.1. Contenido en lignina y fenoles totales

El contenido en lignina y fenoles totales, tanto en raíz como en hoja de plantas de tomate cultivadas en presencia de extracto acuoso de alpeorujó, se refleja en las figuras 14 y 15.

En raíz, el contenido total en lignina no sufrió modificación tras la exposición de las plantas a los residuos transformados o no por los hongos saprobios durante los distintos tiempos de crecimientos ensayados (Fig. 14). Por otro lado, la cuantificación de los fenoles totales reveló un incremento de los mismos en la raíz tras la exposición de la planta durante 4 y 10 días al ADOR. El crecimiento de la planta en presencia de ADOR transformado por *C. rigida* disminuyó considerablemente los fenoles en la raíz, llegando estos a igualarse a los del control sin residuo. Sin embargo, cuando el extracto acuoso de alpeorujó se transformó con *P. chrysogenum*-10, solo se observó una reducción del contenido fenólico a los 10 días de exposición de la planta al residuo. El crecimiento de las plantas durante 30 días en presencia de ADOR sin transformar y transformado no modificó el contenido de fenoles en la raíz.

En la hoja, la cuantificación del contenido total en lignina en hoja mostró un incremento significativo tras el crecimiento de las plantas 10 días en presencia de ADOR (Fig. 15). La transformación del residuo con *P. chrysogenum*-10 no varió la cantidad de lignina respecto al control sin residuo, mientras que la aplicación del extracto transformado por *C. rigida* provocó un incremento de lignina, aunque menor que el producido por el ADOR. Las plantas expuestas a los residuos ensayados durante 4 y 30 días, no modificaron el contenido en lignina. La hoja de tomate incrementó el contenido fenólico a los 4 días de exposición de las plantas al ADOR transformado con *C. rigida*. El crecimiento de las plantas en presencia del residuo durante 10 días provocó un aumento en la producción de fenoles totales en las hojas. En este tiempo de exposición, la transformación del ADOR por *P. chrysogenum*-10 no modificó los fenoles totales mientras que *C. rigida* redujo dichos niveles respecto del residuo sin tratar. A los 30 días, el ADOR en plantas produjo un incremento del contenido fenólico de las hojas del 50% con respecto al control, aunque la transformación del residuo por los hongos contrarrestó este efecto.

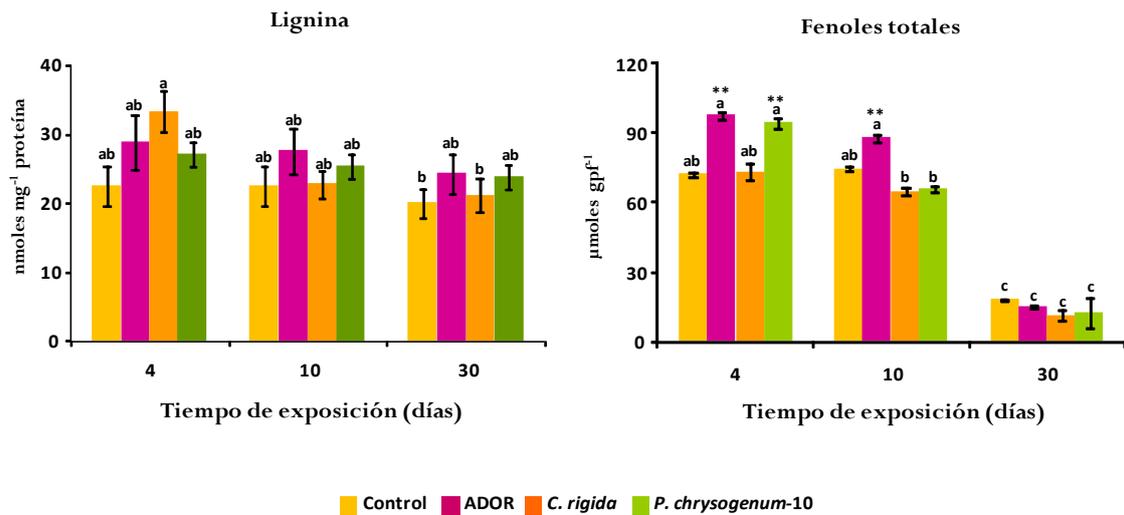


Figura 14. Contenido en lignina y fenoles totales en la raíz de plantas de tomate cultivadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum-10* durante 4, 10 y 30 días. Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=9). En cada tiempo de exposición * y ** representan las diferencias significativas respecto al control según el test de Dunnett ($P < 0,05$ y $P < 0,01$ respectivamente). Las letras indican las diferencias significativas de cada tratamiento a lo largo del tiempo de exposición según el test de Tukey-HSD ($P < 0,05$).

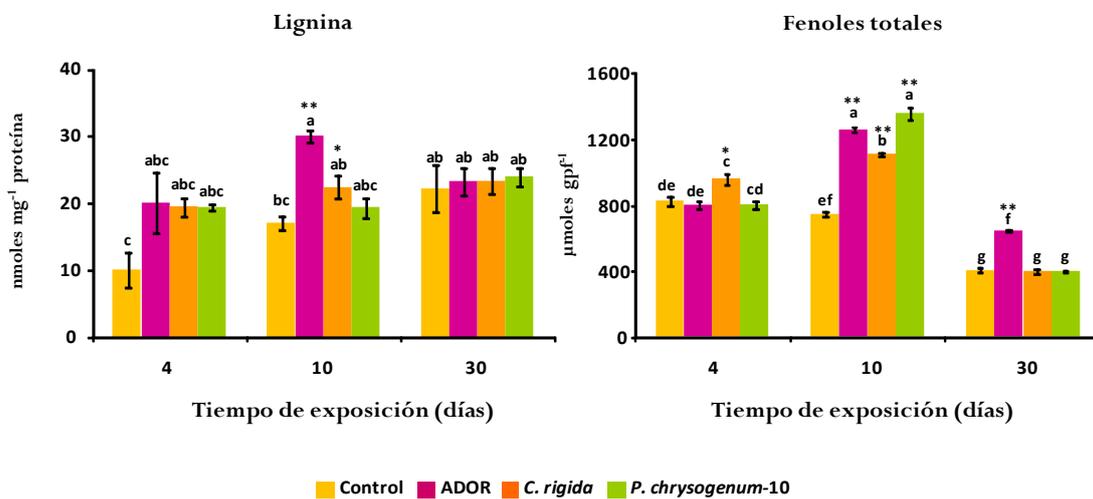


Figura 15. Contenido en lignina y fenoles totales en hoja de plantas de tomate cultivadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum-10* durante 4, 10 y 30 días. Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=9). En cada tiempo de exposición * y ** representan las diferencias significativas respecto al control según el test de Dunnett ($P < 0,05$ y $P < 0,01$ respectivamente). Las letras indican las diferencias significativas de cada tratamiento a lo largo del tiempo de exposición según el test de Tukey-HSD ($P < 0,05$).

2.4.2. Actividad peroxidasa

Respecto a la cuantificación de la POD, en raíz de plantas de tomate no se observó variación de dicha actividad en ninguno de los tratamientos ensayados (Fig. 16). Sin embargo, tras la exposición de las plantas al ADOR durante 10 días, la CAPOD disminuyó de forma significativa con respecto a la raíz control. Por otro lado, la actividad FePOD también se redujo en la raíz de plantas tratadas con ADOR durante 4 y 10 días. El tratamiento del residuo con *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 produjo niveles de actividad CAPOD y FePOD similares a los del control de plantas sin residuo.

En plantas de tomate cultivadas en presencia de ADOR durante 4, 10 y 30 días, la POD de hoja incrementó su actividad significativamente, mientras que en plantas expuestas al residuo transformado por los hongos, esta actividad mantuvo los niveles similares a los del control sin residuo. La determinación de las PODs específicas reveló un aumento de la actividad CAPOD tras 4 y 30 días de exposición de las plantas al ADOR y de FePOD en plantas expuestas 4 días. Cabe destacar que el tratamiento del residuo con *C. rigida* no provocó un incremento en las actividades de dichas enzimas, mientras que en hoja de plantas tratadas con el extracto transformado por *P. chrysogenum*-10 se aumentaron las actividades FePOD y CAPOD a los 4 y 30 días respectivamente.

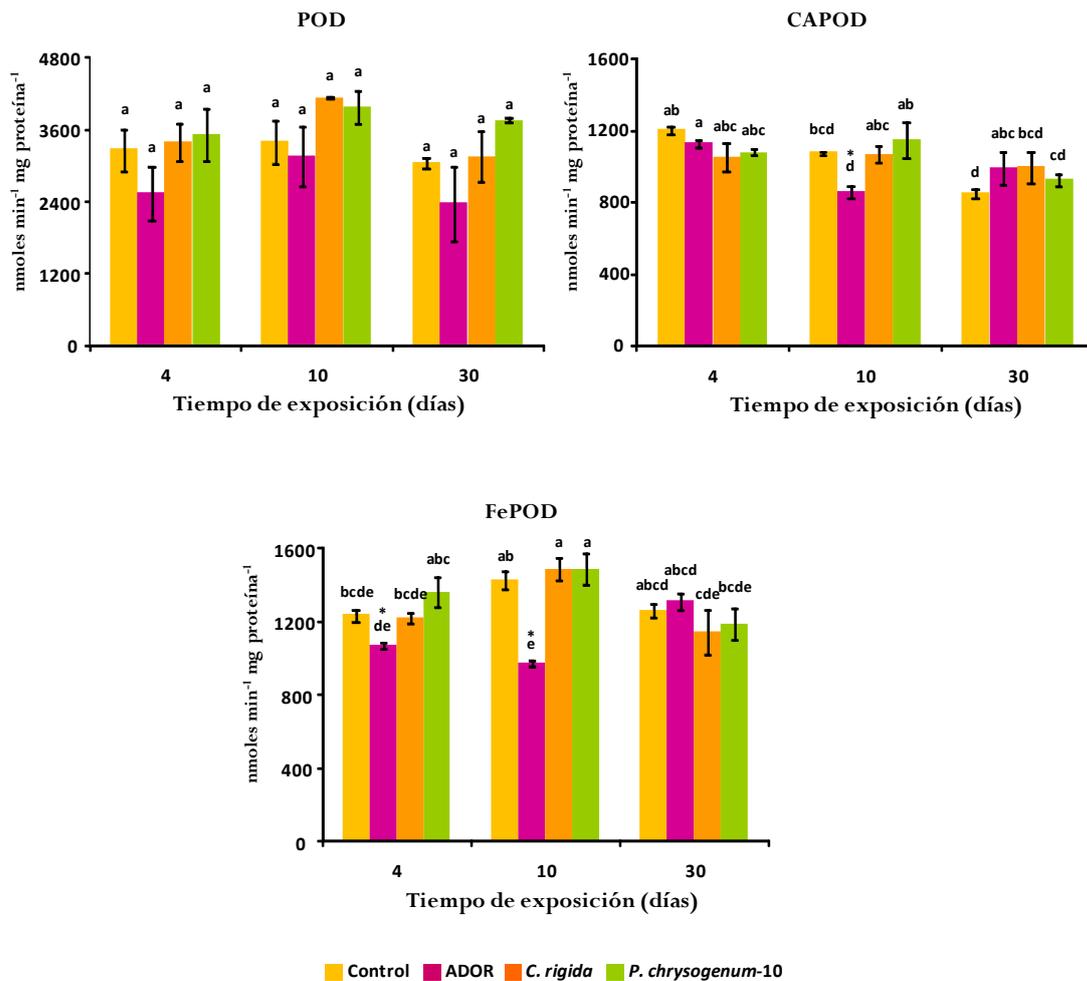


Figura 16. Actividad POD, CAPOD y FePOD en raíz de plantas de tomate cultivadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum-10* durante 4, 10 y 30 días. Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=9). En cada tiempo de exposición * y ** representan las diferencias significativas respecto al control según el test de Dunnett (P<0,05 y P<0,01 respectivamente). Las letras indican las diferencias significativas de cada tratamiento a lo largo del tiempo de exposición según el test de Tukey-HSD (P<0,05).

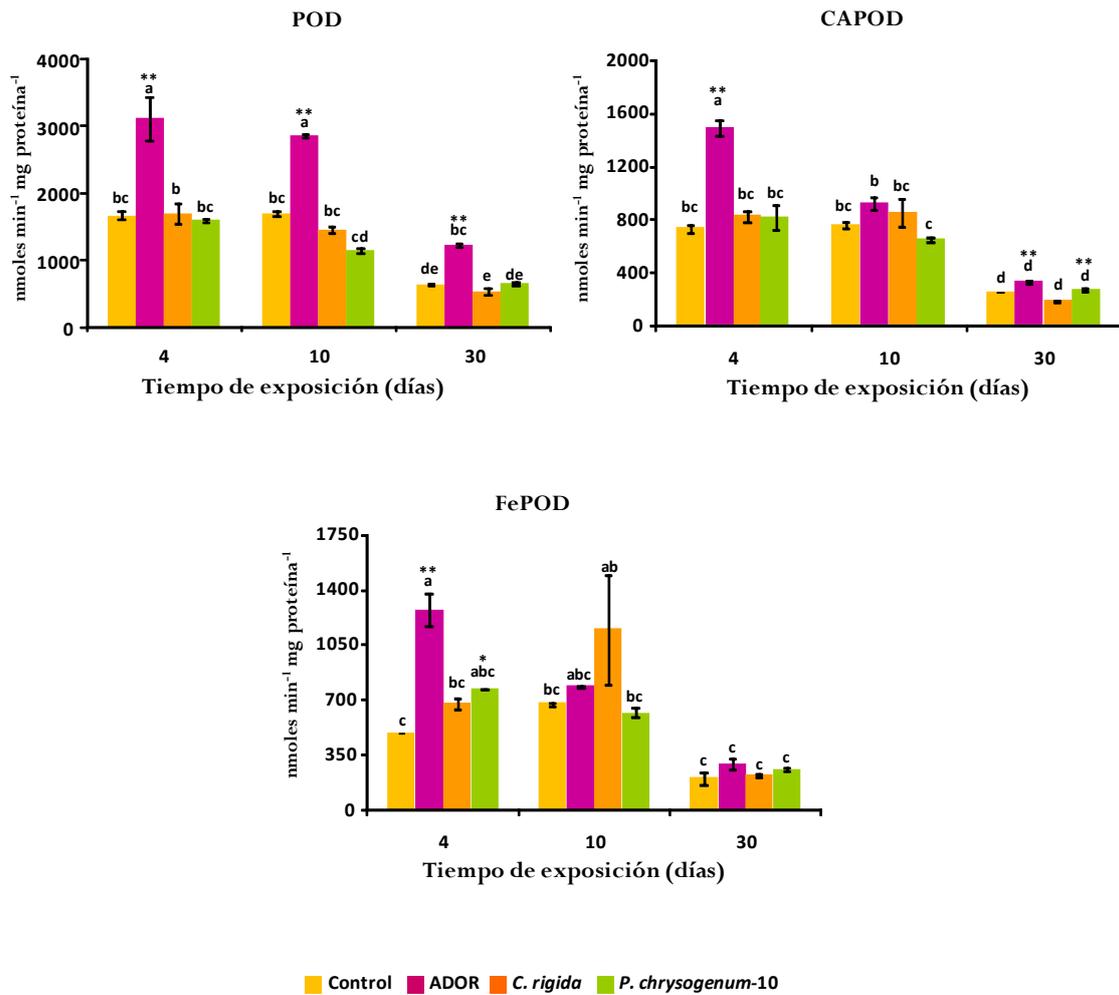


Figura 17. Actividad POD, CAPOD, y FePOD en la hoja de plantas de tomate cultivadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum-10* durante 4, 10 y 30 días. Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=9). En cada tiempo de exposición * y ** representan las diferencias significativas respecto al control según el test de Dunnett ($P < 0,05$ y $P < 0,01$ respectivamente). Las letras indican las diferencias significativas de cada tratamiento a lo largo del tiempo de exposición según el test de Tukey ($P < 0,05$).

DISCUSIÓN

El ADOR representa la fracción soluble del alpeorujo y está constituido fundamentalmente por carbono orgánico, así como macronutrientes (K, Na, S y P) y micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn y Zn), lo que plantea su posible uso como abono orgánico líquido para las plantas. Sin embargo, en su composición también están presentes distintos fenoles simples en una proporción de 17 mg/kg de alpeorujo, los cuales son los principales responsables de la toxicidad y de los efectos inhibidores de este residuo sobre la fisiología de las plantas (Einhellig *et al.*, 1996; Sampedro *et al.*, 2004a; Weir *et al.*, 2004). De hecho, la aplicación del extracto acuoso de alpeorujo puso de manifiesto la fitotoxicidad del residuo sobre el peso fresco de las plantas de tomate tras 4 días de exposición. Tal y como lo muestran numerosos estudios, el alpeorujo no puede aplicarse directamente al suelo por los efectos tóxicos que provoca en el crecimiento de las plantas (Martín *et al.*, 2002; Sampedro *et al.*, 2005). Por esta razón, se hace necesario la estabilización y biotransformación de este subproducto con objeto de obtener un fertilizante orgánico que además de incrementar el crecimiento de la planta suponga un aporte de materia orgánica para el suelo. La transformación del ADOR realizada por los hongos saprobios utilizados en esta Memoria reveló la capacidad detoxificadora que estos microorganismos presentan, ya que el peso de las plantas de tomate cultivadas en presencia del residuo transformado incrementó respecto del de las plantas tratadas con el ADOR. Así podemos considerar que el fraccionamiento acuoso del alpeorujo y el tratamiento del extracto obtenido mediante el uso de hongos saprobios supone una estrategia clara y efectiva para su bioremediación.

El análisis del desarrollo de las plantas reveló que la concentración del 5% de ADOR, dosis seleccionada para realizar un estudio más detallado de los procesos fisiológicos que afecta el residuo, tuvo un efecto inhibitor del peso seco y crecimiento relativo de la raíz y de la parte aérea de plantas de tomate. Estos resultados están de acuerdo con algunos estudios que ponen de manifiesto el efecto fitotóxico del ADOR (Aranda *et al.*, 2004, 2006). No obstante son pocos los estudios de fitotoxicidad del ADOR en plantas, ya que la gran mayoría se han realizado con alpeorujo, cuya composición y disponibilidad fenólica es distinta a la del extracto acuoso, sin embargo también se han observado reducciones del peso de raíz y parte aérea de plantas de soja y tomate cultivadas en presencia de alpeorujo con una concentración de fenoles de 360 mg/kg de alpeorujo (Sampedro *et al.*, 2004a). Nuestros resultados ponen de manifiesto el potencial fitotóxico del ADOR atribuible principalmente a los compuestos fenólicos presentes en su composición

como el ácido vainílico, hidroxibenzoico, ferúlico, p-cumárico, gálico y cafeico entre otros, y coinciden con los de diversos autores que han observado el efecto inhibitor de dichos compuestos fenólicos sobre el crecimiento de raíz de soja, guisante, pepino, tomate, judía y maíz (Vaughan y Ord, 1990; Rama Devi y Prasad, 1996; Blum *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2003). Además, en los estudios morfológicos realizados en la raíz de tomate se reafirma este poder fitotóxico de los fenoles del ADOR, puesto que la exposición de la raíz al residuo redujo significativamente parámetros radiculares tales como la longitud, el área, el volumen y el número de puntas radiculares. Este efecto inhibitor del ADOR es más evidente a los 10 días de exposición de la planta al residuo, que coincide con el estadio de desarrollo y crecimiento del sistema radicular, resaltando la susceptibilidad del sistema radical a los compuestos fenólicos durante ese periodo, como se ha observado en estudios realizados en raíz en presencia del ácido cafeico, 2-benzoxazolina o la (-)-catequina (Batish *et al.*, 2006, 2008; Singh *et al.*, 2009). Pese a que se ha observado una recuperación de la mayoría de los parámetros morfológicos ensayados tras la exposición de la planta al ADOR durante 30 días, cabe destacar que la inhibición del volumen radicular fue la única que se mantuvo a lo largo de este periodo, hecho que podría estar directamente relacionado con la reducción del peso seco y del crecimiento relativo observado en los últimos estadios del cultivo.

Aparte del efecto que los compuestos fenólicos producen sobre el crecimiento de las plantas, se ha descrito su capacidad de alterar numerosos procesos fisiológicos como la transpiración, contenido hídrico, captación de nutrientes, eficiencia del PSII, síntesis de ATP o metabolismo de fitohormonas (Inderjit y Duke, 2003; Blum y Gerig, 2005). Los fenoles también afectan a la permeabilidad de las membranas, reduciendo la captación de agua, además de bloqueando las cadenas de transporte electrónico durante la fotosíntesis y/o respiración (Baziramakenga *et al.*, 1995; Weir *et al.*, 2004). Nuestros resultados indicaron un menor contenido hídrico en los tejidos radiculares y de la parte aérea de plantas cultivadas en presencia de ADOR, así como una reducción de la eficiencia fotosintética del PSII de la hoja, que probablemente esté relacionada con la disminución del contenido en clorofila a y b observado en la hoja de tomate, tal y como se ha observado en otros estudios en plantas de maíz y soja (Jose, 2002). La disminución de la eficiencia del PSII puede indicar que algunos de los compuestos fenólicos presentes en el ADOR estén inhibiendo la cadena transportadora de electrones del fotosistema, por su actuación a nivel de la plastoquinona B (Q_B), ya que estos provocan la ruptura del paso en esta cadena de plastoquinona A (Q_A) a B (Q_B) (González *et al.*, 1997). Este efecto se ha observado en benzoquinonas como la

sorgoleona, que actúa como un análogo de plastoquinonas uniéndose a las proteínas DI del PSII (Czarnota *et al.*, 2001). O bien porque los fenoles actúen inhibiendo alguna de las enzimas de síntesis de las plastoquinonas como la p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa. Algunos autores no obstante proponen otra hipótesis para explicar la menor eficiencia del PSII, según la cual, los compuestos fenólicos pueden actuar a nivel de la actividad ATPasa que es la responsable de la generación del gradiente de protones necesario para la captación y el flujo de iones y metabolitos a través de las membranas plasmáticas (Queirolo *et al.*, 1983). Una disminución de la actividad H⁺-ATPasa conlleva una reducción de la captación de agua e iones hacia la raíz, con la consecuente inhibición de procesos fisiológicos como la fotosíntesis, respiración o la síntesis de proteínas, de forma que se produce la reducción del crecimiento y del peso de las plantas. Existen trabajos que han puesto de manifiesto este efecto en plantas de maíz, soja y lechuga (Fujita y Kubo, 2003; Hejl y Koster, 2004).

Las plantas de tomate cultivadas en presencia del ADOR transformado por los hongos saprobios *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 redujeron el peso seco y el crecimiento relativo de raíz tras 10 días de exposición, aunque esta inhibición fue menor a la que produjo el residuo sin transformar. Es interesante destacar que la transformación del residuo con los hongos eliminó totalmente el efecto fitotóxico del ADOR en raíz y parte aérea tras 30 días de exposición. Por otro lado, las determinaciones morfológicas realizadas en raíz también revelaron el efecto positivo de la transformación del ADOR por los hongos, ya que este residuo incrementó en general la longitud, área, volumen y el número de puntas radiculares respecto a los tratamientos con ADOR, excepto en el caso de la longitud y área radicular tras la exposición al extracto transformado por *P. chrysogenum*-10. Así mismo, el contenido hídrico relativo de raíz y parte aérea de plantas de tomate tratadas con el ADOR transformado fue similar al de plantas controles sin residuo a los 4 y 10 días de exposición, anulando por tanto el efecto inhibitor del ADOR. La eficiencia del PSII se redujo en las plantas tratadas con el ADOR, mientras que la transformación del residuo por los hongos provocó un incremento, llegando a alcanzar los valores de eficiencia fotosintética que tenían los controles. Los distintos comportamientos observados en los parámetros fisiológicos ensayados, entre plantas tratadas con ADOR sin transformar y transformado por *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10, posiblemente sean debidos a las diferencias observadas en el contenido fenólico de ambos residuos. Se sabe que la transformación del ADOR con los hongos saprobios provocó una reducción en el contenido de fenoles, lo cual podría explicar el hecho de que las plantas de tomate incrementasen su peso e índice de crecimiento tanto en

raíz como en hoja en plantas en presencia de ADOR transformado. Sin embargo, hemos descrito que la transformación del residuo por ambos hongos no fue igual puesto que *C. rigida* produjo una reducción del contenido fenólico mayor que *P. chrysogenum*-10. Esta diferencia de actuación de los hongos ensayados a nivel cuantitativo podría ser la responsable de la reducción de la longitud y área radical tras 10 días de exposición de las plantas al ADOR transformado por *P. chrysogenum*-10. No obstante, el menor efecto biorremediador observado en raíz de plantas expuestas a ADOR tratado por *P. chrysogenum*-10 puede ser debido a la producción por parte de este hongo de metabolitos secundarios capaces de inhibir el crecimiento de las plantas de tomate, característica propia de los hongos saprobios filamentosos del suelo del género *Penicillium* (Isebaert *et al.*, 2005). Probablemente durante el proceso de incubación del ADOR con *P. chrysogenum*-10 se producen metabolitos secundarios, cuya naturaleza hasta la fecha no se ha podido determinar que también pueden estar contribuyendo junto con los compuestos fenólicos al efecto fitotóxico del ADOR (Aranda, 2006). La transformación del ADOR por los hongos saprobios también contribuyó a paliar los efectos negativos del residuo sobre los pigmentos clorofílicos y los carotenoides. Los valores de la clorofila b en presencia del residuo transformado fueron similares a los de las plantas control mientras que a nivel de la clorofila a el efecto biorremediador de los hongos no fue tan patente. Los resultados observados en los niveles de clorofila a en presencia de ADOR transformado pueden deberse a la distinta actuación de los compuestos fenólicos presentes en los extractos transformados sobre la síntesis de dicho pigmento, sin embargo, esta reducción del contenido de clorofila a en presencia del ADOR tratado no afectó a la efectividad del PS II. Todos estos resultados ponen de manifiesto y reafirman el efecto biorremediador de los hongos sobre el extracto acuoso de alpeorujó.

Además de la capacidad inhibidora del crecimiento, captación de agua y/o eficiencia del PSII por parte de los fenoles, se ha descrito que estos compuestos son capaces de incrementar la producción de ROS en las plantas (Weir *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2007). Dicho aumento conlleva la activación de una serie de compuestos y enzimas antioxidantes en la planta a fin de eliminar las especies reactivas de oxígeno, evitando de esta forma el daño oxidativo a membranas y/o orgánulos celulares (Mittler, 2002). El desequilibrio entre la producción de ROS y los sistemas antioxidantes de las plantas desencadenará una situación de estrés oxidativo (Cruz-Ortega *et al.*, 2002; Bais *et al.*, 2003; Romero-Romero *et al.*, 2005). Hasta la fecha no existen estudios sobre la capacidad del ADOR para inducir un estrés oxidativo en las plantas. Se sabe que el nivel de MDA o la peroxidación de

lípidos es un buen indicador del daño oxidativo celular y se ha relacionado en respuesta a una gran variedad de estreses abióticos y bióticos (Masia, 2003; Appel y Hirt, 2004). Por ello en un intento de determinar la capacidad del ADOR de producir estrés en nuestros ensayos medimos el contenido de MDA. Hemos observado un incremento del contenido en MDA, tanto en la raíz como en la hoja de plantas en presencia de ADOR sin transformar y transformado por los hongos en los estadios iniciales de desarrollo del tomate, mientras que a los 30 días de crecimiento solo se observa daño oxidativo en hojas de plantas tratadas con ADOR no transformado. Se han descrito situaciones de estrés abiótico causadas por metales pesados o por PAHs en las que se observa un incremento del contenido de MDA en plantas de tomate y *Arabidopsis thaliana* (Cervilla *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009). Además son numerosos los estudios que muestran que compuestos de naturaleza fenólica, como los derivados de ácidos benzoicos o cinámicos, son capaces de inducir un daño oxidativo en las membranas plasmáticas, alterando la permeabilidad de las mismas y por tanto el crecimiento de las plantas (Politycka, 1996; Doblinski *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2007). Esto sugiere que, probablemente, que los compuestos fenólicos presentes en el ADOR serían los responsables del daño observado en membranas las celulares como consecuencia de la acción de las ROS ya que los compuestos fenólicos además de alterar procesos fisiológicos que incrementan los niveles de ROS, los fenoles son responsables de la aparición de formas radicales que generan especies reactivas del oxígeno. Las diferencias observadas en los niveles de MDA de la planta a lo largo del tiempo de exposición al residuo, tanto en raíz como en hoja, puede deberse en gran medida a la respuesta antioxidante generada en los diferentes órganos. Así en raíz, la respuesta antioxidante puede considerarse más efectiva ya que solo se observó daño oxidativo a los 10 días, mientras que en la hoja los daños se constataron a lo largo de todo el proceso de crecimiento de la planta. Además, estas diferencias en los niveles de MDA también pueden deberse a la posible acumulación de los fenoles del ADOR en las hojas debido a la asimilación, transporte y acumulación de dichos compuestos desde la raíz hacia las hojas. Cabe destacar la reducción del contenido en MDA en hojas de plantas expuestas al ADOR transformado por los hongos durante 30 días, lo cual reafirmaría el efecto positivo de los hongos en la conversión del ADOR en un residuo menos tóxico para las plantas.

Por otra parte, el incremento en la producción de ROS en plantas tras su exposición a los compuestos fenólicos, principalmente de H₂O₂, determinó un aumento en el contenido en MDA como han puesto de manifiesto varios autores (Batish *et al.*, 2006, 2008; Lara-Núñez *et al.*, 2006; Bai *et al.*, 2009). En nuestro

caso, la aplicación del ADOR a las plantas de tomate incrementó la producción de H_2O_2 en la raíz, mientras que en la hoja este contenido aumentó al inicio del cultivo en presencia tanto de ADOR no transformado como transformado por los hongos. La producción de H_2O_2 en raíz de tomate cultivado en presencia de ADOR transformado fue similar a la de los controles sin residuo. Las diferencias observadas en los niveles de H_2O_2 en raíz de plantas expuestas al ADOR transformado en relación al control del residuo probablemente sean debidas al distinto grado de estrés provocado por ambos residuos como consecuencia de su diferente contenido fenólico. Además de este hecho, no hay que descartar la probabilidad de que la respuesta antioxidante generada tras la aplicación de los extractos transformados en la planta haya sido más eficaz y efectiva eliminando el incremento de ROS generadas tras la exposición al residuo.

Al igual que ocurre con los indicadores de estrés oxidativo, no existen estudios que hayan analizado el efecto del ADOR sobre el sistema antioxidante enzimático y no enzimático de plantas. Sin embargo, se han analizado el efecto que poseen algunos compuestos de naturaleza fenólica como el ácido cafeico, ferúlico y ftálico en el sistema antioxidante enzimático de plantas de distintas especies (Bathis *et al.*, 2008; dos Santos *et al.*, 2008; Bai *et al.*, 2009). Nuestros trabajos han puesto de manifiesto que, como consecuencia o en respuesta al estrés provocado por el ADOR, se inducen cambios en el sistema antioxidante de las plantas de tomate. Así, en la raíz se observa un incremento de las actividades SOD, CAT, APX, GR y GST ante la presencia de extracto acuoso de alpeorujó. El aumento de actividad SOD en raíz de tomate puede ser un mecanismo de defensa de la planta para evitar el daño oxidativo que ocasionaría un incremento en la producción de radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) como consecuencia de la exposición al ADOR. Otros autores han comprobado que en plantas en presencia de distintos compuestos derivados de ácidos fenólicos se produce también un incremento en la actividad SOD (Lin *et al.*, 2007; Bai *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2009). El análisis isoenzimático realizado para la SOD puso de manifiesto la presencia de dos isoenzimas la SOD-1 y SOD-3, correspondientes a las Cu/Zn-SODs. El perfil isoenzimático de la SOD en tomate consta de dos Cu/Zn-SODs de localización citoplasmática (SOD-3) y cloroplástica (SOD-1) respectivamente; una Fe-SOD, ubicada en los cloroplastos y citoplasma y una Mn-SOD, localizada en las mitocondrias (Perl-Treves *et al.*, 1990). La isoenzima SOD-3 mostró una mayor actividad con respecto a la SOD-1 en plantas de tomate independientemente del tratamiento a las que se sometieron. Este resultado sugiere que probablemente la mayor producción de radicales $O_2^{\cdot-}$ se localiza en el citoplasma celular lo que provocaría el incremento de la actividad de la

isoenzima SOD-1 sobre la SOD-3. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que existan otros lugares de producción de ROS como podrían ser los peroxisomas y el apoplasto, ya que se ha descrito la presencia de Cu/Zn-SOD en estos orgánulos (Corpas *et al.*, 2006).

Se observan incrementos significativos de las actividades CAT en raíces de plantas cultivadas con ADOR, probablemente debidos a la activación que se produce de estas enzimas en presencia de niveles altos de H₂O₂ para contrarrestar el daño oxidativo que el peróxido provoca en las membranas citoplasmáticas (Blokina *et al.*, 2003). No obstante, la reducción de la actividad CAT observada a los 10 días de exposición de las plantas al residuo, podría deberse al efecto inhibitor de los compuestos fenólicos del ADOR sobre dicha actividad, tal y como han descrito Ding *et al.* (2007). El incremento de H₂O₂ observado en raíces de plantas de tomate en presencia de ADOR a lo largo de todo el ensayo podría también explicar el aumento de la actividad APX tras 4, 10 y 30 días de exposición. Además, las actividades de las enzimas CAT y APX, como sistemas detoxificadores del H₂O₂ plantas de tomate, no parece ser el único mecanismo implicado en la protección de las mismas frente al estrés oxidativo provocado por el ADOR, ya que autores como Sandermann (1994) sugieren que las plantas son capaces de tolerar la toxicidad de compuestos xenobióticos por procesos bien de compartimentación o detoxificación. Se ha descrito que los procesos de detoxificación son dependientes del glutation, ya que este se conjuga a los distintos xenobióticos por medio de enzimas como la GST (Schröder y Collins, 2002; Schröder *et al.*, 2007). Además, las GSTs presentan una gran versatilidad, puesto que pueden actuar también como peroxidasas eliminando el exceso de H₂O₂ generado tras la exposición a un estrés por compuestos orgánicos xenobióticos a fin de evitar daños en las células (Cummins y Edwards, 1999). Por otro lado, la GR es una enzima clave del ciclo del ASC-GSH, la cual regenera el GSH transformándolo desde su forma oxidada (GSSG) a la reducida (GSH) y de esta manera regula el balance redox del GSH, además de controlar los niveles de H₂O₂ (Gratão *et al.*, 2005). De hecho, en nuestros experimentos observamos un incremento de las actividades GR y GST en plantas expuestas al ADOR durante cortos periodos de tiempo, tal y como sucede en raíces frente a diferentes compuestos fenólicos xenobioticos (Batish *et al.*, 2006; Bai *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2009). El incremento de la actividad GSTs podría estar directamente implicado en la detoxificación de los compuestos fenólicos a través de la conjugación de dichos compuestos al GSH llegando a provocar la reducción en el contenido de GSH total. Mientras que el incremento de la GR actuaría regulando el estado redox del GSH, el cual podría participar en procesos de eliminación de ROS.

La aplicación del ADOR transformado por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 en plantas no provocó el incremento en la raíz de la actividad SOD como lo hizo el ADOR lo que sugiere el efecto aliviador producido por los hongos del estrés causado por el residuo debido posiblemente a una menor producción de radicales superóxido. Si se observó un incremento de las actividades CAT y APX responsables de la detoxificación del H_2O_2 generado tras la exposición a los extractos transformados por ambos hongos. Sin embargo tras 10 días de cultivo de las plantas en presencia de residuo transformado la actividad de la APX se redujo respecto al tratamiento con ADOR lo cual muestra indicios de rápida adaptación al estrés probablemente debido a los niveles reducidos de H_2O_2 detectados a ese tiempo. A pesar de observarse una reducción del contenido en peróxido, los extractos transformados provocaron en raíz un aumento en los niveles de MDA lo que significa que se está provocando daño oxidativo a las membranas bien por otras ROS o por la acción directa de los compuestos fenólicos sobre las membranas. También se observa el incremento de las actividades GR y GST en la raíz de plantas tratadas con ADOR transformado. De esta forma los compuestos fenólicos del residuo se conjugaran directamente al GSH y se almacenarán en vacuolas a través de la GST, mientras que por otro lado la GR participará en la regulación del estado redox del GSH que interviene en la eliminación del H_2O_2 del medio celular a través del ciclo del ASC-GSH. Cabe resaltar, que los extractos transformados por los hongos indujeron la misma respuesta oxidativa y antioxidante en la raíz de tomate que el ADOR, sin embargo la raíz incrementó su peso y crecimiento radicular por lo que se produjo una mejor adaptación al estrés debido a la reducción del contenido fenólico generado tras la incubación del ADOR con los hongos.

El crecimiento de plantas de tomate en presencia de ADOR produce un incremento de actividad SOD en hoja a los 4 y 10 días mientras que en la raíz solo aumentó esta actividad tras 4 días de exposición. Este efecto puede ser debido a que tras el transporte y acumulación de los compuestos fenólicos del ADOR de la raíz hacia la hoja induciría la producción de O_2^- a tiempos más largos de exposición representando una primera línea de defensa de las plantas frente a la excesiva generación de estos radicales como consecuencia de un estrés oxidativo. La determinación isoenzimática de las SODs puso de manifiesto la presencia de 3 isoenzimas en la hoja de tomate: SOD-3, SOD-2 y SOD-1 correspondientes a la Fe-SOD (SOD-2) y las Cu/Zn-SODs (SOD-3 y SOD-1). La exposición de las plantas de tomate al ADOR no transformado y transformado provocó en hoja el aumento de la isoforma cloroplastídica SOD-2 respecto de los controles lo que revela un perfil isoenzimático diferente entre la hoja y la raíz de plantas de tomate. Este hecho

indican que en hoja se produce una mayor actividad de las SODs cloroplásticas frente a las citoplasmáticas, lo que sugiere que los compuestos fenólicos del ADOR transportados hasta la hoja estén actuando a nivel de las cadenas de transporte electrónico de los fotosistemas provocando el incremento en la producción de ROS, e incluso provocando su disrupción y bloqueando los procesos de fotosíntesis.

Las actividades enzimáticas CAT y la APX de hojas se incrementaron en plantas que crecieron en presencia de extracto acuoso de alpeorujos probablemente en respuesta al incremento de H_2O_2 . Cabe destacar el aumento de CAT en hojas de plantas de tomate tras 4 días de crecimiento en presencia de ADOR, ya que es una enzima que suele incrementar su actividad en medios con una elevada concentración de H_2O_2 . Sin embargo, la APX incrementó tras 10 y 30 días de exposición al residuo en respuesta a los niveles de H_2O_2 detectados y al hecho de que la actividad CAT detectada no fuese suficiente para eliminar la producción de peróxido. La APX es una enzima que suele actuar eficientemente a bajas concentraciones de H_2O_2 ya que presenta una gran afinidad por el peróxido y actúa en compartimentos donde existe CAT. Estos resultados están en concordancia con las observaciones realizadas por Batish *et al.* (2006) en plantas de judía expuestas a 2-BOA, donde se observa un incremento en las actividades SOD, CAT y APX en respuesta a la elevada producción de H_2O_2 desencadenada tras la exposición a dicho compuesto fenólico. La enzima GR incrementó su actividad en plantas tras 4 y 10 días de exposición al ADOR, resultado que podría estar íntimamente relacionado con la regeneración del GSH implicado en la detoxificación de ROS contribuyendo de esta manera al óptimo estado redox intuyendo la posible participación del ciclo ASC-GSH en los procesos de eliminación del H_2O_2 pese a no observar cambios en la actividad de las enzimas MDHAR y DHAR.

En hoja de plantas de tomate tratadas con los extractos transformados por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10, en general se observó un incremento de los niveles de actividad SOD, CAT, APX y GR de forma parecida al descrito en los tratamientos de plantas con ADOR. Los niveles de actividad SOD observados se redujeron tras la exposición de las plantas durante 10 días al extracto acuoso transformado por ambos hongos ya que tras ese periodo probablemente la planta se encuentra mejor adaptada a la situación de estrés que genera el alpeorujos. El nivel de actividad observada para la SOD en estos tratamientos puede deberse al menor contenido fenólico presente en dichos extractos transformados por los hongos lo que provoca una producción inferior de radicales superóxido respecto al de las plantas tratadas con ADOR. También, hay que resaltar el comportamiento

observado en la actividad CAT, ya que a los 4 días de exposición de las plantas al residuo, el incremento de la actividad fue menor en el tratamiento del ADOR transformado por *C. rigida* que por *P. chrysogenum*-10. Este hecho puede ser atribuible a la diferente concentración fenólica encontrada en los extractos transformados que provoca distintos incrementos en la actividad enzimática. Cabe resaltar que el incremento de la GR observado tras la exposición de las plantas de tomate al extracto transformado por *C. rigida* pueda deberse a la diferente composición fenólica de dicho extracto respecto del resto de tratamiento. Sin embargo, no hay que descartar la posibilidad de que las plantas tratadas con dicho extracto estén desencadenado una respuesta oxidativa más eficaz respecto al resto de tratamientos probablemente debida al menor contenido fenólico presente en el residuo. En general, los extractos transformados por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 inducen un estrés oxidativo al igual que el ADOR y desencadenan una respuesta oxidativa mediada por el incremento de actividad de dichas enzimas las cuales actúan controlando los niveles de las ROS reduciendo los daños oxidativos tal y como refleja el contenido de MDA a los 10 y 30 días. Por tanto, la respuesta de defensa observada es mucho más efectiva por lo que las plantas se adaptan de forma más rápida al estrés provocado tras la exposición al extracto debido a la reducción del contenido de fenoles tras la incubación con los hongos. Este hecho se refleja en un incremento del peso y del crecimiento relativo de la parte aérea de la planta.

Se sabe que la planta usa una serie de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para protegerse de la excesiva producción de ROS (Mittler, 2002). El conjunto de antioxidantes totales incrementó en general en periodos cortos de exposición de las plantas a los residuos. No existen trabajos que pongan de manifiesto este efecto tras una exposición a compuestos fitotóxicos de naturaleza fenólica en plantas sin embargo los aumentos en la producción de antioxidantes totales nos podría indicar la participación de estos en los procesos de detoxificación de ROS. Las diferencias en el contenido de antioxidantes totales en función del tiempo de exposición encontradas en raíz y hoja pueden deberse a la distinta respuesta de defensa generada tras el cultivo de las plantas de tomate en presencia de los residuos transformados o no. Así, el incremento del contenido de antioxidantes observado en raíz tras la exposición al ADOR transformado con ambos hongos durante 4 días implicaría la activación de una respuesta más rápida y efectiva frente a los compuestos fenólicos presentes en dicho residuo, mientras que la exposición al ADOR sin transformar provocaría una respuesta a más largo plazo. Las hojas en cambio aumentan los niveles de antioxidantes más tarde y permanecen elevados en el tratamiento del ADOR hasta el final del ensayo. El hecho de que a los

10 días de exposición de las plantas al ADOR transformado por *C. rigida* reduzcan el contenido de antioxidantes en hojas respecto de los otros tratamientos estaría directamente relacionado a la reducción del contenido fenólico observado en dicho extracto. Por otro lado, el diferente comportamiento observado entre la raíz y la hoja parece indicar la posibilidad de que se esté produciendo un efecto de traslación de los fenoles desde la raíz hacia la parte aérea donde se podrían estar acumulando, así la respuesta de defensa generada induce el incremento del contenido de antioxidantes en raíz se detecta a más corto plazo que en la hoja.

El ascorbato y el glutatión son antioxidantes no enzimáticos claves en las plantas, puesto que están implicados en procesos de detoxificación del H_2O_2 a través del ciclo del ASC-GSH (Jiménez *et al.*, 1997; Foyer y Noctor, 2000). Se ha descrito la actuación del ASC y el GSH en procesos de mantenimiento y regulación del estado redox celular frente a diversos estímulos medioambientales (de Pinto *et al.*, 1999; Pastori y Foyer, 2002; Foyer y Noctor, 2003). El ASC actúa directamente en la detoxificación de ROS como $\cdot OH$, $O_2^{\cdot -}$ y el H_2O_2 a través de la ascorbato oxidasa (Noctor y Foyer, 1998) y participa en otras funciones fisiológicas como la síntesis de hormonas, expresión de genes, división y crecimiento celular entre otras (Horemans *et al.*, 2000). El incremento detectado del contenido en ASC total así como del estado redox en hojas de plantas de tomate tras la aplicación del ADOR reveló un papel importante de este antioxidante en la respuesta de defensa de dichos órganos frente al estrés desencadenado. Además, pese a no haberse observado un aumento en las actividades MDHAR y DHAR, enzimas integrantes del ciclo del ASC-GSH, este resultado nos sugiere que los niveles enzimáticos que se producen en presencia de los residuos fueron suficientes para la regeneración del ASC de su forma oxidada a la reducida, por lo que cabría esperar la participación de este ciclo en los procesos de detoxificación del H_2O_2 producido en las hojas tras la exposición al ADOR transformado o no. En cambio, aunque la raíz no reveló cambios en el contenido total de ASC si se observó una reducción del balance redox, hecho que indica un desequilibrio en la regeneración del ASC probablemente asociado a que los niveles de actividad MDHAR y DHAR detectados no fueron suficientes para la reducción del ASC oxidado, por lo que la eliminación del peróxido de hidrógeno por medio del ciclo del ASC-GSH no sería del todo efectivo en la raíz.

El glutatión, es un antioxidante no enzimático importante, que al igual que el ASC también puede eliminar directamente el $^1\text{O}_2$, radicales $\cdot\text{OH}$, O_2^- , H_2O_2 y radicales hidroxiperóxilos por vías no enzimáticas o enzimáticas (Lascano *et al.*, 1998; Gechev *et al.*, 2002; Noctor *et al.*, 2002). Además, el GSH junto con su forma oxidada (GSSG) mantiene el balance redox celular, propiedad de gran importancia biológica ya que no solo lo lleva a cabo bajo condiciones normales sino también al inicio de una situación de estrés, por ello podemos decir que el GSH podría actuar como molécula señal frente al estrés (Blokhina *et al.*, 2003). La exposición de la planta al ADOR produjo un incremento significativo del GSH en hoja mientras que el balance redox del GSH mostró un equilibrio entre la forma reducida y oxidada del GSH. Este hecho indica la participación del GSH en los procesos de detoxificación, bien de forma directa sobre las ROS, a través del ciclo del ASC-GSH debido al óptimo balance redox entre la forma oxidada y reducida. Estos resultados están de acuerdo con estudios en cianobacterias y plantas de alfalfa expuestas a compuestos aleloquímicos procedentes de gramíneas residuos petroquímicos respectivamente, donde se observa el incremento del ASC y GSH en respuesta a la situación de estrés generada por compuestos fenólicos y/o xenobióticos (Hong *et al.*, 2009; Martí *et al.*, 2009). En raíz de plantas de tomate expuestas a ADOR se observó una reducción tanto del contenido total del GSH como del balance redox indicando un predominio de la forma oxidada sobre la reducida, al igual que sucedió con el ASC. Por tanto, este resultado indicaría un desequilibrio en el ciclo ASC-GSH implicado en los procesos de detoxificación del H_2O_2 , probablemente asociado al hecho de no observar un incremento en las actividades MDHAR y DHAR que contribuirían a un óptimo estado redox del GSH. Además, la reducción en los niveles de GSH detectados en raíz en presencia de ADOR podría deberse a la elevada actividad de la enzima GST, la cual estaría consumiendo de forma excesiva todo el GSH con objeto de conjugarlo a los compuestos fenólicos del ADOR a fin de detoxificarlos, provocando de esta forma el desequilibrio entre la producción y el consumo de GSH. El contenido de ASC y GSH observado en plantas cultivadas en presencia de ADOR transformado por *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 puso de manifiesto el efecto aliviador del estrés oxidativo causado por el ADOR, ya que tras 10 y 30 días de exposición se redujeron los niveles de ASC, mientras que el contenido de GSH se redujo tras 10 días.

El contenido de lignina en raíz de plantas en presencia de ADOR no varió en ninguno de los tratamientos ensayados, sin embargo, se observó un incremento en los fenoles totales de la raíz de plantas tras 4 y 10 días de exposición al ADOR. El hecho de encontrar un incremento en el contenido fenólico podría indicar su participación directa en los procesos de detoxificación de las ROS y los diferentes valores observados tanto en el tiempo como en los tratamientos, podrían ser atribuibles al grado de estrés provocado en la raíz como consecuencia del contenido fenólico presente en cada tratamiento. En base a esto podemos decir que el contenido fenólico presente en el extracto transformado por el hongo *C. rigida* no provoca un incremento del contenido de fenoles totales por lo que la situación de estrés oxidativo generado es más moderada con respecto al resto de tratamientos. Las PODs son un grupo de enzimas implicadas en numerosos procesos fisiológicos de la planta, probablemente debido al gran número de formas isoenzimáticas que poseen, así como a su gran versatilidad a la hora de catalizar reacciones enzimáticas (Passardi *et al.*, 2005). Una de las principales funciones que se le atribuyen a las PODs es su participación directa en procesos de lignificación de paredes celulares en diferentes tejidos y/o órganos vegetales (Gaspar *et al.*, 1985; Ros Barceló, 1997). Hemos demostrado que los niveles de actividad de la POD no se incrementaron en raíz tras la exposición al ADOR, lo que apoya el hecho de que los niveles de lignina detectados en raíz no se vieran afectadas a lo largo del ensayo. Por otro lado se observó la inhibición en raíz de la CAPOD tras 10 días de exposición de las plantas al ADOR y de la FePOD a los 4 y 10 días resultados que reafirman los trabajos realizados en raíz de soja y lechuga donde se inhibían las distintas PODs tras la exposición a compuestos fenólicos (Baziramakenga *et al.*, 1995; Sánchez-Moreiras y Reigosa, 2005).

En hoja de plantas de tomate expuestas al ADOR, además del incremento observado en el contenido de lignina y fenoles, se observó un aumento en las actividades POD, CAPOD y FePOD. El aumento de los fenoles totales en la hoja de plantas en presencia del extracto acuoso de alpeorujo estaría asociado a la síntesis de precursores de lignina, lo cual explicaría el aumento observado en este polímero. El hecho de que en raíz se incremente el contenido de fenoles a tiempos de exposición al residuo más cortos que en hoja tanto con ADOR transformado o no por los hongos, al igual que sucedía con los antioxidantes totales, parece indicar la posibilidad de que se está dando un proceso de traslación de los fenoles desde la raíz hacia la hoja y por tanto induciendo la respuesta de defensa a más largo plazo respecto de la raíz. Los elevados niveles de actividad POD detectados, concretamente de la CAPOD y FePOD, explicarían también el incremento de

lignina ya que estas enzimas actuarían polimerizando los precursores de lignina sintetizados por la propia planta, contribuyendo de esta forma al proceso de lignificación. Sin embargo, no hay que descartar la hipótesis de que los fenoles presentes en el ADOR sean absorbidos por la raíz y trasladados hacia las hojas donde se acumulen y actúen como precursores de la lignina. Se sabe que el ácido ferúlico, se esterifica con los polisacáridos de la pared celular incorporándose a la lignina, o bien forma puentes de unión entre la lignina y los polisacáridos, determinando rigidez limitación del crecimiento de la célula (Lam *et al.*, 2001). El ácido ferúlico forma parte de la composición del ADOR, por lo que cabría la posibilidad de que la planta esté utilizando este compuesto para unirlo a la pared celular. Se ha demostrado un incremento de la actividad peroxidasa asociado a un incremento en el contenido de lignina en soja tras una exposición a compuestos aleloquímicos como el ácido ferúlico (dos Santos *et al.*, 2004, 2008). El ácido ferúlico se ha descrito que puede actuar tanto como precursor de la síntesis de lignina como de otros compuestos fenólicos. Por otro lado, se conoce que los compuestos fenólicos reducen la extensibilidad, el crecimiento y confieren rigidez a los tejidos vegetales (Kamisaka *et al.*, 1990; Tan *et al.*, 1991, 1992). Por ello, la reducción del crecimiento de la parte aérea descrito en plantas de tomate cultivadas en presencia de ADOR, podría estar relacionado con el elevado contenido fenólico y de lignina descrito en la hoja y que además debe influir en la rigidez y la extensibilidad de las paredes celulares.

La transformación del ADOR por los hongos saprobios *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 provocan en plantas expuestas durante 10 días un incremento del contenido de fenoles totales de forma similar al ADOR. Sin embargo los niveles de lignina e incluso la actividad de la POD detectadas fueron significativamente menores respecto del ADOR probablemente debido a la reducción del contenido fenólico observado en los extractos tras la incubación. Este resultado indica que el proceso de lignificación en las hojas de plantas de tomate tratadas con los extractos acuosos transformados no acontece con la misma intensidad que en el caso del ADOR, lo que indica que el estrés desencadenado por los extractos transformados es mucho más moderado que en los no transformados y por tanto se genera una mejor respuesta de adaptación por parte de la planta determinando un incremento del peso y del crecimiento de la parte aérea. Por otro lado, el nivel de fenoles totales detectado en hoja de plantas de tomate expuestas a ADOR podría indicar también la posible implicación de estos en procesos de detoxificación de ROS de manera directa y no mediante la lignificación.

Capítulo IV

Papel de las micorrizas sobre la fisiología de plantas de tomate expuestas al extracto acuoso de alpeorujó

Papel de las micorrizas sobre la fisiología de plantas de tomate expuestas al extracto acuoso de alpeorujó

Objetivo

La simbiosis micorrícica arbuscular (MA), está considerada como una de las asociaciones mutualista más importantes, debido a los numerosos beneficios que aporta a las plantas, entre los que cabe destacar el efecto bioprotector bajo condiciones de estrés, tanto abiótico como biótico (Miransari, 2010). Son pocos los estudios realizados sobre el posible papel aliviador que puedan ejercer las micorrizas en plantas expuestas al alpeorujó, incrementando su resistencia al estrés provocado por el residuo. Por ello, se planteó en este capítulo, determinar el impacto que tiene la aplicación del ADOR transformado o no con los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10, sobre la fisiología de las plantas de tomate micorrizadas. Se analizará el papel bioprotector que aporta la micorriza a plantas de tomate bajo una situación de estrés oxidativo causado tras la exposición al extracto acuoso de alpeorujó así como la posible inducción de su sistema antioxidante.

Metodología

Para la realización de este experimento se utilizaron semillas de tomate esterilizadas en superficie y pregerminadas en semilleros. Tras 15 días de cultivo, las plántulas de tomate se transfirieron a macetas de 300 ml que contenían una mezcla estéril de suelo:arena (2:3) (v/v). A los tratamientos con micorrizas se les añadió 8 g de inóculo de *Glomus mosseae* por maceta y a los controles no inoculados un filtrado de suelo libre de propágulos infectivos. Posteriormente se aplicó el extracto acuoso de alpeorujó transformado o no con los hongos saprobios a la dosis del 5%. El cultivo se mantuvo durante 45 días bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad. Finalizado el periodo de cultivo se determinó la eficiencia del PS II y se procesó el material vegetal (hojas y raíces) de forma que una parte se utilizó para la determinación de parámetros fisiológicos como biomasa (PSR y PSPA), crecimiento relativo (RGR_R y RGR_{PA}), contenido hídrico y porcentaje de raíz micorrizada, mientras que el resto se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Con el material congelado se determinaron marcadores de estrés como el MDA y el peróxido de hidrógeno, así como antioxidantes enzimáticos.

Resultados

1. Parámetros fisiológicos

1.1. Análisis del crecimiento

La parte aérea de las plantas de tomate micorrizadas mostraron un mayor crecimiento y peso respecto de las no micorrizadas (Fig. 1). La exposición al ADOR redujo el peso seco y el crecimiento relativo de la raíz y la hoja de plantas de tomate respecto de su control, mientras que en plantas inoculadas con *G. mosseae* este residuo no afectó negativamente al desarrollo de la planta (Fig. 1). La transformación del ADOR realizada por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 produjo incrementos significativos del peso y crecimiento en raíz y hoja en plantas sin micorrizar respecto del tratamiento con ADOR llegando a igualar ambos parámetros al de los controles sin residuo. La exposición de las plantas micorrizadas al extracto transformado al igual que en el caso del ADOR no provocó cambios en la biomasa ni en el crecimiento relativo de raíz y parte aérea obteniendo valores similares a los controles sin residuo.

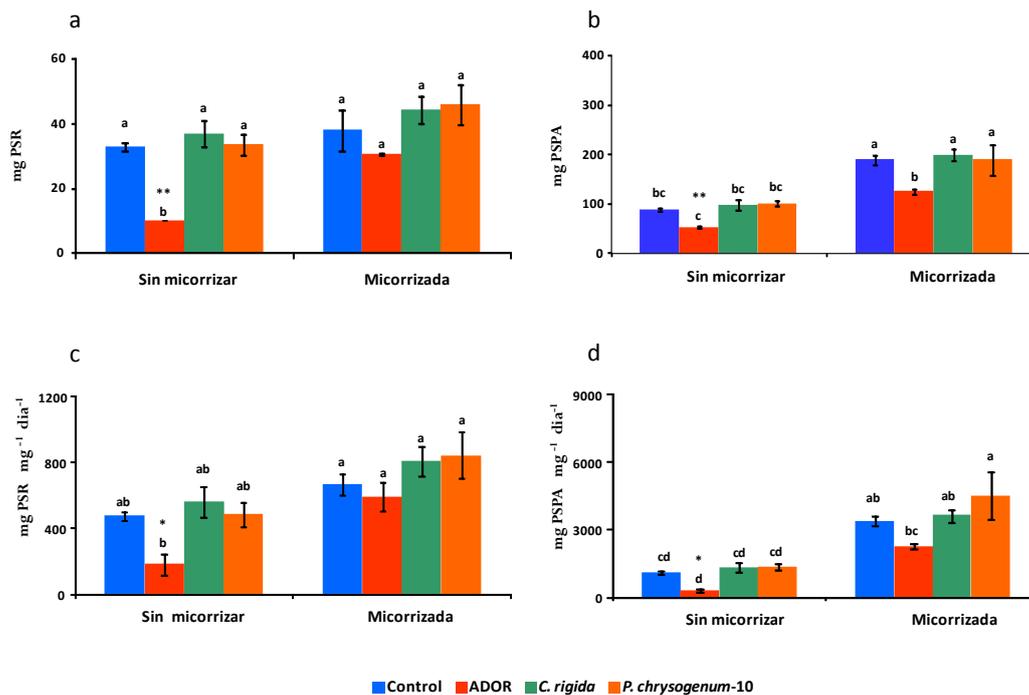


Figura 1. Peso seco de raíz (PSR) (a), y de parte aérea (PSPA) (b) e índice de crecimiento relativo en raíz (RGR_R) (c) y parte aérea (RGR_{PA}) (d) en plantas de tomate sin micorrizar o micorrizadas cultivadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum-10*. Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=4). Los * y ** representan las diferencias significativas de cada tratamiento respecto de su control según el test de Dunnett ($P < 0,05$ y $P < 0,01$ respectivamente). Las letras indican las diferencias significativas entre plantas sin micorrizar/micorrizada según el test de Tukey ($P < 0,05$).

1.2. Contenido hídrico

El contenido hídrico relativo determinado en plantas de tomate no reveló diferencias significativas en la raíz ni en la parte aérea entre plantas sin micorrizar y las inoculadas con *G. mosseae*. Así mismo, la aplicación del ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum-10* a las plantas cultivadas en suelo estéril o micorrizadas no modificó tampoco dicho parámetro (Fig. 2).

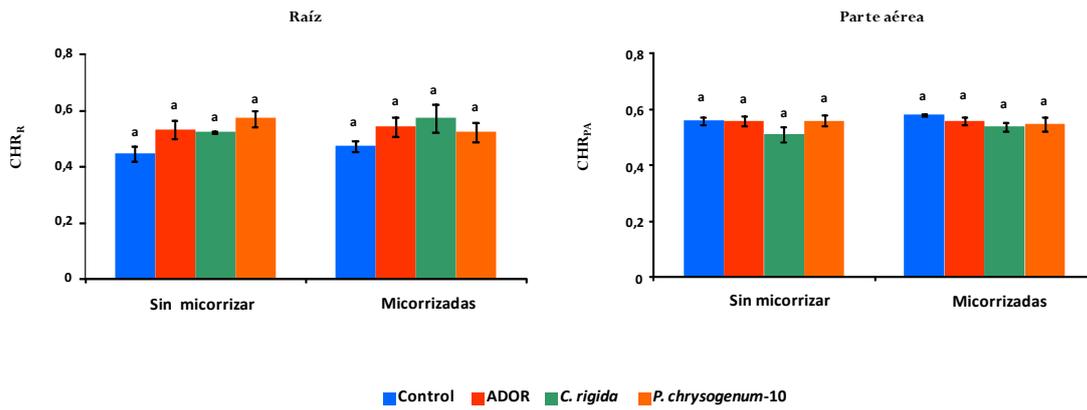


Figura 2. Contenido hídrico relativo (CHR) en raíz y parte aérea de plantas de tomate sin micorrizar y micorrizadas cultivadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum-10*. Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=4). Los * y ** representan las diferencias significativas de cada tratamiento respecto de su control según el test de Dunnett ($P < 0,05$ y $P < 0,01$ respectivamente). Las letras indican las diferencias significativas entre plantas sin micorrizar y micorrizadas según el test de Tukey ($P < 0,05$).

1.3. Eficiencia fotosintética

La eficiencia fotosintética en la hoja de plantas de tomate fue similar entre plantas sin micorrizar y micorrizadas. No se observaron cambios en la eficiencia del fotosistema II de la hoja de plantas no micorrizadas e inoculadas con *G. mosseae* tratadas con extracto acuoso de alpeorujó. La aplicación del ADOR transformado por *C. rigida* y *P. chrysogenum-10* a plantas de tomate cultivadas en suelos estéril y suelo inoculado con *G. mosseae* no modificó la eficiencia fotosintética de la misma (Fig. 3).

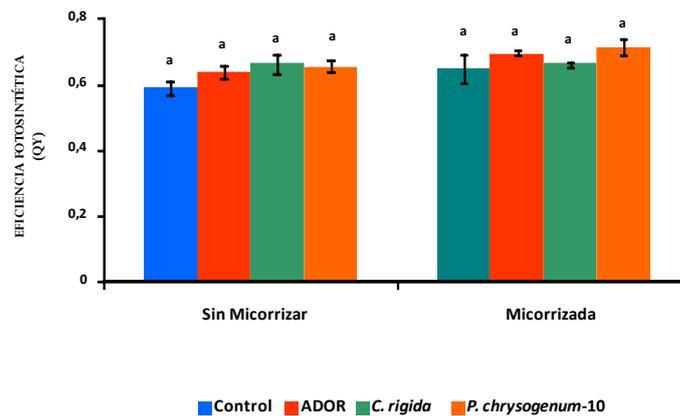


Figura 3. Eficiencia del PSII en la hoja de plantas de tomate sin micorrizar y micorrizadas cultivadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum-10*. Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=4). Los * y ** representan las diferencias significativas de cada tratamiento respecto de su control según el test de Dunnett ($P < 0,05$ y $P < 0,01$ respectivamente). Las letras indican las diferencias significativas entre plantas sin micorrizar y micorrizadas según el test de Tukey ($P < 0,05$).

1.4. Micorrización

El nivel de micorrización alcanzado en las plantas de tomate colonizadas por *G. mosseae* fue de un 35% mientras que en presencia del extracto acuoso no transformado se alcanzó solo un 20% de micorrización. La transformación del residuo con los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum-10* provocó un porcentaje de micorrización similar al observado en el caso del extracto sin transformar.

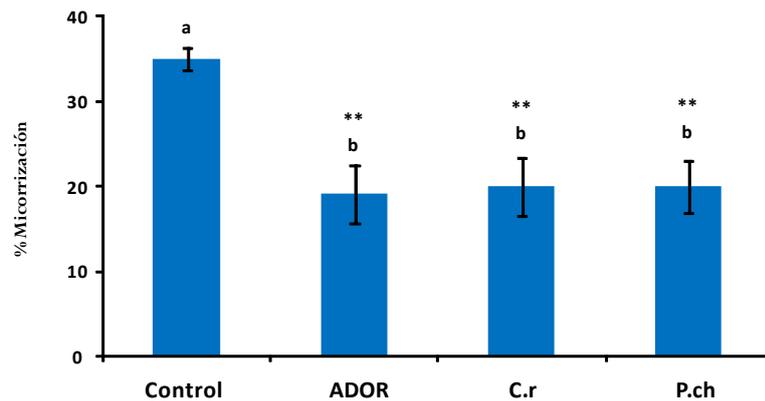


Figura 4. Porcentaje de micorrización de la raíz de plantas de tomate micorrizadas (Control), cultivadas en presencia de ADOR transformado o no (ADOR) por los hongos *C. rigida* (C.r) y *P. chrysogenum*-10 (P.ch). Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=4). Los * y ** representan las diferencias significativas de cada tratamiento respecto de su control según el test de Dunnett ($P < 0,05$ y $P < 0,01$ respectivamente). Las letras indican las diferencias significativas entre plantas sin micorrizar y micorrizadas según el test de Tukey ($P < 0,05$).

2. Marcadores de estrés oxidativo

El daño oxidativo en plantas provocado tras la aplicación del ADOR sin transformar y transformado por los hongos se cuantificó a través de la determinación de MDA y de H_2O_2 (Fig. 5a y b).

Los niveles de MDA detectados en raíz fueron significativamente mayores en plantas de tomate control respecto de las micorrizadas (Fig. 5a). La aplicación del ADOR incrementó dicho parámetro tanto en plantas sin inocular como inoculadas con el hongo arbuscular *G. mosseae*, sin embargo, cabe resaltar que los niveles de MDA detectados en plantas micorrizada fueron menores a los observados en las sin micorrizar. Por otro lado, la transformación con los hongos del ADOR redujo el incremento del contenido en MDA observado en el residuo sin tratar tanto en la raíz de plantas sin micorrizar como en las micorrizadas. Así mismo, el nivel de MDA observado en el tratamiento con el ADOR transformado por los hongos fue mayor en la raíz de plantas cultivadas en suelo estéril que en las micorrizadas.

La hoja de plantas de tomate mostró un comportamiento similar al observado en la raíz ya que se detectaron niveles de MDA superiores en plantas sin inocular respecto a los observados en las micorrizadas. Sin embargo en este caso la aplicación del ADOR transformado o no por los hongos no incrementó el contenido de MDA de las plantas de tomate tanto no micorrizadas como las inoculadas con el hongo *G. mosseae* (Fig. 5a).

En cuanto al contenido en peróxido de hidrógeno detectado en la raíz de plantas sin micorrizar y micorrizadas no se observaron diferencias significativas tal y como se muestra en la figura 5b. La aplicación del ADOR sin transformar y transformado por el hongo *C. rigida* incrementó los niveles de H_2O_2 en la raíz de plantas no inoculadas, sin embargo no se detectó cambios en las que crecieron en presencia del residuo tratado con *P. chrysogenum*-10. Las plantas de tomate inoculadas con *G. mosseae* no variaron el contenido en peróxido tras la aplicación del ADOR sin transformar y transformado por los hongos.

En hoja, al igual que en raíz, no se modificó el contenido de H_2O_2 entre las plantas controles y las micorrizadas. El cultivo de plantas de tomate expuestas al ADOR provocó el aumento en los niveles de peróxido de hoja tanto en las plantas sin micorrizar como en las inoculadas con *G. mosseae*. Tras la exposición de las plantas, micorrizadas o no, al extracto transformado por *C. rigida*, se incrementaron los niveles de H_2O_2 , respecto al de los controles sin residuo, sin embargo hay que destacar que solo se produjo aumento de peróxido en el caso de ADOR tratado con *P. chrysogenum*-10 en las plantas sin inocular. En plantas micorrizadas con *G. mosseae* y expuestas al ADOR tratado con *P. chrysogenum*-10 los niveles de peróxido detectados fueron similares a los observados en las plantas control micorrizadas (Fig 5. b).

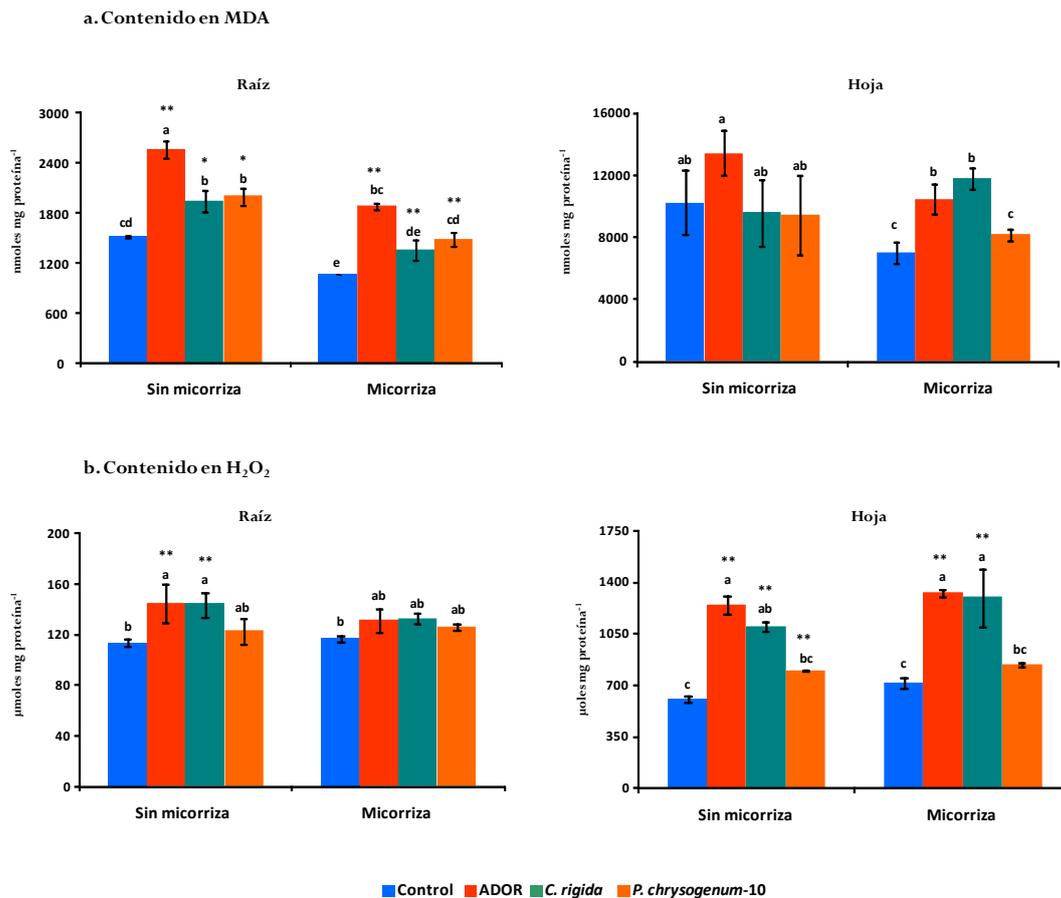


Figura 5. Contenido en MDA (a) y H₂O₂ (b) en raíz y hoja de plantas de tomate sin micorrizar y micorrizadas, cultivadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum-10*. Los datos representan el valor medio de la muestra ±SE (n=4). Los * y ** representan las diferencias significativas de cada tratamiento respecto de su control según el test de Dunnett (P<0,05 y P<0,01 respectivamente). Las letras indican las diferencias significativas entre plantas sin micorrizar y micorrizadas según el test de Tukey (P<0,05).

3. Respuesta antioxidante

3.1. Enzimas antioxidantes

Se realizaron determinaciones de las actividades SOD, CAT, APX, POD y GST de raíz y hoja en plantas sin micorrizar y micorrizadas tal y como puede observarse en las figuras 6 y 7.

En raíz, no se encontraron diferencias en la actividad SOD de plantas micorrizadas o no (Fig. 6). La aplicación del ADOR no modificó la SOD de la raíz de plantas de tomate no micorrizadas mientras que sí se observó un incremento de dicha actividad en plantas inoculadas con *G. mosseae*. Los extractos tratados con los

hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 no afectaron a la actividad SOD en raíz de plantas sin inocular, sin embargo en la raíz micorrizada los extractos transformados redujeron el incremento de dicha actividad observada en presencia del ADOR hasta alcanzar niveles similares a los de las plantas sin residuo.

La enzima CAT en raíz de plantas micorrizadas mostró un nivel de actividad mayor que el observado en plantas sin micorrizar. La aplicación del ADOR provocó un aumento de actividad CAT respecto a los controles en ambos tipos de plantas, sin embargo, cabe resaltar que el incremento fue significativamente mayor en raíz de plantas inoculadas con el hongo *G. mosseae*. La incubación del extracto acuoso de alpeorujos con los hongos produjo un incremento mayor en la actividad CAT de la raíz de plantas crecidas en suelo estéril que el observado con el ADOR, mientras que en las plantas micorrizadas el aumento de dicha actividad fue similar al producido por el residuo.

Las plantas sin micorrizar y micorrizadas tuvieron una actividad APX en raíz similar, tal y como se observa en la fig. 6. Solo la raíz de las plantas controles expuestas al ADOR redujo su actividad APX significativamente ya que en el caso de las plantas colonizadas por *G. mosseae* no se detectaron modificaciones de dicha actividad. El cultivo de plantas de tomate no micorrizadas en presencia del extracto acuoso de alpeorujos tratado con los hongos incrementó la actividad de la APX respecto al ADOR llegando a alcanzar valores similares a los controles. No se detectó variación de la actividad APX frente al extracto acuoso de alpeorujos transformado respecto al ADOR, en la raíz de plantas micorrizadas.

La determinación de la enzima POD puso de manifiesto una mayor actividad en raíz de plantas micorrizadas respecto de las sin micorrizar. La exposición al ADOR en plantas control no indujo cambios en la actividad POD mientras que si se observó una reducción significativa de dicha actividad en la raíz de plantas inoculadas con *G. mosseae*. La actividad POD de raíz de plantas no micorrizadas no se modificó en presencia del ADOR transformado por los hongos saprobios, sin embargo, en plantas micorrizadas, se produjo una reducción de dicha actividad respecto del control sin residuo aunque menor que la producida por el extracto acuoso de alpeorujos.

La GST mostró valores de actividad considerablemente mayores en la raíz de plantas micorrizadas respecto de las controles (Fig. 6). Se observó, en ambos casos, como la aplicación del ADOR aumentó la actividad de dicha enzima en la raíz de plantas de tomate sin micorrizar y micorrizadas en un 169 y 57% respectivamente.

La aplicación a la planta del extracto acuoso de alpeorajo transformado por *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 también provocó el incremento de la GST al igual que se observó tras la aplicación de ADOR tanto en raíz de planta sin inocular como inoculada con el hongo micorrícico *G. mosseae*, sin embargo, las raíces micorrizadas redujeron dichos niveles de actividad respecto del ADOR en presencia de los extractos transformados con los hongos saprobios.

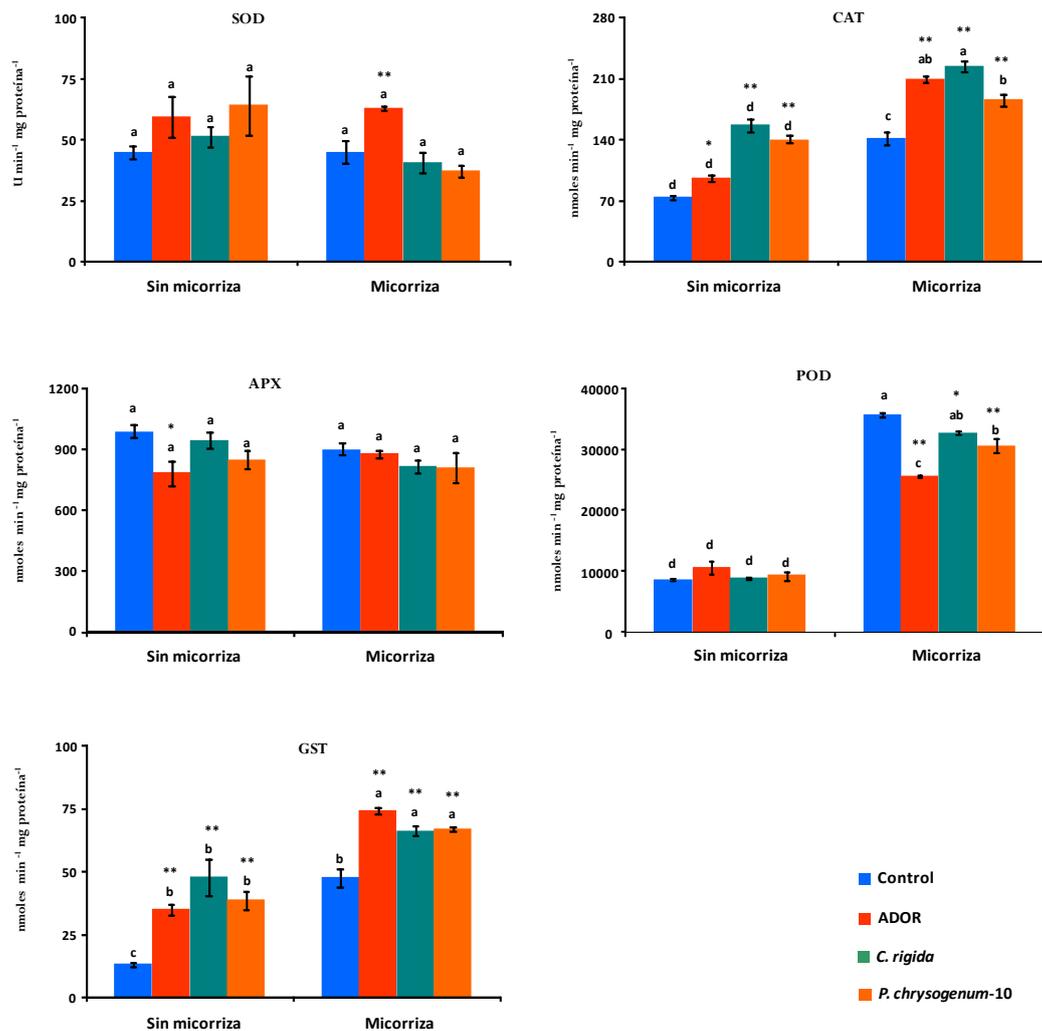


Figura 6. Actividades enzimáticas SOD, CAT, APX, POD y GST en la raíz de plantas de tomate sin micorrizar y micorrizadas, cultivadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10. Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=4). Los * y ** representan las diferencias significativas de cada tratamiento respecto de su control según el test de Dunnett ($P < 0,05$ y $P < 0,01$ respectivamente). Las letras indican las diferencias significativas entre plantas sin micorrizar y micorrizadas según el test de Tukey ($P < 0,05$).

No se observaron diferencias en los niveles de actividad SOD detectados en hojas entre plantas de tomate micorrizadas o no. Sin embargo, en ambos casos la exposición al ADOR provocó un incremento en torno al 140% en dicha actividad tanto en plantas sin micorrizar como inoculadas con *G. mosseae*. La actividad SOD de hojas de plantas en presencia de ADOR transformado se aumentó de forma similar a lo observado en el caso del extracto sin transformar no observándose diferencias en el incremento de la actividad entre plantas no micorrizadas e inoculadas con *G. mosseae*.

Respecto a la actividad CAT, pudimos observar niveles muy superiores de dicha enzima en hojas de plantas de tomate inoculadas con *G. mosseae* que en las cultivadas en suelo estéril. La exposición de las plantas al ADOR sin transformar y transformado por *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 en general no afectó los niveles de dicha enzima, salvo en el caso de las hojas de plantas micorrizadas tratadas con el extracto transformado por *P. chrysogenum*-10, donde se observó un incremento en la actividad CAT respecto al control en torno al 35%.

Por otro lado, los niveles de actividad APX observados en plantas controles fueron superiores a los de las micorrizadas. La aplicación del ADOR provocó la reducción de la actividad APX en plantas cultivadas en suelo estéril mientras que en plantas micorrizadas no se modificó dicha actividad. La transformación del ADOR con los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 provocó la reducción de la APX en plantas sin micorrizar, mientras que en plantas inoculadas con *G. mosseae* solo se detectó un incremento de la actividad en el tratamiento del residuo transformado con *C. rigida* mientras que con *P. chrysogenum*-10 no provocó cambios en la actividad APX respecto a las plantas sin residuo.

Los resultados de este ensayo muestran como la actividad POD fue menor en hoja de plantas de tomate inoculadas con el hongo arbuscular *G. mosseae* que en las cultivadas en suelo estéril. En presencia de ADOR, esta actividad disminuyó en las hojas de plantas sin micorrizar y micorrizadas en torno a un 54 y 42% respectivamente. De la misma manera, la exposición de las plantas a los extractos transformados con *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 redujo la POD aunque en plantas no inoculadas la disminución fue menor respecto de la observada con el ADOR.

Los mayores valores de actividad GST se obtuvieron en hojas de plantas de tomate inoculadas con el hongo *G. mosseae*. El ADOR indujo un incremento de dicha actividad tanto en plantas sin micorrizar como en las micorrizadas, aunque fue superior en plantas sin inocular. La transformación del ADOR por ambos hongos

saprobios redujo los niveles de actividad GST significativamente en plantas micorrizadas mientras que en las plantas sin inocular solo disminuyó en el tratamiento con residuo transformado por *P. chrysogenum*-10.

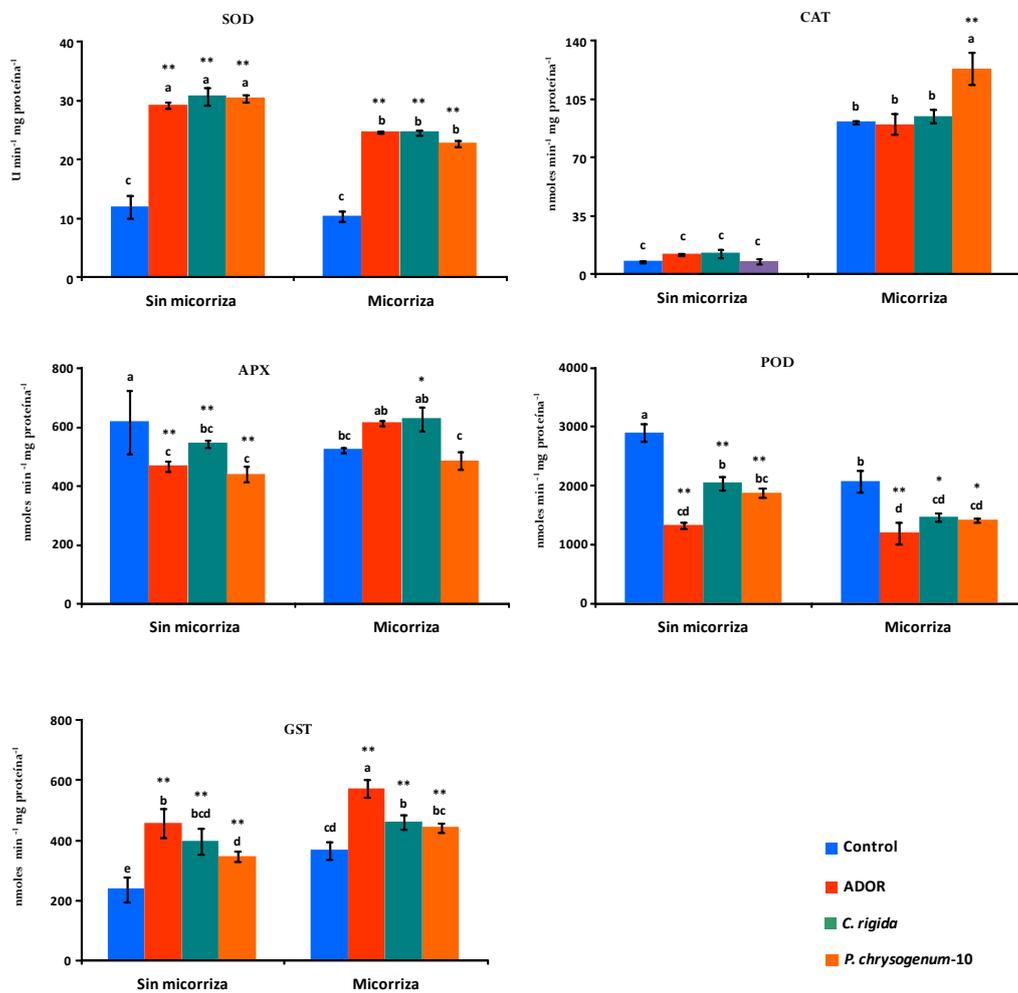


Figura 7. Actividades enzimáticas SOD, CAT, APX y GST en la hoja de plantas de tomate sin micorrizar y micorrizadas cultivadas en presencia de ADOR transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10. Los datos representan el valor medio de la muestra \pm SE (n=4). Los * y ** representan las diferencias significativas de cada tratamiento respecto de su control según el test de Dunnett ($P < 0,05$ y $P < 0,01$ respectivamente). Las letras indican las diferencias significativas entre plantas sin micorrizar y micorrizadas según el test de Tukey ($P < 0,05$).

Discusión

La presencia del ADOR durante el cultivo de las plantas de tomate redujo el peso y el crecimiento de la raíz y parte aérea, mientras que la aplicación del extracto biotransformado por *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 a las plantas incrementó su desarrollo de forma similar al observado en ausencia de ADOR. El extracto acuoso de alpeorujó, tal y como se ha puesto de manifiesto en capítulos anteriores, posee propiedades fitotóxicas y es capaz de generar una situación de estrés oxidativo en plantas de tomate, que se ve aliviada tras la incubación del residuo con los hongos saprobios. Por tanto la extracción acuosa del alpeorujó y su posterior tratamiento mediante hongos saprobios supone una herramienta útil en procesos de biorremediación y valorización del residuo para su posible uso como fertilizante orgánico. Las micorrizas son capaces de mejorar la nutrición mineral de las plantas principalmente a través de un aumento en la captación de fósforo así como la estructura del suelo por medio de la formación de agregados estables, por tanto, se puede considerar que esta simbiosis es esencial para el desarrollo de una agricultura sostenible (Barrios, 2007; Smith y Read, 2008). De hecho en nuestro estudio hemos observado un aumento del peso y crecimiento relativo de las plantas de tomate micorrizadas con respecto a las no micorrizadas, siendo más evidente en la parte aérea que en la raíz. Las micorrizas además confieren a las plantas tolerancia frente a diferentes estreses tales como metales pesados, salinidad, sequía y a la compactación del suelo que parece estar mediada por la combinación de efectos físicos, nutricionales, fisiológicos y celulares (Hildebrandt *et al.*, 2007; Daei *et al.*, 2009; Miransari *et al.*, 2010). La incorporación de los hongos arbusculares durante el cultivo de las plantas de tomate en presencia de ADOR incrementó el peso y el crecimiento de raíz y parte aérea con respecto a las plantas no micorrizadas poniendo de manifiesto el efecto bioprotector que confiere la micorriza. Además, la aplicación de los hongos arbusculares y los extractos de alpeorujó transformados por los hongos saprobios también favoreció el incremento de la parte aérea respecto de las plantas no micorrizadas. Probablemente el hongo arbuscular *G. mosseae* esté dando protección a la planta frente al extracto acuoso de alpeorujó mediante el incremento de la captación de nutrientes minerales procedentes del suelo y del ADOR y por tanto contribuye de esta forma a un mayor crecimiento y desarrollo vegetal. Este resultado está de acuerdo con otros realizados en plantas de tomate micorrizadas, cultivadas en presencia de extracto acuoso de alpeorujó, transformado o no donde se observó un incremento del peso de las plantas debido a la presencia de *G. deserticola* (Aranda *et al.*, 2009). Podemos afirmar que la presencia del hongo micorrícico *G. mosseae* redujo la susceptibilidad de las plantas de tomate a la

fitotoxicidad del ADOR y por tanto la dosis del 5% no resultó tóxica para el crecimiento de las plantas micorrizadas.

El análisis de otros parámetros fisiológicos mostró que el contenido de agua y/o la eficiencia del fotosistema II no sufrieron el efecto inhibitor de los compuestos fenólicos presentes en el extracto acuoso de alpeorujos transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 tanto en plantas sin micorrizar como inoculadas con *G. mosseae*. Sin embargo, en estudios realizados con maíz bajo condiciones de estrés por petróleo se observa como las plantas micorrizadas son capaces de mejorar la captación de agua además de incrementar la síntesis de clorofila y por tanto de llevar a cabo un óptimo funcionamiento de la fotosíntesis (Wang *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2009). Esta aparente contradicción puede deberse a que tal y como ya observamos en el capítulo III, estos parámetros poseen una mayor susceptibilidad al efecto tóxico del ADOR a tiempos cortos de exposición mientras que la presencia de este durante periodos más prolongados produce una recuperación de los mismos que probablemente esté relacionada con una adaptación de la planta a la presencia del residuo. Sin embargo, no cabe descartar la posibilidad de que la presencia de la micorriza haya influido de alguna forma a la mejora en la captación de agua y/o a la eficiencia del fotosistema II en períodos donde la sensibilidad de las plantas de tomate a la presencia del ADOR fue mayor.

El establecimiento de la simbiosis micorrícica en muchos casos puede ser susceptible a la presencia de compuestos tóxicos presentes en el suelo tal y como han mostrado diversos estudios, en los que se ha observado una reducción en el porcentaje de colonización del hongo micorrícico en la raíz en presencia de sustancias tales como metales pesados, petróleo y los compuestos fenólicos del alpeorujos (Andrade *et al.*, 2009; Aranda *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2009). Nuestros resultados revelaron la reducción del porcentaje de raíz inoculada con *G. mosseae* en presencia del 5% de ADOR respecto de las plantas sin residuo. Martín *et al.* (2002) han observado una fuerte reducción de la micorrización en el caso del hongo *G. mosseae* en presencia de alpeorujos, aunque no se vio afectada la funcionalidad del hongo una vez establecida la simbiosis. La incubación del extracto acuoso de alpeorujos con los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10, no evitó la reducción del porcentaje de colonización de la raíz de tomate por *G. mosseae*. Este resultado indica que probablemente la micorrización no solo dependa de la concentración de los compuestos fenólicos presentes en el medio ya que tras la transformación del extracto acuoso realizada por los hongos saprobios se reduce dicho contenido por lo que se podría pensar que en la composición del ADOR exista algún tipo de

sustancia, diferentes de los fenoles, como oligosacáridos y glucoproteínas, que inhiban el desarrollo de la simbiosis MA (Aranda *et al.*, 2009).

La oxidación de lípidos de membrana es un indicador fiable de la producción incontrolada de radicales libres y por consiguiente es representativa de una situación de estrés oxidativo (Noctor y Foyer, 1998). La aplicación de ADOR a plantas de tomate provocó en la raíz un incremento en el contenido de MDA en plantas no micorrizadas y micorrizadas aunque el aumento fue menor en las colonizadas por el hongo *G. mosseae*, en cambio las hojas no modificaron dicho contenido tras la exposición al residuo como consecuencia posiblemente de la mayor respuesta antioxidante generada en estos órganos. La toxicidad de muchos compuestos fenólicos pueden atribuirse a la formación de radicales fenólicos que actúan transfiriendo electrones al oxígeno molecular y por tanto produciendo especies reactivas del oxígeno (ROS) como los radicales superóxido (Weir *et al.*, 2004). Las ROS son altamente peligrosas para las células ya que provocan daños a nivel de las membranas alterando la permeabilidad de las mismas y dando lugar a la peroxidación de lípidos, también son capaces de actuar a nivel del DNA y proteínas e incluso pueden llegar a inducir la muerte celular programada (Ding *et al.*, 2007). El papel bioprotector que confiere el establecimiento de la simbiosis arbuscular a plantas de tomate reduciendo el daño oxidativo tras la exposición al ADOR está de acuerdo con estudios realizados en diversas especies vegetales sometidas a estreses por sequía, metales pesados o por compuestos xenobióticos tales como el petróleo o herbicidas (Porcel y Ruiz-Lozano, 2004; Tang *et al.*, 2009; Bressano *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). La cuantificación del contenido de H_2O_2 también puso de manifiesto que solo en raíz no micorrizada hay incremento frente al ADOR evidenciándose de nuevo el papel bioprotector que confiere la presencia de los hongos arbusculares en la planta. El hongo micorrícico *G. mosseae* podría actuar reduciendo el incremento en los niveles de algunas ROS como el H_2O_2 tras la aplicación del extracto acuoso de alpeorujó, de forma que el daño causado a las membranas sea menor y la situación de estrés se alivie por el establecimiento de la simbiosis. Sin embargo, la hoja mostró un incremento similar de peróxido tras la exposición de las plantas sin micorrizar y micorrizadas al ADOR. En este órgano no se detecta un daño oxidativo tras la exposición al ADOR por lo que probablemente el H_2O_2 que se incrementa tras la exposición al residuo sea detoxificado de forma eficiente por el sistema antioxidante y eliminado del medio con lo que el daño celular se reduce.

El tratamiento del ADOR con los hongos saprobios redujo significativamente el daño oxidativo provocado por el residuo en raíz de plantas de tomate, efecto que probablemente esté relacionado con la disminución, tras la incubación con los hongos, del contenido fenólico responsable de la fitotoxicidad del ADOR. Por otro lado se observó una reducción en el contenido de H_2O_2 tras la exposición al extracto transformado por *P. chrysogenum*-10 lo que nos indica que la transformación por este hongo alivia la situación de estrés generada tras la exposición al ADOR en raíz de tomate. La presencia de la simbiosis arbuscular provoca que los niveles de MDA en los tratamientos con ADOR transformado en dicha raíz sean inferiores a los de plantas sin micorrizar, lo que indica que además del efecto biorremediador de los hongos, en este caso la micorriza confiere resistencia frente al estrés provocado por el extracto transformado. En cambio, la hoja de plantas de tomate micorrizadas en presencia de los extractos transformados no mostró cambios en el contenido de MDA al igual que sucedía en presencia del ADOR, aunque si provocó un incremento en el contenido de peróxido de forma similar al observado en el caso de las plantas sin micorrizar. El efecto aliviador de la micorriza en general frente al extracto transformado probablemente sea debido al papel que tiene la simbiosis potenciando la asimilación de sustancias y/o nutrientes solubles presentes no solo en el suelo sino en el extracto acuoso de alpeorujos que contribuye al incremento del crecimiento de la planta de tomate principalmente de la parte aérea favoreciendo su resistencia frente al estrés tal y como hemos observado en nuestros ensayos.

En condiciones normales existe un equilibrio entre la producción y eliminación de especies reactivas de oxígeno que se ve alterado bajo situaciones de estrés, provocando la acumulación excesiva de ROS y por tanto induciendo daños celulares. A fin de controlar la producción masiva de especies reactivas del oxígeno, las plantas presentan mecanismos capaces de controlar dichos niveles como es el sistema antioxidante enzimático (Apel y Hirt, 2004). De las actividades enzimáticas antioxidantes ensayadas se observó que las plantas micorrizadas mostraron niveles elevados de CAT, POD y GST respecto de las no micorrizadas. Algunos autores han señalado que la micorriza es capaz de incrementar la actividad de enzimas antioxidantes durante estadios tempranos del establecimiento de la simbiosis tales como la formación del apesorio además se ha observado la inducción de algunas isoformas de la enzima SOD (Palma *et al.*, 1993; Blilou *et al.*, 2000). Sin embargo, se desconoce cuál es el papel de dichas enzimas tras el establecimiento de la simbiosis, probablemente dicho incremento pueda ser atribuido a cambios fisiológicos que se induzcan en la planta como consecuencia de la presencia de la micorriza.

La aplicación del ADOR provocó el incremento de la actividad SOD en la raíz de plantas inoculadas con el hongo *G. mosseae* mientras que las enzimas CAT y GST aumentaron los niveles de actividad tanto en las plantas sin micorrizar como en las micorrizadas aunque fueron en estas últimas donde se produjeron los mayores incrementos. Las micorrizas son capaces de incrementar la actividad de dichas enzimas aumentando de esta forma la resistencia de las plantas frente al estrés oxidativo causado tras la exposición al ADOR tal y como se ha puesto de manifiesto en plantas bajo estreses con metales pesados (Andrade *et al.*, 2009). El aumento de la actividad de la enzima CAT fue mayor en plantas micorrizadas en presencia de ADOR lo que explicaría los niveles normales de H_2O_2 detectados en raíz micorrizada tras la exposición atribuible a la participación de dicha enzima. Los niveles de la GST observados tras la exposición al ADOR fueron mayores en plantas en presencia del hongo micorrícico *G. mosseae* que en las no micorrizadas, lo que puede estar favoreciendo el que los compuestos fenólicos en este caso estén siendo conjugados al GSH reduciendo el daño oxidativo en la planta. Estos resultados estarían de acuerdo con las observaciones realizadas por Hildebrandt *et al.* (2007) en estreses provocados por metales pesados. Por otro lado se observó que la POD se redujo en la raíz micorrizada en presencia del ADOR, resultado que está de acuerdo con los descritos por Zhang *et al.* (2006) en raíz de arroz micorrizada expuesta a un fungicida. Sin embargo, la presencia de la micorriza no indujo cambios en la actividad APX, por lo que probablemente la enzima CAT en este caso sea la responsable de la detoxificación del contenido en H_2O_2 de la planta tras la exposición al ADOR.

Las hojas de las plantas de tomate expuestas al ADOR incrementaron los niveles de actividad de las enzimas SOD y GST. El incremento de la actividad SOD en respuesta al ADOR fue similar en los dos tipos de plantas ensayadas lo que determinó la misma acumulación de H_2O_2 en la hoja de plantas sin micorrizar y micorrizadas. No obstante, el menor nivel de SOD detectado en plantas inoculadas con *G. mosseae* respecto a las controles podría deberse a que el establecimiento de la simbiosis esté provocando la inmovilización de los fenoles en el micelio extrarradical o bien este evitando el acceso a la propia raíz con cambios en la forma del micelio permitiendo su inmovilización tal y como se ha descrito para otros contaminantes (Voguel-Mikus *et al.*, 2005, Vodnik *et al.*, 2008). Por otro lado, en las hojas se observó un mayor nivel de actividad de la GST tras la exposición al ADOR en plantas inoculadas con el hongo *G. mosseae* que las no micorrizadas. Las GST son enzimas detoxificadoras de compuestos xenobióticos que actúan conjugando dichos compuestos al GSH a fin de reducir su toxicidad (Schröder y Collins, 2002; Schröder *et al.*, 2007), aunque otros estudios han revelado que dicha

enzima puede actuar como peroxidasa eliminando el H_2O_2 generado en el medio celular tras la exposición a un compuesto xenobiótico (Cummins y Edwards, 1999). Khalvati *et al.* (2009) han observado el incremento de la GST en plantas inoculadas con micorrizas y su papel en la detoxificación de sustancias xenobióticas responsables de provocar un daño oxidativo. En nuestro caso, el hecho de no observar un incremento en la actividad CAT y APX así como la reducción de la POD en las hojas de plantas micorrizadas plantea la posibilidad de que probablemente la GST de las hojas esté actuando como una peroxidasa a fin de eliminar todo el H_2O_2 acumulado tras la exposición al ADOR y así evitar el daño oxidativo. Son numerosos los estudios que han puesto de manifiesto que el incremento de la tolerancia de plantas micorrizadas sometidas a estreses abióticos podría deberse al incremento en la actividad de enzimas antioxidantes que alivian la situación de estrés (Bressano *et al.*, 2010).

La exposición de las plantas de tomate micorrizadas al extracto acuoso de alpeorajo transformado por los hongos saprobios consiguió reducir el incremento de actividad SOD y GST en raíz y de la GST en hoja tras la exposición al ADOR. Como ya hemos puesto de manifiesto, a pesar de la reducción del contenido fenólico del ADOR por los hongos saprobios dicho extracto también provoca un estrés oxidativo aunque más moderado que el del residuo sin transformar, lo que pone de manifiesto la susceptibilidad de las plantas a bajas concentraciones de fenoles o bien a la presencia de sustancias de naturaleza no fenólica como polisacáridos. Como respuesta a dicho estrés la planta desencadena una respuesta de defensa mediada por el sistema antioxidante, menor que la que se produce tras la exposición al ADOR. Sin embargo, el establecimiento de la simbiosis arbuscular hace aumentar en las plantas algunas de las actividades enzimáticas antioxidantes en respuesta al estrés que provocan los extractos de alpeorajo transformados. Se sabe que la micorriza incrementa la adaptación de las plantas frente a diversos tipos de estreses mediante la mejora del estado nutricional, las relaciones hídricas, etc (Göhre y Paszkowski, 2006). De hecho se ha observado que la micorriza favoreció un mayor desarrollo de las plantas de tomate respecto de las no micorrizadas probablemente debido al incremento en la captación de los nutrientes asimilables por la planta presentes tanto en el suelo como en el ADOR.

Discusión general

DISCUSIÓN GENERAL

El ADOR es la fracción soluble del alpeorajo y está constituido principalmente por carbono orgánico, macronutrientes (K, Mg, Na, S y P) y micronutrientes (Mn, Fe, Cu, Zn y B) que lo hace óptimo para su uso como fertilizante orgánico. Sin embargo, la presencia de fenoles simples en su composición, principales responsables de su fitotoxicidad, ha hecho necesario el desarrollo de métodos para su biorremediación. El uso de hongos saprobios, que poseen un complejo sistema enzimático capaz de degradar una gran variedad de sustancias presentes en la matriz acuosa del ADOR, representa una forma eficaz de estabilización. Sin embargo, estos procesos de biorremediación con hongos necesitan periodos de fermentación excesivamente largos que dificultan la gestión de gran cantidad de residuo. Por ello, la combinación de un fraccionamiento físico del alpeorajo y su posterior tratamiento biológico con hongos saprobios constituye una alternativa efectiva de valorización de dicho residuo para su uso como fertilizante orgánico. El pre-tratamiento físico permite la extracción de los compuestos solubles fitotóxicos del alpeorajo como los fenoles, restos de paredes celulares o glucoproteínas, de forma que se facilita la acción detoxificadora de los hongos y se consigue que los tiempos de incubación necesarios para la transformación del residuo se vean reducidos. La transformación biológica del ADOR se llevó a cabo por los hongos ligninolíticos *C. rigida*, *T. versicolor* y *P. cinnabarinus* productores de oxidoreductasas como lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa implicadas en la degradación de compuestos de naturaleza fenólica y policíclicos aromáticos. Además, se utilizó el hongo del suelo *P. chrysogenum*-10 por su capacidad de producir tanto lacasa como enzimas hidrolíticas implicadas en la degradación de restos de paredes celulares y/o glucoproteínas también responsables de la fitotoxicidad del ADOR.

Los hongos *C. rigida*, *T. versicolor* y *P. cinnabarinus*, incubados en medio basal enriquecido con Cu con objeto de estimular e incrementar la actividad enzimática de la lacasa principal implicada en los procesos de defenolización del ADOR, mostraron un incremento de dicha actividad sobre todo en el caso de *C. rigida*. En el cultivo de *P. chrysogenum*-10, no se detectó dicha actividad porque probablemente esta especie fúngica no la produce. Cabe destacar que no se observó la producción de enzimas MnP y LiP en los medios de cultivos de los hongos ensayados.

El ADOR puede ser considerado también como un medio óptimo para el cultivo de hongos saprobios ya que su contenido en nutrientes y sustancias orgánicas que actúan funciona como fuente de carbono y energía para estos. La presencia del

ADOR durante el cultivo de los hongos provocó la reducción de la actividad lacasa, probablemente debido, bien a los compuestos fenólicos del residuo que pueden actuar como agentes inhibidores de la actividad o a la ausencia de inductores de dicha actividad en el residuo. Pero por el contrario durante el cultivo de la mayoría de los hongos con ADOR se estimuló la producción de enzimas hidrolíticas tales como pectinasas, celulasas y xiloglucanasas, debido a la riqueza del residuo en polímeros polisacáridicos. El particular incremento de las actividades hidrolíticas por parte de *P. chrysogenum*-10 probablemente puede ser debido además a la capacidad de los hongos filamentosos del suelo de producir este tipo de enzimas. Por tanto, la detección de la actividad lacasa y las distintas enzimas hidrolíticas tras la incubación de los hongos en el extracto acuoso de alpeorujos podría implicar la participación de dichas enzimas en los procesos degradativos de los compuestos tóxicos presentes en el residuo.

Los hongos ligninolíticos y filamentosos utilizados para la transformación del ADOR produjeron una reducción de sus compuestos fenólicos tras 15 días de incubación, resaltando la capacidad defenolizadora que presentan dichas especies fúngicas. Los hongos *C. rigida*, *T. versicolor* y *P. cinnabarinus* que mayor porcentaje de disminución de fenoles obtuvieron fueron los ligninolíticos, probablemente debido a su mayor actividad lacasa. Esta enzima ligninolítica puede considerarse la principal responsable del proceso de defenolización del ADOR debido principalmente a los procesos de polimerización que ejerce sobre los fenoles simples, de manera que los transforma en compuestos con elevado peso molecular que no pueden atravesar las membranas celulares de las plantas y por tanto reduce su fitotoxicidad. Sin embargo, en el caso de *P. chrysogenum*-10 donde no se detectó actividad lacasa, la defenolización del ADOR puede atribuirse a otras enzimas de membrana como las citocromo P-450.

El análisis de la composición cualitativa del extracto acuoso de alpeorujos por GC-MS puso de manifiesto la presencia de tirosol, ácido protocatecuico y vainílico como compuestos mayoritarios, aunque además también se detectó hidroxitirosol, ácido p-cumárico, cafeico, gálico, siríngico, hidroxibenzoico y ferúlico. Estos compuestos fenólicos que se han relacionado con su implicación en la fitotoxicidad del alpeorujos coinciden con los observados por otros autores en extractos orgánicos y acuosos de alpeorujos proveniente de diferentes campañas oleícolas.

La cuantificación del contenido fenólico por GC-MS del extracto acuosos de alpeorujos transformado reveló la capacidad defenolizadora de los distintos hongos saprobios ensayados. La incubación del residuo con *C. rigida*, *T. versicolor* y *P.*

cinnabarinus eliminó los ácidos p-cumárico, gálico y siríngico y redujo los niveles de tirosol, hidroxitirosol y los ácidos protocatecuico, vainílico y cafeico. Sin embargo, la eficiencia defenolizadora fue distinta según el hongo utilizado, ya que *C. rigida* y *T. versicolor* mostraron mayor poder de transformación que *P. cinnabarinus* por la conversión de compuestos como el ácido vainílico e hidroxitirosol. Esta diferente actuación puede ser debida, en el caso del hongo *C. rigida*, a que los niveles de actividad lacasa producidos por parte de este hongo fueron significativamente superiores a los de *P. cinnabarinus*. En cambio, la mayor capacidad defenolizadora de *T. versicolor* con respecto a *P. cinnabarinus* a pesar de producir actividad lacasa similar puede ser atribuible a la participación en estos hongos de otras enzimas como la aril alcohol oxidasa, glioxal-oxidasa, enzimas de membrana como la piranosa oxidasa y la citocromo P-450 o bien el sistema redox transmembrana. Por otro lado *P. chrysogenum*-10 no fue capaz de eliminar el ácido cafeico, p-cumárico y siríngico y aunque redujo la concentración de gran parte de los compuestos fenólicos presentes en el ADOR, esta disminución fue menor a la observada por los hongos ligninolíticos. Este hecho puede indicar que las enzimas hidrolíticas producidas por este hongo no estarían directamente implicadas en la conversión de los compuestos fenólicos, pero si parecen tener una notable participación en los procesos de disminución de la fitotoxicidad del residuo. Además, en este caso no hay que descartar la posible participación de otras enzimas como las de membrana, menos efectivas que la lacasa pero también implicadas en la degradación fenólica del residuo.

Las pruebas de fitotoxicidad realizadas en semillas de tomate en presencia de diferentes concentraciones (1,25 2,5 y 5%) de extracto acuoso de alpeorujó revelaron la inhibición del porcentaje de germinación, según las dosis ensayadas y el porcentaje de fenoles de la misma. Nuestros resultados mostraron una relación lineal entre la dosis de residuo aplicada y el porcentaje de germinación, Este resultado indica que los compuestos fenólicos presente en el ADOR pueden ser los principales responsables de su fitotoxicidad. Además, no hay que descartar que pueda darse un efecto sinérgico de los fenoles sobre la germinación de semillas de ciertas especies vegetales como se ha descrito. La transformación del extracto acuoso realizada por los hongos saprobios en general redujo la inhibición del porcentaje de germinación producida por el ADOR. El extracto acuoso de alpeorujó transformado por los hongos *C. rigida* y *T. versicolor* produjo niveles más altos de germinación que el tratado por *P. cinnabarinus* y *P. chrysogenum*-10, indicando una estrecha relación entre el contenido fenólico presente en el extracto acuoso y el porcentaje de germinación. El ADOR inhibió tanto el índice de

germinabilidad como el desarrollo radicular de las semillas de tomate, sin embargo en el residuo transformado por los hongos se observó un patrón de comportamiento diferente ya que se redujo de forma significativa el crecimiento radicular pero no se afectó el índice de germinabilidad de semillas. Este hecho nos indica la distinta susceptibilidad de ambos procesos a la presencia de sustancias de tipo fenólico que podrían estar inhibiendo determinadas actividades enzimáticas implicadas en las diferentes fases de la germinación, y necesarias para el desarrollo de la semilla. Parece que durante la fase de emergencia radicular, la presencia de determinados compuestos fenólicos a distintas concentraciones, son capaces de originar ciertos desequilibrios metabólicos que pueden relacionarse con la inhibición del crecimiento radicular. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que existan otras sustancias de naturaleza polisacáridica en la matriz del ADOR que posean un efecto inhibitorio sobre el crecimiento radicular.

Los compuestos fenólicos, además de inhibir la germinación de las semillas y el crecimiento radicular, son capaces de alterar otros procesos fisiológicos e incluso dañar la integridad de las membranas afectando por tanto a la captación de agua y nutrición mineral. El daño oxidativo medido como la acumulación de MDA incrementó durante la germinación de las semillas de tomate en presencia de ADOR, lo que nos indica que los compuestos fenólicos presentes en el extracto acuoso están provocando la alteración y/o disrupción de las membranas celulares. Cabe destacar que esta situación de estrés oxidativo generada por el residuo se ve aliviada tras la biorremediación del extracto acuoso por los hongos ya que en este caso se observan niveles de MDA similares a los de las semillas control. Por otro lado los compuestos fenólicos del ADOR pueden ser agentes inductores de un estrés oxidativo mediado por el incremento en la producción de ROS. La visualización microscópica “*in vivo*” del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) indicó que la germinación de las semillas en presencia del extracto acuoso de alpeorujó provocó un incremento en la acumulación de dichas ROS a lo largo de todo el segmento radicular. La transformación del ADOR con los hongos produjo diferentes patrones de fluorescencia de la raíz, así el nivel de acumulación del $O_2^{\cdot-}$ en los tratamientos con *T. versicolor* y *P. cinnabarinus* fue menor que en el caso de *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10. Respecto al contenido de peróxido, el tratamiento del residuo con *T. versicolor* fue el único que lo redujo mientras que el resto de los extractos transformados provocaron un incremento de los niveles de H_2O_2 mayor incluso que el tratamiento del ADOR. La variabilidad observada en los patrones de acumulación del radical $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 tras la germinación de las semillas nos indica las diferencias que provocan los distintos tratamientos en el

grado de estrés oxidativo generado así como en la respuesta de defensa desencadenada. La acumulación de ROS y el contenido en MDA observado en las raíces germinadas en presencia del extracto transformado por los hongos induciría una situación de estrés oxidativo más moderada que la observada en el caso del ADOR.

Por otro lado hay que destacar que la acumulación de $O_2^{\cdot -}$ en la raíz tras su germinación en presencia de los diferentes residuos puede ser debida a la mayor o menor eficiencia de la SOD ya que esta representa una primera barrera de defensa frente a la producción de radicales superóxido bajo situación de estrés. La raíz germinada en presencia de ADOR mostró niveles elevados de SOD, sin embargo no se observó una relación entre el aumento del nivel de dicha enzima y la menor acumulación de radical superóxido, probablemente debido a que la SOD no es lo suficientemente eficiente en la conversión de $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 y eso provoca el incremento en los niveles de MDA. En cambio, los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 que intervienen en la transformación del residuo disminuyendo el contenido de fenoles provocan un menor incremento de la actividad de la SOD respecto del ADOR. Este hecho provocó mayor acumulación de radicales superóxido, aunque bastante inferior a la observada en el caso del ADOR ya que los daños celulares fueron menores. Sin embargo los extractos incubados con *T. versicolor* y *P. cinnabarinus* con menor concentración de fenoles que la del extracto acuoso de alpeorujó incrementan la SOD de forma similar al ADOR. En este caso la actividad es suficiente para eliminar la producción de superóxidos generados tras la germinación y dismutarlo hacia H_2O_2 . La actuación de la SOD también contribuiría a la formación del H_2O_2 determinando su mayor o menor acumulación en la raíz germinada de tomate.

Las enzimas CAT y APX, claves en los procesos de detoxificación del H_2O_2 , no mostraron cambios en sus niveles de actividad tras la germinación de las semillas en presencia del ADOR transformado o no. El hecho de no observar un incremento en la actividad de estas enzimas parece indicar la ausencia de implicación de dichas enzimas en los procesos de degradación del H_2O_2 , por lo que su detoxificación puede estar llevándose a cabo por otras vías enzimáticas o no enzimáticas. De hecho, se observó un incremento en la enzima GR que participa en la regulación del balance redox del GSH, de forma que podemos intuir la participación del GSH en procesos de detoxificación directa de las ROS. El ADOR sin transformar y transformado por los hongos incrementó la actividad GR, sin embargo cabe destacar que el residuo incubado con *C. rigida* fue el único tratamiento que redujo el nivel de

dicha actividad respecto al del residuo. El nivel elevado de GR observado indica la necesidad de eliminar el exceso de H_2O_2 generado tras la exposición a los residuos, salvo en el caso del ADOR transformado por *C. rigida*, donde probablemente la actividad enzimática haya sido suficiente para detoxificar los niveles de peróxido producidos. Podemos pensar que la menor repuesta de defensa inducida por el extracto tratado con *C. rigida* está determinada por la reducción del contenido fenólico por este hongo durante su transformación. Sin embargo, el hecho de que *C. rigida* y *T. versicolor* que producen una reducción del contenido fenólico similar y provocan distintos niveles de activación de la GR, nos hace pensar que la diferencia no solo es atribuible al contenido fenólico, sino que también puede ser debida a la presencia de otras sustancias de naturaleza polisacáridica en la matriz acuosa del ADOR responsables también de su fitotoxicidad. La GST fue otra de las enzimas que en presencia de los extractos de alpeorujos transformados o no durante la germinación de semillas incrementó su actividad, aunque en este caso no se observaron diferencias entre ninguno de los tratamientos. La participación de esta enzima puede indicar la activación de mecanismos de defensa basados en la detoxificación directa de los compuestos fenólicos mediante su conjugación al GSH. Sin embargo, se ha descrito su versatilidad como peroxidasa, por lo que también puede estar implicada en los procesos de eliminación del peróxido de hidrógeno.

La enzima POD no mostró cambios en su actividad tras la germinación de las semillas de tomate en presencia del extracto acuoso de alpeorujos transformados o no por los hongos saprobios. En cambio, si se observó un incremento en la actividad CAPOD en la raíz de semillas germinadas en presencia del ADOR aunque los extractos de alpeorujos transformados redujeron dicha actividad hasta alcanzar valores similares al control. Este aumento de actividad peroxidasa, junto con el incremento en el contenido de fenoles totales, indica que la raíz pone en marcha un proceso de lignificación como mecanismo de defensa frente al estrés provocado por el ADOR. Esta lignificación puede explicar la reducción de la plasticidad de las paredes celulares y por tanto la inhibición del crecimiento y longitud radicular en presencia del extracto acuoso de alpeorujos. Los extractos transformados por los hongos probablemente no están induciendo el mecanismo de lignificación como sistema de defensa debido a que el estrés generado es más moderado que el observado en el ADOR. Por ello el incremento en el contenido de fenoles totales en la raíz, que se observa en los tratamientos con los extractos transformados, no debe de estar relacionado con el proceso de lignificación, sino en con la función detoxificación de las ROS por estos compuestos fenólicos.

La raíz de semillas germinadas en presencia del ADOR mostró una elevada capacidad antioxidante medida mediante el método FRAP y DPPH. La capacidad antioxidante de las semillas en los extractos de alpeorujos incubados con los hongos, medida mediante FRAP, fue menor que en presencia del ADOR aunque el tratamiento del residuo con *P. cinnabarinus* fue el que mostró los niveles más elevados. En cambio, la capacidad antioxidante determinada por el método del DPPH, no mostró diferencias entre los distintos tratamientos, probablemente asociado a la distinta sensibilidad de ambos métodos. Nuestros resultados indican que el estrés oxidativo provocado tras la exposición al ADOR induce una respuesta de defensa mediada por antioxidantes no enzimáticos que es más severo que el observado en el caso de los extractos transformados. Sin embargo, la transformación del residuo por *P. cinnabarinus* indujo un estrés mucho más severo respecto al observado en el resto de los extractos transformados lo que determinó una mayor respuesta de defensa mediada por antioxidantes no enzimáticos.

En conclusión, el estrés generado durante la germinación de semillas de tomate tras la exposición al ADOR es más severo respecto al inducido por los extractos transformados por los hongos. La respuesta generada frente al estrés oxidativo causado por el ADOR está mediada por la participación de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos y por un proceso de lignificación que puede ser considerado como un mecanismo de defensa frente a la exposición de las semillas a los compuestos fenólicos. Los extractos transformados, a su vez, también generan en las semillas una respuesta de defensa, aunque menor que la del ADOR, mediada por el sistema antioxidante enzimático y no enzimático, además de no observar indicios de un proceso de lignificación. Estos resultados indican que la biorremediación del ADOR mediante el uso de hongos saprobios alivia la situación de estrés oxidativo generada tras la exposición al residuo como consecuencia principal de la reducción del contenido fenólico presente en los extractos. Sin embargo, en el caso del extracto transformado por *P. cinnabarinus* se observó un incremento en el sistema de defensa mayor que el producido por el resto de los hongos aunque inferior al observado en el caso del ADOR puesto que los niveles de acumulación de ROS y el daño oxidativo fueron menores que los del residuo sin transformar. El hecho de que la transformación del ADOR con este hongo provoque diferente estrés que el resto de los extractos, a pesar de mostrar similitud en la reducción del contenido fenólico, puede ser debido a que en este extracto haya además de determinados compuestos fenólicos otras sustancias de naturaleza no fenólica como ya han apuntado algunos autores, que contribuyan a su fitotoxicidad.

Hasta la fecha, los escasos estudios de fitotoxicidad realizados con el ADOR han puesto de manifiesto la reducción del peso seco de varias especies vegetales cultivadas durante 30 días en presencia de dicho residuo. Sin embargo, nuestro trabajo ha puesto de manifiesto también, el marcado efecto reductor que produce el extracto acuoso de alpeorujó a la dosis agronómica del 5% y tras 10 días de exposición, sobre el peso seco y crecimiento relativo de las plantas de tomate, atribuible principalmente a su composición fenólica. Además, el poder fitotóxico del ADOR se reafirma mediante el análisis de otros parámetros morfológicos radiculares, ya que se observó la capacidad inhibidora del residuo sobre la longitud, área, volumen y número de puntas radiculares tras 4, 10 y 30 días de exposición. Numerosos estudios afirman que los compuestos fenólicos no solo afectan negativamente al crecimiento de las plantas, sino que son capaces de interferir sobre el funcionamiento de otros procesos fisiológicos como la fotosíntesis, respiración, captación de agua y nutrientes, transpiración, síntesis de ATP o bien el metabolismo de fitohormonas. De hecho, nuestros resultados confirman que en las plantas de tomate expuestas al ADOR durante 4 y 10 días, se produce una disminución de la eficiencia del fotosistema II durante la fotosíntesis, la síntesis de pigmentos como la clorofila a y b y la capacidad de captación de agua. Sin embargo dichos parámetros se restablecen tras el cultivo de las plantas de tomate durante 30 días en presencia del extracto acuoso, probablemente como consecuencia de la adaptación de la planta al estrés provocado por el residuo.

Cabe destacar que en las plantas de tomate expuestas durante 10 días al ADOR transformado por *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 incrementaron su peso y crecimiento respecto del observado con el residuo sin transformar llegando a alcanzar valores similares a los de las plantas controles. Además, la determinación de otros parámetros morfológicos y fisiológicos realizados en raíz también revelaron el efecto positivo de la transformación del ADOR por los hongos, ya que este residuo aumentó en general la longitud, área, volumen, número de puntas radiculares, la eficiencia del PS II y el contenido hídrico y de clorofila b. El distinto comportamiento fisiológico observado entre plantas tratadas con ADOR sin transformar y transformado por *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10, posiblemente sea debido a las diferencias observadas en el contenido fenólico de ambos residuos tal y como ya habíamos observado en semillas. No obstante, entre los extractos transformados también se observan efectos diferentes ya que la longitud y área radicular tras la exposición al extracto transformado por *P. chrysogenum*-10 fue menor que en el caso del tratamiento con el hongo *C. rigida*, lo cual podría ser atribuible a la producción de metabolitos secundarios por parte de *P. chrysogenum*-10

durante la transformación del residuo que posean cierto efecto inhibitorio tal y como se ha descrito por otros autores.

La exposición al ADOR no transformado y transformado por los hongos fue en general capaz de inducir una situación de estrés oxidativo tanto en la raíz como en la hoja de plantas de tomate. Se sabe que en determinadas situaciones de estrés abiótico causadas por metales pesados, PAHs o fenoles se observa un incremento del contenido de MDA. Nuestros resultados sugieren que los fenoles del ADOR son los principales causantes de un estrés oxidativo en las membranas plasmáticas de raíz y hoja alterando su permeabilidad y por tanto afectando al crecimiento de las plantas. El daño provocado en raíz se observó solo en los estadios iniciales de desarrollo del tomate, mientras que en la hoja se produce a lo largo de todo el periodo de exposición. Estas diferencias en los niveles de MDA pueden deberse a la diferente respuesta antioxidante generada en los distintos órganos debido a la acumulación de los fenoles del ADOR en la hoja. Cabe resaltar el efecto biorremediador del ADOR por la transformación de los hongos, que se refleja en la completa reducción del contenido de MDA en hoja tras 30 días de exposición al residuo.

La toxicidad de muchos fenoles puede ser atribuida a la formación de formas radicales de los mismos que actúan donando un electrón al oxígeno molecular dando lugar a la formación de ROS, que son las responsables de la peroxidación de lípidos de membrana y por tanto del incremento de los niveles de MDA de la planta. De hecho tras la aplicación del ADOR a las plantas de tomate, se produjo en la raíz un incremento en la producción de H_2O_2 mientras que la transformación del residuo redujo los valores de peróxido hasta niveles similares a los de las plantas control. La menor producción de H_2O_2 en los tratamientos transformados probablemente es debida al diferente grado de estrés que estos provocan por su distinto contenido fenólico y como consecuencia de la respuesta de defensa que desencadenan que provoca la eliminación del peróxido producido. En cambio en la hoja se observó un aumento de los niveles de peróxido tras 10 días de exposición al ADOR sin transformar y transformado. El distinto grado de estrés generado en ambos órganos probablemente sea debido, tal y como se vio anteriormente, a un diferente patrón de acumulación de fenoles en los órganos. También hay que considerar el hecho de que el daño a las membranas celulares, no solo sea debido al H_2O_2 sino que pueda atribuirse a la actuación directa de otras ROS tales como el $O_2^{\cdot-}$ y/o $\cdot OH$ generadas tras la exposición a los compuestos fenólicos del ADOR.

Como consecuencia de la situación de estrés oxidativo generado en raíz y hoja tras la exposición al ADOR transformado o no, las plantas de tomate desencadenan una respuesta de defensa mediada por el sistema antioxidante enzimático y no enzimático. Así, tras la exposición del extracto acuoso de alpeorujó en plantas durante los primeros estadios de desarrollo, se observó en raíz un incremento de las actividades SOD, CAT, APX, GR y GST. Estas enzimas, principalmente la SOD, CAT y APX, contribuyen a reducir y controlar los niveles de ROS generadas durante los primeros estadios de contacto de la raíz con los fenoles del ADOR, con objeto de reducir el daño oxidativo tal y como se ha sugerido por otros autores en estreses por fenoles. Por otro lado, el incremento en la actividad GR indicó la posible participación del GSH en la respuesta de defensa que genera la raíz eliminando las ROS. Así los compuestos fenólicos presentes en el ADOR pueden estar provocando la participación del GSH, uno de los antioxidantes no enzimáticos más importantes presentes en las plantas, en los procesos de detoxificación de las ROS. Sin embargo a pesar de observarse un incremento de las enzimas APX y GR no hay indicios de que el ciclo del ASC-GSH tenga un papel clave en la respuesta de la raíz frente al ADOR, ya que no se observan cambios en las actividades MDHAR y DHAR integrantes de dicho ciclo e implicadas también en la regeneración del ASC. Además, el estado redox del GSH y del ASC pone de manifiesto el predominio de la forma oxidada sobre la reducida, lo que indica el desacoplamiento del dicho ciclo. Por otro lado, el incremento de la actividad GST así como la reducción del contenido de GSH total tras la exposición al ADOR indican un posible mecanismo de detoxificación de los compuestos fenólicos presentes en la matriz acuosa del ADOR mediante su conjugación al GSH con objeto de reducir los daños oxidativos de estos sobre las membranas y/o sus biomoléculas. Sin embargo se ha observado que hay otros antioxidantes totales no enzimáticos, aparte del GSH, que participan en la respuesta de defensa de la planta frente al ADOR. De hecho observamos un incremento del contenido de fenoles totales en presencia del residuo lo que indica que probablemente estos compuestos están implicados en procesos de la detoxificación directa de las ROS, y no en procesos de lignificación, ya que en general no se observan cambios en el contenido total de lignina ni en la actividad peroxidasa implicada el proceso de lignificación.

Los extractos de ADOR transformados por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10, desencadenan también una respuesta mediada por sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos frente al estrés oxidativo provocado tras la exposición al residuo en la raíz de plantas de tomate. Sin embargo, cabe resaltar que la presencia de del extracto acuoso de alpeorujó transformado en las plantas,

concretamente en los estadios iniciales de exposición del residuo, redujo los niveles de las actividades SOD, APX y del contenido de antioxidantes totales, respecto del tratamiento con ADOR. Estos resultados indican que el residuo transformado desencadena una situación de estrés moderado en la raíz y como consecuencia, la respuesta de defensa generada es más eficaz y efectiva permitiendo la rápida adaptación de la raíz a la presencia de los compuestos fitotóxicos del ADOR. Este hecho se apoya con el incremento significativo observado en la biomasa y crecimiento radicular en presencia del extracto transformado respecto al del ADOR, que incluso y en el caso de exposiciones de 30 días, llega a alcanzar valores similares a los de las plantas control.

La hoja incrementó los niveles de las actividades SOD, CAT, APX y GR tras la exposición al ADOR aunque a diferencia de lo observado en raíz, en esta el aumento de estas enzimas fue a más largo plazo. Este resultado puede indicar los fenoles del residuo son trasladados desde la raíz hacia la parte aérea de la planta para acumularse y causar el efecto tóxico, por lo que la situación de estrés oxidativo se induce más tarde en la hoja que en la raíz. El aumento de actividad SOD en hoja de tomate puede ser un mecanismo de defensa de la planta para evitar el daño oxidativo que ocasionaría un incremento en la producción de radicales superóxido ($O_2^{\cdot -}$) como consecuencia de la exposición al ADOR. La determinación isoenzimática de las SODs puso de manifiesto la presencia de 3 isoenzimas en la hoja de tomate: SOD-3, SOD-2 y SOD-1 correspondientes a la Fe-SOD (SOD-2) y las Cu/Zn-SODs (SOD-3 y SOD-1). Cabe resaltar que la exposición de las plantas de tomate al ADOR transformado o no provocó en hoja el aumento de la isoforma cloroplastídica SOD-2 respecto de los controles. así como el incremento de la SOD-1 respecto de los controles. Este hecho indica que en hoja se produce una mayor actividad de las SODs cloroplásticas frente a las citoplasmáticas, lo que sugiere que los compuestos fenólicos del ADOR transportados hasta la hoja estén actuando a nivel de las cadenas de transporte electrónico de los fotosistemas provocando el incremento en la producción de ROS, e incluso provocando su disrupción y bloqueando los procesos de fotosíntesis. Las actividades enzimáticas APX y CAT se incrementan en respuesta a los compuestos fenólicos del ADOR eliminando el exceso de peróxido del medio celular y por tanto reduciendo de esta forma los posibles daños oxidativos que pudiese ocasionar dicha ROS. Además, el hecho de observar niveles elevados en las actividades APX y GR en la hoja junto con el incremento en el contenido en ASC y GSH nos indica la posible participación del ciclo del ASC-GSH también en los procesos de detoxificación del H_2O_2 tras la exposición de las plantas de tomate al extracto acuoso de alpeorujó. El balance

redox del ASC y del GSH indicó de manera general la predominancia de la forma reducida sobre la oxidada, resaltando de esta forma el perfecto funcionamiento del ciclo del ASC-GSH a pesar de no observarse un incremento de las actividades MDHAR y DHAR, lo que hace pensar que los niveles de dichas actividades son suficientes como para controlar el estado redox de estos antioxidantes. La exposición al ADOR provocó en la hoja el incremento en los niveles de antioxidantes totales como respuesta de defensa a los compuestos fenólicos de dicho residuo. La cuantificación del contenido en lignina y fenoles totales junto con la determinación enzimática de las peroxidasas ponen de manifiesto que tras la exposición al extracto acuoso de alpeorajo en la hoja de las plantas de tomate se desencadena una respuesta de lignificación como mecanismo implicado en el sistema de defensa frente al ADOR. Este proceso de lignificación explica la reducción del peso y del crecimiento observado en hoja tras el cultivo de las plantas de tomate en presencia del residuo.

De la misma forma que se observó en raíz, los extractos transformados inducen una respuesta de defensa en la hoja tras la exposición de la planta al residuo. Sin embargo, esta respuesta sucede de forma menos acusada que en el caso del extracto sin transformar ya que se observa como las enzimas SOD y CAT reducen su actividad en presencia del residuo transformado. Además, el proceso de lignificación o no se produce como en el caso del extracto transformado por *P. chrysogenum*-10, o lo hace de forma muy leve, por lo que no se ve tan afectada la plasticidad de las paredes celulares de la hoja y por tanto la reducción del peso y del crecimiento de la misma es menor que en los tratamientos con el ADOR.

En definitiva, el efecto biorremediador de los hongos sobre la concentración fenólica del ADOR reduce o anula la inhibición que provoca el residuo sobre parámetros como el peso seco, crecimiento, contenido hídrico o la eficiencia fotosintética. Sin embargo, la transformación del ADOR por los hongos provoca un estrés oxidativo moderado con la consecuente participación del sistema antioxidante al igual que sucedía en el caso del residuo no transformado. La sensibilidad y rápida respuesta del sistema enzimático y no enzimático frente a esta situación de estrés moderado generado tras la exposición al extracto transformado contribuye a la pronta adaptación de las plantas al estrés, permitiendo el desarrollo y crecimiento de las mismas. Sin embargo, en las plantas cultivadas en presencia de ADOR, a pesar de desencadenar el mismo sistema de defensa, la situación de estrés es tan grave que las plantas deben de optimizar el poder reductor y la energía obtenida,

reduciendo así su crecimiento y desarrollo para finalmente poder adaptarse a la situación de estrés.

Las micorrizas arbusculares están consideradas como unas de las asociaciones simbióticas mutualistas más importantes debido a los numerosos beneficios que aportan a las plantas, entre los que cabe destacar el efecto bioprotector que confieren bajo situaciones de estreses bióticos y/o abióticos. Se sabe que el efecto aliviador que ejercen las micorrizas sobre plantas sujetas a condiciones adversas está relacionado en gran parte con una mejora del estado nutricional, favoreciendo su adaptación a la situación de estrés. El cultivo de plantas de tomate en presencia del hongo micorrícico *G. mosseae* incrementó el peso y el crecimiento relativo siendo más evidente en la parte aérea. La exposición al extracto acuoso de alpeorujos a la dosis del 5% redujo el peso y crecimiento de la planta como ya pudimos comprobar en estudios anteriores, sin embargo, la incorporación de *G. mosseae* al cultivo de plantas de tomate en presencia de ADOR incrementó la biomasa y el desarrollo de las plantas de tomate en presencia del extracto acuoso poniendo de manifiesto el efecto bioprotector que confiere la micorriza. Además, la aplicación de los hongos arbusculares y los extractos de alpeorujos transformados por los hongos saprobios también favoreció el incremento de la parte aérea respecto de las plantas no micorrizadas. Este resultado indica la posibilidad de que la micorriza esté dando protección a la planta frente al extracto acuoso de alpeorujos potenciando la absorción y captación de nutrientes procedentes del suelo y/o del extracto acuoso hacia la planta favoreciendo de esta forma el crecimiento y desarrollo de la misma. Podemos afirmar que la presencia del hongo micorrícico *G. mosseae* redujo la susceptibilidad de las plantas de tomate a la fitotoxicidad del ADOR y por tanto la dosis del 5% no resultó tóxica para el crecimiento de las plantas micorrizadas.

El análisis de otros parámetros fisiológicos mostró que el contenido de agua y/o la eficiencia del fotosistema II no sufrieron el efecto inhibitorio de los compuestos fenólicos presentes en el extracto acuoso de alpeorujos transformado o no por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 tanto en plantas sin micorrizar como inoculadas con *G. mosseae*. Sin embargo se ha descrito ampliamente en la bibliografía la capacidad de la micorriza de captar agua además de incrementar la síntesis de clorofila y por tanto de llevar a cabo un óptimo funcionamiento de la fotosíntesis. Esta aparente contradicción puede deberse a que tal y como ya observamos en el capítulo III, estos parámetros poseen una mayor susceptibilidad al efecto tóxico del ADOR a tiempos cortos de exposición mientras que la presencia de este durante periodos más prolongados produce una recuperación de los mismos que

probablemente esté relacionada con una adaptación de la planta a la presencia del residuo. Sin embargo, no cabe descartar la posibilidad de que la presencia de la micorriza haya influido de alguna forma a la mejora en la captación de agua y/o a la eficiencia del fotosistema II en períodos donde la sensibilidad de las plantas de tomate a la presencia del ADOR fue mayor.

El establecimiento de la simbiosis micorrícica en muchos casos puede ser susceptible a la presencia de compuestos tóxicos presentes en el suelo tal y como han mostrado diversos estudios. Nuestros resultados revelaron que el porcentaje de micorrización se redujo en presencia del ADOR respecto de las plantas control. Sin embargo, se ha descrito que la funcionalidad de la simbiosis no se afecta en presencia del alpeorujo, por lo que probablemente los compuestos fenólicos del mismo estén inhibiendo la germinación de esporas de los hongos arbusculares o bien afectando al establecimiento de la simbiosis. La incubación del extracto acuoso de alpeorujo con los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10, no evitó la reducción del porcentaje de colonización de la raíz de tomate por *G. mosseae*. Existe la posibilidad de que además de los fenoles existan otros compuestos presentes en el ADOR de naturaleza polisacáridica que inhiban la micorrización, ya que los extractos transformados por los hongos con menor contenido fenólico redujeron la micorrización de forma similar al residuo.

La aplicación del ADOR al cultivo de plantas de tomate indujo un estrés oxidativo debido al incremento de los niveles de MDA como consecuencia de la peroxidación de lípidos por acción de las ROS, efecto que se alivió en la raíz de plantas de tomate micorrizadas cultivadas en presencia del residuo. Así mismo, la reducción del contenido fenólico de los extractos a través de la biorremediación por los hongos saprobios alivió la situación de estrés provocada por el residuo sin transformar tanto en raíz micorrizada como no micorrizada, aunque fue más evidente esta mejora en plantas inoculadas con *G. mosseae*. La exposición a compuestos de naturaleza fenólica incrementa la producción de ROS, de hecho nuestros resultados mostraron que tras la exposición de la planta al ADOR transformado o no por *C. rigida*, solo se aumentó en raíz no micorrizada la producción de H_2O_2 evidenciándose de nuevo el papel bioprotector que confiere la presencia de los hongos arbusculares en la planta. Sin embargo, la hoja mostró un incremento similar de peróxido tras la exposición de las plantas sin micorrizar y micorrizadas al ADOR transformado o no por los hongos saprobios. El H_2O_2 generado en este órgano tras la exposición probablemente es detoxificado o

eliminado del medio por el sistema antioxidante de forma eficiente y con ello se reduce el daño celular.

La respuesta de defensa generada por las plantas de tomate tras la exposición al ADOR transformado o no está mediada por el sistema antioxidante enzimático y no enzimático, a fin de controlar los niveles de ROS y así evitar daños celulares. De las actividades enzimáticas antioxidantes ensayadas se observó que las plantas micorrizadas mostraron niveles elevados de CAT, POD y GST respecto de las no micorrizadas. Algunos autores han señalado que la micorriza es capaz de incrementar la actividad de enzimas antioxidantes durante los estadios tempranos de la micorrización, sin embargo, se desconoce cuál es el papel de dichas enzimas tras el establecimiento de la simbiosis, probablemente dicho incremento pueda ser atribuido como consecuencia de cambios fisiológicos que se induzcan en la planta en presencia de la micorriza. La aplicación del ADOR provocó el incremento de la actividad SOD en la raíz de plantas inoculadas con el hongo *G. mosseae* mientras que las enzimas CAT y GST aumentaron los niveles de actividad tanto en las plantas sin micorrizar como en las micorrizadas aunque fueron en estas últimas donde se produjeron los mayores incrementos. Las micorrizas son capaces de incrementar la actividad de dichas enzimas aumentando de esta forma la resistencia de las plantas frente al estrés oxidativo causado tras la exposición al ADOR tal y como se ha puesto de manifiesto en plantas bajo estreses con metales pesados. El mayor incremento de la actividad GST detectado en plantas micorrizadas está favoreciendo que los compuestos fenólicos estén siendo detoxificados por esta enzima y acumulados en vacuolas reduciendo el daño oxidativo de la planta. En hoja de plantas no micorrizadas y micorrizadas se incrementaron de forma similar las actividades SOD y GST tras la exposición al ADOR lo que explicaría en cierta medida que no existieran diferencias en el contenido de H₂O₂ acumulado en ambos tipos de planta. Sin embargo la hoja de plantas micorrizadas mostró niveles inferiores de actividad de SOD respecto de las sin inocular, lo que puede indicar que el establecimiento de la simbiosis esté provocando la inmovilización de los fenoles en el micelio extrarradical o bien este evitando el acceso a la propia raíz con cambios en la forma del micelio permitiendo su inmovilización tal y como se ha descrito para otros contaminantes. El elevado contenido en peróxido observado en hoja, tanto de plantas sin inocular como micorrizadas, puede atribuirse al hecho de no producirse un incremento en las actividades de las enzimas CAT y APX, responsables de su detoxificación. Sin embargo, se observa un aumento en los niveles de actividad de la GST, enzima que posee una versatilidad enzimática, ya que no solo puede intervenir en procesos de detoxificación de los compuestos fenólicos,

sino que también actuar como una peroxidasa eliminando el exceso de H_2O_2 producido.

La exposición de las plantas de tomate micorrizadas al extracto acuoso de alpeorujos transformado por los hongos saprobios reduce el incremento de actividad SOD y GST observado en la raíz y de la GST en hoja tras la exposición al ADOR. Como ya hemos puesto de manifiesto, a pesar de la reducción del contenido fenólico del ADOR por los hongos saprobios dicho extracto también provoca un estrés oxidativo aunque más moderado que el del residuo sin transformar, lo que pone de manifiesto la susceptibilidad de las plantas a bajas concentraciones de fenoles o bien a sustancias de naturaleza no fenólica. De hecho, la respuesta de defensa de la planta al estrés causado por los residuos transformados mediada por el sistema antioxidante enzimático fue menor que la que se produce tras la exposición al ADOR. Sin embargo, el establecimiento de la simbiosis arbuscular hace aumentar en las plantas algunas de las actividades enzimáticas antioxidantes en respuesta al estrés que provocan los extractos de alpeorujos transformados respecto de las plantas no micorrizadas. De hecho se ha observado que la micorriza favoreció un mayor desarrollo de las plantas de tomate respecto de las no micorrizadas probablemente debido al incremento en la captación de los nutrientes asimilables por la planta presentes tanto en el suelo como en el ADOR.

Conclusiones

1. La incubación del extracto acuoso de alpeorujó con los hongos ligninolíticos *C. rigida*, *T. versicolor*, *P. cinnabarinus* y el hongo filamentoso *P. chrysogenum*-10 reducen el contenido fenólico de dicho residuo. Siendo los hongos ligninolíticos los que muestran un mayor poder de conversión de los fenoles del ADOR frente al hongo filamentoso del suelo.
2. La lacasa es la principal enzima responsable del proceso de biotransformación del ADOR por los hongos ligninolíticos mientras que en el caso de *P. chrysogenum*-10, la reducción del contenido fenólico esté mediado por la acción de las enzimas hidrolíticas ya que no se observó producción de lacasa.
3. La germinación de las semillas de tomate disminuye en presencia del extracto acuoso de alpeorujó a la dosis agronómica del 5%, mientras que la biotransformación del residuo por los hongos saprobios aumenta considerablemente dicha germinación.
4. La reducción de la fitotoxicidad del extracto acuoso de alpeorujó transformado por los hongos saprobios sobre el crecimiento radicular de las semillas de tomate en presencia de los extractos transformados por los hongos no presenta una relación directa con el descenso del contenido fenólico lo que indica la presencia de otro tipo de sustancias en el alpeorujó, probablemente de naturaleza polisacáridica, con poder fitotóxico.
5. El extracto acuosos de alpeorujó induce un estrés oxidativo en las semillas de tomate según los niveles de MDA y ROS observados. La respuesta de defensa de las semillas ante el residuo parece estar mediada por el sistema antioxidante enzimático y no enzimático, así como por un proceso de lignificación.
6. La biorremediación del extracto acuosos de alpeorujó por los hongos saprobios alivia la situación de estrés generada durante la germinación de semillas observándose, en general una relación directa entre el contenido fenólico y el nivel de respuesta del sistema antioxidante enzimático y no enzimático aunque no se excluye la posible participación de otras sustancias en la inducción de dicho estrés.
7. El cultivo de las plantas de tomate en presencia del extracto acuoso de alpeorujó a la dosis agronómica reduce, en general, la biomasa, el crecimiento y afecta negativamente a la eficiencia del fotosistema II, nivel de clorofila a y b, así como el contenido hídrico relativo de las plantas de tomate en los estadios iniciales de contacto de la planta con el residuo, mientras los extractos transformados

incrementan los niveles de los parámetros de crecimiento y fisiológicos afectados tras la exposición al ADOR.

8. La exposición al extracto acuoso de alpeorujó induce, en plantas de tomate, un estrés oxidativo mediado por el incremento en los niveles de MDA y H_2O_2 y como consecuencia, se incrementan en general los niveles de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en las plantas. En raíz, cabe resaltar el mecanismo aliviador del estrés mediado por la enzima GST, mientras que en hoja, el ciclo ASC-GSH y los procesos de lignificación parecen tener un papel primordial en respuesta al estrés generado.

10. La aplicación de los extractos acuosos de alpeorujó biotransformados por los hongos *C. rigida* y *P. chrysogenum*-10 reducen la situación de estrés oxidativo provocado por el residuo generando una respuesta antioxidante más rápida y eficaz y permitiendo una pronta adaptación de la planta de tomate al estrés provocando así el incremento del peso y crecimiento de la misma.

11. El estrés oxidativo que provoca la aplicación del extracto acuoso de alpeorujó a las plantas de tomate se alivia en presencia del hongo micorrícico *G. mosseae*. La micorriza confiere bioprotección a la planta mediante el incremento de los niveles de antioxidantes enzimáticos en respuesta a la situación de estrés generada por dicho residuo.

Bibliografía

- Abdulghader K, Nojavan M, Naghshbandi N** (2008) Chemical stress induced by heliotrope (*Heliotropium europaeum* L.) allelochemicals and increased activity of antioxidant enzymes. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **11**: 915-919.
- Abenavoli MR, Cacco G, Sorgona A, Marabottini R, Paolacci AR, Ciaffi M, Badiani M** (2006) The inhibitory effects of coumarin on the germination of durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. durum, CV. Simeto) seeds. *Journal of Chemical Ecology* **32**: 489-506.
- Abenavoli MR, De Santis C, Sidari M, Sorgonà A, Badiani M, Cacco G** (2001) Influence of coumarin on the net nitrate uptake in durum wheat. *New Phytologist* **150**: 619-627.
- Agarwal S** (2007) Increased antioxidant activity in *Cassia* seedlings under UV-B radiation. *Biologia Plantarum* **51**: 157-160.
- Albuquerque JA, Gonzalez J, García D, Cegarra J** (2004) Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology* **91**: 195-200.
- Alfenito MR, Souer E, Goodman CD, Buell R, Mol J, Koes R, Walbot V** (1998) Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *Plant Cell* **10**: 1135-1149.
- Almagro L, Gómez Ros LV, Belchi-Navarro S, Bru R, Ros Barceló A, Pedreño MA** (2009) Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany* **60**: 377-390.
- Andrade SAL, Gratão PL, Schiavinato MA, Silveira APD, Azevedo RA, Mazzafera P** (2009) Zn uptake, physiological response and stress attenuation in mycorrhizal jack bean growing in soil with increasing Zn concentrations. *Chemosphere* **75**: 1363-1370.
- Anselmo AM, Novais JM** (1992) Biological treatment of phenolic wastes: comparison between free and immobilized cell systems. *Biotechnology Letters* **14**: 239-244.
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review Plant Biology* **55**: 373-399.
- Aranda E** (2006) Fraccionamiento físico del alpeorujo como base para desarrollar una estrategia biológica con hongos saprobios y arbusculares para la eliminación de su fitotoxicidad. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, España.
- Aranda E, García-Romera I, Ocampo JA, Carbone V, Malorni A, Sannino F, De Martino A, Capasso R** (2007a) Reusing ethyl acetate and aqueous exhausted fractions of dry olive mill residue by saprobe fungi. *Chemosphere* **66**: 67-74.

- Aranda E, García-Romera I, Ocampo JA, Carbone V, Mari A, Malorni A, Sannino F, De Martino A, Capasso R** (2007b) Chemical characterization and effects on *Lepidium sativum* of the native and bioremediated components of dry olive mill residue. *Chemosphere* **69**: 229-239.
- Aranda E, Sampedro I, Díaz R, García-Sánchez M, Arriagada CA, Ocampo JA, García-Romera I** (2009) The effects of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus deserticola* on growth of tomato plants grown in the presence of olive mill residues modified by treatment with saprophytic fungi. *Symbiosis* **47**: 133-140.
- Aranda E, Sampedro I, Ocampo JA, García-Romera I** (2006) Phenolic removal of olive-mill dry residues by laccase activity of white-rot fungi and its impact on tomato plant growth. *International Biodeterioration and Biodegradation* **58**: 176-179.
- Aranda E, Sampedro I, Ocampo JA, García-Romera I** (2004) Contribution of hydrolytic enzymes produced by saprophytic fungi to the decrease in plant toxicity caused by water-soluble substances in olive mill dry residue. *Applied Microbiology and Biotechnology* **64**: 132-135.
- Araus JL** (2004) The problems of sustainable water use in the Mediterranean and research requirements for agriculture. *Annals of Applied Biology* **144**: 259-272.
- Aresta M, Dibenedetto A, Narracci M, Tommasi I** (2003) A technology for the treatment of olive-mill wastewater in a continuously fed plant: An insight into the degradation mechanism of methoxypolyphenols. *Environmental Chemistry Letter* **1**: 13-18.
- Aroca R, Bago A, Sutka M, Paz JA, Cano C, Amodeo G, Ruíz-Lozano JM** (2009) Expression analysis of the first arbuscular mycorrhizal fungi aquaporin described reveals concerted gene expression between salt-stressed and nonstressed mycelium. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 1169-1178.
- Arriagada C, Aranda E, Sampedro I, García-Romera I, Ocampo JA** (2009a) Interactions of *Trametes versicolor*, *Coriolopsis rigida* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus deserticola* on the copper tolerance of *Eucalyptus globulus*. *Chemosphere* **77**: 273-278.
- Arriagada C, Pereira G, García-Romera I, Ocampo JA** (2010) Improved zinc tolerance in *Eucalyptus globulus* inoculated with *Glomus deserticola* and *Trametes versicolor* or *Coriolopsis rigida*. *Soil Biology and Biochemistry* **42**: 118-124.
- Arriagada C, Sampedro I, García-Romera I, Ocampo J** (2009b) Improvement of growth of *Eucalyptus globulus* and soil biological parameters by amendment with sewage sludge and inoculation with arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi. *Science of the Total Environment* **407**: 4799-4806.

- Arriagada CA, Herrera MA, Borie F, Ocampo JA** (2007a) Contribution of arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi to the aluminum resistance of *Eucalyptus globulus*. *Water, Air, and Soil Pollution* **182**: 383-394.
- Arriagada CA, Herrera MA, García-Romera I, Ocampo JA** (2004) Tolerance to Cd of soybean (*Glycine max*) and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) inoculated with arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi. *Symbiosis* **36**: 285-299.
- Arriagada CA, Herrera MA, Ocampo JA** (2005) Contribution of arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi to the tolerance of *Eucalyptus globulus* to Pb. *Water, Air, and Soil Pollution* **166**: 31-47.
- Arriagada CA, Herrera MA, Ocampo JA** (2007b) Beneficial effect of saprobe and arbuscular mycorrhizal fungi on growth of *Eucalyptus globulus* co-cultured with *Glycine max* in soil contaminated with heavy metals. *Journal of Environmental Management* **84**: 93-99.
- Augé RM** (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* **11**: 3-42.
- Avery SV** (2001) Metal toxicity in yeasts and the role of oxidative stress. *Advances in Applied Microbiology* **49**: 111-142.
- Awad HM, Boersma MG, Vervoot J, Rietjens IM** (2000) Peroxidases-catalyzed formation of quercetin quinine methide-glutathione adducts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **378**: 224-233.
- Bacon MA** (1999) The biochemical control of leaf expansion during drought. *Plant Growth Regulation* **29**: 101-112.
- Bai R, Ma F, Liang D, Zhao X** (2009) Phthalic acid induces oxidative stress and alters the activity of some antioxidant enzymes in roots of *Malus prunifolia*. *Journal of Chemical Ecology* **35**: 488-494.
- Bais HP, Vepachedu R, Gilroy S, Callaway RM, Vivanco JM** (2003) Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. *Science* **301**: 1377-1380.
- Balis C, Chatzipavlidis J, Flouri F** (1996) Olive mill waste as a substrate for nitrogen fixation. *International Biodeterioration and Biodegradation* **38**: 169-178.
- Barrios E** (2007) Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecological Economics* **64**: 269-285.
- Barrs HD, Weatherely PE** (1962) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating waters deficits in leaves. *Australian Journal of Biology and Science* **15**: 413-428.
- Batish DR, Singh HP, Kaur S, Kohli RK, Yadav SS** (2008) Caffeic acid affects early growth, and morphogenetic response of hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus*). *Journal of Plant Physiology* **165**: 297-305.

- Batish DR, Singh HP, Setia N, Kaur S, Kohli RK** (2006) 2-Benzoxazolinone (BOA) induced oxidative stress, lipid peroxidation and changes in some antioxidant enzyme activities in mung bean (*Phaseolus aureus*). *Plant Physiology and Biochemistry* **44**: 819-827.
- Baziramakenga R, Leroux GD, Simard RR** (1995) Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots. *Journal of Chemical Ecology* **21**: 1271-1285.
- Beaumont F, Jouve HM, Gagnon J, Gaillard J, Pelmont J** (1990) Purification and properties of a catalase from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Plant Science* **72**: 19-26.
- Bellaloui N, Brown PH** (1998) Cultivar differences in boron uptake and distribution in celery (*Apium graveolens*), tomato (*Lycopersicon esculentum*) and wheat (*Triticum aestivum*). *Plant and Soil* **198**: 153-158.
- Benítez E, Sainz H, Melgar R, Nogales R** (2002) Vermicomposting of a lignocellulosic waste from olive oil industry: A pilot scale study. *Waste Management and Research* **20**: 134-142.
- Berk MM** (1980) *Corioloopsis rigida*. *North American Flora* (New York) **9** (II) 75.
- Beuchamp C, Fridovich I** (1971) Superoxide dismutase. Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**: 276-287.
- Bezalel L, Hadar Y, Cerniglia CE** (1996a) Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 292-295.
- Bezalel L, Hadar Y, Fu PP, Freeman JP, Cerniglia CE** (1996b) Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 2554-2559.
- Blilou I, Ocampo JA, García-Garrido JM** (2000) Induction of LTP (lipid transfer protein) and Pal (phenylalanine ammonia-lyase) gene expression in rice roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Journal of Experimental Botany* **51**: 1969-1977.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV** (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Annals of Botany* **91**: 179-194.
- Blum U, Gerig TM** (2005) Relationships between phenolic acid concentrations, transpiration, water utilization, leaf area expansion, and uptake of phenolic acids: Nutrient culture studies. *Journal of Chemical Ecology* **31**: 1907-1932.
- Blum U, Shafer SR, Lehman ME** (1999) Evidence for inhibitory allelopathic interactions involving phenolic acids in field soils: Concepts vs. an experimental model. *Critical Reviews in Plant Sciences* **18**: 673-693.

- Bogatek R, Oracz K, Bailly C, Gawronska H, Come D, Corbineau F, Gawronski SW** (2002) Induction of oxidative stress by sunflower allelopathics during germination of mustard (*Sinapis alba* L.) seeds. Abstracts of Third Congress on Allelopathy 26-30 August, 2002. (Fuji Y, Hiradate S, Araya H, Tsukuba (eds)). Japan. pp. 158.
- Bolwell GP** (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 287-294.
- Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C, Minibayeva F** (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: A three-component system. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1367-1376.
- Bradford MM** (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Bradley DJ, Kjellbom P, Lamb CJ** (1992) Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. *Cell* **70**: 21-30.
- Bressano M, Curetti M, Giachero L, Gil SV, Cabello M, March G, Ducasse DA, Luna CM** (2010) Mycorrhizal fungi symbiosis as a strategy against oxidative stress in soybean plants. *Journal of Plant Physiology* **167**: 1622-1626.
- Bruce RJ, West CA** (1989) Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectin fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiology* **91**: 889-897.
- Bruhlmann F, Kwi Suk K, Zimmerman W, Fiechter A** (1994) Pectinolytic enzymes from actinomycetes for the degumming of ramie bast fibers. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 2107-2112.
- Bucheli P, Doares SH, Albersheim P, Darvill A** (1990) Host-pathogen interactions. XXXVI. Partial purification and characterization of heat-labile molecules secreted by rice blast pathogen that solubilize plant cell wall fragments that kill plant cells. *Plant Pathology* **36**: 159-173.
- Buege JA, Aust SD** (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymology* **52**: 302-310.
- Bumpus JA, Tien M, Wright D, Aust SD** (1985) Oxidation of persistent environmental pollutants by white rot-fungus. *Science* **228**: 1434-1436.
- Cabrera F, López R, Martínez-Bordiú A** (1996) Land treatment of olive oil wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation* **38**: 215-225.
- Cabrera F, Martín-Olmedo P, López R, Murillo JM** (2005) Nitrogen mineralization in soils amended with composted olive mill sludge. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **71**: 249-258.
- Capasso R, Cristinzio G, Evidente A, Scognamiglio F** (1992) Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste waters. *Phytochemistry* **31**: 4125-4128.

- Capasso R, Evidente A, Schivo L, Orru G, Marcialis MA, Cristinzio G** (1995) Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste-waters. *Journal of Applied Bacteriology* **79**: 393-398.
- Carnicero A, Trojanowski J, Falcon MA, de la Fuente G, Kharazipour A, Huettermann A** (1992) Lignin degrading capacities of several Fungi - Imperfecti isolated from soils tested by the radiorespirometric method. *Microbios* **72**: 17-25.
- Casa R, D'Annibale A, Pieruccetti F, Stazi SR, Sermanni GG, Lo Cascio B** (2003) Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere* **50**: 959-966.
- Cegarra J, Paredes C, Roig A, Bernal MP, García D** (1996) Use of olive mill waste-water compost for crop production. *International Biodeterioration and Biodegradation* **38**: 193-203.
- Cervilla LM, Blasco B, Ríos JJ, Romero L, Ruiz JM** (2007) Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants subjected to boron toxicity. *Annals of Botany* **100**: 747-756.
- Cervilla LM, Rosales MA, Rubio-Wilhelmi MM, Sánchez-Rodríguez E, Blasco B, Ríos JJ, Romero L, Ruiz JM** (2009) Involvement of lignification and membrane permeability in the tomato root response to boron toxicity. *Plant Science* **176**: 545-552.
- Colarieti ML, Toscano G, Greco Jr G** (2006) Toxicity attenuation of olive mill wastewater in soil slurries. *Environmental Chemistry Letters* **4**: 115-118.
- Cole DJ** (1994) Detoxification and activation of agrochemicals in plants. *Pesticide Science* **42**: 209-222.
- Collins PJ, Dobson ADW** (1997) Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3444-3450.
- Collins PJ, Kotterman MJJ, Field JA, Dobson ADW** (1996) Oxidation of anthracene and benzo(a)pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 4563-4567.
- Conway GR, Pretty JN** (1991) Unwelcome Harvest: Agriculture and Pollution. London: Earthscan Publications Ltd. 672.
- Corpas FJ, Fernández-Ocaña A, Carreras A, Valderrama R, Luque F, Esteban FJ, Rodríguez-Serrano M, Chaki M, Pedrajas JR, Sandalio LM, Del Río LA, Barroso JB** (2006) The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant and Cell Physiology* **47**: 984-994.
- Costa F, García C, Hernández MT, Polo A** (1991) Residuos orgánicos urbanos, manejo y utilización. CEBAS-CSIC. Murcia. España. pp. 181.
- Cruz-Ortega R, Álvarez-Añorve M, Romero-Romero MT, Lara-Nuñez A, Anaya AL** (2008) Growth and oxidative damage effects of *Sicyos deppei* weed on tomato. *Allelopathy Journal* **21**: 83-94.

- Cruz-Ortega R, Ayala-Cordero G, Anaya AL** (2002) Allelochemical stress produced by the aqueous leachate of *Callicarpa acuminata*: Effects on roots of bean, maize, and tomato. *Physiologia Plantarum* **116**: 20-27.
- Cruz-Ortega R, Lara-Núñez A, Anaya AL** (2007) Allelochemical stress can trigger oxidative damage in receptor plants mode of action of phytotoxicity. *Plant Signaling and Behavior* **2**: 269-270.
- Cummins ICD, Edwards R** (1999) A role for glutathione transferase functioning as glutathione peroxidase in resistance to multiple herbicides in black-grass. *The Plant Journal* **18**: 285-292.
- Czarnota MA, Paul RN, Dayan FE, Nimbal CI, Weston LA** (2001) Mode of action, localization of production, chemical nature, and activity of sorgoleone: a potent PSII inhibitor in sorghum spp. root exudates. *Weed Technology* **15**: 813-825.
- Chaudhry TM, Hill L, Khan AG, Knek C** (1999) Colonization of iron and zinc contaminated dumped waste by microbes, plants and associated mycorrhizae Remediation and management of degraded land. (Wong HM, Wong JMC, Baker AJM (eds)). CRC Press LLC, Boca Raton FL. **27**: 275-283.
- Choudhary OP, Ghuman BS, Josan AS, Bajwa MS** (2006) Effect of alternating irrigation with sodic and non-sodic waters on soil properties and sunflower yield. *Agricultural Water Management* **85**: 151-156.
- D'Annibale A, Crestini C, Vinciguerra V, Giovannozzi Sermanni G** (1998) The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus. *Journal of Biotechnology* **61**: 209-218.
- D'Annibale A, Ricci M, Quarantino D, Federici F, Fenice M** (2004) *Panus tigrinus* efficiently removes phenols, color and organic load from olive-mill wastewater. *Research in Microbiology* **155**: 596-603.
- Daei G, Ardekani MR, Rejali F, Teimuri S, Miransari M** (2009) Alleviation of salinity stress on wheat yield, yield components, and nutrient uptake using arbuscular mycorrhizal fungi under field conditions. *Journal of Plant Physiology* **166**: 617-625.
- Das MKL, Prasad JS, Ahmad SK** (1997) Endoglucanase production by paper-degrading mycoflora. *Letters in Applied Microbiology* **25**: 313-315.
- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**: 779-795.
- Davies BJ** (1964) Disc electrophoresis II. Methods and application to human serum proteins. *Annals of New York Academy of Sciences* **121**: 407-427.
- Dayan FE, Watson SB, Galindo JCG, Hernández A, Dou J, McChesney JD, Duke SO** (1999) Phytotoxicity of quassinoids: Physiological responses and structural requirements. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **65**: 15-24.

- De Gara L, De Pinto MC, Moliterni VMC, D'Egidio MG** (2003) Redox regulation and storage processes during maturation in kernels of *Triticum durum*. *Journal of Experimental Botany* **54**: 249-258.
- De Gara L, Tommasi F** (1999) Ascorbate redox enzymes: a network of reactions involved in plant development. *Recent Research Developments in Phytochemistry* **3**: 1-15.
- de Pinto MC, Francis D, De Gara L** (1999) The redox state of the ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma* **209**: 90-97.
- DellaGreca M, Monaco P, Pinto G, Pollio A, Previtiera L, Temussi F** (2001) Phytotoxicity of low-molecular-weight phenols from olive mill waste waters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **67**: 352-359.
- Díaz R** (2010) Caracterización y papel biorremediador de la lacasa producida por el hongo ligninolítico *Coriopsis rigida* en alpeorujo. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, España.
- Díaz R, Saparrat MCN, Jurado M, García-Romera I, Ocampo JA, Martínez MJ** (2010) Biochemical and molecular characterization of *Coriopsis rigida* laccases involved in transformation of the solid waste from olive oil production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **88**: 133-142.
- Dietz KJ** (1997) Functions and responses of the leaf apoplast under stress. *Progress in Botany* **58**: 221-254.
- Ding J, Sun Y, Xiao CL, Shi K, Zhou YH, Yu JQ** (2007) Physiological basis of different allelopathic reactions of cucumber and figleaf gourd plants to cinnamic acid. *Journal of Experimental Botany* **58**: 3765-3773.
- Dix NJ, Webster J** (1995) *Fungal Ecology*. Chapman and Hall, England. pp. 594.
- Dixit V, Pandey V, Shyam R** (2001) Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of Experimental Botany* **52**: 1101-1109.
- Dixon DP, Cummins L, Cole DJ, Edwards R** (1998) Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 258-266.
- Dixon DP, Skipsey M, Edwards R** (2010) Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **71**: 338-350.
- Doblinski PMF, Ferrarese MDLL, Huber DA, Scapim CA, De Lucca E, Braccini A, Ferrarese-Filho O** (2003) Peroxidase and lipid peroxidation of soybean roots in response to p-coumaric and p-hydroxybenzoic acids. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **46**: 193-198.
- dos Santos WD, Ferrarese MDLL, Finger A, Teixeira ACN, Ferrarese-Filho O** (2004) Lignification and related enzymes in *Glycine max* root growth-inhibition by ferulic acid. *Journal of Chemical Ecology* **30**: 1203-1212.

- dos Santos WD, Ferrarese MLL, Nakamura CV, Mourão KSM, Mangolin CA, Ferrarese-Filho O** (2008) Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. The possible mode of action. *Journal of Chemical Ecology* **34**: 1230-1241.
- Doulis AG, Debian N, Kingston-Smith AH, Foyer CH** (1997) Differential localization of antioxidants in maize leaves. *Plant Physiology* **114**: 1031-1037.
- Dudai N, Chaimovitsh D, Larkov O, Fischer R, Blaicher Y, Mayer AM** (2009) Allelochemicals released by leaf residues of *Micromeria fruticosa* in soils, their uptake and metabolism by inhibited wheat seed. *Plant and Soil* **314**: 311-317.
- Edwards R, Dixon DP, Walbot V** (2000) Plant glutathione S-transferases: Enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science* **5**: 193-198.
- Eggert C, Temp U, Eriksson KEL** (1996) The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 1151-1158.
- Ehaliotis C, Papadopoulou K, Kotsou M, Mari I, Balis C** (1999) Adaptation and population dynamics of *Azotobacter vinelandii* during aerobic biological treatment of olive-mill wastewater. *FEMS Microbiology Ecology* **30**: 301-311.
- Einhellig FA** (1996) Interactions involving allelopathy in cropping systems. *Agronomy Journal* **88**: 886-893.
- Eyidogan F, Öz M** (2007) Effect of salinity on antioxidant responses of chickpea seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* **29**: 485-493.
- Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Sampaio JP** (2001) Basidiomycetous yeasts. *The Mycota VII. Part B. Systematics and Evolution* (McLaughlin DJ, McLaughlin EG, Lemke PA (eds)). Springer-Verlag, Berlín. pp. 3-35.
- Ferrer MA, Calderon AA, Muñoz R, Ros Barceló A** (1990) 4-Methoxy- α -naphthol as a specific substrate for kinetic, zymographic and cytochemicals studies on plant peroxidase activities. *Phytochemical Analysis* **1**: 63-69.
- Finlay R, Soderstrom B** (1992) Mycorrhiza and carbon flow to the soil. *Mycorrhizal functioning* (Allen M (ed)) Chapman and Hall, New York. pp. 134-160.
- Fountoulakis MS, Dokianakis SN, Kornaros ME, Aggelis GG, Lyberatos G** (2002) Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research* **36**: 4735-4744.
- Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ** (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum* **92**: 696-717.
- Foyer CH, Noctor G** (2000) Oxygen processing in photosynthesis: Regulation and signalling. *New Phytologist* **146**: 359-388.

- Foyer CH, Noctor G** (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: A re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment* **28**: 1056-1071.
- Foyer CH, Noctor G** (2001) The molecular biology and metabolism of glutathione. Significance of glutathione in plant adaptation to the environment. (Grill D, Tausz M, De KoK LJ (eds)). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 27-57.
- Foyer CH, Noctor G** (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplast, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* **119**: 355-364.
- Foyer CH, Rowell J, Walker D** (1983) Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplast and chloroplast during illumination. *Planta* **157**: 239-244.
- Fr. J** (1881) *Pycnoporus cinnabarinus*. *Revue Mycologique*, Toulouse. pp. 3-18.
- Fracchia S, García-Romera I, Godeas A, Ocampo JA** (2000) Effect of the saprophytic fungus *Fusarium oxysporum* on arbuscular mycorrhizal colonization and growth of plants in greenhouse and field trials. *Plant and Soil* **223**: 175-184.
- Frew JE, Jones P, Scholes G** (1983) Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide and organic hydroperoxides at low concentrations in aqueous solution. *Analytica Chimica Acta* **155**: 139-150.
- Fujita KI, Kubo I** (2003) Synergism of polygodial and cinnamic acid on inhibition of root elongation in lettuce seedling growth bioassays. *Journal of Chemical Ecology* **29**: 2253-2262.
- Garg N, Manchanda G** (2009) ROS generation in plants: Boon or bane?. *Plant Biosystems* **143**: 81-96.
- Gaspar T, Penel C, Castillo FJ, Greppin H** (1985) A two step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiologia Plantarum* **64**: 418-423.
- Gechev T, Gadjev I, Van Breusegem F, Inzé D, Dukiandjiev S, Toneva V, Minkov I** (2002) Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**: 708-714.
- Gianfreda L, Rao MA** (2004) Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: A review. *Enzyme and Microbial Technology* **35**: 339-354.
- Gill SS, Tuteja N** (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**: 909-930.
- Giovannetti M, Mosse B** (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in root. *New Phytologist* **84**: 489-500.

- Goel A, Goel AK, Sheoran IS** (2003) Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. *Journal of Plant Physiology* **160**: 1093-1100.
- Göhre V, Paszkowski U** (2006) Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* **223**: 1115-1123.
- González-Guerrero M, Benabdellah K, Valderas A, Azcón-Aguilar C, Ferrol N** (2010) GintABC1 encodes a putative ABC transporter of the MRP subfamily induced by Cu, Cd, and oxidative stress in *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza* **20**: 137-146.
- González MD, Moreno E, Quevedo-Sarmiento J, Ramos-Cormenzana A** (1990) Studies on antibacterial activity of waste waters from olive oil mills (alpechín): Inhibitory activity of phenolics and fatty acids. *Chemosphere* **20**: 423-432.
- González VM, Kazimir J, Nimbal C, Weston LA, Cheniae GM** (1997) Inhibition of a photosystem II electron transfer reaction by the natural product sorgoleone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**: 1415-1421.
- Gratão PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA** (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology* **32**: 481-494.
- Greco Jr G, Colarieti ML, Toscano G, Iamarino G, Rao MA, Gianfreda L** (2006) Mitigation of olive mill wastewater toxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 6776-6782.
- Guillén DA, Merello F, Barroso CG, Pérez-Bustamante JA** (1997) Solid-phase extraction for sample preparation, in the HPLC analysis of polyphenolic compounds in "Fino" sherry wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**: 403-406.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB** (1974) Glutathione S-transferase. First enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* **249**: 7130-7139.
- Halliwell B, Gutteridge J** (2000) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, London.
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG** (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**: 1773-1791.
- Harbone JB** (1980) Plant phenolics. *Secondary Plant Products*. Encyclopedia of Plant Physiology. (Bell EA, Charlwood BV (eds)). Springer-Verlag, Berlin. **8**: 331-401.
- Hasan SA, Hayat S, Ali B, Ahmad A** (2008) 28-Homobrassinolide protects chickpea (*Cicer arietinum*) from cadmium toxicity by stimulating antioxidants. *Environmental Pollution* **151**: 60-66.
- Hatakka A** (1994) Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: Production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews* **13**: 125-135.

- Hejl AM, Koster KL** (2004) Juglone disrupts root plasma membrane H⁺-ATPase activity and impairs water uptake, root respiration, and growth in soybean (*Glycine max*) and corn (*Zea mays*). *Journal of Chemical Ecology* **30**: 453-471.
- Hernández I, Chacón O, Rodríguez R, Portieles R, López Y, Pujol M, Borrás-Hidalgo O** (2009) Black shank resistant tobacco by silencing of glutathione S-transferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **387**: 300-304.
- Hewitt EJ** (1966) Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Technical Communication. Commonwealth Agricultural Bureaux **22**: 237-315.
- Hildebrandt U, Kaldorf M, Bothe H** (1999) The zinc violet and its colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Physiology* **154**: 709-717.
- Hildebrandt U, Regvar M, Bothe H** (2007) Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* **68**: 139-146.
- Hippeli S, Heiser I, Elstner EF** (1999) Activated oxygen and free oxygen radicals in pathology: New insights and analogies between animals and plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**: 167-178.
- Hirai H, Kondo R, Sakai K** (1995) Characterization of reducing abilities of white-rot fungi using tetrazolium salts. *Mokuzai Gakkaishi* **41**: 917-924.
- Hofrichter M, Bublitz F, Fritsche W** (1995) Cometabolic degradation of o-cresol and 2,6-dimethylphenol by *Penicillium frequentans* Bi 7/2. *Journal of Basic Microbiology* **35**: 303-313.
- Hofrichter M, Scheibner K** (1993) Utilization of aromatic compounds by the *Penicillium* strain Bi 7/2. *Journal of Basic Microbiology* **33**: 227-232.
- Hong Y, Hu HY, Xie X, Sakoda A, Sagehashi M, Li FM** (2009) Gramine-induced growth inhibition, oxidative damage and antioxidant responses in freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology* **91**: 262-269.
- Horemans N, Foyer CH, Potters G, Asard H** (2000) Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 531-540.
- Hsu CL, Chen W, Weng YM, Tseng CY** (2003) Chemical composition, physical properties, and antioxidant activities of yam flours as affected by different drying methods. *Food Chemistry* **83**: 85-92.
- Hückelhoven R, Kogel K-H** (2003) Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: Who is who in powdery mildew resistance? *Planta* **216**: 891-902.
- Inderjit** (1996) Plant phenolics in allelopathy. *Botanical Review* **62**: 186-202.
- Inderjit, Duke SO** (2003) Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta* **217**: 529-539.
- Isebaert S, Haesaert G, Devreese R, Maene P, Fremaut F, Vlaemynck G** (2005) *Fusarium* spp. and *Fusarium* mycotoxins in maize: a problem for

- Flanders?. Communications in Agricultural Applied Biological Sciences **70**: 129-136.
- Isidori M, Lavorgna M, Nardelli A, Parrella A** (2005) Model study on the effect of 15 phenolic olive mill wastewater constituents on seed germination and *Vibrio fischeri* metabolism. Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**: 8414-8417.
- Jabs T, Tschöpe M, Colling C, Hahlbrock K, Scheel D** (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O_2^- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. Proceedings of the National Academy of Sciences **94**: 4800-4805.
- Jakobsen I** (1995) Transport of phosphorus and carbon in VA mycorrhizas. (Varma A, Hock B (eds)). Mycorrhiza. Springer-Verlag, Berlin. pp. 297-324.
- Jiménez A, Hernández JA, Del Río LA, Sevilla F** (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. Plant Physiology **114**: 275-284.
- Joner EJ, Johansen A, Loibner AP, Cruz MAD, Szolar OHJ, Portal JM, Leyval C** (2001) Rhizosphere effects on microbial community structure and dissipation and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in spiked soil. Environmental Science and Technology **35**: 2773-2777.
- Jose S** (2002) Black walnut allelopathy: current state of the science. Chemical ecology of plants: Allelopathy in aquatic and terrestrial ecosystems (Inderjit, Malik AU (eds)). Birkhäuser Verlag, Basel-Boston-Berlin. pp. 149-172.
- Joshi DK, Gold MH** (2001) Degradation of 2,4,5-trichlorophenol by lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology **59**: 1779-1785.
- Kamisaka S, Takeda S, Takahashi K, Shibata K** (1990) Diferulic acid and ferulic acids in cell walls of *Oryza sativa* coleoptiles their relationships to mechanical properties of cell wall. Physiologia Plantarum **78**: 1-7.
- Kapoor KK, Jain MK, Mishra MM, Singh CP** (1978) Cellulase activity, degradation of cellulose and lignin and humus formation by cellulolytic fungi. Annales de Microbiologie **129**: 613-620.
- Kato-Naguchi H, Macias FA** (2004) Mode of action of MBOA on inhibition of plant germination. Proceedings of Secondary European Allelopathy Symposium "Allelopathy from understanding to application". Pulawy, Poland. pp. 96-97.
- Kelly FJ, Mudway I, Krishna MT, Holgate ST** (1995) The free radical basis of air pollution: Focus on ozone. Respiratory Medicine **89**: 647-656.
- Khalvati M, Bartha B, Dupigny A, Schröder P** (2009) Arbuscular mycorrhizal association is beneficial for growth and detoxification of xenobiotics of barley under drought stress. Journal of Soils and Sediments **10**: 54-64.

- Khan AG, Kuek C, Chaudhry TM, Khoo CS, Hayes WJ** (2000) Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* **41**: 197-207.
- Khan NA, Samiullah, Singh S, Nazar R** (2007) Activities of antioxidative enzymes, sulphur assimilation, photosynthetic activity and growth of wheat (*Triticum aestivum*) cultivars differing in yield potential under cadmium stress. *Journal of Agronomy and Crop Science* **193**: 435-444.
- Kirchmann H, Bernal MP** (1997) Organic waste treatment and C stabilization efficiency. *Soil Biology and Biochemistry* **29**: 1747-1753.
- Knörzer OC, Durner J, Böger P** (1996) Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. *Physiologia Plantarum* **97**: 388-396.
- Kowaljew E, Julia Mazzarino M** (2007) Soil restoration in semiarid Patagonia: Chemical and biological response to different compost quality. *Soil Biology and Biochemistry* **39**: 1580-1588.
- Kupidłowska E, Dobrzynska K, Parys E, Zobel AM** (1994) Effects of coumarin and xantoxin on mitochondrial structure, oxygen uptake and succinate dehydrogenase activity in onion root cells. *Jornal Chemical Ecology* **20**: 2471-2480.
- Lam TBT, Kadoya K, Iiyama K** (2001) Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: Ferulic and p-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the β -position, in grass cell walls. *Phytochemistry* **57**: 987-992.
- Lara-Núñez A, Romero-Romero T, Ventura JL, Blancas V, Anaya AL, Cruz-Ortega R** (2006) Allelochemical stress causes inhibition of growth and oxidative damage in *Lycopersicon esculentum* Mill. *Plant Cell and Environment* **29**: 2009-2016.
- Lara-Núñez A, Sánchez-Nieto S, Luisa Anaya A, Cruz-Ortega R** (2009) Phytotoxic effects of *Sicyos deppei* (Cucurbitaceae) in germinating tomato seeds. *Physiologia Plantarum* **136**: 180-192.
- Lascano HR, Gómez LD, Casano LM, Trippi VS** (1998) Changes in glutathione reductase activity and protein content in wheat leaves and chloroplasts exposed to photooxidative stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**: 321-329
- Lee BR, Kim KY, Jung WJ, Avice JC, Ourry A, Kim TH** (2007) Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany* **58**: 1271-1279.
- Levitt J, Lovett JV, Garlick PR** (1984) *Datura stramonium* allelochemicals: longevity in soil, and ultrastructural effects on root tip cell of *Helianthus annuus* L. *New Phytologist* **97**: 213-218.

- Li HM, Inove H, Nishimura J, Mizutani J, Tsuzuki E** (1993) Interactions of trans-cinnamic acid, its related phenolic allelochemicals and abscisic acid in seedling growth and seed germination of lettuce. *Journal Chemical Ecology* **19**: 1775-1787.
- Lin R, Wang X, Luo Y, Du W, Guo H, Yin D** (2007) Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere* **69**: 89-98.
- Liu H, Weisman D, Ye Yb, Cui B, Huang Yh, Colón-Carmona A, Wang Zh** (2009) An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* **176**: 375-382.
- Løvdal T, Olsen KM, Slimestad R, Verheul M, Lillo C** (2010) Synergetic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato. *Phytochemistry* **71**: 605-613.
- Lyu SW, Blum U, Gerig TM, O'Brien TE** (1990) Effects of mixtures of phenolic acids on phosphorus uptake by cucumber seedlings. *Journal of Chemical Ecology* **16**: 2559-2567.
- Lloyd** (1921) *Traemetes vesicolor*. *Mycological Notes*. pp. 65-105.
- Maffei M, Margherita Berteà C, Garneri F, Scannerini S** (1999) Effect of benzoic acid hydroxy- and methoxy- ring substituents during cucumber (*Cucumis sativus* L.) germination. I. Isocitrate lyase and catalase activity. *Plant Science* **141**: 139-147.
- Mantzavinos D, Kalogerakis N** (2005) Treatment of olive mill effluents: Part I. Organic matter degradation by chemical and biological processes. An overview. *Environment International* **31**: 289-295.
- Marrs KA** (1996) The functions and regulation of glutathione s-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 127-158.
- Martí MC, Camejo D, Fernández-García N, Rellán-Álvarez R, Marques S, Sevilla F, Jiménez A** (2009) Effect of oil refinery sludges on the growth and antioxidant system of alfalfa plants. *Journal of Hazardous Materials* **171**: 879-885.
- Martín J, Sampedro I, García-Romera I, García-Garrido JM, Ocampo JA** (2002) Arbuscular mycorrhizal colonization and growth of soybean (*Glycine max*) and lettuce (*Lactuca sativa*) and phytotoxic effects of olive mill residues. *Soil Biology and Biochemistry* **34**: 1769-1775.
- Martínez AT, Speranza M, Ruíz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A, Del Río JC** (2005) Biodegradation of lignocellulosics: Microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* **8**: 195-204.

- Martirani L, Giardina P, Marzullo L, Sannia G** (1996) Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research* **30**: 1914-1918.
- Masia A** (2003) Physiological effects of oxidative stress in relation to ethylene in post-harvest produce. *Postharvest oxidative stress in horticultural crops* (Hodges DM (eds)). Products Press, New York. pp. 165-197.
- McCord JM, Fridovich I** (1969) Superoxide dismutase: an enzyme function for erythrocyte hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry* **244**: 6049-6055.
- McDowell JM, Dangi JL** (2000) Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Sciences* **25**: 79-82.
- McLaughlin JC, Smith SM** (1994) Metabolic regulation of glyoxylate-cycle enzyme synthesis in detached cucumber cotyledons and protoplasts. *Planta* **195**: 22-28.
- McLusky SR, Bennett MH, Beale MH, Lewis MJ, Gaskin P, Mansfield JW** (1999) Cell wall alteration and localised accumulation of feruloyl-3'-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis allii* are associated with actin polarisation, peroxidases activity and suppression of flavonoid biosynthesis. *Plant Journal* **17**: 523-534.
- Mechri B, Echbili A, Issaoui M, Braham M, Elhadj SB, Hammami M** (2007) Short-term effects in soil microbial community following agronomic application of olive mill wastewaters in a field of olive trees. *Applied Soil Ecology* **36**: 216-223.
- Medina A, Vassilev N, Alguacil MM, Roldán A, Azcón R** (2004a) Increased plant growth, nutrient uptake, and soil enzymatic activities in a desertified mediterranean soil amended with treated residues and inoculated with native mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting yeast. *Soil Science* **169**: 260-270.
- Medina A, Vassilev N, Azcón R** (2010) The interactive effect of an AM fungus and an organic amendment with regard to improving inoculum potential and the growth and nutrition of *Trifolium repens* in Cd-contaminated soils. *Applied Soil Ecology* **44**: 181-189.
- Medina A, Vassilev N, Barea JM, Azcón R** (2005) Application of *Aspergillus niger* treated agrowaste residue and *Glomus mosseae* for improving growth and nutrition of *Trifolium repens* in a Cd-contaminated soil. *Journal of Biotechnology* **117**: 369-378.
- Medina A, Vassileva M, Caravaca F, Roldán A, Azcón R** (2004b) Improvement of soil characteristics and growth of *Dorycnium pentaphyllum* by amendment with agrowastes and inoculation with AM fungi and/or the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Chemosphere* **56**: 449-456.
- Mekki A, Dhouib A, Sayadi S** (2006) Changes in microbial and soil properties following amendment with treated and untreated olive mill wastewater. *Microbiological Research* **161**: 93-101.

- Mekki A, Dhouib A, Sayadi S** (2007) Polyphenols dynamics and phytotoxicity in a soil amended by olive mill wastewaters. *Journal of Environmental Management* **84**: 134-140.
- Mellouli HJ, Hartmann R, Gabriels D, Cornells WM** (1998) The use of olive mill effluents ("margines") as soil conditioner mulch to reduce evaporation losses. *Soil and Tillage Research* **49**: 85-91.
- Mendum TA, Hirsch PR** (2002) Changes in the population structure of [beta]-group autotrophic ammonia oxidising bacteria in arable soils in response to agricultural practice. *Soil Biology and Biochemistry* **34**: 1479-1485.
- Meza JC, Auria R, Lomascolo A, Sigoillot JC, Casalot L** (2007) Role of ethanol on growth, laccase production and protease activity in *Pycnoporus cinnabarinus* ss3. *Enzyme and Microbial Technology* **41**: 162-168.
- Miller G, Shulaev V, Mittler R** (2008) Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum* **133**: 481-489.
- Miller G, Suzuki N, Rizhsky L, Hegie A, Koussevitzky S, Mittler R** (2007) Double mutants deficient in cytosolic and thylakoid ascorbate peroxidase reveal a complex mode of interaction between reactive oxygen species, plant development, and response to abiotic stresses. *Plant Physiology* **144**: 1777-1785.
- Miransari M** (2010) Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant growth under different types of soil stress. *Plant Biology* **12**: 563-569.
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**: 405-410.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**: 490-498.
- Miyake C, Asada D** (1992) Thylakoid bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in tylakoids. *Plant and Cell Physiology* **33**: 541-553.
- Miyake C, Schreiber U, Hormann H, Sano S, Asada K** (1998) The FAD-enzyme monodehydroascorbate radical reductase mediates photoproduction of superoxide radicals in spinach thylakoid membranes. *Plant and Cell Physiology* **39**: 821-829.
- Mobin M, Khan NA** (2007) Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *Journal of Plant Physiology* **164**: 601-610.
- Moons A** (2003) Osgtu3 and osgtu4, encoding tau class glutathione S-transferases, are heavy metal- and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots. *FEBS Letters* **553**: 427-432.
- Morelló JR, Romero MP, Motilva MJ** (2004) Effect of the maturation of the olive fruit on the phenolic fraction of drupes and oils from Arbequina, Farga,

- and Morrut cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 6002-6009.
- Morillo JA, Antizar-Ladislao B, Monteoliva-Sánchez M, Ramos-Cormenzana A, Russell NJ** (2009) Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **82**: 25-39.
- Morisot A, Tournier JP** (1986) Répercussions agronomiques de l'épandage d'effluents et déchets de moullins á huile d'olive agronomie. *Agronomie* **6**: 235-241.
- Navas P, Gómez-Díaz C** (1995) Ascorbate free radical and its role in growth control. *Protoplasma* **184**: 8-13.
- Niaounakis M, Halvadakis CP** (2006) Olive oil processing waste management: literature review and patent survey, 2nd edn. Waste Management Series, Vol. 5. Elsevier.
- Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascorbate and Glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 249-279.
- Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH** (2002) Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1283-1304.
- Nogales R, Melgar R, Guerrero A, Lozada G, Benítez E, Thompson R, Gómez M** (1999) Growth and reproduction of *Eisenia andrei* in dry olive cake mixed with other organic wastes. *Pedobiologia* **43**: 744-752.
- Norris DM** (1980) Degradation of C¹⁴-labeled lignins and C¹⁴-labeled aromatic acids by *Fusarium solani*. *Applied and Environmental Microbiology* **40**: 376-380.
- Oracz K, Bailly C, Gniazdowska A, Côme D, Corbineau F, Bogatek R** (2007) Induction of oxidative stress by sunflower phytotoxins in germinating mustard seeds. *Journal of Chemical Ecology* **33**: 251-264.
- Oved T, Shaviv A, Goldrath T, Mandelbaum RT, Minz D** (2001) Influence of effluent irrigation on community composition and function of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 3426-3433.
- Oxborough K, Baker NR** (1997) Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components - Calculation of qP and Fv'/Fm' without measuring Fo'. *Photosynthesis Research* **54**: 135-142.
- Palma JM, Longa MA, del Río LA, Arines J** (1993) Superoxide dismutase in vesicular arbuscular mycorrhizal red clover plants. *Physiologia Plantarum* **87**: 77-83.
- Paradiso A, Berardino R, De Pinto MC, Sanità Di Toppi L, Storelli MM, Tommasi F, De Gara L** (2008) Increase in ascorbate-glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants. *Plant and Cell Physiology* **49**: 362-374.

- Paredes C, Cegarra J, Bernal MP, Roig A** (2005) Influence of olive mill wastewater in composting and impact of the compost on a Swiss chard crop and soil properties. *Environment International* **31**: 305-312.
- Paredes C, Cegarra J, Roig A, Sánchez-Monedero MA, Bernal MP** (1999) Characterization of olive mill wastewater (alpechin) and its sludge for agricultural purposes. *Bioresource Technology* **67**: 111-115.
- Paredes MJ, Moreno E, Ramos-Cormenzana A, Martínez J** (1987) Characteristics of soil after pollution with waste waters from olive oil extraction plants. *Chemosphere* **16**: 1557-1564.
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C** (2005) Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports* **24**: 255-265.
- Pasti-Grigsby MB, Paszczynski A, Goszczynski S, Crawford RL, Crawford DL** (1992) Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* sp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 3598-3604.
- Pastori GM, Foyer CH** (2002) Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiology* **129**: 460-468.
- Pedrol N, González L, Reigosa MJ** (2006) Allelopathy and abiotic stress. Allelopathy: a physiological process with ecological implications. (Reigosa MJ, Pedrol N, González L (eds)). Springer, The Netherlands. pp. 171-209.
- Pelaez F, Martinez MJ, Martinez AT** (1995) Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycological Research* **99**: 37-42.
- Péridé FH, Gold MH** (1991) Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squaleus*. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 2240-2245.
- Perl-Treves R, Abu-Abied M, Magal N, Galun E, Zamir D** (1990) Genetic mapping of tomato cDNA clones encoding the chloroplastic and the cytosolic isozymes of superoxide dismutase. *Biochemical Genetics* **28**: 543-552.
- Petre M, Zarnea G, Adrian P, Gheorghiu E** (1999) Biodegradation and bioconversion of cellulose wastes using bacterial and fungal cells immobilized in radiopolymerized hydrogels. *Resources, Conservation and Recycling* **27**: 309-332.
- Phillips JM, Hayman DS** (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assesment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* **55**: 158-161.
- Piotrowska A, Iamarino G, Rao MA, Gianfreda L** (2006) Short-term effects of olive mill waste water (OMW) on chemical and biochemical properties of a semiarid Mediterranean soil. *Soil Biology and Biochemistry* **38**: 600-610.

- Pnueli L, Liang H, Rozenberg M, Mittler R** (2003) Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx1)-deficient Arabidopsis plants. *The Plant Journal* **34**: 187-203.
- Podestà EE, Plaxton WC** (1994) Regulation of cytosolic carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. I. Developmental profiles for the activity, concentration and molecular structure of the pyrophosphate and ATP-dependent phosphofructokinases, phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate kinase. *Planta* **194**: 374-380.
- Pointing SB** (2001) Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 20-33.
- Politycka B** (1996) Peroxidase activity and lipid peroxidation in roots of cucumber seedlings influenced by derivatives of cinnamic and benzoic acids. *Acta Physiologiae Plantarum* **18**: 365-370.
- Politycka B, Bednarski W** (2004) Oxidative burst and lipoxygenase activity induced by hydroxycinnamic acids in cucumber roots. *Allelopathy Journal* **14**: 187-196.
- Pomar F, Caballero N, Pedreo MA, Ros Barceló A** (2002) H₂O₂ generation during the auto-oxidation of coniferyl alcohol drives the oxidase activity of a highly conserved class III peroxidase involved in lignin biosynthesis. *FEBS Letters* **529**: 198-202.
- Porcel R, Ruiz-Lozano JM** (2004) Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1743-1750.
- Pretty J** (1995) Regenerating agriculture: policies and practice for sustainability and self-reliance. Earthscan, London. National Academy Press, Washington. pp. 320.
- Queirolo CB, Andreo CS, Niemeyer HM, Corcuera LJ** (1983) Inhibition of ATPase from chloroplast by hydroxamic acid from Gramineae. *Phytochemistry* **22**: 2455-2458.
- Quiroga M, de Forchetti SM, Taleisnik E, Tigier HA** (2001) Tomato root peroxidase isoenzymes: kinetic studies of the coniferyl alcohol peroxidase activity, immunological properties and role in response to salt stress. *Journal of Plant Physiology* **158**: 1007-1013.
- Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Barceló A, Amaya I, Medina MI, Alonso FJ, De Forchetti SM, Tigier H, Valpuesta V** (2000) A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology* **122**: 1119-1127.
- Rama Devi S, Prasad MNV** (1996) Ferulic acid mediated changes in oxidative enzymes of maize seedlings: Implications in growth. *Biologia Plantarum* **38**: 387-395.

- Ramos-Cormenzana A, Juárez-Jiménez B, García-Pareja MP** (1996) Antimicrobial activity of olive mill waste-waters (alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation* **38**: 283-290.
- Ramos-Cormenzana A, Monteoliva-Sanchez M, Lopez MJ** (1995) Bioremediation of alpechin. *International Biodeterioration and Biodegradation* **35**: 249-268.
- Regalado V, Rodríguez A, Perestelo F, Carnicero A, De la Fuente G, Falcón MA** (1997) Lignin degradation and modification by the soil-inhabiting fungus *Fusarium proliferatum*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3716-3718.
- Reigosa MJ, Pazos-Malvido E** (2007) Phytotoxic effects of 21 plant secondary metabolites on *Arabidopsis thaliana* germination and root growth. *Journal of Chemical Ecology* **33**: 1456-1466.
- Reigosa MJ, Souto XC, González L** (1999) Effect of phenolic compounds on the germination of six weeds species. *Plant Growth Regulation* **28**: 83-88.
- Rejón-Palomares A, García-Garrido JM, Ocampo JA, García-Romera I** (1996) Presence of xyloglucan-hydrolyzing glucanases (xyloglucanases) in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Symbiosis* **21**: 249-261.
- Ribereu-Gayon P** (1968) *Les Composés Phenoliques des Vegetaux*. Dumond, Paris.
- Rice EL** (1984) *Allelopathy* 2nd ed. Academic Press. New York.
- Rivera-Becerril F, Van Tuinen D, Martin-Laurent F, Metwally A, Dietz KJ, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V** (2005) Molecular changes in *Pisum sativum* L. roots during arbuscular mycorrhiza buffering of cadmium stress. *Mycorrhiza* **16**: 51-60.
- Rivero RM, Ruiz JM, García PC, López-Lefebvre LR, Sánchez E, Romero L** (2001) Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science* **160**: 315-321.
- Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Zabalza A, Corpas FJ, Gómez M, Del Río LA, Sandalio LM** (2006) Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant, Cell and Environment* **29**: 1532-1544.
- Roig A, Cayuela ML, Sánchez-Monedero MA** (2006) An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management* **26**: 960-969.
- Romero-Romero T, Sánchez-Nieto S, Sanjuan-Badillo A, Anaya AL, Cruz-Ortega R** (2005) Comparative effects of allelochemical and water stress in roots of *Lycopersicon esculentum* Mill. (Solanaceae). *Plant Science* **168**: 1059-1066.

- Ros Barceló A** (1997) Lignification in plant cell walls. *International Review of Cytology* **176**: 87-132.
- Ros.Barceló A, Pomar F, López-Serrano M, Pedreño MA** (2003) Peroxidase: A multifunctional enzyme in grapevines. *Functional Plant Biology* **30**: 577-591.
- Ros M, Hernandez MT, García C** (2003) Soil microbial activity after restoration of a semiarid soil by organic amendments. *Soil Biology and Biochemistry* **35**: 463-469.
- Rosales MA, Ruiz JM, Hernández J, Soriano T, Castilla N, Romero L** (2006) Antioxidant content and ascorbate metabolism in cherry tomato exocarp in relation to temperature and solar radiation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**: 1545-1551.
- Roxas VP, Smith RK, Allen ER, Allen RD** (1997) Overexpression of glutathione-S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nature Biotechnology* **15**: 988-991.
- Rozzi A, Malpei F** (1996) Treatment and disposal of olive mill effluents. *International Biodeterioration and Biodegradation* **38**: 135-144.
- Ruiz-Lozano JM** (2003) Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza* **13**: 309-317.
- Saavedra M, Benitez E, Cifuentes C, Nogales R** (2006) Enzyme activities and chemical changes in wet olive cake after treatment with *Pleurotus ostreatus* or *Eisenia fetida*. *Biodegradation* **17**: 93-102.
- Saiz-Jiménez C, De Leeuw JW, Gómez-Alarcón G** (1987) Sludge from the waste water of the olive processing industry: A potential soil fertilizer?. *The Science Total Environment* **62**: 445-452.
- Sampedro I, Aranda E, Martín J, García-Garrido JM, García-Romera I, Ocampo JA** (2004a) Saprobic fungi decrease plant toxicity caused by olive mill residues. *Applied Soil Ecology* **26**: 149-156
- Sampedro I, Cajthaml T, Marinari S, Stazi SR, Grego S, Petruccioli M, Federici F, D'Annibale A** (2009) Immobilized inocula of white-rot fungi accelerate both detoxification and organic matter transformation in two-phase dry olive-mill residue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 5452-5460.
- Sampedro I, D'Annibale A, Ocampo JA, Stazi SR, García-Romera I** (2005) Bioconversion of olive-mill dry residue by *Fusarium lateritium* and subsequent impact on its phytotoxicity. *Chemosphere* **60**: 1393-1400.
- Sampedro I, D'Annibale A, Ocampo JA, Stazi SR, García-Romera I** (2007a) Solid-state cultures of *Fusarium oxysporum* transform aromatic components of olive-mill dry residue and reduce its phytotoxicity. *Bioresource Technology* **98**: 3547-3554.

- Sampedro I, Marinari S, D'Annibale A, Grego S, Ocampo JA, García-Romera I** (2007b) Organic matter evolution and partial detoxification in two-phase olive mill waste colonized by white-rot fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation* **60**: 116-125.
- Sampedro I, Aranda E, Díaz R, García-Sánchez M, Ocampo JA, García-Romera I** (2008) Saprobe fungi decreased the sensitivity to the toxic effect of dry olive mill residue on arbuscular mycorrhizal plants. *Chemosphere* **70**: 1383-1389.
- Sampedro I, Romero C, Ocampo JA, Brenes M, García I** (2004b) Removal of monomeric phenols in dry mill olive residue by saprobic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 4487-4492.
- Sánchez M, Pena MJ, Revilla G, Earra I** (1996) Changes in dehydrodiferulic acid associated with cell wall during growth of *Pinus Pinaster* hypocotyls. *Plant Physiology* **111**: 941-946.
- Sánchez-Moreiras AM, Reigosa MJ** (2005) Whole plant response of lettuce after root exposure to BOA (2(3H)-benzoxazolinone). *Journal of Chemical Ecology* **31**: 2689-2703.
- Sandermann Jr H** (1994) Higher plant metabolism of xenobiotics: The 'green liver' concept. *Pharmacogenetics* **4**: 225-241.
- Sanjust E, Pompei R, Rescigno A, Rinaldi A, Ballero M** (1991) Olive milling wastewater as a medium for growth of four *Pleurotus* species. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **31**: 223-235.
- Saparrat MCN, Guillén F, Arambarri AM, Martínez AT, Martínez MJ** (2002) Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1534-1540.
- Saparrat MCN, Jurado M, Díaz R, Romera IG, Martínez MJ** (2010) Transformation of the water soluble fraction from "alpeorujo" by *Coriolopsis rigida*: The role of laccase in the process and its impact on *Azospirillum brasiliense* survival. *Chemosphere* **78**: 72-76.
- Saparrat MCN, Martínez MJ, Tournier HA, Cabello MN, Arambarri AM** (2000) Production of ligninolytic enzymes by *Fusarium solani* strains isolated from different substrata. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**: 799-803.
- Scheibner K, Hofrichter M, Fritsche W** (1997) Mineralization of 2-amino-4,6-dinitrotoluene by manganese peroxidase of the white-rot fungus *Nemalotoma frowardii* b19. *Biotechnology Letters* **19**: 835-839.
- Schoemaker HE, Tuor U, Muheim A, Schmidt HWH, Leisola MSA** (1991) White-rot degradation of lignin and xenobiotics. *Biodegradation: natural and synthetic materials*. (Betts WB (ed)). Springer-Verlag, London. pp. 157-174.

- Schröder P, Collins C** (2002) Conjugating enzymes involved in xenobiotic metabolism of organic xenobiotics in plants. *International Journal of Phytoremediation* **4**: 247-265.
- Schröder P, Scheer CE, Diekmann F, Stampfl A** (2007) How plants cope with foreign compounds. Translocation of xenobiotic glutathione conjugates in roots of barley (*Hordeum vulgare*). *Environmental Science and Pollution Research* **14**: 114-122.
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C** (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and evolution. *Mycological Research* **105**: 1413-1421.
- Schützendübel A, Polle A** (2002) Plant responses to abiotic stresses: Heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1351-1365.
- Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heysler R, Godbold DL, Polle A** (2001) Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiology* **127**: 887-898.
- Sierra J, Martí E, Garau MA, Cruañas R** (2007) Effects of the agronomic use of olive oil mill wastewater: Field experiment. *Science of the Total Environment* **378**: 90-94.
- Simova-Stoilova L, Vaseva I, Grigorova B, Demirevska K, Feller U** (2010) Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**: 200-206.
- Singh HP, Kaur S, Batish DR, Kohli RK** (2009) Caffeic acid inhibits in vitro rooting in mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] hypocotyls by inducing oxidative stress. *Plant Growth Regulation* **57**: 21-30.
- Singh S, Khan NA, Nazar R, Anjum NA** (2008) Photosynthetic traits and activities of antioxidant enzymes in blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper) under cadmium stress. *American Journal of Plant Physiology* **3**: 25-32.
- Smirnoff N** (1995) Antioxidant systems and plant response to the environment. *Environment and plant metabolism: flexibility and acclimation*. (Smirnoff N (eds)). BIOS Scientific Publishers. Oxford. pp. 243-271.
- Smirnoff N** (2000) Ascorbic acid: Metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 229-235.
- Smith SE, Read DJ** (2008) *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd Edn. Academic London.
- Sottomayor M, Ros Barceló A** (2004) Plant peroxidases and phytochemistry - Foreword. *Phytochemistry Reviews* **3**: 1-2.
- Souza JVB, Da Silva ES, Da Silva FT, Paiva TCB** (2005) Fungal treatment of a delignification effluent from a nitrocellulose industry. *Bioresource Technology* **96**: 1936-1942.

- Spadaro JT, Gold MH, Renganathan V** (1992) Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 2397-2401.
- Srivastava AK, Bhargava P, Rai LC** (2005) Salinity and copper-induced oxidative damage and changes in the antioxidative defence systems of *Anabaena doliolum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **21**: 1291-1298.
- Tahlil N, Rada A, Baaziz M, Morel JL, El Meray M, El Aatmani M** (1999) Quantitative and qualitative changes in peroxidase of *Cucurbita pepo* cultivars stressed with heavy metals. *Biologia Plantarum* **42**: 75-80.
- Tan K-S, Hoson T, Masuda Y, Kamisaka S** (1991) Correlation between cell wall extensibility and the content of diferulic and ferulic acids in cell walls of *Oryza sativa* coleoptiles grown under water and in air. *Physiologia Plantarum* **83**: 397-403.
- Tan K-S, Hoson T, Masuda Y, Kamisaka S** (1992) Involvement of cell wall-bound diferulic acid in light-induced decrease in growth rate and cell wall extensibility of *Oryza* coleoptiles. *Plant and Cell Physiology* **33**: 103-108.
- Tan K, Keltjens WG, Findenegg GR** (1992) Acid soil damage in sorghum genotypes: Role of magnesium deficiency and root impairment. *Plant and Soil* **139**: 149-155.
- Tang M, Chen H, Huang JC, Tian ZQ** (2009) AM fungi effects on the growth and physiology of *Zea mays* seedlings under diesel stress. *Soil Biology and Biochemistry* **41**: 936-940.
- Tarchitzky J, Lerner O, Shani U, Arye G, Lowengart-Aycicegi A, Brener A, Chen Y** (2007) Water distribution pattern in treated wastewater irrigated soils: Hydrophobicity effect. *European Journal of Soil Science* **58**: 573-588.
- Teow CC, Truong VD, McFeeters RF, Thompson RL, Pecota KV, Yencho GC** (2007) Antioxidant activities, phenolic and β -carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chemistry* **103**: 829-838.
- Testa B** (1995) *The metabolism of drugs and other xenobiotics*. New York: Academic Press. pp. 475.
- Thom** (1910) *Penicillium chrysogenum*. *Bulletin of the U.S. Department of Agriculture, Bureau Animal Industry*. pp. 118-158.
- Thom R, Dixon D, Edwards R, Cole D, Laphorn A** (2001) Structure determination of zeta class glutathione transferase from *Arabidopsis thaliana*. *Chemico-Biological Interactions* **133**: 55-57.
- Tian CY, Feng G, Li XL, Zhang FS** (2004) Different effects of arbuscular mycorrhizal fungal isolates from saline or non-saline soil on salinity tolerance of plants. *Applied Soil Ecology* **26**: 143-148.
- Tien M, Kirk TK** (1983) Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. *Science* **221**: 661-662.

- Tomati U, Galli E, Pasetti L, Volterra E** (1995) Bioremediation of olive-mill wastewaters by composting. *Waste Management and Research* **13**: 509-518.
- Torres MA, Dangel JL** (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 397-403.
- Tribak M, Ocampo JA, García-Romera I** (2002) Production of xyloglucanolytic enzymes by *Trichoderma viride*, *Paecilomyces farinosus*, *Wardomyces inflatus* and *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia* **94**: 404-410.
- Tsioulpas A, Dimou D, Iconomou D, Aggelis G** (2002) Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology* **84**: 251-257.
- Turnau K, Mesjasz-Przybyłowicz J** (2003) Arbuscular mycorrhiza of *Berkheya coddii* and other Ni-hyperaccumulating members of *Asteraceae* from ultramafic soils in South Africa. *Mycorrhiza* **13**: 185-190.
- Van Breusegem F, Vranová E, Dat JF, Inzé D** (2001) The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* **161**: 405-414.
- van den Brink HM, van Gorcom RFM, van den Hondel CAMJJ, Punt PJ** (1998) Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genetics and Biology* **23**: 1-17.
- Van der Werf A, Kooijan, A., Welschen, R., Lambers, H.** (1988) Respiratory energy costs for the maintenance of biomass, for growth and for ion uptake in roots of *Carex diandra* and *Carex acutiformis*. *Physiology Plantarum* **72**: 483-491.
- Vaughan D, Ord BG** (1991) Excretion of potential allelochemicals and their effects on root morphology and nutrients contents. *Plant root growth: an ecological perspective.* (Atkinson D (ed)). Blackwell, Oxford. pp. 399-421.
- Virtanen AI, Hietala PK, Wahlross O** (1957) Antimicrobial substances in cereals and fodder plants. *Archives of Biochemical and Biophysical*. **69**: 486-500.
- Vodnik D, Grčman H, Maček I, van Elteren JT, Kovačević M** (2008) The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. *Science of the Total Environment* **392**: 130-136.
- Vogel-Mikus K, Drobne D, Regvar M** (2005) Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonisation of pennycress *Thlaspi praecox* Wulf. (*Brassicaceae*) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia. *Environmental Pollution* **133**: 233-242.
- Vranová E, Atichartpongkul S, Villarroel R, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W** (2002) Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 10870-10875.

- Walker DJ, Bernal MP** (2008) The effects of olive mill waste compost and poultry manure on the availability and plant uptake of nutrients in a highly saline soil. *Bioresource Technology* **99**: 396-403.
- Wang CL, Shi XM, Kong FM** (2005) Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and physiology of corn under oil and salt stress. *Journal of Agro-Environment Science* **24**: 247-251
- Wang FY, Tong RJ, Shi ZY, Xu XF, He XH** (2011) Inoculations with arbuscular mycorrhizal fungi increase vegetable yields and decrease phoxim concentrations in carrot and green onion and their soils. *PLoS ONE* **6**.
- Wang X, Sun C, Gao S, Wang L, Shuokui H** (2001) Validation of germination rate and root elongation as indicator to assess phytotoxicity with *Cucumis sativus*. *Chemosphere* **44**: 1711-1721.
- Weir TL, Park SW, Vivanco JM** (2004) Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 472-479.
- Weston LA, Duke SO** (2003) Weed and crop allelopathy. *Critical Reviews in Plant Sciences* **22**: 367-389.
- Wood TK** (2008) Molecular approaches in bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* **19**: 572-578.
- Wu H, Haig T, Pratley J, Lemerle D, An M** (2000) Distribution and exudation of allelochemicals in wheat *Triticum aestivum*. *Journal of Chemical Ecology* **26**: 2141-2154.
- Yang CM, Chang IF, Lin SJ, Chou CH** (2004) Effects of three allelopathic phenolics on chlorophyll accumulation of rice (*Oryza sativa*) seedlings: II. Stimulation of consumption-orientation. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **45**: 119-125.
- Yang Y, Han C, Liu Q, Lin B, Wang J** (2008) Effect of drought and low light on growth and enzymatic antioxidant system of *Picea asperata* seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* **30**: 433-440.
- Yu HY, Zeng GM, Huang GH, Huang DL, Chen YN** (2005) Lignin degradation by *Penicillium simplicissimum*. *Huanjing Kexue/Environmental Science* **26**: 167-171.
- Yu JQ, Matsui Y** (1997) Effects of root exudates of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals on ion uptake by cucumber seedlings. *Journal of Chemical Ecology* **23**: 817-827
- Yu JQ, Ye SF, Zhang MF, Hu WH** (2003) Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals, on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. *Biochemical Systematics and Ecology* **31**: 129-139.
- Zeng RS, Luo SM, Shi YH, Shi MB, Tu CY** (2001) Physiological and biochemical mechanism of allelopathy of secalonic acid F on higher plants. *Agronomy Journal* **93**: 72-79.

- Zenjari B, Nejmeddine A** (2001) Impact of spreading olive mill wastewater on soil characteristics: Laboratory experiments. *Agronomie* **21**: 749-755.
- Zhang HH, Tang M, Chen H, Zheng CL, Niu ZC** (2010) Effect of inoculation with AM fungi on lead uptake, translocation and stress alleviation of *Zea mays* L. seedlings planting in soil with increasing lead concentrations. *European Journal of Soil Biology* **46**: 306-311.
- Zhang XH, Zhu YG, Lin AJ, Chen BD, Smith SE, Smith FA** (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi can alleviate the adverse effects of chlorothalonil on *Oryza sativa* L. *Chemosphere* **64**: 1627-1632
- Zlatev ZS, Lidon FC, Ramalho JC, Yordanov IT** (2006) Comparison of resistance to drought of three bean cultivars. *Biologia Plantarum* **50**: 389-394.

GLOSARIO

AAO: Agencia para el aceite de oliva

ABTS: 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico

ADOR: Aqueous dry olive residue

ANOVA: Análisis de normalidad y homogeneidad de varianza

APS: Amonio persulfato

APX: Ascorbato peroxidasa

ASC: Ascorbato

BHT: Butilhidroxitolueno

CAT: Catalasa

CAPOD: Coniferil alcohol peroxidasa

CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno

CHR_R: Contenido hídrico relativo en raíces

CHR_H: Contenido hídrico relativo en hojas

C.r.: *Coriopsis rigida*

DCF-DA: Diaminofluoresceína diacetato

DHAR: Dehidroascorbato reductasa

DHA: Dehidroascorbato

DHE: Dihidroetidium

DPPH: Dipicril hidracina

DTT: Dithiothreitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

Endo-PMG: Endopolimetilgalacturonasa

Endo-GN: Endoglucanasa

Endo-XG: Endoxiloglucanasa

FePOD: Ferúlico peroxidasa

FRAP: Ferric reducing ability plasma

GC-MS: Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas

GR: Glutation reductasa

GSH: Glutation

GSSG: Glutation oxidado

GST: Glutation-S-transferasa

HCl: Ácido clorhídrico

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

IG: Índice de germinabilidad

Lac: Lacasa

LiP: Lignina peroxidasa

MA: Micorriza arbuscular

MB: Medio basal

MDHAR: Monodehidroascorbato reductasa

MDHA: Monodehidroascorbato

MnP: Manganeso peroxidasa

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NaOH: Hidróxido de sodio

NEM: N-etilmaleimida

O₂: Oxígeno molecular

O₂⁻: Radical superóxido

$\cdot\text{OH}$: Radical hidroxilo

$^1\text{O}_2$: Oxígeno singlete

P.c: *Pycnoporus cinnabarinus*

P.ch.: *Penicillium chrysogenum*-10

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PODs: Peroxidasas

PS: Fotosistema

PVPP: Polivinilpirrolidona

RGR_R: Tasa de crecimiento relativo en raíces

RGR_H: Tasa de crecimiento relativo en hojas

RSU: Residuos sólidos urbanos

SE: Error estándar

TCA: Ácido tricloroacético

TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity

TEMED: Tetrametiletilendiamino

TMB: 3,3'-5,5'-Tetrametilbenzidina

TMP: Tetrametil piperidinoxy