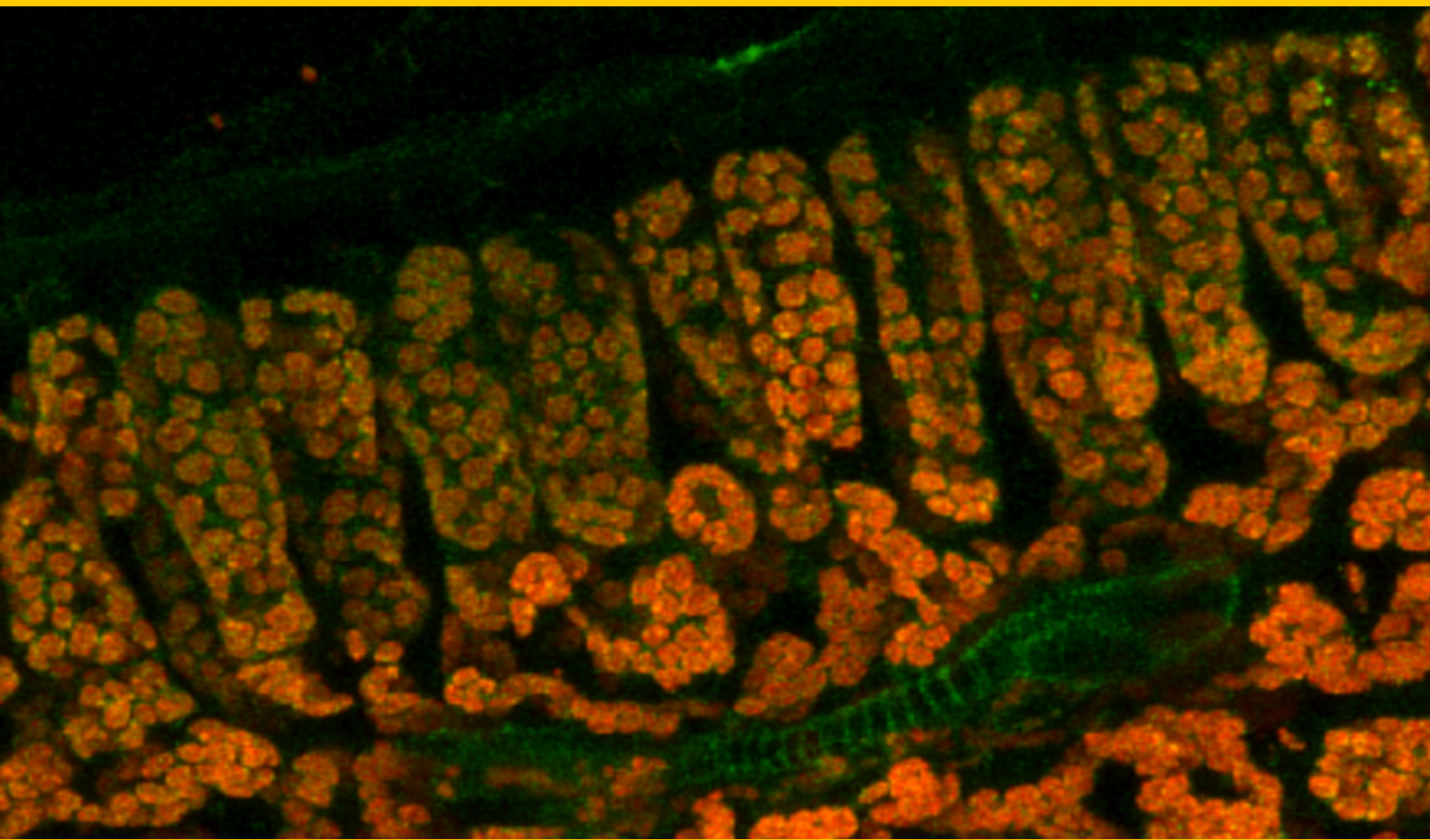


**Mecanismos Moleculares de Respuesta al
Cadmio en Plantas de *Pisum sativum* L.:
Función de las Especies de Oxígeno y
Nitrógeno Reactivo**



María Rodríguez Serrano
TESIS DOCTORAL

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC)
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN**

**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS**



**Mecanismos Moleculares de Respuesta
al Cadmio en Plantas de *Pisum sativum* L.:
Función de las Especies de Oxígeno y
Nitrógeno Reactivo**

María Rodríguez Serrano

**TESIS DOCTORAL
2007**

Mecanismos Moleculares de Respuesta al Cadmio en Plantas de *Pisum sativum* L.: Función de las Especies de Oxígeno y Nitrógeno Reactivo

Memoria que presenta la Licenciada en Ciencias Bioquímicas
María Rodríguez Serrano para optar al grado de Doctor.

Fdo. María Rodríguez Serrano

Vº Bº

EL DIRECTOR DEL TRABAJO

Fdo. Dra. Luisa Mª Sandalio González
Doctora en Ciencias Biológicas
Investigador Científico del CSIC

Granada, Abril de 2007

El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, de la Estación Experimental del Zaidín de Granada, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, con ayuda de una beca del Plan de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia, y ha sido financiado por la DGEIC (Proyecto BFI2002-04440-C02-01) y la Junta de Andalucía (grupo de investigación CVI 192).

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

- IVth Conference on Plant Stress, Reactive Oxygen and Antioxidants. (Freising-Weihenstephan, Alemania, Septiembre de 2003)
- XIIth Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research Internacional (Buenos Aires, Argentina, Mayo de 2004)
- VII Reunión de Biología Molecular de Plantas (Benalmádena, Málaga, Junio de 2004)
- XXII Reunión Bial de la Sociedad de Microscopía de España. (Granada, Junio de 2005)
- Conference on Oxygen Metabolism, ROS & Redox Signalling in Plants. (Bristol, Reino Unido, Diciembre de 2005)
- VIII Reunión de Biología Molecular de Plantas (Pamplona, España, Junio de 2006)
- Ist Plant NO Group Meeting (Verona, Italia, Agosto de 2006)

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

- **Rodríguez-Serrano M**, Romero-Puertas MC, Zabalza A, Corpas FJ, Gómez M, del Río LA, Sandalio LM (2006) Cadmium effect on oxidative metabolism in pea roots. Imaging of ROS and NO production *in vivo*. *Plant Cell Environ* **29**: 1532-1544

- Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A, **Rodríguez-Serrano M**, Esteban FJ, Fernandez-Ocaña A, Chaki M, Romero-Puertas MC, Valderrama R, Sandalio LM, del Río LA (2006) Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *J Exp Bot* **57**: 1785-1793



**Grupo de Antioxidantes
y Señalización**

Durante toda esta etapa en la EEZ, he pasado por buenos y malos momentos, pero ahora que se va acabando, soy consciente de lo feliz que he sido y sobre todo de lo que he aprendido, tanto de las buenas como de las malas experiencias, ya que creo que en esta vida todo sirve para aprender algo nuevo. Son muchísimas las personas que de una u otra manera me han ayudado y no me gustaría olvidarme de ninguna de ellas, pero si es así, pido disculpas de antemano y gracias a todos.

En primer lugar quiero agradecer a mi directora de Tesis, la Dra. Luisa M^a Sandalio, todo lo que ha hecho por mí, tanto a nivel profesional como personal, por haber sido mi jefa, mi madre y mi amiga, por haberme transmitido sus inquietudes científicas, y en definitiva por ser como es, mil gracias!.

Al Prof. Luís Alfonso del Río, jefe del grupo de investigación y padre de la que ha sido para mí una familia durante estos años, gracias por la confianza, por los buenos consejos y por el tan importante rigor científico.

Al Dr. Francisco J. Corpas, por todo lo que me ha enseñado y por haber creído en mí desde el principio y haberme hecho ver que sí valía para esto.

Al Dr. José M. Palma, por estar siempre dispuesto a ayudar en todo, por su comprensión, por su magnífico humor y por esas largas conversaciones que me han enseñado mucho a todos los niveles.

Al Dr. Manuel Gómez, por ser un gran fisiólogo, por su trabajo con las plantas, por su gran ayuda con la estadística y por estar siempre que lo necesitamos. Desde que te fuiste las cosas no han vuelto a ser lo mismo.

A la Dra. Francisca Sevilla, por haberme convencido para entrar en el maravilloso mundo de la investigación, siempre recordaré esa conversación. Gracias.

A la Dra. María Romero, *mi Mery*, me faltarían folios para agradecerle todo lo que ha hecho por mí, antes y después de irse, siempre pendiente de mi trabajo, mi estado de ánimo y dispuesta a ayudarme. Nunca olvidaré los meses en Verona, no cambies nunca.

A toda la gente del laboratorio: M. Pepa, mi segunda madre, siempre pendiente de cómo estás y dispuesta a animarte; Carmelo, mi consejero espiritual, mi jefe de protocolos, el cuidador de mi espalda y mi gran amigo; Dianita, por esa dulzura y por estar siempre dispuesta a ayudar, gracias y perdona si en algún momento me equivoqué. A Marichu, la nueva adquisición del lab, gracias por tu ayuda y espero que te quedes con nosotros. A toda la gente que ha pasado por el laboratorio en estos años, Rosa, Iva, Ana, Elena, Lara, Marina, etc. gracias por los buenos momentos y por supuesto a Palomita, que aunque no estuvo mucho tiempo, para mí ha sido suficiente para ver lo que vale, gracias y suerte en tu nueva vida.

A todo el grupo de Jaén; a los Dres. Juan B. Barroso y Alfonso Carreras, por su ayuda, por los viajes a Jaén y por su agradable compañía; a Raquel Valderrama, Mounira, Pilar, etc. Por haberme hecho sentir como en casa.

He de agradecer a todos los investigadores del centro que me han ayudado en algún momento, que no han sido pocos, a Silvia, Mariam, Andrés, Pilar, Juanjo, Arancha, M. Dolores, Juande, Adela, Eulogio, M. Jesús, Juan Sanjuán, M. José Soto y D. José por preocuparse por cómo van las cosas y tener siempre una palabra de ánimo. Y agradecer también a Dolo su gran ayuda con el cromatógrafo de gases. Gracias a todos!

Quiero agradecer al Dr. Massimo Delledonne y a toda la gente de su grupo, todo lo que aprendí y disfruté durante mi estancia en Verona; al Dr. Chris Hawes y a todo su grupo el intensivo aprendizaje del confocal y el descubrimiento del maravilloso mundo del movimiento de los orgánulos, durante mi estancia en Oxford y a las Dras. M. Carmen Risueño y Pilar Testillano, así como a todos los miembros del grupo, su inestimable enseñanza y ayuda con la hibridación *in situ*, durante mi estancia en Madrid.

Como no, quiero agradecerles a todos mis compañeros y amigos, el haber estado siempre ahí y por tantos buenos momentos, sin vosotros esto no hubiera sido igual. A Quina, Ana y Mamen, gracias por todo, no sé que hubiera sido de mí sin vosotras, no cambiéis nunca, espero que siempre seamos amigas como ahora, amigas de verdad. Quinita, gracias por haberme abierto los ojos cuando mas cerrados los tenía. A Carmen, compañera de carrera, de piso, de fatigas y de mil fiestas, no dejes nunca de ser fuerte y de ser mi amiga. Y a Beatriz, siempre con esa sonrisa y dando ejemplo de fortaleza. Al resto de amigos y compañeros, os dedicaría a todos una frase, pero sería demasiado largo, todos sabéis que lugar ocupáis en mi corazón y en mi vida, algunos sois amigos de más tiempo, otros de menos y otros compañeros, pero a todos os agradezco vuestra amistad o el simple hecho de cruzar dos palabras, que a veces resultan muy confortables. Raúl, Nieves, Fran, Raquel, M. Carmen, J. Carlos, Anita, Juande, espero que esto que ha empezado no hace mucho, siga subiendo y acabemos siendo grandes amigos, gracias por estos últimos años. A Soco y M. Lorite, así como a sus respectivos, gracias por haber estado siempre ahí y por esas maravillosas charlas, que pienso recuperar en cuanto acabe con esto. A Morad, Sergio, Irene, Salvatore, África, Mónica, Emilio, Lola, Rafa, Antonio, Laura, Rebeca, Antonio, Tesi, Astrid, "One", Helena, y todos los demás gracias por tener aunque solo sea una sonrisa por los pasillos, a veces es más que suficiente y por hacer mejores las comidas. A Patri, Chechu, Amada, J. Angel, Jesusito y Carlos, por todos los buenos momentos vividos, que no han sido pocos, gracias por haber estado ahí. Amada gracias por esas sobremesas al microscopio. Os deseo lo mejor de todo corazón.

A mis últimos amigos, Virtu, Susana y Mamel, por haberme hecho más llevaderos los meses en UK, espero que nunca perdamos el contacto y a Keko, por estar ahí después de tantos años y tantas cosas, prometo poner más de mi parte para que nunca perdamos el contacto.

No puedo terminar esto sin agradecer a todo el personal de la EEZ, lo que ha hecho por mí, Antonio Melgar, Samuel, Jaime, Luís, J. Luís, Tere, Angelines, Salo y todos los demás, a Marisol, siempre tan alegre y tan cariñosa, eres genial. Gracias por estar dispuestos a ayudar. Y como no, a los informáticos, qué haría yo sin ellos, gracias a Javi, Alejandro y por supuesto a Cesar, pobre, todo lo que me ha aguantado, tanto aquí como en GxC, espero que no te encuentres muchas como yo a lo largo de tu vida profesional, sino fuera por tí, probablemente no estaría ahora escribiendo los agradecimientos, sino reescribiendo la tesis, eres un cielo y vales tu peso en oro, gracias, gracias y gracias.

Muchas gracias también a Conchi, Juande y David de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada, por haberme aguantado tantas veces por allí. Y como no, a Nieves, de los Servicios Técnicos de la Universidad de Jaén, por su infinita paciencia durante tantas horas en el confocal, gracias por esas maravillosas imágenes y por tu amistad.

Por último, he de agradecer toda la tesis y todo lo que soy a mi familia, a mis abuelos/as, tíos, primos, a Charo, mi tercera abuela, y demás, gracias por apoyarme en todo lo que he hecho o pensado hacer a lo largo de mi vida. Gracias a Pili y Juanma por ser como mis hermanos y estar ahí al pie del cañón en todo momento y Miguel, espero que tú seas el próximo. Gracias a mis hermanos Antonio, Manolo, Malores y Blanca, gracias por estar siempre

pendientes de “la niña” y por haberme mostrado vuestro apoyo en todo momento. Y a mi Pablito, lo más bonito que ha pasado últimamente, gracias a tus fotos, que me han iluminado muchos días grises, espero que tengas una vida maravillosa.

Y por supuesto a mis padres, sin vosotros jamás hubiera estado aquí, gracias por apostar por mí, gracias por apoyarme en esta aventura, tanto moral como económicamente, todo en mi vida os lo debo a vosotros y me faltarían años para poder agradeceros la mitad de lo que habéis hecho por mí, espero que os sintáis orgullosos de todos nosotros, ya que somos el resultado de toda vuestra dedicación y cariño, aunque lo sabéis de sobra, os quiero.

*"Para que pueda surgir lo posible, es preciso
intentar una y otra vez lo imposible"*

Hermann Hesse

A mis padres

ÍNDICE

	Página
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 El cadmio	1
1.2 Fuentes de contaminación del cadmio	1
1.3 Paso del cadmio a la cadena trófica	3
1.4 Entrada, transporte y acumulación de cadmio	5
1.5 Toxicidad del cadmio	9
1.6 Acumulación del cadmio en plantas	11
1.7 Hiperacumulación y fitoextracción de cadmio	12
1.8 Estrés oxidativo	13
1.8.1 La molécula de oxígeno	13
1.8.2 Especies de oxígeno reactivo (ROS)	14
1.8.2.1 Radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	15
1.8.2.2 Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	16
1.8.2.3 Radical hidroxilo (OH)	16
1.8.2.4 Oxígeno singlete (1O_2)	17
1.8.3 Producción de ROS en sistemas biológicos	17
1.8.4 Toxicidad de especies de oxígeno reactivo (ROS)	20
1.9 Especies de nitrógeno reactivo (RNS)	21
1.9.1 El óxido nítrico en plantas	21
1.9.2 Síntesis de óxido nítrico en plantas	23
1.10 Papel de ROS y NO en la señalización celular	26
1.11 Sistemas antioxidantes	32
1.11.1 Antioxidantes no enzimáticos	32
1.11.2 Antioxidantes enzimáticos	34
1.11.2.1 Superóxido dismutasas	34
1.11.2.2 Catalasa	35
1.11.2.3 Enzimas del ciclo Ascorbato-Glutation	35
1.11.2.4 NADP deshidrogenasas	39

	Página
1.11.2.5 Otras peroxidases	40
1.11.2.6 Glutathion-S-transferasas	40
1.11.2.7 Tiorredoxinas	40
1.11.2.8 Peroxirredoxinas	41
1.12 Peroxisomas	42
1.12.1 Principales funciones metabólicas	42
1.12.1.1 β -Oxidación de Ácidos Grasos	43
1.12.1.2 Ciclo del glioxilato	45
1.12.1.3 Fotorrespiración	45
1.12.1.4 Metabolismo de los ureidos	47
1.12.2 Especies de oxígeno reactivo, nitrógeno reactivo y sistemas antioxidantes	47
1.12.3 Movimiento de peroxisomas	50
2 OBJETIVOS	54
3 MATERIAL Y MÉTODOS	58
3.1 Material vegetal y condiciones de cultivo	61
3.1.1 Plantas de guisante (<i>Pisum sativum</i> L. cv Lincoln)	61
3.1.2 Plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	62
3.1.3 Recolección y preparación de las muestras vegetales	64
3.1.4 Determinación de actividad fotosintética	64
3.1.5 Diseño estadístico y análisis de resultados	65
3.2 Preparación de homogenados	65
3.3 Aislamiento y purificación de peroxisomas	65
3.3.1 Gradientes de Sacarosa	65
3.3.2 Gradientes de Percoll	66
3.4 Determinación de proteínas totales	67
3.5 Desarrollos electroforéticos	67
3.5.1 Electroforesis en geles de Poliacrilamida en condiciones nativas (EGPA)	67

3.5.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (EGPA-SDS) -----	68
3.5.3 Electroforesis bidimensional -----	68
3.5.4 Tinción de Proteínas en geles de poliacrilamida -----	69
3.5.4.1 Tinción con Azul Coomassie -----	69
3.5.4.2 Tinción con plata -----	69
3.5.4.3 Tinción con Sypro -----	69
3.6 Transferencia de proteínas e inmunodetección (técnica de Western) -----	70
3.6.1 Transferencia de Proteínas -----	70
3.6.2 Inmunodetección -----	70
3.7 Análisis de proteínas nitrosiladas: S-nitrosilación -----	71
3.8 Análisis de proteínas fosforiladas -----	72
3.8.1 Tinción con ProQ-Diamon -----	73
3.9 Determinación de actividades enzimáticas -----	74
3.9.1 Superóxido Dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1) -----	74
3.9.1.1 Actividad en Solución -----	74
3.9.1.2 Actividad en Geles de Poliacrilamida -----	75
3.9.2 Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6) -----	75
3.9.3 Glicolato oxidasa -----	76
3.9.4 Peroxidasa Total -----	76
3.9.5 Glutation Reductasa (GR; EC 1.6.4.2) -----	76
3.9.6 S-Nitrosoglutatión reductasa -----	77
3.9.6.1 Actividad en solución -----	77
3.9.6.2 Actividad en Geles de Poliacrilamida -----	77
3.10 Análisis de peróxido de hidrógeno -----	78
3.11 Determinación de grupos carbonilo -----	78
3.12 Determinación de glutatión -----	79
3.13 Determinación de ácido ascórbico -----	80

	Página
3.14 Peroxidación lipídica -----	80
3.15 Determinación de etileno -----	81
3.16 Determinación de ácido salicílico y ácido jasmónico -----	81
3.17 Microscopía electrónica -----	82
3.17.1 Preparación de muestras para citoquímica de H ₂ O ₂ -----	82
3.17.2 Inmunolocalización de proteínas por marcaje con oro coloidal -----	83
3.18 Microscopía laser confocal -----	83
3.18.1 Visualización de H ₂ O ₂ , O ₂ ⁻ y NO -----	83
3.18.2 Estudio de movimiento de peroxisomas -----	86
3.19 Microscopía de fluorescencia -----	87
3.20 Detección de muerte celular -----	87
3.21 Aislamiento de RNA total y DNA plasmídico -----	87
3.22 Transcripción inversa -----	88
3.23 Diseño y síntesis de oligonucleótidos para la obtención de cDNAs -----	88
3.24 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) -----	89
3.25 Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa -----	89
3.26 Ligación de fragmentos de DNA en vectores de clonación -----	89
3.26.1 pGEMT [®] -----	90
3.26.2 Directional –TOPO -----	90
3.27 Preparación de células competentes -----	90
3.28 Transformación de bacterias competentes y aislamiento de plásmidos recombinantes -----	91
3.29 RT-PCR Semicuantitativa -----	93
3.30 Hibridación <i>in situ</i> -----	94
3.30.1 Obtención de la sonda RNA marcada con digoxigenina -----	94
3.30.2 Preparación de las muestras -----	96
3.30.3 Obtención de criocortes -----	96
3.30.4 Deshidratación-Rehidratación -----	96

	Página
3.30.5 Hibridación	97
3.30.6 Inmunodetección de los híbridos por microscopía de fluorescencia	97
3.31 Obtención de mutantes de <i>Arabidopsis</i>	97
3.31.1 Obtención de mutantes deficientes en GOX	99
3.31.2 Obtención de mutantes GFP-SKL	101
3.31.3 Transformación de <i>Agrobacterium</i>	102
3.31.4 Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> mediante “Dipping” o inmersión	103
3.31.5 Selección de plantas transformadas	104
4 RESULTADOS	105
4.1 EFECTO DEL CADMIO SOBRE RAÍCES DE GUISANTE	107
4.1.1 Crecimiento, morfología y estructura de la raíz	107
4.1.2 Estudio de parámetros oxidativos en raíces de plantas de guisante	108
4.1.2.1 Antioxidantes enzimáticos	108
4.1.2.2 Antioxidantes no enzimáticos	110
4.1.2.3 Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	111
4.1.2.4 Daños oxidativos a macromoléculas	111
4.1.3 Visualización de la producción de ROS y NO	112
4.1.3.1 Producción de O ₂ ⁻	112
4.1.3.2 Producción de H ₂ O ₂	115
4.1.3.3 Producción de NO	118
4.1.4 Detección de muerte celular en raíces tratadas con Cd	120
4.1.5 Niveles de etileno (ET), ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA)	121
4.2 EFECTO DEL CADMIO SOBRE HOJAS DE GUISANTE	122
4.2.1 Efecto del cadmio sobre sistemas antioxidantes	122
4.2.2 Efecto del cadmio sobre la producción de ROS y NO	123
4.2.2.1 Producción de O ₂ ⁻	123
4.2.2.2 Producción de H ₂ O ₂	125

	Página
4.2.2.3 Producción de NO	127
4.2.3 Determinación de la actividad <i>S</i> -nitrosoglutation reductasa	129
4.2.4 Efecto del Cadmio sobre el patrón de proteínas fosforiladas	131
4.2.5 Niveles de etileno (ET), ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA)	132
4.2.6 Expresión de proteínas de defensa	133
4.2.6.1 Expresión de PrP4a mediante hibridación <i>in situ</i>	134
4.2.7 Efecto del calcio sobre la respuesta de la hoja al estrés por cadmio	136
4.2.7.1 Efecto del calcio sobre la producción de O ₂ ⁻ y NO	136
4.2.7.2 Efecto del calcio sobre la expresión de CuZn-SOD	139
4.2.7.3 Efecto del camdio y del calcio sobre mutantes de <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i> deficientes en NADPH oxidasa(DF)	139
4.2.7.3.1 Producción de O ₂ ⁻	140
4.2.7.3.2 Expresión de proteínas de defensa y antioxidantes	141
4.3 ESTUDIOS EN PEROXISOMAS	142
4.3.1 Efecto del cadmio sobre la <i>S</i> -nitrosilación de proteínas en peroxisomas de hojas de guisante	142
4.3.2 Movimiento de peroxisomas de hojas de <i>Arabidopsis</i> en situaciones de estrés por cadmio	144
4.4 CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE DEFICIENTES EN GLICOLATO OXIDASA	148
4.4.1 Mutantes Goxi-I	148
4.4.1.1 Porcentaje de germinación	149
4.4.1.2 Peso fresco de la parte aérea	150
4.4.1.3 Longitud de la raíz	150
4.4.1.4 Tiempo de floración	151
4.4.1.5 Actividad glicolato oxidasa	151
4.4.1.6 Acitividad fotosintética	151
4.4.2 Mutantes GFP	152
5 DISCUSIÓN	155

INTRODUCCIÓN

1.1 EL CADMIO

El cadmio (Cd) fue descubierto por Friedrich Strohmeyer en 1817. Es un elemento de color blanco plateado y elevada densidad, lo que hace que se incluya dentro del grupo de los metales pesados (Cabot y col., 1988a). El cadmio pertenece al grupo del Zn en la tabla periódica y presenta un estado de oxidación ordinario de tipo II, correspondiente a la pérdida de dos electrones de su última capa. Es un elemento muy electronegativo lo que le da carácter reductor. Es capaz de formar complejos con una gran variedad de ligandos, fundamentalmente con donadores débiles como el azufre, nitrógeno y selenio. Interacciona así con grupos sulfhidrilos de la cisteína, siendo esta interacción la más importante de este metal con los constituyentes bioquímicos (Cabot y col., 1988b; Wagner, 1993). El cadmio es uno de los metales pesados que atrae mayor atención por su potencial toxicidad para el hombre ya que se acumula en suelo, pasa a plantas y animales y finalmente a humanos.

El cadmio es un elemento no esencial, poco abundante en la corteza terrestre. La presencia excesiva del mismo en la atmósfera, el agua y el suelo puede causar serios problemas en todos los organismos vivos.

1.2 FUENTES DE CONTAMINACIÓN DE CADMIO

La contaminación ambiental por metales es cada vez mayor como consecuencia del aumento de la actividad industrial que ha tenido lugar a finales del siglo XX y principios del siglo XXI. Estos contaminantes, derivados de un creciente número de diversos factores antropogénicos, han afectado progresivamente a los diferentes ecosistemas (Pinto y col., 2004).

Entre los factores antropogénicos como fuente de contaminación de cadmio, cabe destacar los siguientes:

Emisiones atmosféricas: Su origen son fundamentalmente las minas de metales, las emisiones industriales, la incineración de basuras sólidas municipales y la combustión del carbón. El cadmio se encuentra suspendido en el aire principalmente en forma de óxido, sulfuros, sulfatos y cloruros (Jensen y Bro-Rasmussen, 1992) y más tarde se deposita sobre el suelo y las plantas. Una de las principales fuentes de emisiones

atmosféricas del cadmio, son las minas metalúrgicas, que lo emiten en forma particulada y soluble. Aunque la explotación del cadmio no es viable desde el punto de vista económico, este metal se obtiene generalmente como subproducto del Zn o bien como metal acompañante del Pb, del Cu y de otros metales (McLaughlin y Singh, 1999). Por otro lado, el cadmio es usado en procesos industriales como son: protección del hierro, acero y otros metales frente a la corrosión, pigmentos para cristales, esmaltes, pinturas y plásticos, estabilizadores para plásticos, producción de insecticidas y baterías de Ni-Cd. Además, el Cd está presente en residuos que contienen Zn (gomas y neumáticos de coches). Por tanto, también se producen emisiones de Cd a la atmósfera como resultado de procesos industriales y residuos urbanos. La emisión de Cd debido a las incineradoras municipales de residuos sólidos también aumenta de modo significativo el contenido de este metal en la atmósfera (McLaughlin y Singh, 1999).

Depósitos directos: El uso de fertilizantes, especialmente los fosfatados que contienen hasta 300 mg Cd kg⁻¹ (Fergusson, 1990) son la fuente principal de contaminación de Cd en suelos agrícolas. El hecho de que este metal se incorpore a la cadena trófica y pueda llegar al hombre suponiendo un riesgo para su salud, ha obligado a imponer límites a la hora de utilizar fertilizantes fosfatados en suelos agrícolas que varían entre 35 y 450 mg Cd kg⁻¹ (Mortvedt, 1996). Otro factor que contribuye a los depósitos directos son los fangos procedentes del tratamiento de aguas residuales para su posterior utilización en tierra o para su eliminación por incineración o vertido al mar. Dependiendo de las aguas de las que proceda y su posterior tratamiento, la concentración de cadmio en estos fangos puede variar desde 1 hasta 3,41 g kg⁻¹. Dado su alto contenido en N y P, aparte de la materia orgánica que puede beneficiar la estructura del suelo, estos fangos se están utilizando últimamente en agricultura, aunque con sus limitaciones por el alto contenido en metales pesados (Alloway y Steinnes, 1999).

Contaminación Accidental: Este proceso ocurre eventualmente debido a la contaminación de tierras por procesos industriales, residuos de la minería o corrosión de estructuras metálicas galvanizadas. Un ejemplo son los vertidos de Aznalcóllar en 1998 que llegaron a alcanzar 40 km de extensión entre los ríos Agrio y Guadiamar, en la

provincia de Sevilla (informe de La Junta de Andalucía, Consejería de Medio Ambiente, 1999). Como consecuencia de ello, resultaron degradados todos los hábitats que conformaban el cauce y sus riberas. Las pérdidas agrícolas calculadas fueron del orden de 11 millones de Euros, y además resultaron afectados todos los aprovechamientos primarios que se desarrollaban en la zona, con una paralización inmediata de la actividad minera, supresión de la agricultura, eliminación de las cosechas y prohibición de la pesca y la caza. El accidente minero de Aznalcóllar no ha sido el único de los que han ocurrido en las últimas décadas en el mundo, lo que pone en evidencia la necesidad de mejorar las medidas de seguridad, prevención y los análisis de riesgos ecológicos de las explotaciones mineras. La figura 1.1 muestra una distribución de la contribución relativa de las distintas fuentes de cadmio anteriormente mencionadas, a la exposición del hombre.

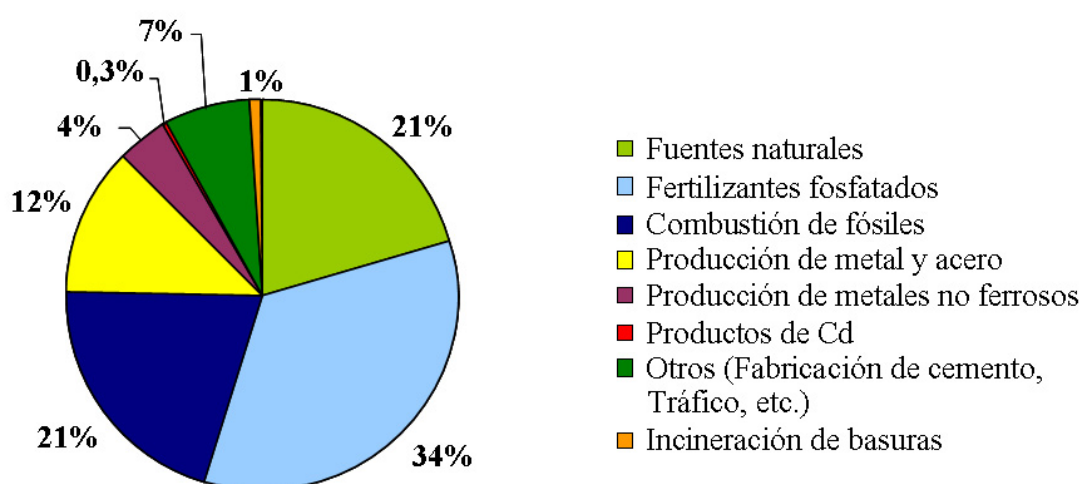


Figura 1.1: Contribución relativa de las diferentes fuentes ambientales de emisión de cadmio. Tomado de la presentación para la LR/UNECE-LRTP Heavy Metals 16-03-05 (Comisión Económica de las Naciones Unidas para Europa - Contaminación Transfronteriza del Aire de Larga Distancia por metales pesados)

1.3 PASO DEL CADMIO A LA CADENA TRÓFICA

La principal fuente de consumo de cadmio en el ser humano son los alimentos de origen vegetal (Norvell y col., 2000). El cadmio ingresa en la cadena trófica desde el suelo produciéndose fenómenos de bioacumulación y biomagnificación. Químicamente,

el cadmio se puede encontrar disuelto en el suelo, absorbido en superficies orgánicas e inorgánicas, dentro de minerales, precipitado con otros compuestos del suelo o incorporado a estructuras biológicas. Sin embargo la biodisponibilidad del cadmio presente en el suelo para la planta, depende de numerosos factores físicos, químicos y biológicos que modifican la solubilidad y el estado de este metal en el suelo, especialmente en la rizosfera (Helmke, 1999; Christensen y Haung, 1999). Uno de los principales responsables de la disponibilidad del cadmio para la planta, es el pH del suelo, ya que la capacidad de absorción del cadmio disminuye considerablemente a pH básico (Jensen y Bro-Rasmussen, 1992), también influyen el contenido en arcillas, el potencial redox, el contenido en materia orgánica, la temperatura y el contenido en agua y otros ligandos. La presencia en el suelo de otros cationes, como el Cu, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn y Ni, también afectan a la biodisponibilidad del cadmio (Clarkson y Lüttge, 1989; Rivetta y col., 1997).

Es importante destacar el tipo de cultivo del que se trate, ya que no todas las plantas acumulan Cd en igual medida. Así, serán relevantes para el paso del cadmio a la cadena trófica aquellas plantas capaces de acumular cantidades de cadmio tóxicas para humanos y animales, pero no fitotóxicas (Prince y col., 2002). En la figura 1.2 se muestra la sensibilidad de distintas especies vegetales a este metal. También es importante la actividad de la raíz en la entrada de Cd en la planta, siendo dependiente del flujo de protones, extrusión de compuestos reductores, actividad de NADPH-reductasas y de ATPasas de la membrana plasmática, extrusión de ácidos orgánicos o aminoácidos no proteicos y absorción de macro y micronutrientes (Salt y col., 1995a; Gries y Wagner, 1998; Cabot y col., 1988b). Por último hay que tener en cuenta la implicación de microorganismos asociados que influyen en la entrada de cadmio a la planta (McLaughlin y Singh, 1999).

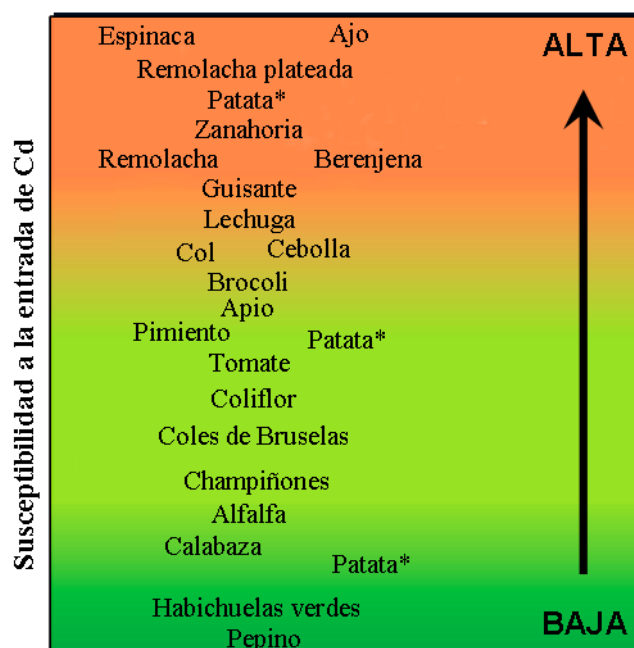


Figura 1.2: Susceptibilidad de algunos cultivos vegetales a la entrada de Cd. (*Variedades específicas de patata). Tomado de Managing Cadmium in Vegetables. VEGEnotes, Julio 2003.

1.4 ENTRADA, TRANSPORTE Y ACUMULACIÓN DE CADMIO

En los últimos diez años se han publicado numerosos trabajos destinados a elucidar la entrada de cadmio en la planta. Es bien conocido que un exceso de cationes esenciales como el Zn^{2+} y el Ca^{2+} , producen un efecto protector frente a la toxicidad del cadmio (Aravind y Prasad, 2005), lo que sugiere la existencia de una competencia de estos cationes por la entrada a la planta. Como el Cd no es un metal esencial, se asume que no existen mecanismos de entrada a la planta específicos para el mismo. Esto se observó en *Saccharomyces cerevisiae*, donde tras la clonación de la proteína LCT1 de *Triticum sativum*, implicada en la entrada de calcio, se produjo hipersensibilidad al cadmio (Clemens y col., 1998), por lo tanto esta proteína sería responsable de la entrada de cadmio, hasta el momento, solo en plantas de *Triticum*, ya que no se ha identificado ningún gen homólogo a LCT1 en *Arabidopsis thaliana* Perfus-Barbeoch y col., (2002), han demostrado la implicación de los canales de Ca^{2+} en la entrada del Cd^{2+} en las células guarda. Otro transportador implicado en la entrada de Cd es el IRT1 de *Arabidopsis*, perteneciente a la ubicua familia de transportadores de metales ZIP (ZRT1/IRT1)

(Guerinot y col., 2000), ahora denominados SLC39 (Eide, 2004). El IRT1 es el principal sistema de entrada del Fe^{2+} en raíces de *Arabidopsis* (Vert y col., 2002), si bien en *Saccharomyces* también se ha demostrado la implicación de este transportador en la entrada de Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} y Cd^{2+} (Korshunova y col., 1999). La sobreexpresión del gen IRT1 en plantas de *Arabidopsis*, producía acumulación de Zn^{2+} y Cd^{2+} en raíces, cuando la concentración de Fe^{2+} en el medio era baja (Connolly y col., 2002). Existen otros transportadores ZIP de *Arabidopsis* implicados en la entrada del Cd^{2+} , como ZIP1, ZIP2 y ZIP3, que en *Saccharomyces* están parcialmente bloqueados por el Cd^{2+} (Grotz y col., 1989). Otra familia de transportadores potencialmente implicada en la entrada de Cd^{2+} , es la Nramp (Thomine y col., 2000) La sobreexpresión de Nramp3 en *Arabidopsis* produce hipersensibilidad al Cd^{2+} (Thomine y col., 2000). Posteriormente se demostró que este gen se localizaba en la membrana de la vacuola, por lo que probablemente estará implicado en la movilización del metal y no en la entrada del mismo (Thomine y col., 2003).

Una vez en la célula, el Cd^{2+} , como la mayoría de los iones metálicos de transición, se unirá preferentemente a donadores de N y S, de grupos funcionales de macromoléculas y ligandos de bajo peso molecular que están presentes de forma constitutiva o bien se sintetizan en respuesta al Cd^{2+} . De esta forma los complejos Cd^{2+} -ligando pueden ser transportados a vacuolas u otros orgánulos celulares (Frausto da Silva y Williams, 2001).

El Cd^{2+} se acumula preferentemente en la raíz, y sólo una pequeña parte es transportada y se acumula en orden decreciente en tallos, hojas, frutos y semillas (Blum, 1997). La mayor parte del Cd es secuestrado en la vacuola de las células de la raíz. En células de levadura se ha demostrado que entra a la vacuola unido a PCs a través de un transportador de tipo ABC (Ortiz y col., 1992, 1995). Otro posible mecanismo de entrada del cadmio en la vacuola es mediante un simporte $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^+$ a través del tonoplasto (Salt y Wagner, 1993). Los intercambiadores de cationes CAX están implicados en el transporte de Ca^{2+} a la vacuola, actuando como antiporte $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Park y col., 2005). CAX2 y CAX1 de *Arabidopsis* transportan además otros metales, entre ellos el Cd^{2+} (Park y col., 2005).

Una vez en la raíz puede pasar al xilema a través del apoplasto y/o simplasto formando complejos. Mediante estudios de espectroscopía de absorción de rayos X se ha visto que, en raíces de *Brassica juncea* el cadmio está coordinado con ligandos de S (Salt y col., 1995b). Otros ligandos de unión del cadmio en plantas y algas son el glutatión (GSH), así como péptidos derivados del GSH denominados fitoquelatinas (PCs), y ácidos orgánicos como el citrato (Domínguez-Solis y col., 2004). Las PCs se sintetizan en respuesta a la exposición de varios iones metálicos. Presentan una estructura general $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ($n = 2-11$) y son sintetizadas a partir del GSH mediante una reacción catalizada por la fitoquelatina sintetasa (PCS) (Cobbett, 2000; Benavides y col., 2005). Estudios *in vitro* con extractos crudos y la enzima parcialmente purificada, muestran que la PC sintasa es estrictamente dependiente de la presencia de iones metálicos en el medio de reacción (Grill y col., 1989). En presencia de exceso de metales, se sintetizan PCs y estas capturan eficientemente los metales.

Otras posibles moléculas responsables de la acumulación del cadmio son la metalotioneínas (MTs), pequeñas proteínas ricas en cisteína. Si bien en plantas, estas moléculas no son las principales responsables de la desintoxicación del cadmio como ocurre en células animales (Hamer, 1986), se ha visto que confieren tolerancia al cadmio cuando se expresan en *Saccharomyces*. En algunas plantas se han encontrado genes que codifican para MTs que están regulados positivamente por exceso de metales (Cobbett y Goldsbrough, 2002; Rauser, 1999).

Por último, la eficiente translocación del metal al tallo requiere un paso radial por el simplasto, una carga activa en el xilema y la disponibilidad de ligandos adecuados en el mismo (Clemens y col., 2002). Hay evidencias de que el Cd compite con el Zn en la acumulación en el tallo, lo que sugiere que deben entrar por el mismo sitio. En *Triticum*, un exceso de Zn en el medio altera notablemente la proporción de Cd en tallo (Green y col., 2003). Los componentes esenciales en el camino de desplazamiento de los metales, son los ligandos móviles en el citoplasma y en el xilema, así como el bombeo de metales de células de la raíz al xilema. Datos de espectroscopía de absorción de rayos x sugieren que el cadmio se une a grupos tioles en células de la raíz y a ligandos de

oxígeno o nitrógeno en el xilema (Salt y col., 1995a). También existen pruebas indirectas de la implicación de PCs en el transporte de cadmio de la raíz al tallo, la expresión de una PC sintasa (TaPCS-1) bajo el control de un promotor específico de raíz, en mutantes de *Arabidopsis* deficientes en PCs, produjo la aparición de Cd en el tallo y una reducción de los niveles de Cd en la raíz, sugiriendo un transporte de Cd a larga distancia de la raíz al tallo mediante PCs (Gong y col., 2003). Además, la expresión de dicho gen bajo el control de un promotor específico del tallo, puso de manifiesto que el transporte de Cd unido a PCs también tenía lugar del tallo a la raíz (Chen y col., 2006). Estos resultados sugieren la participación de PCs en el transporte de Cd a larga distancia, aunque no excluye la existencia de otros mecanismos de transporte (Chen y col., 2006).

El paso del metal desde el citosol de células de la raíz a los haces vasculares, requiere un transporte de los iones metálicos y/o la unión de los mismos a ligandos con los cuales atraviesen la membrana. Un buen candidato para este transporte es una ATPasa tipo P de la subfamilia Ib (HMAs) (Axelsen y Palmgren, 2001). La familia HMA se subdivide en dos grupos, bombas de transporte Cu/Ag y bombas de transporte de Zn/Cd/Co/Pb. Las plantas expresan ambos tipos de proteínas. En *Arabidopsis*, la familia HMA está compuesta por cuatro miembros, el 2 y el 4 son imprescindibles para el transporte de Zn a la parte aérea (Hussain y col., 2004). Ambos transportadores se localizan en el tejido vascular. La sobreexpresión de AtHMA4 produce un aumento de los niveles de Zn y Cd en las hojas, lo que sugiere que estas bombas pueden utilizar el Cd^{2+} como segundo sustrato (Verret y col., 2004). En la figura 1.3 se muestra un esquema de la entrada del cadmio a través de las células de la raíz, hasta llegar al xilema.

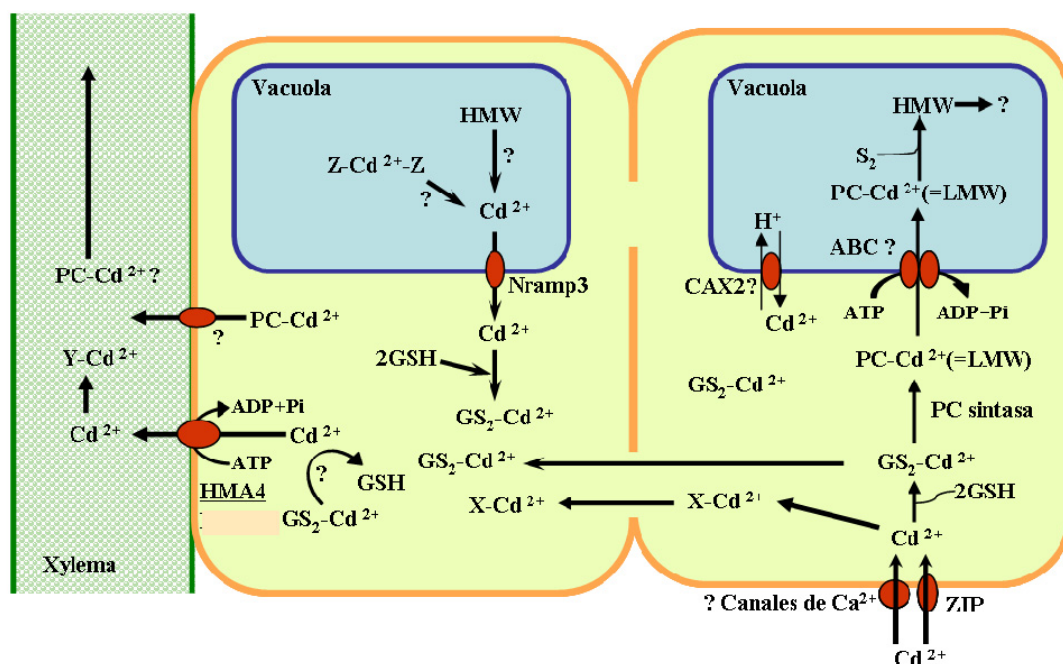


Figura 1.3: Representación esquemática de los mecanismos de entrada, secuestro y translocación del Cd en raíces (Clemens, 2006). Aparecen representadas dos células, la de la derecha, en contacto con la rizosfera, y la adyacente está en contacto con el xilema. La capacidad de secuestro del metal en las células de la raíz juega un papel clave en la determinación del rango de translocación del mismo a la parte aérea. Otro factor importante es la accesibilidad y movilización del metal secuestrado, la eficiencia del paso radial por el simplasto y a través de la endodermis, y por último el flujo desde las células del parénquima del xilema al xilema. Abreviaturas: GSH; glutation, posible ligando del Cd, con el que formaría el complejo bisglutatonato-Cd (GS_2-Cd^{2+}). PC, fitoquelatina; CAX2, posible proteína de *Arabidopsis*, responsable del antiporte H^+/Cd^{2+} ; ABC, transportador de tipo ABC; HMA4, posible bomba de Cd de *Arabidopsis*; ZIP, transportadores ZIP; Nrapm3, transportador de la familia Nrapm; HMW y LMW, complejo Cd-PC de elevado y bajo peso molecular respectivamente.

1.5 TOXICIDAD DEL CADMIO

Los efectos tóxicos del cadmio sobre los sistemas biológicos, han sido ampliamente estudiados (Obata y Umebayashi, 1997; Das y col., 1997; Sanitá di Toppi y Gabrielli, 1999; Seregein e Ivanov, 2001), sin embargo los mecanismos de la toxicidad del cadmio, aún no se conocen completamente. El cadmio puede alterar la entrada de minerales en la planta, bien por el efecto que ejerce sobre la disponibilidad de los mismos en el suelo, o bien por la reducción de microbios del suelo (Moreno y col., 1999). Las plantas expuestas a suelos contaminados con cadmio presentan modificaciones en la apertura

estomática, la fotosíntesis y transpiración. (Sanitá di Toppi y Gabbrielli, 1999; Sandalio y col., 2001; Seregein e Ivanov, 2001). Uno de los síntomas más visibles de la toxicidad por cadmio es la clorosis. La clorosis puede aparecer por una deficiencia en hierro (Keller y Hammer, 2004; Benavides y col., 2005), deficiencia de fosfato o reducción del transporte de Mn (Goldbol y Hutterman, 1985). En general el Cd interfiere en la planta en la entrada, transporte y utilización de gran cantidad de elementos esenciales (Ca, Mg, P y K) y del agua, provocando desequilibrios nutricionales e hídricos (Das y col., 1997; Sandalio y col., 2001). El Cd también reduce la absorción de nitratos y el transporte de los mismos de la raíz al tallo, mediante la inhibición de la actividad nitrato reductasa en tallos (Gouia y col., 2000). La fijación de nitrógeno y la primera asimilación de amonio, disminuye en nódulos de plantas de *Glycine max* tratadas con Cd (Balestrasse y col., 2003). La toxicidad por este metal puede afectar a la permeabilidad de la membrana plasmática, causando una alteración del balance de agua (Barceló y col., 1986; Poschenrieder y col., 1989; Singh y Tewari, 2003). El tratamiento con cadmio produce una reducción de la actividad ATPasa de la membrana plasmática, (Fodor y col., 1995; Astolfi y col., 2005), produciendo también, alteraciones en la funcionalidad de la membrana plasmática por un aumento en la peroxidación lipídica (Fodor y col., 1995; Sandalio y col., 2001) y desequilibrios en el metabolismo del cloroplasto, inhibiendo la síntesis de clorofila y reduciendo la actividad de enzimas implicadas en la fijación de CO₂ (Ali y col., 2000; Maksymiec y col., 2007).

La toxicidad por metales pesados se debe en parte a un estrés oxidativo, como consecuencia de la generación de especies de oxígeno reactivo (ROS) a través de diferentes mecanismos, dependiendo del metal de que se trate (Stohs y Bagchi, 1995). El Cd²⁺, Pb²⁺ y el Hg²⁺, son metales que no experimentan cambios redox y por tanto, a diferencia del Fe²⁺ o Cu²⁺, no actúan directamente en la generación de ROS, sin embargo, pueden actuar como prooxidantes a través de la reducción del GSH, necesario tanto para la síntesis de PCs como para la defensa frente a daños oxidativos (Pinto y col., 2003). Este estrés oxidativo se manifiesta por daños oxidativos a membranas y proteínas y va acompañado de alteraciones de los sistemas antioxidantes de defensa celular. La activación o inhibición de enzimas antioxidantes, no depende únicamente de

la intensidad o duración del estrés, sino que también varía en función del tipo de tejido y la edad de la planta (Sgherri y col., 2001). El tratamiento con Cd produce la estimulación de la peroxidación lipídica en *Pisum sativum* (Lozano-Rodríguez y col., 1997; Dalurzo y col., 1997; Sandalio y col., 2001; Dixit y col., 2001; Metwally y col., 2005), en diferentes genotipos de *Hordeum vulgare* (Wua y col., 2003), en semillas y discos foliares de *Helianthus annuus* (Groppa y col., 2001; Gallego y col., 1996), en semillas de *Arabidopsis* (Cho y Seo, 2004) y nódulos de *Glycine max* (Balestrasse y col., 2004). También se han descrito daños oxidativos a proteínas por formación de radicales carbonilo, en plantas de guisante cultivadas con Cd (Romero-Puertas y col., 2002). Las actividades antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GR), ascorbato peroxidasa (APX), peroxidasa (POD) y la catalasa (CAT) experimentan reducciones o incremento de su actividad en función de la concentración de cadmio a la que son expuestas, la duración del tratamiento y del tipo de planta utilizada (Wua y col., 2003; Sandalio y col., 2001; Metwally y col., 2003, 2005; Gallego y col., 1996; Balestrasse y col., 2003). En hojas de *Helianthus*, el cadmio disminuye el contenido de GSH y disminuye o aumenta las actividades SOD, CAT, APX, GR y DHAR dependiendo de la concentración de cadmio, el tejido y la edad de la planta (Gallego y col., 1996, Groppa y col., 2001). El tratamiento con cadmio induce la actividad lipooxigenasa y la inhibición de la SOD y la CAT (Somashekaraiyah y col., 1992). En particular, la actividad CAT, con frecuencia disminuye a elevadas concentraciones de Cd (Shim y col., 2003; Dalurzo y col., 1997; Sandalio y col., 2001; Fornaizer y col., 2002). Por otro lado las actividades CAT, GR y SOD aumentaban en hojas y raíces de una variedad de *Raphanus sativus* resistente al Cd (Victoria y col., 2001).

1.6 ACUMULACIÓN DEL CADMIO EN PLANTAS

En general, la acumulación del metal en la planta depende de la capacidad de entrada del mismo y de la existencia de sitios de unión dentro de las células. En cualquier caso, la concentración y afinidad de moléculas quelantes de metales así como la selectividad de los transportadores, afectan a la acumulación del metal dentro de la planta (Clemens y col., 2002). Las estrategias para evitar la toxicidad del metal son diversas. La primera

barrera frente al Cd, se localiza a nivel de la raíz, mediante la inmovilización del metal por medio de la pared celular (Nishizono y col., 1989) y carbohidratos extracelulares como son el mucílago y la calosa (Verkleij y Schat, 1990; Wagner, 1993). En raíces y hojas del *Vigna sinensis*, los iones Cd parecen ser inmovilizados en las moléculas de peptina y grupos histidina de la pared celular (Leita y col., 1996). Sin embargo, la importancia de estos mecanismos puede variar en función de la concentración de cadmio suministrada, del tiempo de exposición, de la especie vegetal, etc. (Sanità di Toppi y Gabbrielli, 1999). La prevención de la entrada de Cd al citoplasma de las células a través de la membrana plasmática, a través de la exclusión de los cationes de la pared celular, sería, teóricamente, el mejor mecanismo de defensa. Otro mecanismo utilizado por algunas plantas consiste en la acumulación del metal en los tricomas de la superficie foliar, como ocurre en *Brassica* (Salt y col., 1995a). En definitiva, existen numerosos mecanismos de acumulación y tolerancia al cadmio, que difieren en los distintos tipos vegetales, en donde pueden coexistir todos o algunos de ellos.

1.7 HIPERACUMULACIÓN Y FITOEXTRACCIÓN DE CADMIO

Las plantas hiperacumuladoras son, en muchos casos, endémicas de suelos naturalmente ricos en metales pesados. El contenido en Cd de las plantas hiperacumuladoras es aproximadamente 100 veces mayor, que en plantas no hiperacumuladoras cultivadas en las mismas condiciones (Brooks, 1998). Hasta la fecha, sólo se conocen dos hiperacumuladores de Cd, ambos miembros de la familia Brassicaceae, *Arabidopsis halleri* y *Thlaspi caerulescens* (Dahmani-Müller y col., 2000; Lombi y col., 2000). Diferentes autores han propuesto aprovechar la característica inusual de estas plantas para la limpieza de terrenos contaminados (Baker y col., 1994; Raskin y col., 1997; McGrath 1998). Sin embargo, la restricción principal de este tipo de fitoextracción es la pequeña biomasa de estas plantas. Es por ello, que se ha potenciado la investigación sobre cómo aumentar la producción de su biomasa para utilizarlas en la descontaminación de suelos. El híbrido obtenido como resultado del cruce entre *T. caerulescens* y *Brassica napus*, presenta mayor biomasa que *T. caerulescens*, además de acumular Zn y Cd en niveles que resultarían tóxicos para *B. napus*, pero por debajo de los niveles comúnmente asociados

con la hiperacumulación (Brewer y col., 1999). Otra posibilidad es usar la ingeniería genética para conferir las características de hiperacumulación a plantas con elevada biomasa (Krämer y Chardonnens, 2001; Pilon-Smits y Pilon, 2002). Sin embargo, los mecanismos básicos responsables de la hiperacumulación aún no se conocen completamente, lo cual limita la aplicación de técnicas de ingeniería genética. No obstante, aunque la ingeniería genética podría ser la forma más rápida de obtención de plantas eficientes para la fitoextracción, su uso y su liberación en el medio ambiente, está todavía restringido en muchos países. Existen plantas que acumulan metales en menor proporción que las hiperacumuladoras, pero que presentan mayor biomasa (McGrath, 1998), como *Nicotiana tabacum*, *Helianthus annuus*, *B. juncea* y algunas especies de *Zea mays*. Estas plantas acumuladoras, pueden ser utilizadas en suelos contaminados para fitoestabilizar la contaminación, mediante la reducción del Cd producido por la lixiviación o la erosión del terreno (Vangronsveld y Cunningham, 1998; Rosselli y col., 2003).

1.8 ESTRÉS OXIDATIVO

1.8.1 La molécula de oxígeno

La atmósfera terrestre actual contiene un 21% de oxígeno molecular (O_2). Las principales trazas de O_2 aparecieron en nuestra atmósfera hace aproximadamente 2500 millones de años, debido a la actividad fotosintética de las algas verde-azuladas (Halliwell y Gutteridge, 2000). El aumento de la cantidad de oxígeno atmosférico permitió el desarrollo de una capa estratosférica de ozono (O_3) protectora frente a la acción de rayos ultravioletas, que favoreció la colonización terrestre de parte de los seres vivos que en un principio habitaban en medios acuáticos. Desde que estos organismos colonizaron la tierra, han tenido que evolucionar con el incremento del nivel de oxígeno, desarrollando formas más sofisticadas metabólicamente, capaces de obtener energía a través de cadenas de transporte electrónico, cuyo último aceptor es el O_2 , así como capaces de defenderse de la propia toxicidad del oxígeno, mediante el desarrollo de diferentes sistemas antioxidantes (Noctor y col., 2000).

1.8.2 Especies de oxígeno reactivo (ROS)

Para los organismos aeróbicos actuales, la toxicidad del oxígeno no se debe tanto al efecto directo que puede ejercer sobre determinadas enzimas, a las que puede inactivar, sino a la formación de especies de oxígeno reactivo (ROS). Algunas ROS son intermediarios de la reducción del oxígeno molecular (Fig. 1.4) y se generan tanto por actividades fisiológicas normales, como la respiración, como por otras situaciones, tales como la respuesta frente a la infección, el metabolismo de agentes químicos y las reacciones catalizadas por metales (Mukhopadhyay y Chatterjee, 1994; Liu y Thiele, 1996; Dat y col., 2000). En la siguiente tabla, se muestran algunas de las especies de oxígeno reactivo más importantes:

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

Tabla 1.1: Especies de oxígeno reactivo (ROS)

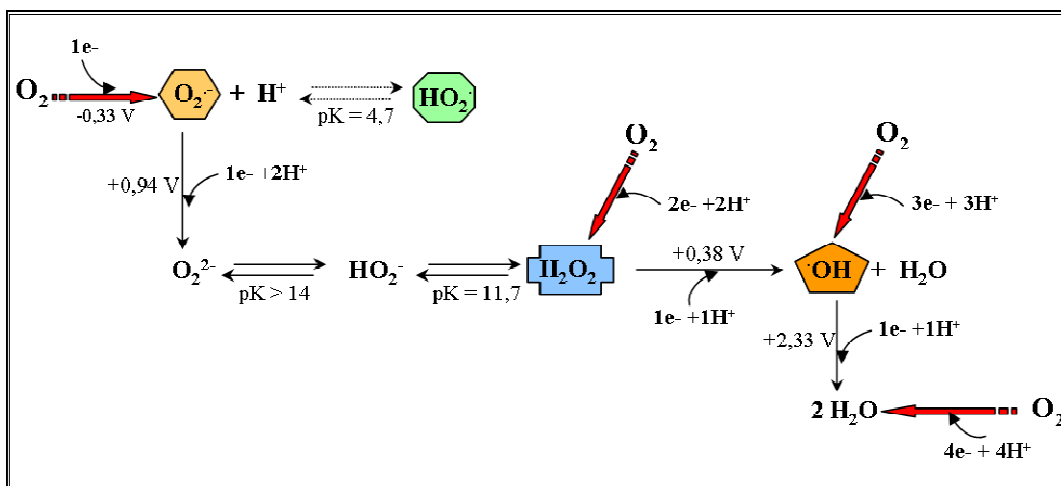


Figura 1.4: Formación de especies de oxígeno reactivo durante la reducción del oxígeno a H_2O . Modificado de Vranová y col., 2002.

1.8.2.1 Radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

Es el primer producto de la reducción del oxígeno. El $O_2^{\cdot-}$ puede actuar como oxidante o como reductor, dependiendo del medio en que se encuentre y del pH (Halliwell y Gutteridge, 2000). En soluciones acuosas es un reductor moderado, pero también un oxidante débil, oxidando, entre otros compuestos, al ácido ascórbico y a tiol-proteínas (Halliwell y Gutteridge, 2000). El $O_2^{\cdot-}$ es inestable, con una vida media de milisegundos (Halliwell y Gutteridge 2000) y puede reaccionar con los peróxidos lipídicos generados bajo su acción y oxidar aminoácidos específicos como la histidina, metionina y triptófano (Dat y col., 2000). También puede reaccionar con el óxido nítrico, dando lugar a peroxinitrito ($ONOO^-$) que es un oxidante fuerte (Dat y col., 2000). Sin embargo el papel más relevante del radical $O_2^{\cdot-}$ en la toxicidad del oxígeno consiste en su interacción con el H_2O_2 dando lugar, mediante la reacción de Haber-Weiss, a la producción del radical hidroxilo $\cdot OH$, uno de los oxidantes más potentes que se conocen (Fig. 1.5).

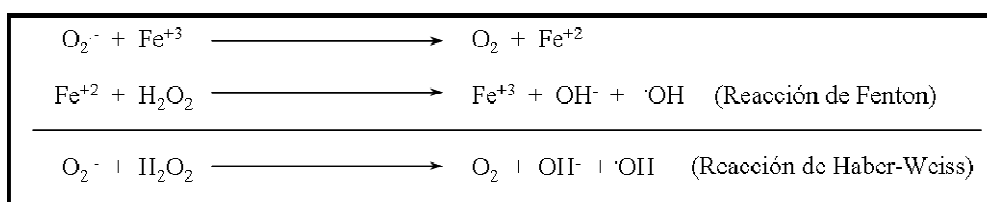


Figura 1.5: Reacción química de Haber-Weiss catalizada por metales.

A nivel subcelular, el radical $O_2^{\cdot-}$ se origina como consecuencia del desvío hacia el oxígeno de electrones de las cadenas de transporte de electrones ubicadas en las membranas de los orgánulos celulares (Donelly y Robinson, 1995; Lledías y col., 1998). También es generado por enzimas capaces de reducir directamente el O_2 a $O_2^{\cdot-}$, como son la xantina oxidasa, la galactosa oxidasa, peroxidasas inespecíficas, la glucosa oxidasa y la aldehído oxidasa (Fridovich, 1986; Halliwell y Gutteridge, 2000). Otra fuente es la autooxidación de compuestos reducidos tales como la hemoglobina, el citocromo c, la ferredoxina, las catecolaminas, los fenoles, las flavinas y las hidroquinonas (Halliwell y Gutteridge, 2000).

1.8.2.2 Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂)

Es la única especie de oxígeno reactivo estable en solución, tiene una vida media relativamente larga, y puede comportarse como oxidante o reductor, aunque tiene baja capacidad para reaccionar con la mayoría de las moléculas orgánicas si no existen catalizadores metálicos (Dat y col., 2000; Halliwell y Gutteridge, 2000). El H₂O₂ es estable en solución, no tiene carga y no es muy reactivo, con lo cual puede acumularse de forma apreciable en medios acuosos neutros y difundir a través de las membranas de los compartimentos celulares (Elstner, 1987; Lledías y col., 1998). La síntesis de H₂O₂ tiene lugar en la β-oxidación de ácidos grasos y la reacción de la glicolato oxidasa del peroxisoma durante la fotorrespiración (Foyer y Noctor, 2000). Además hay otras enzimas capaces de producir cantidades importantes de H₂O₂ como las peroxidasas de la pared celular, las NADPH oxidasas, la oxalato oxidasa, las aminooxidasas y las oxidasas que contienen flavinas, etc (Berna y Bernier, 1999; Bolwell y Wojtaszek, 1997; Bolwell, 1999; Sagi y Fluhr, 2001). Una de las causas de la toxicidad biológica del H₂O₂, proviene de su capacidad para oxidar a los grupos –SH, la cual puede incrementarse en presencia de catalizadores metálicos por las reacciones tipo Fenton o Haber-Weiss (Dat y col., 2000). En presencia de radicales O₂^{·-} y de metales de transición como el Fe²⁺ o el Cu²⁺, el H₂O₂ puede dar lugar a radicales hidroxilos (OH).

1.8.2.3 Radical Hidroxilo (·OH)

Es la especie oxidante más potente de los sistemas biológicos (Buettner, 1989). Tiene una vida media muy corta, del orden de nanosegundos, y reacciona de forma inespecífica con cualquier molécula biológica oxidándola de manera irreversible. Se origina mediante la reacción del H₂O₂ con O₂^{·-} mediante reacciones tipo Fenton (Fig.1.6), catalizadas por trazas de metales como el Fe²⁺ y el Cu²⁺ y mediante la reacción con el óxido nítrico y algunos de sus derivados (Nappi y Vass, 1998), tal y como se muestra en la figura 1.6.

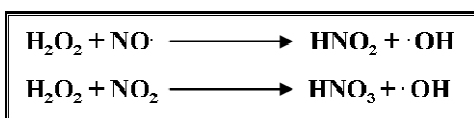


Figura 1.6: Reacciones del H₂O₂ con el NO y sus derivados que dan lugar a la formación de ·OH.

El radical hidroxilo reacciona con la mayoría de los compuestos presentes en los sistemas biológicos, como azúcares, aminoácidos, fosfolípidos y ácidos orgánicos (Anbar y Neta, 1967; Hoey y col., 1988; Halliwell y Gutteridge, 1989, 1992). También reacciona con el DNA, provocando daños en las bases y rotura de las cadenas (Packer y Glazer, 1990; Halliwell y Gutteridge, 2000).

1.8.2.4 Oxígeno Singlete ($^1\text{O}_2$)

Es una forma excitada del oxígeno molecular, que se origina por la transferencia de energía desde otra molécula reactiva por reacciones fotoquímicas, principalmente por la transferencia de energía de excitación desde un pigmento fotoactivado, por ejemplo una clorofila activada, lo cual provoca la inversión del espín de uno de los electrones desapareados que posee, originando el oxígeno singlete. Es una especie muy reactiva, no radical que puede oxidar algunas enzimas como la catalasa (Asada y Takahashi, 1987; Lledías y col., 1998). Presenta gran afinidad por los ambientes lipofílicos, donde muestra una vida media más alta y puede promover la peroxidación lipídica (Halliwell y Gutteridge, 2000; Affek y Yakir, 2002; Bonini y col., 2002; Trebst y col., 2002). Además puede ejercer daños en el DNA, así como estimular la formación de otras ROS y de radicales hidroperoxilo (O_2H) e hipoclorito, en su forma no protonada (ClO^-) o protonada denominada también ácido hipocloroso.

1.8.3 Producción de ROS en sistemas biológicos

La formación de especies de oxígeno reactivo (ROS) acompaña a los procesos metabólicos normales de los organismos aeróbicos, como la fotosíntesis, la respiración, el catabolismo de lípidos y de purinas, aunque en otras ocasiones las vías de producción de ROS pueden verse estimuladas en situaciones de estrés. En levaduras y mamíferos, la mayor parte de las ROS se producen en mitocondrias, sin embargo en plantas las principales fuentes de producción de ROS, tienen lugar en cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas (Fridovich, 1986). También se producen ROS en la membrana plasmática.

Cloroplastos (Fig. 1.7): El principal sitio de generación de radicales O_2^- tiene lugar en el fotosistema I, a nivel de la ferredoxina-NADP⁺-reductasa y la forma reducida de la monodeshidroascorbato reductasa (MADHAR) (Asada y Takahashi, 1987; Halliwell y Gutteridge, 1989; Asada, 1992, 1994). También se ha descrito la generación de O_2^- en el fotosistema II (PSII), por el P₆₈₀, la feofitina y la proteína Q_A (Annanyev y col., 1994; Navari-Izzo y Rascio, 1999; Navari-Izzo y Quartacci, 2001). El H₂O₂ en los cloroplastos, se origina por dismutación espontánea del O_2^- y por acción de las superóxido dismutasas (Asada, 1994; Choi, 2002).

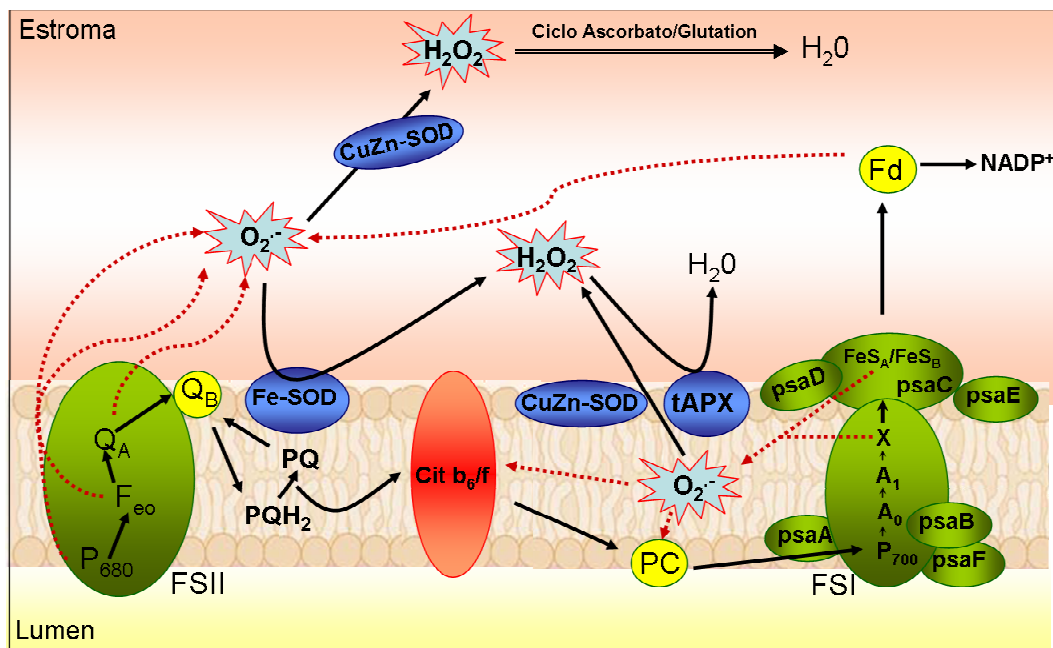


Figura 1.7: Producción y degradación de ROS en cloroplastos. (Modificado de Navari-Izzo y col., 1999). CuZn-SOD, FeS-OD, CuZn y Fe superóxido dismutasas; Fd, ferredoxina; Feo, feofitina; FSI y FSII, fotosistemas I y II; PC, plastocianina; PQ, plastoquinona; psa A-F, polipéptidos del FSI con función estructural; tAPX, ascorbato peroxidasa tilacoidal.

Mitocondrias (Fig.1.8): La producción de O_2^- ocurre por autooxidación de los componentes reducidos de la cadena de transporte electrónico respiratoria (Miwa y col., 2003), concretamente a nivel de la NAD(P)H deshidrogenasa del complejo I, de la ubiquinona-citocromos b del complejo II y de los centros o del complejo III (Boveris, 1984; González-Flecha y Boveris, 1995; Dat y col., 2000).

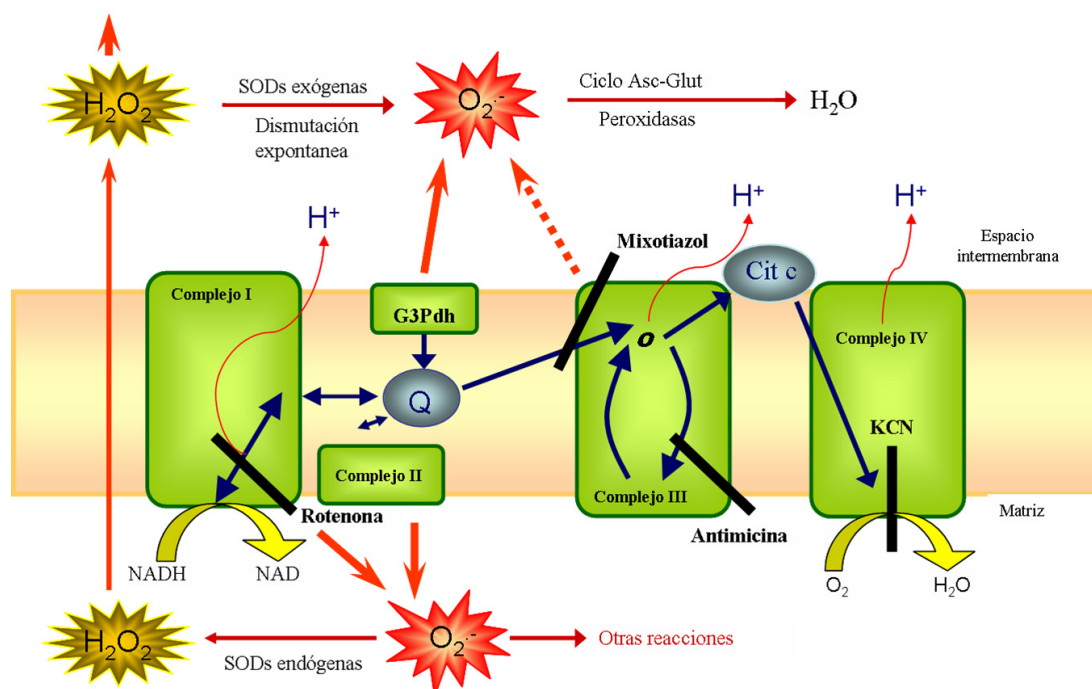


Figura 1.8: Producción de ROS en la cadena de transporte electrónico mitocondrial. (Modificado de Miwa y col., 2003). H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; O_2^- , superóxido; G3P; gliceraldehído 3-fosfato; G3Pdh, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; SOD, superóxido dismutasas.

Otras fuentes celulares de producción de ROS, se localizan en la ***pared celular*** y en la ***membrana plasmática*** (Fig.1.9). Las peroxidasas de la pared celular producen O_2^- a expensas de NADH, en una reacción dependiente de Mn (Bolwell y col., 1995) y las NAD(P)H óxidorreductasas de la membrana plasmática producen O_2^- y H_2O_2 y están asociadas a cadenas de transporte electrónico. La producción de ROS asociada a la membrana plasmática, más conocida, es la que se induce en procesos de infección por patógenos. Estas formas de oxígeno reactivo desempeñan un papel importante en el proceso de defensa frente a patógenos, actuando directamente como antipatógenos o indirectamente, reforzando la pared celular o bien como molécula señal en la inducción de la respuesta de defensa (Low y Merida, 1996; Grant y Loake, 2000).

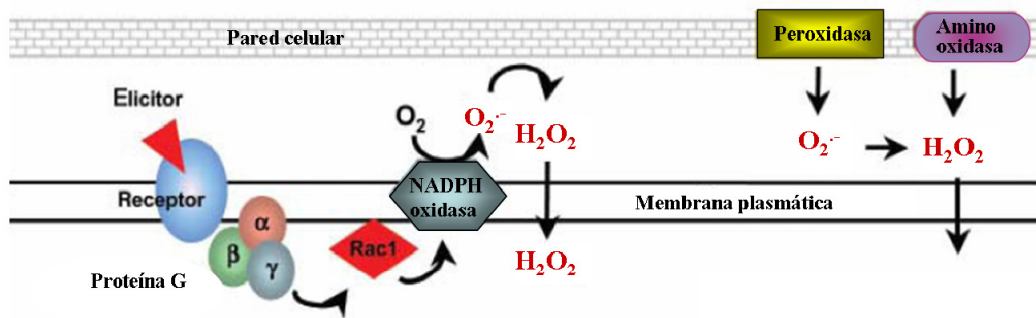


Figura 1.9: Producción de ROS en membrana plasmática y pared celular. Tomado de Mittler, 2002

1.8.4 Toxicidad de especies de oxígeno reactivo (ROS)

En situaciones fisiológicas normales, las ROS generadas por el metabolismo celular, no son tóxicas, ya que son eliminadas eficientemente por los sistemas de defensa. Sin embargo, bajo determinadas situaciones de estrés, la síntesis de ROS se incrementa hasta el punto de no poder ser eliminadas por dichos sistemas antioxidantes, generándose un estrés oxidativo y daños en las células y tejidos donde se producen. En plantas, se ha descrito que las ROS son generadas por exposición a varios tipos de estrés abiótico tales como sequía, bajas temperaturas, salinidad, metales pesados, contaminantes, herbicidas y daño mecánico (Doulis y col., 1998; Kaminaka y col., 1999; Sandalio y col., 2001; Dat y col., 2000).

Altas concentraciones de ROS causan modificaciones oxidativas en las proteínas (Reinheckel y col., 1998; Palma y col., 2002; Romero-Puertas y col., 2002), lo que conlleva inactivación y aumento de la susceptibilidad de las mismas a su degradación proteolítica (Stadtman, 1992; Doulis y col., 1998; Lascano y col., 1998; Lledías y col., 1998; Palma y col., 2002; Romero-Puertas y col., 2002), siendo los aminoácidos aromáticos y los grupos $-SH$ los más expuestos a la acción de ROS (Lascano y col., 1998). El daño a las proteínas puede tener lugar de forma directa, mediante oxidación de las cadenas laterales de los aminoácidos, como la oxidación de los grupos $-SH$ y por cambios redox de los metales presentes en los grupos prostéticos (Stadtman, 1992) o

bien de forma indirecta, por reacciones secundarias con productos aldehídicos de la peroxidación lipídica (Levine y col., 1990). En cualquier caso, se pueden formar grupos carbonilos en la molécula proteica, cuya determinación se ha convertido en un buen marcador para estimar el grado de modificación oxidativa de las proteínas (Levine y col., 1994; Reinheckel y col., 1998; Romero-Puertas y col., 2002).

Los daños al DNA pueden ser indirectos, como la activación de endonucleasas dependientes de Ca^{2+} , o la inactivación de enzimas implicadas en la reparación y/o replicación del DNA, o directos, como la modificación de bases púricas y pirimidínicas y de los azúcares que componen las cadenas de DNA (Halliwell y Gutteridge, 2000). Estas modificaciones pueden alterar la replicación, transcripción y reparación del DNA, así como provocar mutaciones y alteraciones en la estructura del DNA (Halliwell y Gutteridge, 2000).

Por último, a nivel de las membranas, las ROS, pueden causar peroxidación lipídica (Apostol y col., 1989), proceso que se ve favorecido por la presencia de ciertos metales (Casano y col., 1997) como el Cu^{2+} y el Fe^{2+} e inhibida por otros como el Zn^{2+} y el Se^{4+} (Sakuma y col., 1994). La peroxidación lipídica puede iniciarse por los radicales $\cdot\text{OH}$, acompañada, generalmente de la formación de productos secundarios derivados de la rotura de ácidos grasos (Reinheckel y col., 1998). Una gran parte de estos productos secundarios, son los aldehídos y entre ellos el 4-hidroxinonenal (4-HNE), altamente citotóxico y posiblemente el responsable de algunos de los efectos más dañinos de la peroxidación lipídica (Marrs, 1996; Reinheckel y col., 1998). Otro aldehído producto de la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos es el malondialdehído (MDA), cuya determinación es una herramienta básica para determinar el grado de daño celular durante el estrés oxidativo (Gechev y col., 2002).

1.9. ESPECIES DE NITRÓGENO REACTIVO (RNS)

1.9.1 El óxido nítrico en plantas

El NO es un radical libre de naturaleza gaseosa, lo cual le permite difundir rápidamente en el medio celular e intracelular. En contacto con el aire puede reaccionar con el oxígeno, dando lugar a dióxido de nitrógeno (NO_2) que es mucho más reactivo

(Halliwell y Gutteridge, 2000) (Fig.1.10). Además el NO puede reaccionar con el O_2^- dando lugar a peroxinitrito (ONOO⁻), potente oxidante que puede reaccionar con los grupos -SH, lípidos, aminoácidos y nucleótidos (Beckman y Koppenol, 1996) (Fig. 1.10). El NO puede reaccionar directamente sobre sus dianas biológicas (radicales lipídicos y de DNA, citocromo P₄₅₀, guanilato ciclasa, aconitasa, hemoglobina, complejos metálicos, etc), generalmente de manera rápida y las concentraciones de NO requeridas no son altas (Miranda y col., 2000). Por otro lado, el NO puede actuar de manera indirecta, a través de las especies de nitrógeno reactivo (RNS), entre las que se citan, el dióxido de nitrógeno (NO₂) y el trióxido de dinitrógeno (N₂O₃), que derivan de la inestabilidad del NO en el ambiente oxigenado, ya que antes de reaccionar con su sustrato es activado por el O_2^- o el O₂. Así las RNS son altamente reactivas y pueden alterar proteínas, lípidos y DNA y se cree que son responsables de la muerte celular programada (Romero-Puertas y Delledonne, 2003; Hess y col., 2005).

El NO es un mensajero intra e intercelular en vertebrados, con gran cantidad de funciones reguladoras en el sistema cardiovascular, inmune y nervioso central (Buchanan y col., 2000; Moncada y Higgs, 2006). En plantas, el NO participa como mediador en procesos tales como la lignificación de la pared celular (Ferrer y Ros-Barceló 1999), regulación de canales iónicos de las células guarda (García-Mata y col., 2003), funcionalidad mitocondrial y cloroplastídica (Yamasaki y col., 2001; Huang y col., 2002; Zottini y col., 2002; Takahashi y Yamasaki, 2002), muerte celular (Predroso y col., 2000b; Zago y col., 2006) y en procesos de señalización, a través de una cascada dependiente de GMP cíclico, implicada, en algunos casos, en la generación de ADPRc y en la activación de MAPKs (Klessig y col., 2000; Kumar y Klessig, 2000). Además el NO puede actuar como regulador endógeno del desarrollo de la planta, promoviendo la germinación, la expansión foliar, crecimiento de la raíz y retrasando la senescencia foliar y la maduración del fruto (Delledonne y col., 1998; Van Camp y col., 1998; Durner y Klessig, 1999; Grant y Loake, 2000; Leshem, 2000; Lamattina y col., 2003; Neill y col., 2003). Se ha descrito también una función protectora para el NO. Así, puede actuar como antioxidante a bajas concentraciones reaccionando con el O_2^- , previniendo de esta forma la iniciación de reacciones tipo Fenton (Romero-Puertas y Delledonne, 2003).

También puede reaccionar con el ONOO^- para formar N_2O_3 (Wink y Mitchell, 1998), evitando la formación de un estrés nitrosativo. Por lo que en la célula, debe existir un balance entre estrés oxidativo y nitrosativo, para mantener un estado fisiológico normal. El NO, se ha demostrado que regula la expresión de un gran número de genes en plantas, entre otros, genes que codifican para proteínas relacionadas con la patogénesis (PRPs), enzimas implicadas en la síntesis y respuesta de jasmónico, enzimas implicadas en la síntesis de etileno y antioxidantes y otras proteínas protectoras (Durner y col., 1998; Delledonne y col., 1998; Murgia y col., 2002; Huang y col., 2002, 2004; Neill y col., 2003; Guo y col., 2003).

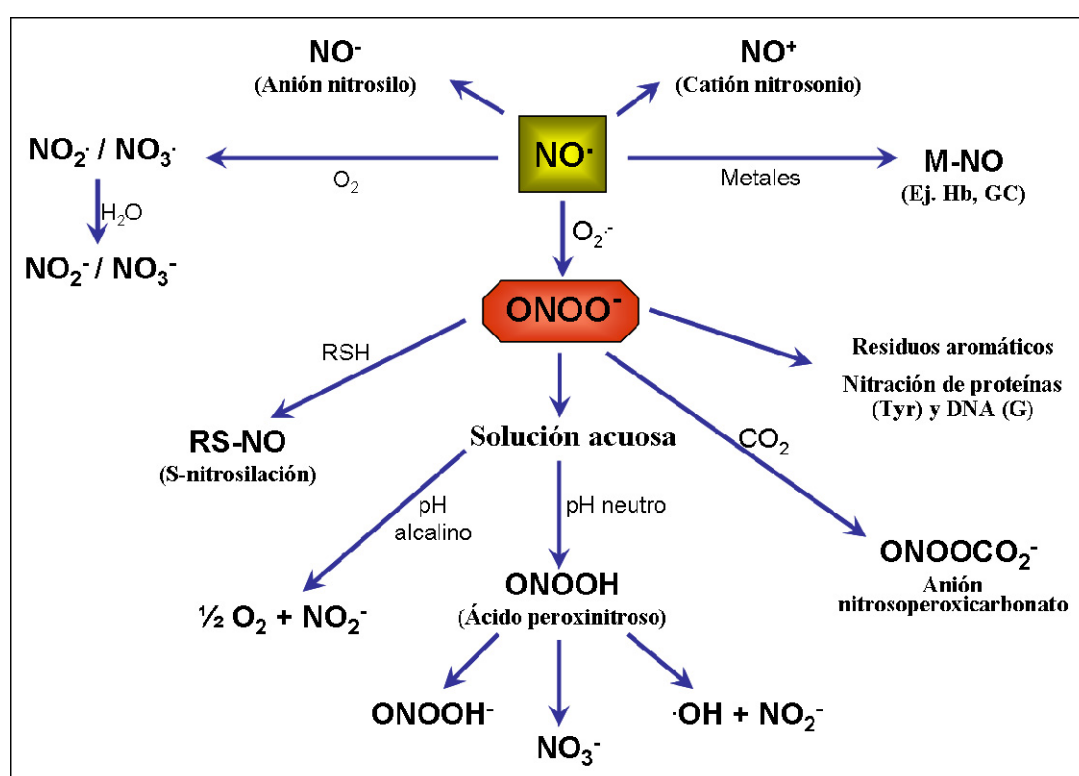


Figura 1.10: Bioquímica del NO en sistemas biológicos

1.9.2 Síntesis del NO en plantas

La síntesis del NO en plantas tiene lugar mediante procesos enzimáticos y no enzimáticos. En cuanto a la producción no enzimática, se puede generar NO *in vitro*, a

partir de H_2O_2 (10-50 mM) y L-Arginina (10-20 mM) a pH 7,4 y 37°C (Nagase y col., 1997; Gotte y col., 2002). Los ciclos de nitrificación/desnitrificación también producen NO como producto de la oxidación del N_2O en la atmósfera (Wojtaszek, 2000) (Fig. 1.11). La reducción no enzimática del nitrito (NO_2^-) también puede conducir a la formación de NO y nitrato, reacción que se ve favorecida a pH ácido, condición que se da en el apoplasto de raíces y en semillas (Stöhr y Ullrich, 2002), pero no en tejidos fotosintéticos (Yu y col., 2000). El nitrito también puede ser reducido químicamente por el ácido ascórbico a pH 3-6, produciéndose NO y ácido deshidroascórbico (DHA) (Henry y col., 1997; Weitzberg y Lundberg, 1998) (Fig. 1.11)

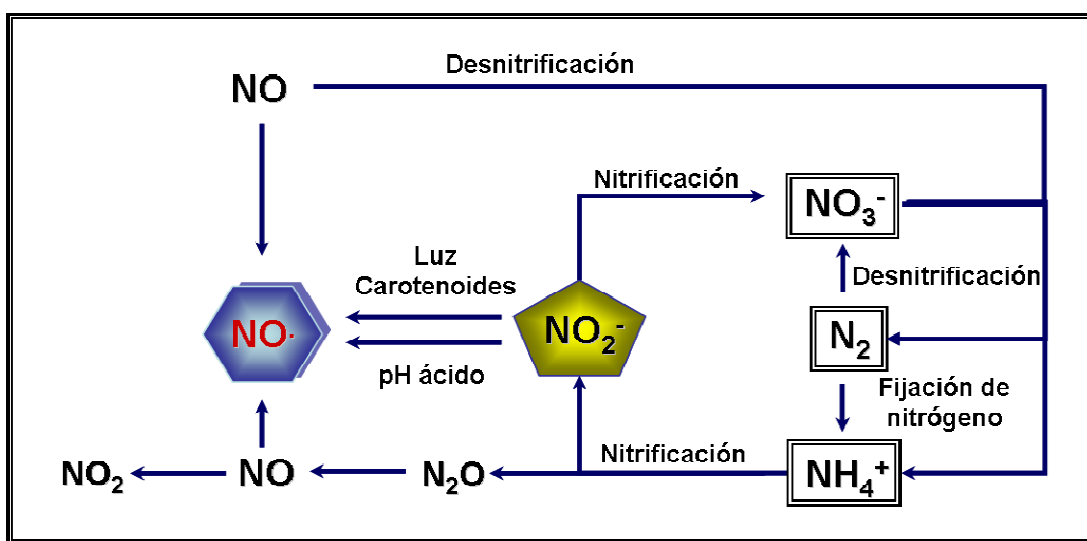


Figura 1.11: Algunos sistemas no enzimáticos, generadores de NO. Modificado de Wojtaszek, 2000.

En cuanto a la síntesis enzimática de NO, existe una gran controversia al respecto. En condiciones de anerobiosis, la acumulación de nitrito y la actividad nitrato reductasa (NR) son necesarios para la liberación de NO (Dean y Harper, 1988; Klepper, 1990). La nitrato reductasa purificada de *Zea mays*, se ha demostrado que es capaz de reducir el nitrito a NO (Yamasaki y Sakihama, 2000; Rockel y col., 2002). Estos estudios apuntaban a la NR como la principal candidata para la síntesis enzimática de NO en plantas. Sin embargo en los últimos años han surgido numerosos trabajos que ponen en tela de juicio esta afirmación, ya que la NR presenta una elevada afinidad por el nitrato y

baja por el nitrito (Rockel y col., 2002). Teniendo en cuenta que en condiciones normales, la concentración de nitrato es mucho mayor que la de nitrito, es difícil pensar que una molécula señal tan importante como el NO se sintetice a partir de una enzima cuya afinidad por el nitrito es muy reducida. Actualmente existen numerosos trabajos que defienden a la NR como enzima responsable de la síntesis de NO (Xu y Zhao, 2003; Simontacchi y col., 2004; Vanin y col., 2004), mientras que otros la cuestionan (Garces y col., 2001; Zhang y col., 2003). Así en mitocondrias vegetales se ha descrito la síntesis de NO a partir de nitritos, en condiciones de anaerobiosis (Tischner y col., 2004; Planchet y col., 2005). Inhibidores de la cadena de transporte mitocondrial, también inhiben la síntesis de NO, lo que sugiere que los electrones procedentes de esta cadena estarían implicados en la reducción del nitrito (Tischner y col., 2004). Por otro lado Tischner y col., (2004) han demostrado que mutantes deficientes en NR producen grandes cantidades de NO a partir de nitrito y en condiciones de anoxia.

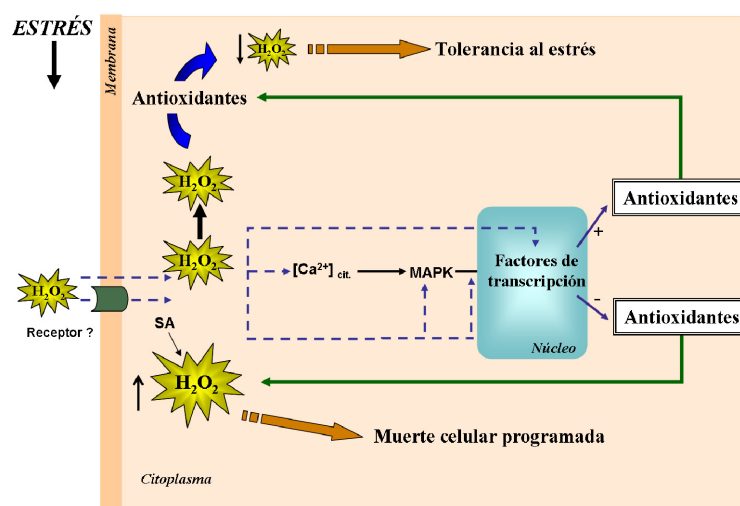
Otro mecanismo enzimático de síntesis de NO en plantas muy controvertido, es la posible existencia de una enzima similar a la óxido nítrico sintasa (NOS) de animales. Esta enzima cataliza la oxidación dependiente de oxígeno y de NADPH de la L-arginina hasta NO y citrulina, mediante una compleja reacción que requiere FAD, FMN, tetrahidrobiopterina (BH_4), iones Ca^{2+} y calmodulina (Knowles y Moncada, 1994; Alderton y col., 2001). Estudios basados en ensayos bioquímicos, demuestran la existencia en extractos vegetales de una actividad NOS, que se inhibe por los inhibidores clásicos de la actividad NOS de animales (Cueto y col., 1996; Ninnemann y Maier, 1996; Delledone y col., 1998; Barroso y col., 1999; Foissner y col., 2000; Pedroso y col., 2000a). Estos resultados, se apoyan además, en el reconocimiento de proteínas vegetales por anticuerpos frente a la NOS animal (Huang y Knopp, 1998; Barroso y col., 1999; Ribeiro, 1999). Una de estas proteínas es la NOS descrita en peroxisomas de hojas de guisante (Barroso y col., 1999). Sin embargo no se ha encontrado ningún gen en el genoma de *Arabidopsis* homólogo al gen que codifica la NOS de animales (The *Arabidopsis* Project). En 1997 Huang y col., describieron una proteína de caracol de 60 kDa, que era reconocida por anticuerpos de la NOS de mamíferos y con actividad NOS dependiente de NADPH, Ca^{2+} , calmodulina, pero que no guardaba ninguna homología

con la NOS animal. Esta proteína no tenía ningún sitio de unión para el NADPH, FAD o la arginina, y era similar a la proteína de unión de GTP y a la GTPasa. Los autores concluyeron que esta proteína podría ser una proteína accesoria o bien una proteína reguladora de la NOS. Esta proteína ha sido identificada en bacterias, insectos, humanos y plantas (Zemojtel y col., 2004). En *Arabidopsis*, se ha encontrado un gen que codifica una proteína denominada AtNOS1 que presenta un 16% de homología con la proteína del caracol (Guo y col., 2003). Numerosos estudios realizados con mutantes deficientes en AtNOS, demuestran que se reduce la acumulación de NO *in vivo*, pero no completamente, indicando la existencia de otros genes o mecanismos implicados en la síntesis de NO (He y col., 2004; Zeidler y col., 2004). No obstante, recientemente se ha demostrado que la AtNOS no es una NOS característica y podría constituir una subunidad de un complejo mayor implicado en la síntesis de NO en mitocondrias. Estos resultados han surgido de la imposibilidad de producir NO en proteínas recombinantes obtenidas de mutantes de *Arabidopsis* que expresan la AtNOS1 y sus respectivos ortólogos en *Zea mays* y *Oryza sativa* (Zemojtel y col., 2006). Por lo tanto, desde un punto de vista molecular, la naturaleza de la NOS vegetal sigue siendo una incógnita.

1.10 PAPEL DE ROS Y NO EN LA SEÑALIZACIÓN CELULAR

Además de su papel tóxico, las ROS y RNS desempeñan un papel como segundos mensajeros en respuesta a distintas situaciones de estrés biótico y abiótico (Apel y Hirt, 2004; Grün y col., 2006). El papel señalizador de estas moléculas se ha demostrado en los últimos años gracias al desarrollo de las técnicas de análisis transcriptómico mediante microarrays. De esta forma, se ha demostrado que células de *Arabidopsis* expuestas a H₂O₂ experimentan cambios en la expresión de 1-2% de su genoma, aproximadamente 175 genes (Desikan, y col., 2001). De estos genes, 113 codifican antioxidantes, proteínas asociadas con la defensa celular frente a distintos tipos de estrés o implicadas en funciones de señalización (Desikan y col., 2001). La exposición de plantas a dosis subletales de H₂O₂, O₂⁻ o una fuente de estrés, resulta en el desarrollo de protección frente a dosis letales del mismo inductor, lo que conduce a la aclimatación (Apel y Hirt, 2004). Entre las ROS, el H₂O₂ es la especie más apropiada para funcionar como

molécula señal en función de su estabilidad y su capacidad para difundir a otras células. En cuanto a su modo de acción, el H_2O_2 puede modificar la regulación de la expresión génica bien activando sensores de ROS, mediante la oxidación de otras moléculas señal, o bien modificando la actividad de factores de transcripción. Uno de los primeros efectos del H_2O_2 consiste en la activación de los canales de calcio de la membrana plasmática (Murata y col., 2001) lo que conduce a un aumento de los niveles de Ca^{2+} en el citosol (Knight y Knight, 2001), que es un componente esencial de la cascada de señalización eucariota. El H_2O_2 activa la cascada de fosforilación de proteínas de la fosfoproteín quinasa activada por mitógeno (MAPK) (Jonak y col., 2002). En *Arabidopsis*, la activación de estas proteínas quinasa tiene lugar a través de la MAPKKK ANP1, y la sobreexpresión de ANP1 aumenta la tolerancia de las plantas transgénicas al choque térmico, congelación y estrés salino (Kovtun y col., 2000). Además, el H_2O_2 puede regular las proteínas quinasa mediante inhibición de fosfatasa (Meinhard y col., 2002; Gupta y Luan, 2003).



1.12: Modelo de inducción por H_2O_2 de la cascada de señalización celular. Modificado de Hung y col., 2005.

A diferencia de procariotas y levaduras, en los que se han identificado y caracterizado al menos dos factores de transcripción dependientes de ROS (OxyR y Yap1, respectivamente), en plantas aún no han sido identificados estos factores. La expresión

génica dependiente de ROS parece estar regulada mediante la interacción de factores de transcripción con elementos *cis* sensibles al estrés oxidativo, de los promotores de los genes (Desikan y col., 2001).

Las ROS desempeñan un papel esencial en la defensa frente a patógenos. Las plantas reaccionan frente a la invasión de un patógeno, mediante una reacción hipersensible (RH) en la zona infectada y mediante el establecimiento de un mecanismo de resistencia sistémica adquirida (SAR), que es un sistema inmunitario duradero que protege a la planta entera frente al ataque del patógeno, y posteriores ataques del mismo (Ryals y col., 1996). En este proceso, la producción celular de ROS se incrementa por activación de la NADPH oxidasa, peroxidasas de pared celular y aminooxidases del apoplasto, y por la reducción de actividades antioxidantes como la ascorbato peroxidasa y la catalasa (Grant y Loake, 2000; Hammond-Kosack y Jones, 2000). La reducción de estas enzimas es dependiente de salicílico y NO (Klessig y col., 2000). Como consecuencia de ello, se favorece el acúmulo de ROS y la inducción de la muerte celular programada (PCD). Este proceso es dependiente de un incremento de la producción de ROS y NO, pero también requiere la supresión de los mecanismos antioxidantes (Klessig y col., 2000). La inducción de PCD tiene lugar en reacciones incompatibles en las que tiene lugar la muerte de las células próximas al punto de infección, con objeto de limitar la expansión de la enfermedad. La producción de ROS o explosión oxidativa, en la reacción incompatible también activa una respuesta sistémica de la planta que confiere inmunidad a la misma, gracias a la expresión de proteínas de defensa (PRPs, PAL, etc), siendo necesaria la intervención del SA (Klessig y col. 2000). Además del SA, también desempeñan un papel importante el etileno (ET) y el jasmónico (JA). Las tres hormonas mantienen una compleja red de interacciones sinérgicas y antagónicas (Overmyer y col., 2003). Así, SA y etileno favorecen la producción de ROS y establecimiento de PCD, mientras que el JA limita la propagación de la lesión (Overmyer y col., 2003). El ácido abscísico (ABA) también desempeña un papel importante en la respuesta a estrés hídrico y otras situaciones de estrés, siendo responsable del cierre de los estomas, siendo el H₂O₂ un componente de la vía de señalización dependiente de esta hormona. La producción de H₂O₂ en respuesta al ABA es dependiente de proteínas fosfatasa (Apel y

Hirt, 2004). La PCD también se induce por otros agentes no bióticos como el ozono (Wolghemuth y col., 2002). La explosión oxidativa y su función señalizadora ha sido demostrada en otras situaciones de estrés como la herida (Schilmiller y Howe, 2005), radiaciones ultravioleta (Yannarelli y col., 2006), altas temperaturas y bajas temperaturas (Suzuki y Mittler, 2006), metales pesados (Richards y col., 1998), o sequía (Reddy y col., 2004). No obstante, el papel que las ROS desempeñan en estrés abiótico parece ser opuesto al que juegan en la infección por patógenos. Estas diferencias pueden venir determinadas por la acción de hormonas, diferencias en la localización subcelular de la producción de ROS o interconexiones entre distintos elementos implicados en la señalización celular (Mittler, 2002). Así, el estrés abiótico lleva consigo, en general, una inducción de sistemas antioxidantes para controlar los niveles tóxicos de ROS. Sin embargo, análisis transcriptómicos demuestran un solapamiento en la respuesta a estrés biótico y abiótico, lo que sugiere que la señalización en plantas es una compleja red de interconexiones que tienen en común las ROS (Fujita y col., 2006).

El NO desempeña un gran número de funciones como segundo mensajero en procesos fisiológicos y patofisiológicos (Wendehenne y col., 2004). El NO puede existir en distintas formas redox y cada una de ellas puede activar distintos eventos celulares (Neill y col., 2003). El NO puede ejercer su función señalizadora, directamente a través de la nitrosilación de proteínas (Stamler y col., 2001) o bien de una forma indirecta, a través de terceros mensajeros. Una de las dianas más importantes del NO son los canales de Ca^{2+} , tanto los de membrana plasmática como los intracelulares. El NO modula estos canales, directamente por nitrosilación o a través de mensajeros secundarios como el GMP cíclico (GMPc) y/o la ADP ribosa cíclica (ADPRc), por lo tanto el NO es un mensajero clave, que controla la homeostasis del calcio (Clementi, 1998). Cambios en los niveles intracelulares de calcio, inducidos por el NO, se ha visto que son necesarios en el proceso de diferenciación de los elementos xilemáticos (Groover y Jones, 1999; Gabaldón y col., 2005) y el cierre estomático mediado por ABA (Neill y col., 2003). El NO también puede activar la expresión de genes relacionados con procesos de defensa de la planta frente a patógenos, como PR-1, dependiente de SA, y PAL, bien directamente o través de la ADPRc (Wendehenne y col., 2004). El SA juega

un papel importante en la señalización del NO. Ambos presentan dianas comunes pudiendo inhibir de forma reversible las actividades CAT y APX, regulando de esta manera los niveles de H₂O₂ (Clark y col., 2000). El SA, también juega un papel importante en la señalización del NO en procesos de defensa frente a herida, mediada por jasmónico (JA). En plantas de *Solanum lycopersicon*, donadores de NO inhiben tanto la producción de H₂O₂ dependiente de herida, como la expresión de genes de defensa inducidos por herida a través de la producción de jasmónico (Orozco-Cardenas y Ryan, 2002) Por otro lado, el NO también inducía genes implicados en la síntesis de JA, si bien no se detectaba un incremento de los niveles de JA (Huang y col., 2004). Esta discrepancia se ha demostrado que se debe a un efecto antagonista del SA. Así, el tratamiento con NO de mutantes de *Arabidopsis* deficientes en SA producía un aumento de los niveles de JA, mientras que en las plantas silvestres, el SA inhibía la activación de enzimas implicadas en la síntesis de JA, inducidas por NO (Wendehenne y col., 2004).

Durante la interacción planta-patógeno avirulento, se produce una rápida y elevada acumulación de NO, sin embargo durante la interacción con patógenos virulentos, esta producción de NO es extremadamente modesta (Romero-Puertas y col., 2004b). El NO junto a las ROS, juega un papel importante en la respuesta hipersensible (RH) (Lamb y Dixon, 1997). Uno de los primeros eventos en la RH es la rápida acumulación de ROS (Keller y col., 1998) y NO (Delledonne y col., 1998; Durner y col., 1998), lo que conduce a la PCD, mientras que el incremento de uno solo de ellos no es suficiente (Delledonne y col., 1998). El NO juega un papel importante en el establecimiento de la SAR, junto con el SA, en *Nicotiana*, si bien el SA no parece ser una molécula imprescindible (Mauch-Mani y Métraux, 1998). Otro candidato como molécula señal móvil, es el S-nitrosoglutation (GSNO; Durner y Klessig, 1999), pudiendo actuar como transporte intra e intercelular de NO, de hecho el glutation es el mayor metabolito en el floema, donde probablemente la señal de la SAR sea transmitida. Se ha demostrado, que el GSNO induce la SAR en *Nicotiana* tras la infección del virus del mosaico del tabaco (TMV; Song y Goodman, 2001). El GSNO es un fuerte inductor de genes de defensa (Durner y col., 1998), y el reciente descubrimiento de enzimas que participan en el catabolismo del GSNO en plantas, sugiere una función para esta enzima

en la modulación de la actividad y función señalizadora de esta forma estable de NO (Romero-Puertas y col., 2004b).

En cuanto al papel del NO en respuesta a estrés abiótico, se ha visto que la síntesis de NO puede ser inducida en determinadas situaciones de estrés abiótico, como altas temperaturas, estrés osmótico, salinidad, sequía y ozono (Gould y col., 2003; Wendehenne y col., 2004; Velikova y col., 2005; Zhang y col., 2006) sin embargo no se afecta en situaciones de estrés lumínico y daño mecánico, por lo que no puede ser considerada como una respuesta universal de la planta frente al estrés abiótico (Gould y col., 2003; Wendehenne y col., 2004).

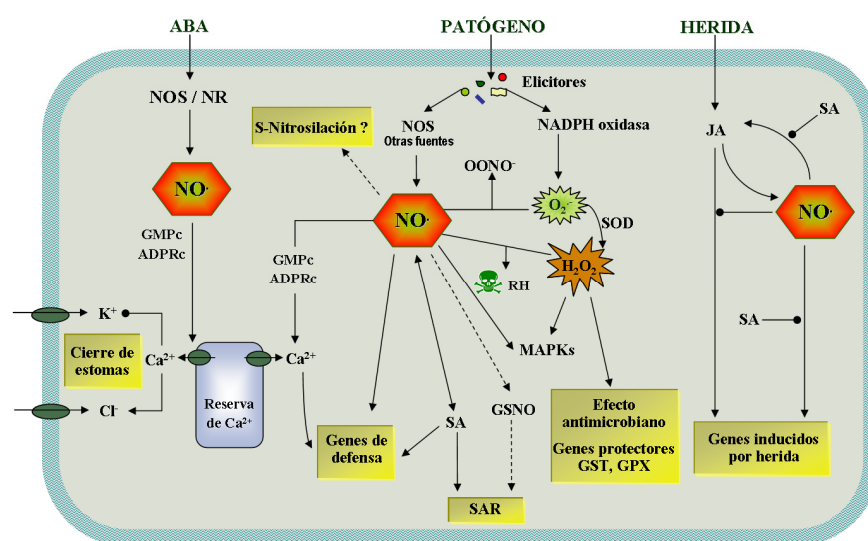


Figura 1.13: Función del NO en la señalización mediada por ABA, defensa frente a patógenos y herida. Modificado de Wendehenne y col., (2004). En células guarda, el NO activa los canales de Ca^{2+} intracelulares a través del GMPc y la ADPRc. El incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelular, inhibe el influjo de K^+ al interior celular, y activa la entrada de Cl^- , produciéndose una despolarización de la membrana que induce el cierre estomático. En defensa a patógenos, el NO ejerce su papel señalizador a través de varias rutas cuya interconexión no está muy clara. Por un lado, activa genes de defensa, directamente o bien a través de la activación de canales de Ca^{2+} , vía GMPc /ADPRc. Induce muerte celular junto con el H_2O_2 . Induce la producción de SA, el cuál a su vez, aumenta los niveles de NO y facilita la respuesta local y la SAR, además de inducir la expresión de genes de defensa. En la respuesta a herida, el JA parece inducir la síntesis de NO y este activa la síntesis de JA. La inducción de la síntesis de JA por el NO, solo se ha observado en plantas deficientes en SA, lo que sugiere que la síntesis de JA mediada por NO, está regulada negativamente por SA. El SA, también puede reprimir la expresión, inducida por NO, de genes activados en la respuesta del JA. En otras especies diferentes de *Arabidopsis*, como el *Solanum lycopersicom* y *Solanum tuberosum*, el NO inhibe la respuesta del JA a nivel de la expresión de genes de respuesta a herida.

1.11 SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Existen varias estrategias de defensa celular para controlar los niveles de ROS y RNS y prevenir así daños celulares. Las proteínas o moléculas encargadas de esta defensa reciben el nombre de antioxidantes. Halliwell y Gutteridge (2000) definen como antioxidante a toda sustancia que hallándose presente, a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable, retarda o previene la oxidación del mismo. Entre los mecanismos de defensa antioxidante, se encuentran moléculas de bajo peso molecular (antioxidantes no enzimáticos) y enzimas (antioxidantes enzimáticos).

1.11.1 Antioxidantes no enzimáticos

Se denominan también antioxidantes estequiométricos por su capacidad de neutralizar un radical libre por molécula. Normalmente actúan a concentraciones relativamente elevadas (Halliwell y Guteridge, 2000) y se pueden clasificar en tres grupos:

1.- Reductores hidrosolubles. Este grupo incluye compuestos como la cisteína (N-acetilcisteína), glutatión (GSH), ácido ascórbico (vitamina C), ácido úrico, glucosa, manitol y albúmina (Arouma y col., 1989; Halliwell y Gutteridge, 2000). *In vivo*, los de mayor importancia antioxidante son el ácido ascórbico y el glutatión reducido (GSH) (Halliwell y Gutteridge, 2000; Foyer, 2001).

El ascorbato es de especial relevancia debido a su elevada capacidad reductora y su abundancia (Smirnoff, 2000). En plantas, se sintetiza en la membrana mitocondrial interna, de donde es transportado a distintos compartimentos celulares en los que forma parte del ciclo ascorbato-glutatión. El ascorbato es capaz de reducir el O_2^- (Nishikimi, 1975), reaccionar con radicales $\cdot OH$ (Anbar y Neta, 1967) e inactivar el (1O_2) (Bodannes y Chan, 1979). También puede eliminar H_2O_2 , de forma no enzimática o mediante la participación de la ascorbato peroxidasa (APX) (De Gara y col., 1997). En los sistemas biológicos, el ASC funciona como donador de un electrón dando lugar al monodeshidroascorbato (MDHA), siendo su oxidación completa a deshidroascorbato (DHA). Está presente en todos los compartimentos celulares, incluyendo el apoplasto, con una concentración media de 2-25 mM dependiendo de la edad del organismo y del tejido (Potters y col., 2002). El metabolismo del ASC está relacionado con la regulación

de la división y ciclo celular (Noctor y col., 2000; Smirnov, 2000; Potters y col., 2002). Recientemente se ha relacionado la interacción ASC-H₂O₂ y ácido abscísico (ABA) con la regulación del cierre estomático (Foyer y Noctor., 2005). El aumento de ASC en las hojas, puede modular genes relacionados con la patogénesis, y la resistencia sistémica adquirida (SAR) (Pastori y col., 2003; Kiddle y col., 2003; Barth y col., 2004). Una disminución en los niveles de ASC, desencadena respuesta de muerte celular programada (PCD) y de SAR (Kangasjarvi y col., 2005).

El glutatión es un compuesto tiólico de bajo peso molecular y puede encontrarse de forma reducida u oxidada. La forma reducida (GSH) es un tripéptido (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina), relativamente estable y con alta solubilidad en agua. El glutatión se encuentra presente fundamentalmente en su forma reducida (GSH), mientras que su forma oxidada (GSSG), sólo representa un 1% del total, siendo necesario controlar esa proporción para evitar la inactivación de enzimas mediante la formación de puentes disulfuros. El GSH se puede sintetizar en el citosol y cloroplastos de células vegetales, por acción de la γ -glutamilcisteína sintetasa y la glutatión sintetasa (GSHS) (Noctor y Foyer, 1998), mientras que su degradación está confinada al citosol. La concentración de GSH estimada en el cloroplasto varía entre 1-4,5 mM (Noctor y Foyer 1998). El GSH contribuye a la desintoxicación de xenobióticos, bien de forma espontánea, o a través de la actividad glutatión *S*-transferasa (GST), así como a la defensa frente a algunos metales pesados, siendo el precursor de las fitoquelatinas (Noctor y Foyer, 1998). Junto con el ascorbato forma parte del ciclo ascorbato-glutatión que elimina el H₂O₂. El glutatión está implicado en la regulación de la expresión de genes relacionados con la respuesta celular al estrés ambiental y a los ataques por patógenos (Creissen y col., 1992; Wingsle y Karpinski, 1995), y en el transporte por el floema de azufre reducido (Rennenberg, 1982). Esta molécula juega un importante papel en el control del potencial redox en la división celular (Noctor y Foyer, 1998) y junto con el ASC, regula la expresión de genes relacionados con la PCD y SAR (Pastori y col., 2003; Kiddle y col., 2003; Barth y col., 2004).

2.- Reductores liposolubles. En este grupo está incluida la vitamina E (α -tocoferol), presente en membranas de plastidios de todas las plantas y en algunas algas y cianobacterias (Sattler y col., 2004). Interfiere en las reacciones en cadena de formación de radicales libres, reaccionando con radicales de oxígeno o lipídicos, formando un radical tocoferilo estable (Liebler, 1998; Smirnov, 2000; Munné-Bosch y col., 2005).

Los flavonoides también están incluidos en este grupo y son una familia de compuestos fenólicos que pueden ejercer actividad antioxidante inhibiendo lipooxigenasas, ciclooxigenasas e incluso a la xantina oxidasa (Hayashi y col., 1988; Bors y col., 1990). También son poderosos inhibidores de la peroxidación lipídica, secuestradores de ROS/RNS y quelantes de metales (Rohnert y col., 1998; Halliwell y Gutteridge, 2000). Los β -carotenos también son miembros de este grupo y actúan de forma no estequiométrica, atrapando el oxígeno singlete (Kappus y Sies, 1981; Krinsky y Deneke, 1982; Halliwell y Gutteridge, 2000).

3.- Quelantes de metales. Estos antioxidantes actúan atrapando a los iones metálicos e impidiendo su participación en reacciones tipo Fenton generadoras de $\cdot\text{OH}$. A este grupo pertenecen proteínas como la transferrina, ceruloplasmina, ferritina o fitoquelatinas.

1.11.2 Antioxidantes enzimáticos

Su función es prevenir la iniciación de las oxidaciones en cadena, eliminando las especies de oxígeno reactivo parcialmente reducidas (O_2^- y H_2O_2) (Winston, 1990).

1.11.2.1 Superóxido dismutasas (SODs; EC 1.15.1.1)

La actividad superóxido dismutasa (SOD) fue descubierta por primera vez por McCord y Fridovich en 1969. LLeva a cabo la dismutación catalítica de los radicales libres O_2^- con formación de O_2 y H_2O_2 , según la reacción:



Las SODs son una familia de enzimas que se agrupan, según el grupo prostético metálico ligado a la enzima, en CuZn-SODs, Fe-SODs y Mn-SODs. Están presentes en todos los organismos vivos, salvo algunos anaerobios estrictos. El tipo de SOD y su localización, varía en función de la especie vegetal, el estado de desarrollo y la respuesta a estreses medioambientales. Todas las SOD se codifican en el núcleo (Casano y col., 1997) y se encuentran presentes en todos los orgánulos celulares. Así las mitocondrias contienen Cu,Zn-SOD y Mn-SOD (del Río y col., 2003), en los cloroplastos están presentes la CuZn-SOD y la Fe-SOS (Palma y col., 1987; Sandalio y col., 1997), en peroxisomas se han detectado la CuZn-SOD, Mn-SOD (Sandalio y del Río, 1987; Sandalio y col., 1997), y Fe-SOD (Droillard y Paulín, 1990) y en citosol, núcleo y espacio extracelular también se ha detectado la CuZn-SOD (Sandalio y del Río, 1987; Streller y Wingsle, 1994; Ogawa y col., 1996).

La función más aceptada de las SODs, es la protección frente a las especies de oxígeno derivadas del radical O_2^- , como los radicales $\cdot OH$ (Fridovich, 1983; Halliwell y Gutteridge, 2000; Nyska y Kohen, 2002). En el apoplasto juegan un papel importante como primera barrera de defensa, junto con la ascorbato oxidasa y el ASC, frente a oxidantes externos como el ozono, SO_2 , etc (Conklin y Barth, 2004). Las SODs también participan en la modulación de los niveles de O_2^- en procesos de señalización celular (del Río y col., 2002a). La regulación de los genes SOD, en situaciones de estrés biótico y abiótico, podría depender de H_2O_2 (Kaminaka y col., 1999; Romero-Puertas y col., 2006b).

1.11.2.2 Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6)

Es una enzima hemínica que cataliza la descomposición o dismutación del H_2O_2 con un mecanismo similar al de la SOD, una molécula de H_2O_2 es reducida a agua, mientras que la otra es oxidada a O_2 . Esta reacción es propiciada a elevadas concentraciones de H_2O_2 (Chance y col., 1979):



La CAT puede llevar a cabo ciertas reacciones peroxidásicas a pH básico, en presencia de H_2O_2 , actuando sobre algunos alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos como sustratos (AH_2) (Butt, 1980; Halliwell y Gutteridge, 2000). Está presente en la mayoría de los organismos aeróbicos y salvo alguna excepción, no está presente en organismos anaeróbicos (Halliwell y Gutteridge, 2000). La actividad catalítica de la CAT es muy elevada, difícil de saturar y está limitada por la concentración de su sustrato en disolución (Halliwell y Gutteridge, 2000). Es una enzima implicada en procesos metabólicos como la β -oxidación de ácidos grasos y el ciclo del glioxilato (Huang y col., 1983), donde se generan cantidades importantes de H_2O_2 . Es una enzima importante en el mecanismo de defensa frente a distintos tipos de estrés (Willekens y col., 1997). Se localiza de forma casi exclusiva en peroxisomas/glioxisomas, por lo que se utiliza como marcador de estos orgánulos celulares.

1.11.2.3. Enzimas del ciclo Ascorbato-Glutation

También denominado ciclo de Foyer-Halliwell-Asada, es un mecanismo eficiente de las células vegetales para la eliminación del H_2O_2 , especialmente en aquellos compartimentos celulares donde se produce este metabolito y no existe catalasa (Halliwell y Gutteridge, 2000). Está compuesto por cuatro enzimas: ascorbato peroxidasa (APX), monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR), deshidroascorbato reductasa (DHAR) y glutation reductasa (GR), ascorbato (ASC), glutation (GSH) y poder reductor (NADPH) (Foyer y Halliwell, 1976; Asada, 1984) (Fig. 1.14). Las enzimas de este ciclo se localizan en cloroplastos, citosol, mitocondrias y peroxisomas (Halliwell y Foyer, 1976; Jiménez y col., 1997; Foyer y col., 1997; del Río y col., 2002a; Mittova y col., 2002; 2003a).

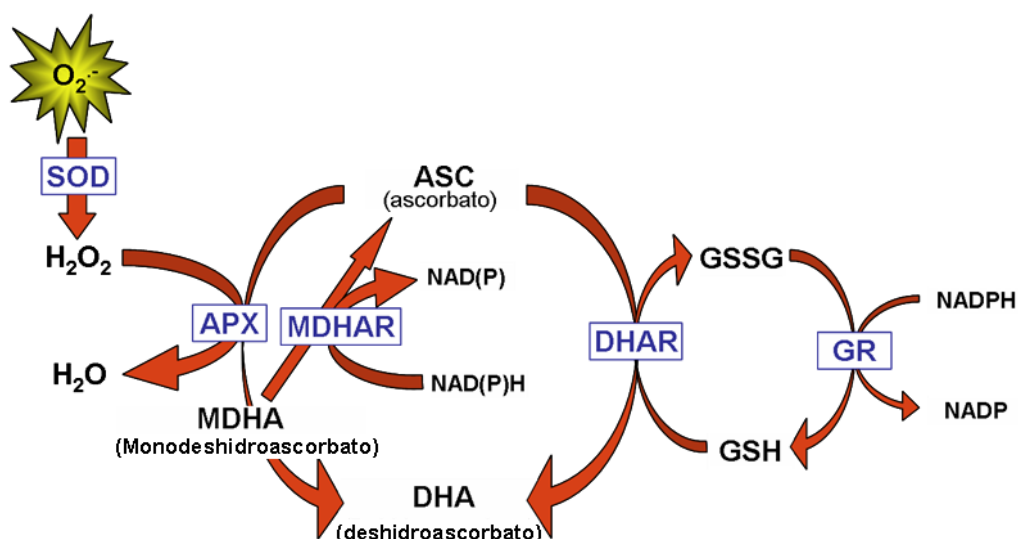


Figura 1.14: Ciclo Ascorbato-Glutation o de Foyer-Halliwel-Asada. Modificado de Inze y Van-Montagu, 1995.

Existe un alto grado de complejidad en términos de compartimentación subcelular de los componentes de este ciclo, del tamaño de sus familias de genes y de la regulación de la expresión de los mismos. Esta complejidad, asociada al papel del glutatión en procesos de señalización en respuesta a distintos tipos de estrés, sugiere que el ciclo ascorbato-glutatión es sólo una parte de la función de las enzimas que lo forman dentro de la célula (Creissen y Mullineaux, 2002).

Ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11)

Es una peroxidasa hemínica que lleva a cabo la primera reacción del ciclo ascorbato-glutatión, reduciendo el H_2O_2 a H_2O , utilizando el ASC como sustrato reductor, el cual se oxida a monodeshidroascorbato (MDA). Esta enzima se localiza en el cloroplasto, a nivel de estroma y tilacoides, en el citosol, en mitocondrias y peroxisomas (Chen y Asada, 1989; Miyake y Asada, 1992; Bunkelmann y Trelease, 1996; Jiménez y col., 1997; Foyer y col., 1997; Ishikawa y col., 1996; López-Huertas y col., 1999a) y la expresión de las distintas isoformas puede variar en función del tejido (Teixeira y col., 2006). En un principio se pensó que había un sólo gen que codificaba la APX citosólica en guisante y en *Arabidopsis*. Sin embargo, la base de datos de *Arabidopsis* muestra la existencia de 4

clases de APXs que incluyen a 62 cDNAs con homología al centro activo de APX: APX1, APX3 y los que codifican las isoformas tAPX y sAPX. Todos ellos se expresan en los tejidos de la planta en condiciones fisiológicas. Además, se ha detectado un gen que sólo se expresa en condiciones de estrés (APX2) (Creissen y Mullineaux, 2002).

Monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR; EC 1.6.5.4)

Cataliza la reducción del MDHA para generar ascorbato usando NAD(P)H como donador de electrones (Asada y Takahashi, 1987). Por otro lado, el MDHA puede transformarse en ASC y DHA por dismutación espontánea. Es una enzima ampliamente distribuida en plantas, algas y animales, y está presente en el citosol, cloroplastos (Hossain y Asada, 1984a; Sano y col., 2005), mitocondrias (Jiménez y col., 1997; Mitowa y col., 2003b) y peroxisomas/glioxisomas (Bowditch y Donaldson, 1990; Jiménez y col., 1997; Mitowa y col., 2003b; Leterrier y col., 2005). En cloroplastos, la MDHAR puede tener la función de regeneración del ASC a partir de MDA, y mediar la fotorreducción del oxígeno a radical superóxido cuando el sustrato MDA está ausente (Miyake y col., 1998).

Deshidroascorbato reductasa (DHAR; EC 1.8.5.1)

La DHAR cataliza la reducción divalente del deshidroascorbato (DHA) a ASC a expensas del GSH (Hossain y Asada, 1984b; Villalba y col., 1995). Es una enzima poco caracterizada debido a su baja estabilidad (Foyer y Halliwell, 1977; Trumper y col., 1994), lo que unido a su escasa afinidad por el sustrato (Minetti y col., 1992) ha llevado a sugerir que *in vivo* no parece ser fundamental en el mantenimiento del ASC en su forma reducida, e incluso se ha dudado de su existencia como enzima específica (Morell y col., 1997). La DHAR se ha purificado de hojas de *Spinacia oleracea* (Foyer y Halliwell, 1977; Hossain y Asada, 1984b), de tallos de *Pisum sativum* (Jablonski y Anderson, 1981), tubérculos de *Solanum tuberosum* (Dipierro y Borranccino, 1991), y de *Oryza* (Kato y col., 1997), de donde se ha clonado y caracterizado el gen que la codifica (Urano y col., 2000) y de *Arabidopsis* (Creissen y col., 2001).

Glutation reductasa (GR; EC 1.6.4.2)

Es una flavoproteína que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) utilizando NADPH como donador de electrones. Es una proteína dimérica con FAD en el centro activo de cada subunidad (Halliwell y Gutteridge, 2000). La actividad GR se encuentra ampliamente distribuida en procariotas y eucariotas, y está implicada en procesos metabólicos de vital importancia para la célula, considerándose crucial en el mantenimiento de la capacidad antioxidante celular (Meister y Anderson, 1983; Creissen y col., 1994). Se ha purificado y caracterizado en numerosas especies y tejidos vegetales (Guy y Carter, 1984; Wingsle, 1989; Anderson y col., 1990; Asada, 1994; Romero-Puertas y col., 2006a). La GR, aunque está localizada en un 80% en el cloroplasto, también se ha detectado en mitocondrias, citosol y peroxisomas (Jiménez y col., 1997; Lascano y col., 1998; Romero-Puertas y col., 2006a). Es una enzima importante en la protección de la planta frente a distintos tipos de estrés como los producidos por herbicidas, contaminantes, bajas temperaturas, alta intensidad lumínica y estrés hídrico (Smith y col., 1989; Foyer y col., 1991; Oswald y col., 1992; Mullineaux y col., 1994; Navari-Izzo e Izzo, 1994; Lascano y col., 1998; Schulz y Hartling, 2001; Schutzendubel y Polle, 2002; Gechev y col., 2003).

1.11.2.4 NADP deshidrogenasas

El NADPH necesario para el funcionamiento del ciclo ASC-GSH es suministrado por la ruta de las pentosas fosfato. La primera enzima implicada en esta ruta es la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH; EC 1.1.1.49), seguida de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH; EC 1.1.1.44). La G6PDH se localiza en el citosol, cloroplastos y peroxisomas (Schnarrenberger y col., 1973; Herbert y col., 1979; Corpas y col., 1998a). La velocidad de esta ruta depende del suministro de NADP^+ a la primera enzima. A su vez, este NADP^+ es proporcionado por la GR. Otras fuentes de poder reductor son el enzima málico (EM) y la isocitrato deshidrogenasa (ICDH), y en cloroplastos existe una fuente adicional de NADPH que es la ferredoxín-NADP⁺ reductasa del fotosistema I (Joliot y Joliot, 2006).

1.11.2.5 Otras peroxidasas

Las peroxidasas son un grupo heterogéneo de enzimas hemínicas, que oxidan un amplio grupo de sustratos (SH₂) utilizando el H₂O₂. Se encuentran en plantas, mamíferos, hongos y organismos procariontas (Asada, 1992). Se clasifican en función de sus propiedades estructurales y catalíticas, e intervienen en distintos procesos vegetales como la organogénesis, la formación de la pared celular, el desarrollo y maduración de los frutos, biosíntesis de etileno, senescencia y respuesta frente a estrés biótico y abiótico. De forma genérica, a las peroxidadas inespecíficas celulares, se les denomina guayacol peroxidadas (GPX), por ser el guayacol el donador más utilizado en los ensayos de espectrofotometría (Halliwell y Gutteridge, 2000).

1.11.2.6 Glutation-*S*-Transferasas (GST; EC 2.5.1.18)

Catalizan la reacción de compuestos de bajo peso molecular con grupos tioles y glutatión pudiendo utilizar una gran variedad de sustratos tanto hidrofóbicos como electrofílicos y, normalmente citotóxicos, formando tioésteres denominados S-conjugados (Marrs, 1996). Las GSTs se han localizado en la mayoría de los organismos aeróbicos, incluidas las plantas (Pascal y col., 1998). Las GSTs se inducen durante procesos de estrés como la toxicidad por metales pesados, heridas, el ataque por patógenos, producción de etileno y ozono (Marrs, 1996; Pascal, 1998; Alfenito y col., 1998; Moons, 2005). Además, las GSTs en plantas juegan un papel importante en la respuesta celular frente a auxinas y durante el metabolismo normal de la planta relacionado con productos secundarios como, antocianinas y ácido cinámico (Marrs, 1996; Alfenito y col., 1998).

1.11.2.7 Tiorredoxinas (Trx)

Son polipéptidos de bajo peso molecular con actividad ditiol-disulfuro óxidoreductasa que se encuentran presentes tanto en procariontas como en eucariotas (Arnér y Holgren, 2000; Gelhaye y col., 2005) Contienen dos grupos -SH adyacentes en forma reducida, que se convierten en un puente disulfuro (-S-S-) en su forma oxidada. La proteína oxidada puede ser reducida *in vivo* por la tiorredoxín reductasa, una enzima que contiene

un grupo FAD y utiliza NADPH, y que muestra similitud con la glutation reductasa. En *Arabidopsis* se han descrito al menos 20 genes que codifican Trx y en función de su estructura primaria se clasifican en: TrxF (cloroplastos), Trxh (mitocondria y citosol), Trxo (mitocondria), Trxx (cloroplastos) y Trxy (cloroplastos) (Gelhaye y col., 2005).

Las tiorredoxinas juegan un papel clave en el metabolismo de plantas y animales, interviniendo en numerosos procesos. Pueden reaccionar directamente con el H_2O_2 , aunque su función metabólica se desconoce, están implicadas en la regulación de actividades de enzimas del ciclo de Calvin en el cloroplasto, regulan enzimas implicadas en la glucólisis, intervienen en la síntesis de ATP (factor de acoplamiento CF1), en la asimilación del carbono de plantas C_3 , participan en la exportación de equivalentes de reducción al citosol en plantas C_3 e intervienen en la reparación de daños a residuos de metionina en proteínas (Gelhaye y col., 2005).

1.11.2.8 Peroxirredoxinas (Prx)

Recientemente se ha asignado un papel importante a las peroxirredoxinas en la protección frente al daño oxidativo (Dietz y col., 2006). Se trata de peroxidases de aproximadamente 25 kDa y con una especificidad de sustrato amplia ya que son capaces de reducir diversos peróxidos como el H_2O_2 , alquilhidroperóxidos y peroxinitritos (Dietz y col., 2006). Estas proteínas poseen una o dos cisteínas características en regiones altamente conservadas que son fundamentales para la actividad catalítica y se pueden dividir en cuatro subgrupos (Dietz y col., 2006). El primer subgrupo está representado por las peroxirredoxinas de una cisteína (1-Cys Prx) que se localizan en el núcleo. El segundo grupo está representado por las peroxirredoxinas de dos cisteínas (2-Cys Prx) que se sitúan en el cloroplasto donde protegen la membrana fotosintética de los daños oxidativos (Baier y Dietz, 1999). El tercer grupo, Prx de tipo II, parece situarse en peroxisomas de células eucarióticas, en el citosol, mitocondrias y cloroplastos. Finalmente, la Prx Q representa el cuarto subgrupo, se trata de una proteína pequeña, si se compara con las anteriores, que se localiza fundamentalmente en los cloroplastos. En el genoma de *Arabidopsis* se han descrito 10 genes que codifican Prx, mientras que en arroz se han encontrado 8 (Dietz y col., 2006). La mayoría de las

peroxirredoxinas utilizan las cisteínas reactivas presentes en la tiorredoxina (Trx) como donador de electrones para reducir el H_2O_2 , por lo que también se han denominado tiorredoxina peroxidadas (TrxPx) (Dietz y col., 2006).

1.12 PEROXISOMAS

1.12.1 Principales funciones metabólicas

Los peroxisomas intervienen en muchos procesos metabólicos, que se encuentran compartimentalizados, lo cual implica un flujo de sustratos entre distintos orgánulos celulares y un posible papel regulador indirecto de los peroxisomas sobre otras vías metabólicas (Tolbert y col., 1987). Fueron descritos por primera vez por Rhodin en 1954, y se denominaron “microcuerpos”. A principio de los años 60 fue cuando estos microcuerpos se caracterizaron bioquímicamente y se reconocieron como orgánulos diferentes, gracias a los trabajos realizados por de Duve y col., (1965), en tejido de mamíferos. Debido a su alto contenido en H_2O_2 , de Duve y Baudhuin en 1966 bautizaron a estos orgánulos como peroxisomas. Breidenbach y Beevers en 1967 aislaron unos orgánulos de morfología similar a los “microcuerpos” en tejidos vegetales, que contenían catalasa y las enzimas del ácido glioxílico, y los denominaron glioxisomas. Actualmente, los peroxisomas están bien caracterizados, son unos orgánulos de 0,1-2 μm de diámetro, constituidos por una membrana simple que rodea a una matriz granular o fibrilar, y que en ocasiones presentan inclusiones amorfas o cuerpos cristalinos (Tolbert y Essner, 1981; Kindl y Lazarow, 1982; Huang y col., 1983). No poseen DNA intraorganular, ni ribosomas, ni sistemas de membrana internos, por lo que todas las proteínas peroxisomales están codificadas en el genoma nuclear (Kunau, 1998; Olsen, 1998; López-Huertas y Baker, 1999b). En los últimos años, se ha demostrado la implicación de los peroxisomas en distintas funciones celulares en células eucariotas (Baker y Graham, 2002, del Río y col., 2002b).

Los peroxisomas de plantas superiores se pueden clasificar en 4 tipos, según su función metabólica específica y el tejido donde se encuentren (Huang y col., 1983; Baker y Graham, 2002):

1.- *Glioxisomas*, presentes en semillas oleaginosas y hojas senescentes. Contienen las enzimas necesarias para llevar a cabo la β -oxidación de ácidos grasos y el ciclo del glioxilato, lo que permite la transformación de los lípidos de reserva de la semilla en azúcares que serán utilizados durante la germinación y el crecimiento de la plántula (Tolbert, 1981; Tolbert y Essner, 1981; Beevers, 1982)

2.- *Peroxisomas de hojas*, presentes en los tejidos fotosintéticos, y que llevan a cabo las reacciones más importantes de la fotorrespiración (Tolbert, 1981; Huang y col., 1983; Douce y Heldt, 2000). Están en estrecho contacto con mitocondrias y cloroplastos con los que cooperan para realizar la fotorrespiración (Huang y col., 1983).

3.-*Peroxisomas de nódulos de raíz*, presentes en los nódulos de ciertas leguminosas tropicales. Están implicados en la síntesis de la alantoína, el principal metabolito para el transporte de nitrógeno en estas plantas (Schubert, 1986).

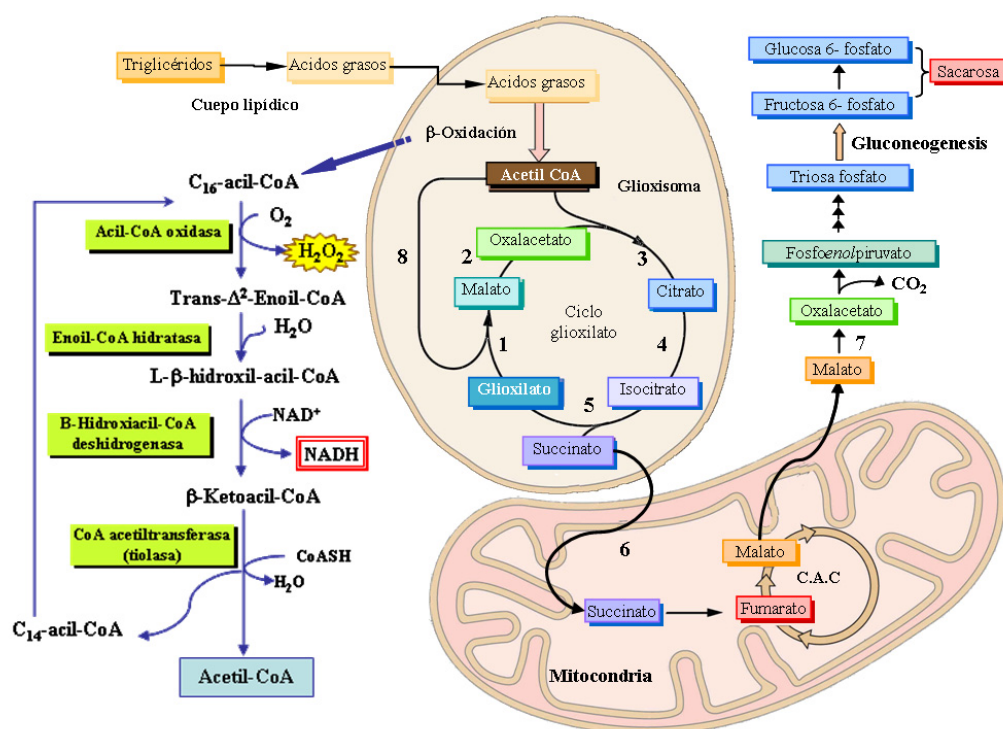
4.-*Peroxisomas no especializados*. Se encuentran en una gran variedad de tejidos y contienen las enzimas básicas peroxisomales, pero no desempeñan un papel fisiológico conocido (Tolbert, 1981; Huang y col., 1983).

1.12.1.1 β -Oxidación de Ácidos Grasos

En mamíferos y en animales en general, aproximadamente un 25% de los ácidos grasos se degradan en peroxisomas y el resto en mitocondrias, al contrario de lo que ocurre en plantas, donde la β -oxidación tiene lugar mayoritariamente en peroxisomas. Otra diferencia con células animales es el tipo de ácidos grasos utilizados como sustratos de la β -oxidación, que en plantas son fundamentalmente insaturados (Escher y Widmer, 1997). La ruta de la β -oxidación comienza con la digestión de los triglicéridos almacenados en los cuerpos lipídicos, por la acción de lipasas presentes en las membranas de cuerpos lipídicos y glioxisomas (Moreau y col., 1980; González y col., 1987). Los ácidos grasos, entran en el peroxisoma a través de transportadores específicos de la membrana, y son activados hasta Acil-CoA por una Acil-CoA sintetasa (ACS) (Hooks, 2002). Una vez activado el ácido graso, sufre una serie de reacciones (dos oxidaciones, una hidratación y una tiólisis), cuyo producto final es 1 mol de Acetil-CoA

y un ácido graso con dos carbonos menos, que comienza un nuevo ciclo (Fig. 1.15). En peroxisomas de tejidos de reserva, el Acetil-CoA entra en el ciclo del glioxilato y, tras sucesivas reacciones en el mismo orgánulo y en otros compartimentos celulares, dará lugar a la formación de sacarosa, fuente de carbono y energía para el crecimiento de la plántula (Buchanan y col., 2000; Reumann, 2000). Durante este proceso se genera H_2O_2 en la reacción catalizada por la Acil-CoA oxidasa, NADH y Acetil-CoA, como productos finales (Fig. 1.15). La eliminación del H_2O_2 y la regeneración del NAD y CoASH son necesarias para el funcionamiento del ciclo. El H_2O_2 es eliminado por antioxidantes presentes en este orgánulo (ver apartado 1.11), y la oxidación del NADH puede ser llevada a cabo a través de una pequeña cadena de transporte electrónico situada en la membrana del orgánulo (ver apartado 1.12.2), o bien en la reacción de la hidroxipiruvato reductasa durante la fotorrespiración (Baker y col., 2006).

Entre las funciones que actualmente se asignan a la β -oxidación de ácidos grasos en vegetales están la regulación del desarrollo de la planta durante la germinación, la madurez y la senescencia, el metabolismo de hormonas, y las respuestas frente al estrés abiótico (Hooks, 2002). Durante la germinación, la β -oxidación de ácidos grasos del glioxisomas en las semillas los lípidos de reserva son catabolizados para proporcionar fuente de carbono (sacarosa) y energía a la plántula (Eastmond y col., 2000; Baker y col., 2006). Durante la senescencia juega un papel crucial en la degradación de lípidos con fines de abastecimiento de carbono y energía, con la salvedad de que los lípidos hidrolizados son estructurales y no de reserva (Pistelli y col., 1992). También interviene en la síntesis de auxinas, y ácido jasmónico (Baker y col., 2006). Análisis de mutantes de Acil-CoA oxidasa (ACX) y tiolasa (KAT) demuestran la participación de ACX1 y KAT2-PED1 en la biosíntesis de jasmónico inducida por herida (Castillo y col., 2004). La β -oxidación también puede contribuir a la reparación de lípidos de membranas, causados por radiación ultravioleta e inducidos por distintas situaciones de estrés (Rylott y col., 2003).



1.15: Esquema de la β -oxidación de ácidos grasos y del ciclo del glioxilato en peroxisomas (Buchanan y col., 2000). 1: malato sintetasa; 2: malato deshidrogenasa; 3: citrato sintetasa; 4: aconitasa; 5: isocitrato liasa; 6: succinato deshidrogenasa; 7: malato deshidrogenasa; 8: tiolasa, β -hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, enoil-CoA hidratasa y acil-CoA oxidasa.

1.12.1.2 Ciclo del Glioxilato

Este ciclo es exclusivo de tejidos de reserva en plantas (Huang y col., 1983). Está muy relacionado con la β -oxidación, ambos actúan para suministrar glúcidos a la plántula durante su desarrollo. En la figura 1.15 se muestra un esquema de este ciclo. Las enzimas malato sintetasa e isocitrato liasa junto con las enzimas del ácido cítrico, utilizan el acetil-CoA procedente de la β -oxidación de los ácidos grasos para producir succinato, que entra en la mitocondria donde se convierte en malato y éste, a su vez, en oxalacetato que pasa al citosol donde se lleva a cabo la gluconeogénesis hasta la obtención de sacarosa (Donaldson, 1986).

1.12.1.3 Fotorrespiración

La fotorrespiración o ciclo oxidativo fotosintético del carbono consiste en la

incorporación del oxígeno, dependiente de la luz, con la liberación de una molécula de CO_2 por ciclo (Fig. 1.16). La fotorrespiración de las plantas C_3 involucra tres compartimentos subcelulares, cloroplasto, peroxisoma y mitocondria (Fig. 1.16), y su velocidad viene determinada por la intensidad luminosa, la temperatura y la relación O_2/CO_2 (Tolbert, 1980; Huang y col., 1983; Buchanan y col., 2000). La primera función de esta ruta consiste en la recuperación del 2-P-glicolato que se produce continuamente en la luz por la actividad oxigenasa de la rubisco (Douce y Neuburger, 1999). En el curso de este ciclo, 2 moléculas de 2-P-glicolato son metabolizadas a 3-P-glicerato y CO_2 . El 3-P-glicerato, a su vez, se utiliza para regenerar la ribulosa-2-P en el Ciclo de Calvin (Fig. 1.16). La oxidación del glicolato a glioxilato se lleva a cabo en los peroxisomas, en la reacción catalizada por la glicolato oxidasa. En el curso de esta reacción se genera una gran cantidad de H_2O_2 , que se degrada por las defensas antioxidantes del orgánulo (del Río y col., 2006). La fotorrespiración también puede tener un papel protector previniendo procesos de fotoinactivación en el cloroplasto en situaciones de estrés que conlleven reducción del CO_2 disponible para el proceso fotosintético (Romero-Puertas y col., 1999).

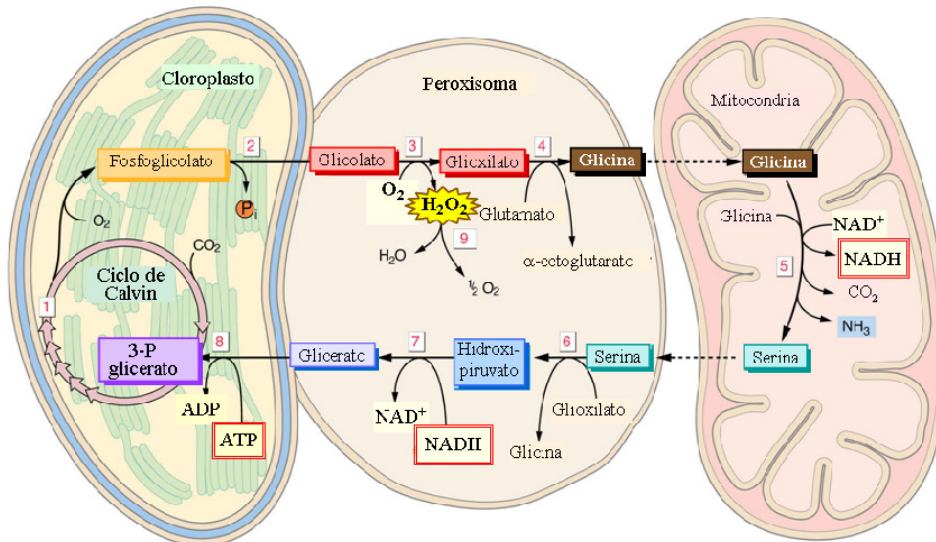


Figura 1.16: Esquema de la fotorrespiración que implica a los cloroplastos, las mitocondrias y los peroxisomas (Buchanan y col., 2000). Enzimas: 1. Rubisco; 2. Fosfoglicolato fosfatasa; 3. Glicolato oxidasa; 4. Glutamato: glioxilato aminotransferasa; 5. Glicina descarboxilasa y serina hidroximetil transferasa; 6. Serin glioxilato aminotransferasa; 7. Hidroxipiruvato reductasa; 8. Glicerato quinasa; 9. Catalasa.

1.12.1.4 Metabolismo de los Ureidos

Los ureidos alantoína y ácido alantoico son metabolitos importantes para el transporte del nitrógeno en el xilema de algunas plantas leguminosas (Schubert, 1986). La xantina óxidoreductasa (XOD, forma O y XDH, forma D) y la urato oxidasa (UO) son las primeras enzimas de la ruta de degradación de purinas y ambas se han detectado en nódulos de ciertas leguminosas (Nguyen y col., 1986), en el citosol (Nguyen y Feierabend, 1978; Hanks y col., 1981; Nguyen, 1986) y en peroxisomas de hojas de *Pisum sativum* (del Río y col., 1989 y 1998) y de caupí (Corpas y col., 1989). La XOD cataliza la oxidación de xantina e hipoxantina a ácido úrico y la UO convierte el ácido úrico en alantoína, y en ambas reacciones tiene lugar la producción de H_2O_2 y O_2^- (del Río y col., 1992). La presencia de XOD y UO en peroxisomas sugiere un papel de estos orgánulos en el catabolismo de RNA y DNA (Sandalio y col., 1988; del Río y col., 1992).

1.12.2 Especies de oxígeno reactivo, nitrógeno reactivo y sistemas antioxidantes

En plantas, como en la mayoría de los organismos eucariotas, la mayor producción de H_2O_2 , tiene lugar a nivel de los peroxisomas, aunque en los últimos años también se ha demostrado la producción de O_2^- y NO, en estos orgánulos (del Río y col., 2006). En condiciones normales, la producción de H_2O_2 tiene lugar durante la fotorrespiración, ciclo del glioxilato, β -oxidación de ácidos grasos, y catabolismo de purinas, por acción de flavinoxidasas y el desproporcionamiento enzimático o espontáneo del O_2^- (Fig. 1.17) (Baker y col., 2006; del Río y col., 2006). En peroxisomas de hojas de *Pisum sativum* y cotiledones de *Citrullus lanatus*, se genera O_2^- a nivel de la matriz y de la membrana del orgánulo. En la matriz se produce fundamentalmente por la actividad XOD (Sandalio y col., 1988) y en la membrana a través de una pequeña cadena de transporte electrónico, constituida por tres polipéptidos integrales de membrana, uno de 29 kDa que podría estar relacionado con un citocromo P_{450} dependiente de NADPH, otro de 18 kDa (cit *b*) y por último uno de 32 kDa que posiblemente sea la monodeshidroascorbato reductasa (MDAR) (Fig. 1.17) (López-Huertas y col., 1999a). Recientemente se ha demostrado la existencia de actividad NOS en peroxisomas de hojas de *Pisum sativum* (Barroso y col.,

1999), además se ha evidenciado la existencia de NO en peroxisomas purificados, mediante técnicas de fluorimetría y espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR) (Corpas y col., 2004). La proteína responsable de la producción de NO en peroxisomas es dependiente de arginina, NADPH, calmodulina, BH₄ y Ca²⁺ y se inhibe por inhibidores característicos de la NOS de mamíferos (Corpas y col., 2001)

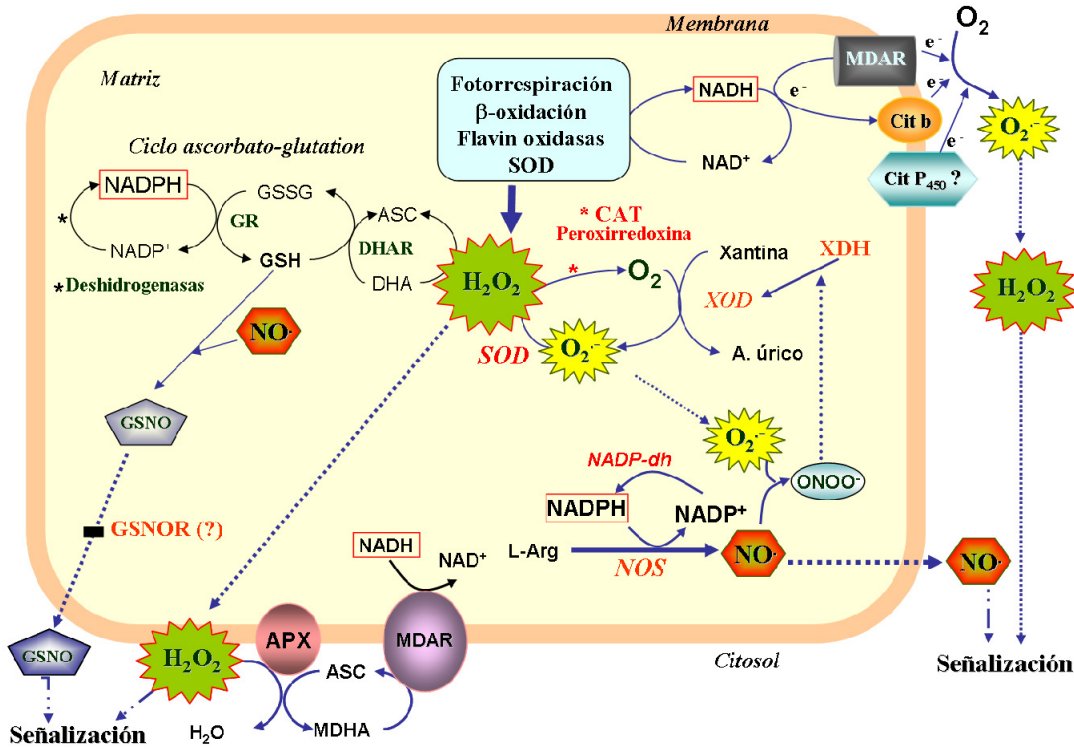


Figura 1.17: Esquema de la producción de ROS/RNS y sistemas antioxidantes en peroxisomas de hojas de guisantes. Modificado de del Río y col., 2006. GR: Glutation reductasa; DHAR: Deshidroascorbato reductasa; CAT: Catalasa; SOD: superóxido dismutasa; XOD y XDH: Xantina oxidasa y deshidrogenasa; GSNOR: S-nitrosoglutation reductasa; APX: Ascorbato peroxidasa; MDAR: Monodeshidroascorbato reductasa

En los últimos años se ha demostrado la presencia de distintos sistemas antioxidantes dentro del peroxisoma. Además de la catalasa que se encarga de eliminar el H₂O₂ producido durante el metabolismo normal de este orgánulo (Huang y col., 1983; del Río y col., 1992), cabe destacar la existencia de actividad SOD. Concretamente en la matriz se ha localizado la Mn-SOD en peroxisomas de hoja y la CuZn-SOD en glioxisomas

(Sandalio y del Río, 1988), y la Fe-SOD en peroxisomas de pétalos de rosa (Droillard y Paulin, 1990). En la membrana de glioxisomas también se ha detectado la presencia de Mn-SOD (Sandalio y del Río, 1988; del Río y Donaldson, 1995). Las enzimas del ciclo ascorbato-glutation, así como los metabolitos implicados en el mismo, ascorbato y glutatión, también se han localizado en peroxisomas (Jiménez y col., 1997; López-Huertas y col., 1999a; Romero-Puertas y col., 2006b), la DHAR y GR en la matriz, mientras que la MDAR y la APX se encuentran unidas a la membrana (Bunkelmann y Trelease, 1996; Jiménez y col., 1997; López-Huertas y col., 1999a; Lisenbee y col., 2005). Igualmente se han localizado en peroxisomas de hojas las actividades de la ruta de las pentosas fosfato encargadas de suministrar poder reductor a este ciclo (G6PDH y 6PGDH) (Corpas y col., 1998a) y la actividad isocitrato deshidrogenasa (ICDH) (Yamazaki y Tolbert, 1970; Donaldson, 1982; Corpas y col., 1999). En *Arabidopsis* se han descrito dos peroxirredoxinas que podrían estar localizadas en citosol y peroxisomas (Horling y col., 2002; Dietz y col., 2006). La existencia de peroxirredoxinas en los peroxisomas, hace pensar que podrían colaborar con otros sistemas antioxidantes, como la catalasa y el ciclo ascorbato-glutation, en el control de los niveles de H₂O₂ (del Río y col., 2006).

La mayoría de las situaciones de estrés biótico y abiótico, conducen a una sobreproducción de ROS, responsables del daño oxidativo asociado al estrés en plantas (Dat y col., 2000; Mittler, 2002). En condiciones fisiológicas normales, la producción de ROS en peroxisomas, está controlada por los sistemas antioxidantes descritos anteriormente, pero bajo condiciones de estrés la sobreproducción de ROS, junto con la depresión de los sistemas antioxidantes, conducen a la aparición de serios daños celulares. Por otro lado, el estrés oxidativo conduce a un incremento en la población de peroxisomas, tal como se ha observado frente a xenobióticos (Palma y col., 1991), metales pesados (Romero-Puertas y col., 1999) o frente a H₂O₂ (López-Huertas y col., 2000). En estas situaciones, las ROS producidas en peroxisomas podrían actuar como moléculas señal, contribuyendo a la comunicación entre distintos compartimentos celulares en la regulación de la respuesta celular frente al estrés (Romero-Puertas y col., 2004a; del Río y col., 2006).

1.12.3 Movimiento de peroxisomas

En los últimos años, los avances técnicos en la microscopía láser confocal, análisis de imágenes en tres dimensiones y el uso de proteínas fluorescentes como marcadores *in vivo*, han permitido estudiar la organización y la naturaleza dinámica de las células vegetales. Existen numerosos trabajos sobre el movimiento de orgánulos celulares como cloroplastos, retículo endoplasmático, mitocondrias, aparato de Golgi y núcleo (Hanson y Kohler, 2001; Hawes y Satiat-Jeunemaitre, 2001; Brandizzi y col., 2002) y más recientemente de peroxisomas. Los peroxisomas de plantas son orgánulos extremadamente dinámicos, con respecto a su forma, distribución y movimiento. No son orgánulos estáticos, sino que se mueven rápidamente, en diferentes direcciones a lo largo de la célula (Collings y col., 2002; Jedd y Chua, 2002; Mano y col., 2002; Mathur y col., 2002). El tipo de movimiento depende del tipo de célula. En epidermis de cebolla y en distintos tipos de células de *Arabidopsis*, los movimientos son rápidos y lentos, unidireccionales y bidireccionales, movimientos de parada y avance y oscilaciones arbitrarias, y el movimiento individual de un orgánulo es totalmente independiente de los otros (Muench y Mullen, 2003). El porcentaje de peroxisomas en movimiento y estacionarios dependen del estado y el tipo de célula. La velocidad de movimiento de los peroxisomas se ha estudiado en distintos tipos celulares, en células de epidermis de puerro la mayor velocidad observada es de 6,5 $\mu\text{m/s}$ (Collings y col., 2002), mientras que en otros tipos celulares examinados, como tricomas, células corticales de la raíz y pelos radicales de *Arabidopsis*, la mayor velocidad observada está entre 2-5 $\mu\text{m/s}$ (Jedd y Chua, 2002; Mano y col., 2002; Mathur y col., 2002). Por término medio, la velocidad de movimiento de los peroxisomas de plantas es de 0,75-2 $\mu\text{m/s}$ (Rapp y col., 1996), mucho mayor que la observada en tejidos animales de 0,2-0,5 $\mu\text{m/s}$ (Wiemer y col., 1997), lo que sugiere que los mecanismos moleculares responsables del control del movimiento de peroxisomas en ambos grupos de organismos pueden ser diferentes.

La movilidad de los peroxisomas en células de mamíferos, tiene lugar a través de microtúbulos, mediante un proceso regulado en parte por una proteína motora, una proteína de unión a GTP y proteínas diana en el citosol, por el contrario, en plantas el

movimiento de los peroxisomas tiene lugar a través de los microfilamentos de actina (Marthur y col., 2002). El movimiento de los peroxisomas en células vegetales se inhibe con latrunculina B, una droga que rompe los filamentos de actina (Fig. 1.18), sin embargo no se afecta tras la degradación de los microtúbulos, lo que demuestra la dependencia de los filamentos de actina para el desplazamiento de estos orgánulos (Marthur y col., 2002).

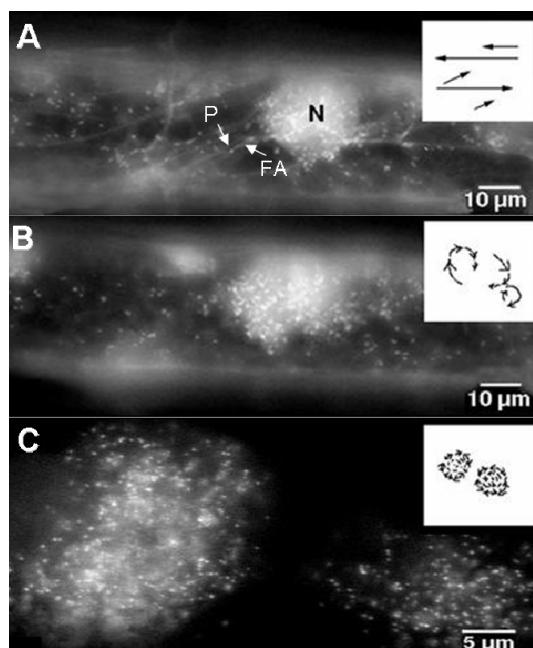


Figura 1.18: Efecto de la latrunculina 2 mM sobre el movimiento de peroxisomas en células de epidermis de cebolla. A: 5' de tratamiento, se observan claramente los filamentos de actina (FA) y el movimiento de los peroxisomas (P) es de largo recorrido y en todas las direcciones. B: 15' de tratamiento, los filamentos de actina, no se distinguen y los peroxisomas se mueven en círculos con desplazamientos cortos. C; tras 30' de tratamiento, los peroxisomas forman agregados y el desplazamiento es arbitrario y de muy corto recorrido (Mathur y col., 2002).

El movimiento de los peroxisomas a través de la actina, depende de importantes procesos celulares, como la distribución de los orgánulos durante la división celular y el intercambio de metabolitos y proteínas a lo largo de la célula. Hasta el momento, la única proteína conocida responsable del tráfico de peroxisomas es la miosina 2 (Mío 2), una proteína motora dependiente de ATP, que co-sedimenta con los filamentos de actina, y que ha sido localizada en diferentes especies vegetales y distintos tipos celulares (Yokota y Shimmen, 1994; Tominaga y col., 2003; Hashimoto y col., 2005).

Estudios de inmunolocalización en plantas de *Arabidopsis* demuestran que la Mio 2 colocaliza con los filamentos de actina y con peroxisomas (Hashimoto y col., 2005) y la inhibición de la actividad miosina con 2,3-butanodiono monoxina y la desestructuración de los filamentos de actina con latrunculina, demuestran que el sistema actina-miosina está implicado en el movimiento de los peroxisomas (Hashimoto y col., 2005). La Mio2 además de transportar peroxisomas, podría transportar otros pequeños orgánulos o vesículas, pero no mitocondrias ni cloroplastos, lo cual pone de manifiesto la existencia de distintas proteínas motoras para el transporte de diferentes orgánulos (Hashimoto y col., 2005).

Una de las posibles funciones del movimiento de los peroxisomas, sería el acercamiento del orgánulo a zonas del citoplasma donde se sintetizan las proteínas destinadas al peroxisoma (Muench y Mullen, 2003). El citoesqueleto es una estructura sólida, con proteínas y otras moléculas asociadas, y esta forma de interacción podría incrementar la eficiencia de procesos como la translocación y el flujo de metabolitos (Jansen, 1999). Es probable que las proteínas recién sintetizadas, destinadas al peroxisoma, interaccionen con el citoesqueleto para mejorar el grado de importación a los peroxisomas que se están moviendo por los filamentos de actina. De hecho, se ha identificado un sitio de unión a microtúbulos en la proteína multifuncional (MFP), la cual interviene en la β -oxidación de ácidos grasos (Chuong y col., 2002). Otra posible función del movimiento de los peroxisomas, sería maximizar algunos procesos metabólicos como la fotorrespiración, mediante el acercamiento a los cloroplastos (Mano y col., 2002). La unión de peroxisomas y cloroplastos es fuerte y el desplazamiento de los peroxisomas depende, parcialmente, del movimiento de los cloroplastos (Wada y Suetsugu, 2004).

En *Arabidopsis*, se ha demostrado que la infección con el patógeno compatible *Erysiphe cichoracearum*, provoca una agregación de orgánulos subcelulares, fundamentalmente mitocondrias y peroxisomas, en los sitios de penetración del hongo. Por tanto el desplazamiento de los peroxisomas, también podría estar relacionado con procesos de respuestas celulares (Koh y col., 2005).

OBJETIVOS

La bioquímica de especies de oxígeno y de nitrógeno reactivo (*ROS* y *RNS*) en células vegetales en condiciones de estrés abiótico, constituye una de las líneas de investigación del Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC) de Granada. En los últimos años, el interés de nuestro laboratorio se ha centrado en el estudio de los mecanismos implicados en la toxicidad de metales pesados, concretamente el Cd, en plantas, y la implicación de las especies de oxígeno reactivo en la respuesta de la planta frente al metal. El Cd es un contaminante muy peligroso con una larga vida media que procede fundamentalmente de actividades antropogénicas. Los aspectos más estudiados de la toxicidad del Cd son los relacionados con alteraciones nutricionales, mecanismos de transporte del metal, inducción de fitoquelatinas y algunos aspectos relacionados con la fisiología de la planta.

En los últimos años ha habido un interés creciente por el estudio de este metal, y en especial se ha incrementado el interés de los investigadores por establecer el papel de las especies de oxígeno reactivo y el estrés oxidativo en la toxicidad del Cd. Actualmente se desconoce el mecanismo mediante el cual este metal es capaz de generar estrés oxidativo si bien se ha incrementado considerablemente nuestro conocimiento sobre la respuesta de diferentes especies vegetales al Cd, en lo que se refiere a cambios en la capacidad antioxidante y análisis de marcadores de estrés oxidativo. Muy recientemente se ha comenzado a estudiar la producción de *ROS* mediante técnicas de histoquímica y microscopía electrónica y más inexplorado aún, se encuentra el estudio de los efectos de este metal sobre el metabolismo del NO y especies relacionadas.

Nuestro grupo ha sido pionero en el estudio de la producción de *ROS* y *RNS* en distintas situaciones de estrés y en la identificación de las fuentes de producción de *ROS* y *RNS* en peroxisomas. Como consecuencia de ello, hoy día sabemos que los peroxisomas contienen una amplia batería de sistemas antioxidantes de defensa frente a *ROS* y a la vez son emisores de *ROS* y NO. Las *ROS* presentan una dualidad con aspectos negativos, ya que en exceso promueven daños oxidativos a macromoléculas; y por otro lado su papel como moléculas señal actuando en la regulación de procesos de

desarrollo y de respuesta al estrés. El papel de los peroxisomas como emisores de señales celulares y a la par, como fuentes de estrés oxidativo es por tanto un tema de actualidad.

En trabajos anteriores en nuestro laboratorio se estudió el efecto del Cd sobre distintos parámetros fisiológicos en hojas de plantas de guisante, así como alteraciones en el metabolismo de ROS en hoja completa y también en peroxisomas. Para tener una imagen mas amplia de la respuesta al Cd en plantas, era necesario ampliar estos estudios a la raíz, es por ello, que en esta Memoria Doctoral se han completado estos estudios analizando la raíz. Los estudios iniciados en hojas se han completado con nuevas aproximaciones moleculares y celulares que nos permitan profundizar en los mecanismos de acción del metal y en la regulación de la respuesta celular frente al mismo. Para ello, se han establecido los siguientes objetivos:

1.- Estudio del efecto del Cd sobre el crecimiento y estructura de la raíz. Alteraciones de los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos y daños oxidativos a macromoléculas. Se efectuará un estudio comparativo del efecto del Cd sobre los sistemas antioxidantes en la hoja.

2.- Análisis de la acumulación de ROS y NO a nivel tisular y celular, en hojas y raíces e identificación de las principales fuentes de ROS y NO en respuesta al Cd. Establecer el papel regulador de las ROS y RNS en la respuesta celular al Cd.

3.- Con objeto de profundizar en el mecanismo de la regulación de la respuesta celular al Cd se analizarán los posibles cambios en los niveles de las hormonas jasmónico, salicílico y etileno que previamente se ha establecido desempeñan un papel regulador en la respuesta celular frente a distintas situaciones de estrés.

4.- Estudio de la expresión de proteínas de defensa y su regulación y función en respuesta al Cd.

5.- Para establecer el papel de los peroxisomas en la respuesta al Cd se analizará el movimiento de estos orgánulos, su regulación y las implicaciones en la respuesta al estrés por cadmio. También se obtendrán mutantes de *Arabidopsis* deficientes en la actividad glicolato oxidasa, una de las principales fuentes de H₂O₂, para abordar en un futuro el estudio de posibles genes regulados por esta fuente de ROS en situaciones de estrés.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO

3.1.1 Plantas de guisante (*Pisum sativum* L. cv Lincoln)

Las semillas de guisante de la variedad Lincoln se obtuvieron de las casas comerciales Ramiro Arnedo S.A. (La Rioja) y Semillas Fitó (Barcelona). Las semillas fueron desinfectadas por inmersión en etanol al 96% (v/v) durante tres minutos, secándolas posteriormente al aire sobre papel de filtro. Estas semillas, con poder germinativo superior al 90%, se germinaron en vermiculita humedecida con CaSO_4 0,5 mM, en cámara de cultivo a 25°C durante 4 días. Posteriormente, se trasladaron al invernadero, donde se cultivaron durante diecisiete días, en condiciones óptimas para dicha especie vegetal. Una vez obtenido el estadio de crecimiento adecuado, las plántulas se extrajeron cuidadosamente del soporte de vermiculita para no dañar el sistema radical y se trasplantaron a botes de PVC (2,5 litros de capacidad; 4 plántulas por bote) que se distribuyeron según un diseño de bloques de parcelas al azar hasta la finalización del ensayo. Se utilizó un sistema de cultivo en medios líquidos (Hewitt, 1966) con aireación controlada de la solución nutritiva en cada unidad de cultivo.

Las condiciones de cultivo de las plantas (día/noche) en el invernadero fueron las siguientes: temperatura, $26 \pm 2^\circ\text{C}$ / $18 \pm 1^\circ\text{C}$; humedad relativa, $70 \pm 5\%$ / $80 \pm 5\%$. Las soluciones nutritivas se prepararon con agua desionizada (resistividad $\geq 4 \text{ M}\Omega$) y reactivos específicos de pureza analítica, reponiéndose cada 24 h el volumen perdido por transpiración con agua desionizada.

La composición de la solución nutritiva es básicamente la descrita por del Río y col., (1985), con un pH de $5,5 \pm 0,1$ y una concentración iónica de 30 mg ion l^{-1} . Las concentraciones de nutrientes utilizadas se muestran en la Tabla 3.1. Las plantas se mantuvieron durante 14 días en estas soluciones nutritivas completas con aireación continua. La renovación total de las soluciones nutritivas se realizó semanalmente. Posteriormente, las soluciones nutritivas se suplementaron con CdCl_2 50 μM y se mantuvieron en estas condiciones durante otros 14 días.

Alternativamente, también se realizaron ensayos con plántulas jóvenes acortando el tiempo de cultivo en hidropónicos a 9 días. En estas plantas se determinó el efecto del

CdCl₂ 50 μM y de un donador exógeno de óxido nítrico, nitroprusiato sódico (SNP, 10 mM) siendo el periodo de tratamiento de 7 días.

MACRONUTRIENTES	mM	MICRONUTRIENTES	μM
KH ₂ PO ₄	0,52	Sequestrene 138Fe G100	91,3
(NO ₃) ₂ Ca	5,21	BO ₃ H ₃	46
SO ₄ Mg 7H ₂ O	1,87	SO ₄ Cu 5H ₂ O	1,1
(NO ₃) ₂ Mg 6H ₂ O	0,075	SO ₄ Zn 7H ₂ O	2,3
NO ₃ K	4,63	SO ₄ Mn H ₂ O	9,3
KOH	0,05		

Tabla 3.1: Composición de la solución nutritiva utilizada para hidropónicos de plantas de guisante (del Río y col., 1985).

Para determinar la respuesta de la planta al suministro exógeno de Ca²⁺, las soluciones nutritivas se suplementaron con Ca(NO₃)₂ 10 mM un día antes de la adición de CdCl₂, y se mantuvieron el tiempo que duró el tratamiento con el metal (2 semanas).

3.1.2 Plantas de *Arabidopsis thaliana*

Se han utilizado plantas de *Arabidopsis*, silvestres (wt) del ecotipo columbia 0 y los siguientes mutantes: la GFP-SKL que presenta una proteína de fusión GFP con el péptido señal del peroxisoma SKL, la Goxi-I que presentan niveles bajos de glicolato oxidasa, ambas obtenidas en esta Tesis Doctoral, la GFP-SKL A5, cedida por el profesor Chris Hawes de la Universidad Oxford Brookes (Oxford, Reino Unido), y el doble mutante Atrboh-DF deficiente en NADPH oxidasa, cedida por el profesor Jonathan Jones del John Innes Center (Norwich, Reino Unido).

Las semillas se esterilizaron superficialmente mediante inmersión consecutiva en etanol al 70% durante 1 min y en hipoclorito sódico comercial al 50% durante 10 min en condiciones de esterilidad, finalmente se realizaron dos lavados en agua destilada estéril. Las semillas se sometieron a un proceso de estratificación consistente en mantenerlas a 4°C y en oscuridad, embebidas en agua destilada estéril durante dos días,

con objeto de favorecer su germinación. Seguidamente, las semillas se sembraron en medio sólido MS (Murashige y Skoog, 1962), adicionado con tiamina (1 mg/l), ácido nicotínico (0,5 mg/l), mio-inositol (100 mg/l), sacarosa (30 g/l) y fitoagar (6 g/l), en placas Petri de nueve centímetros de diámetro. La composición del medio MS se describe en la tabla 3.2.

MACRONUTRIENTES	mM	MICRONUTRIENTES	μM
NH ₄ NO ₃	20,61	H ₃ BO ₃	100,27
KNO ₃	18,79	MgSO ₄ *H ₂ O	140,4
MgSO ₄ *7H ₂ O	1,5	ZnSO ₄ *7H ₂ O	30
KH ₂ PO ₄	1,25	KI	5
Fe-EDTA	μM	NaMoO ₄ *2H ₂ O	1
NaEDTA	100	CuSO ₄ *5H ₂ O	0,1
FeSO ₄ *7H ₂ O	100	CoCl ₂ *6H ₂ O	0,1

Tabla 3.2: Composición del medio MS (Murashige y Skoog, 1962)

Las placas con las semillas se mantuvieron inmóviles en una cámara de cultivo, durante el tiempo necesario hasta que las plantas tuvieron aproximadamente cuatro hojas, momento en el cual se trasladaron a sustrato con vermiculita al 50% aproximadamente. Una vez transplantadas se pasaron a una cámara de cultivo hasta el momento de su procesamiento. Las condiciones de cultivo (día/noche) de las plantas fueron las siguientes: temperatura 21°C/18°C, humedad relativa 60%/50%, y un fotoperiodo de 14 h con un PAR (Photosynthetically Active Radiation) mínimo de 19mE s⁻¹ · m⁻².

Para determinar el efecto del CdCl₂ 100 μM, las plántulas se cultivaron en sistemas hidropónicos para lo cual las semillas una vez esterilizadas y estratificadas se sembraron en puntas amarillas, que contenían el medio MS estéril, descrito en la tabla 3.2, solidificado con un 0,8% de fitoagar (Fig. 3.1).



Figura 3.1: Cultivo hidropónico de *Arabidopsis* en puntas.

Las puntas conteniendo las plántulas se pasaron a cultivos hidropónicos conteniendo la solución nutritiva descrita en la Tabla 3.3, con aireación continua hasta que tuvieron de 6 a 8 hojas. Esta solución se suplementó con CdCl_2 100 μM , y las plantas se recogieron a distintos intervalos de tiempo.

Para determinar el papel del Ca^{2+} en la respuesta de la planta frente al Cd, las soluciones nutritivas se suplementaron con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 10 mM 1 día antes de añadir el Cd y se mantuvo durante el periodo de tratamiento (48 h).

MACRONUTRIENTES	mM	MICRONUTRIENTES	mM
KNO_3	1	H_3BO_3	46
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1	MnSO_4	10
KH_2PO_4	1	ZnSO_4	0,77
MgSO_4	1	CuSO_4	0,32
Fe-EDTA	50 μM	NaMoO_4	0,58
		$\text{Cl}_2\text{Co} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,01

Tabla 3.3: Composición de la solución nutritiva para cultivos hidropónicos de *Arabidopsis*.

3.1.3 Recolección y preparación de las muestras vegetales

Concluido el periodo de crecimiento de las plantas de guisante en los tratamientos aplicados, se procedió a la recogida del material, separando la parte aérea de la raíz. Las raíces se lavaron por sucesivas inmersiones en agua destilada, hasta eliminar los restos de solución de cultivo. Las muestras vegetales recolectadas fueron pesadas para determinar el peso fresco, se midió el área foliar y parte del material se destinó a realizar estudios bioquímicos, celulares y moleculares, según se describe más adelante.

3.1.4 Determinación de actividad fotosintética

Las medidas de fijación de CO_2 fueron realizadas en las plantas de *Arabidopsis* deficientes en glicolato oxidasa (Goxi-I), con un analizador de gases por infrarrojos (IRGA), modelo LICOR 6400, para determinar la concentración de CO_2 y agua en un

compartimento en el cual las hojas son mantenidas en condiciones ambientales controladas. Previamente se analizó la respuesta de fijación de CO₂ a diferentes intensidades de luz (PAR; Photosynthetic Active Radiation), fijando las condiciones óptimas de análisis a 1500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de luz, 22°C (l) temperatura de la cámara y con una humedad aproximadamente del 45-50 %.

3.1.5 Diseño estadístico y análisis de resultados

El análisis matemático de los resultados experimentales se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza, considerando como fuentes de variación los tratamientos y las repeticiones, con objeto de calcular el nivel de probabilidad del efecto estudiado. La estimación múltiple de medias se efectuó mediante la prueba de Duncan.

3.2 PREPARACIÓN DE HOMOGENEIZADOS

El proceso se llevó a cabo a 4°C. Las hojas y raíces de guisante se lavaron y homogeneizaron en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, conteniendo EDTA 0,1 mM, 1,4-ditiotreitol (DTT) 2 mM, Triton X-100 al 0,2% (v/v) y PMSF 1 mM utilizando una relación peso/volumen de 1:4. Los homogeneizados se filtraron a través de 2 capas de nylon y posteriormente se centrifugaron a 27.000 g durante 20 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se almacenaron a -20°C o -80°C.

3.3 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PEROXISOMAS

3.3.1 Gradientes de Sacarosa

El proceso se llevó a cabo a 4°C. El método utilizado es el descrito por López-Huertas y col., (1995), que consiste en realizar centrifugaciones diferenciales seguidas de una centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa (Fig. 3.2). Se partió de 40 g de hojas de guisante que se homogeneizaron en 160 ml de un medio de extracción semicongelado (Tricina-KOH 170 mM, pH 7,5, sacarosa 1 M, EDTA-Na₂ 1 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM, ASB al 0,3 % (p/v) y DTT 5mM), utilizando un Sorvall Omnimixer a velocidad máxima en tres golpes de tres segundos cada uno.

El homogeneizado se filtró a través de dos capas de entretela y se centrifugó a 2.600 g durante 20 min para eliminar la mayor parte de los cloroplastos, núcleos y residuos celulares. El sobrenadante se centrifugó de nuevo a 12.000 g durante 15 min y el precipitado obtenido se resuspendió en 3 ml de un medio similar al de extracción pero a pH 7,0 y sin DTT, y la suspensión de orgánulos se depositó con ayuda de una jeringa, en la parte superior de un gradiente discontinuo de sacarosa compuesto por: 3ml del 60%, 6 ml del 57%, 9 ml del 51%, 9 ml del 47 %, 6 ml del 42% y 3 ml del 35% de sacarosa (p/p). Las soluciones de sacarosa se prepararon a partir de una solución madre de sacarosa del 66% (p/p) preparada en EDTA-Na₂ 1 mM, pH 7,5. Los tubos (Quick seals de Beckman) una vez sellados, se centrifugaron a 83.000 g durante 1 hora y 30 min en una ultracentrífuga Beckman usando un rotor vertical VTi50. Finalizada la centrifugación, los peroxisomas se situaban en la parte inferior del gradiente, en la interfase entre las capas de 57 y 51% de sacarosa (López-Huertas y col., 1995). La banda correspondiente a la fracción de peroxisomas se extrajo mediante perforación de los tubos con una jeringa. Los peroxisomas se almacenaron a -80°C.

3.3.2 Gradientes de Percoll

Los peroxisomas se purificaron mediante centrifugación en gradientes de Percoll del 15-53 % (v/v) (Sandalio y col., 1987). El medio de extracción estaba compuesto por tampón Mops 30 mM, pH 7,5, manitol 3,5 M, EDTA-Na₂ 1 mM, ASB al 0,2 % y se utilizó una relación p/v de 1/4. El homogeneizado se sometió a dos centrifugaciones diferenciales a 2600 g y 12000 g, respectivamente. El precipitado final, enriquecido en peroxisomas, se resuspendió en 2 ml de un medio de lavado compuesto por tampón Mops 20 mM, pH 7,2, conteniendo manitol 0,3 M, EDTA-Na₂ 1 mM y ASB al 0,2 % (p/v) y se depositó sobre un gradiente discontinuo de Percoll (Pharmacia) compuesto por 5,3 ml del 53 %, 12,4 ml del 38 %, 7,1 ml del 20 % y 7,1 ml del 15 % de Percoll preparado en tampón Mops 10 mM, pH 7,2, sacarosa 0,25 M y ASB al 0,2 % (p/v). El gradiente se centrifugó en un rotor 60Ti a 13.000 g durante 35 min en una ultracentrífuga Beckman. Finalmente, la banda de los peroxisomas se separó del gradiente mediante succión con jeringa y se diluyó diez veces con medio de lavado sin

ASB, para reducir la concentración de Percoll, recuperándose los orgánulos mediante centrifugación a 12.000 g durante 15 min.

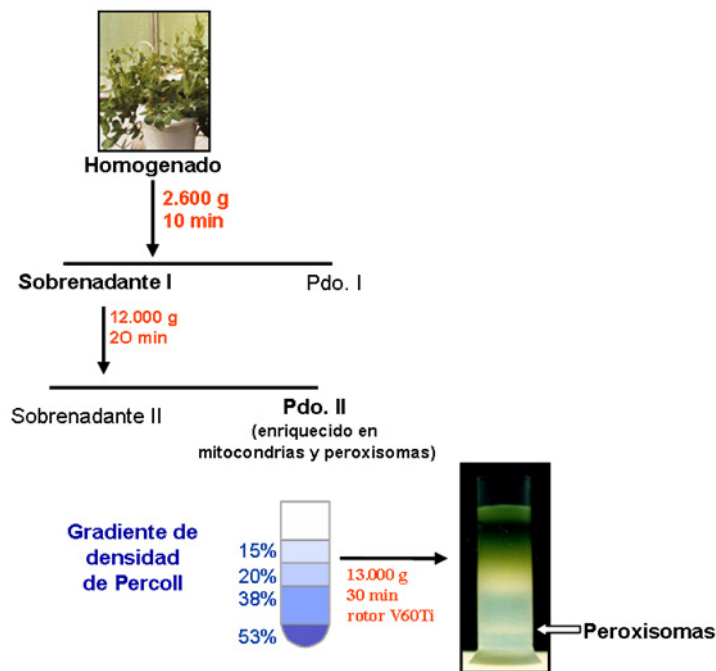


Figura 3.2: Purificación de peroxisomas mediante centrifugación diferencial y en gradiente de densidad de percoll.

3.4 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976) empleando albúmina de suero bovino (ASB) como patrón de calibración. Las muestras se prepararon en un volumen de 0,8 ml al que se le adicionaron 0,2 ml de una solución de Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay Reagent). Transcurridos 5 min, se procedió a la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm frente a un blanco con agua destilada.

3.5 DESARROLLOS ELECTROFORÉTICOS

3.5.1 Electroforesis en geles de Poliacrilamida en Condiciones Nativas (EGPA)

Se utilizó un equipo "Mini-Protean II" de Bio-Rad con geles de 7,5 x 8 cm y 1 ó 1,5 mm de grosor. Se utilizaron soluciones de acrilamida al 10-12 % (p/v) preparados en tampón

Tris-HCl 377 mM, pH 8,9, y la gelificación se realizó con TEMED y persulfato amónico al 0,45 % (p/v). Las muestras se prepararon en tampón de geles conteniendo azul de bromofenol al 0,006 %, (p/v) y sacarosa al 10 %. El desarrollo se efectuó a una intensidad de 10 mA por gel, durante 15-20 min y posteriormente a 20 mA por gel, hasta que el frente de azul de bromofenol alcanzó prácticamente el final del mismo. Se utilizó un tampón de electrodos compuesto por Tris 5 mM, pH 8,3, y glicina 38 mM.

3.5.2 Electroforesis en geles de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes (EGPA-SDS)

Se siguió básicamente la técnica descrita por Laemmli (1970), utilizando un equipo "Mini-Protean II" de Bio-Rad. Se prepararon geles de poliacrilamida 12 % (p/v) de 7,5 x 8 cm y 0,75 ó 1,5 mm de grosor, con un gel concentrador de poliacrilamida al 4 % (p/v). Las muestras para la electroforesis se prepararon en tampón Tris-HCl 0,063 M, pH 6,8, conteniendo SDS al 2 % (p/v), glicerol al 10 % (v/v) y azul de bromofenol al 0,006 % (p/v), y DTT 10 mM, y se calentaron a 95°C durante 5 minutos. Seguidamente, las muestras se cargaron en los geles y se aplicó un voltaje de 100 V durante 15 min y después 200 V durante 45 min utilizando como tampón de electrodos Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3, con glicina 0,192 M y SDS al 0,1 % (p/v). Se utilizaron marcadores de masas moleculares entre 14,4 y 97,4 kDa (Bio-Rad).

3.5.3 Electroforesis bidimensional

Para analizar el proteoma de peroxisomas de hojas de guisante, las proteínas se separaron mediante electroforesis bidimensional. En la primera dimensión las proteínas fueron separadas en función de su punto isoeléctrico, mediante isoelectroenfoque utilizando tiras comerciales IPG (*i*mmobilized *i*soelectric *f*ocusing) de BioRad (7 cm de longitud, 0,5 mm grosor) con un gradiente lineal de pH 3 a pH 10. Las tiras se rehidrataron de forma pasiva durante 4 h con la muestra solubilizada en Urea 8M, tiourea 2 M, CHAPS 3 %, anfolitos 1% y Tris 40 mM. El isoelectroenfoque se llevo a cabo en un aparato de Bio-Rad (Protean IEF) con un voltaje bajo inicial, aplicando

después un voltaje en gradiente hasta 5000 v con una intensidad limitante de 50 μ A/tira. El voltaje total aplicado fue de 35000 v/h para cada tira. La temperatura se mantuvo durante todo el proceso a 20 grados. En la segunda dimensión, las proteínas se separaron en función de su peso molecular en geles de poliacrilamida. La electroforesis se realizó en un gel de SDS, descrito en el apartado 3.5.2, al 12 %, sin concentrador. La tira se neutralizó durante 26 min con una solución de Urea 6 M, SDS al 2 %, glicerol al 20 % y TrisHCl 1,5 M, pH 8,8, posteriormente se incubó con una solución de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5 % preparada en tampón Tris HCL 0,025 M, pH 8,3, glicina 0,192 M, SDS 0,1 % y azul de bromofenol. El desarrollo electroforético se realizó a 5 mA/gel 1h, 10 mA/gel 1h, y 15 mA/gel hasta el final del desarrollo.

3.5.4 Tinción de Proteínas en geles de poliacrilamida

3.5.4.1 Tinción con Azul Coomassie

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

3.5.4.2. Tinción con plata

Se utilizó la técnica descrita por Jiang y col., (1994). Los geles se incubaron con etanol al 30 % (v/v) y ácido acético al 10 % (v/v) durante 3 h, después de lo cual se lavaron en repetidas ocasiones y se incubaron con una solución reductora de ferricianuro potásico al 1 % (p/v) y tiosulfato de sodio al 1,6 % (p/v) durante 15 minutos. Posteriormente, los geles se lavaron y se incubaron en una solución con nitrato de plata al 0,1 % (p/v), en oscuridad, durante 30 minutos. El revelado se efectuó por inmersión en una solución conteniendo carbonato sódico 0,3 M y formaldehído al 0,02 % (v/v) hasta aparición de las bandas de proteínas. La reacción se paró por adición de ácido acético al 3 % (v/v).

3.5.4.3 Tinción con Sypro-Ruby

La tinción con Sypro se utilizó para los geles bidimensionales, ya que es muy sensible y compatible con la secuenciación de proteínas mediante Maldi-Tof. Los geles se fijaron con metanol 50 % (v/v) y ácido acético al 7 % (v/v) durante 30 min y se tiñeron con SYPRO Ruby Protein Gel Stain (Molecular Probes) en oscuridad, toda la noche y se destiñeron con metanol al 10 % (v/v) y ácido acético al 7% (v/v) durante 30 min. Por último los geles se revelaron con luz ultravioleta.

3.6 TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS E INMUNODETECCIÓN (TÉCNICA DE WESTERN)

3.6.1 Transferencia de Proteínas

Los geles obtenidos por EGPA-SDS se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF) de Millipore, utilizando un sistema de transferencia semi-seco de Bio-Rad. En la transferencia se utilizó un tampón Caps 10 mM, pH 11, conteniendo metanol al 10 % (v/v) y se llevó a cabo aplicando una corriente de 1,5 mA por cm² durante 2 h.

3.6.2 Inmunodetección

Para la detección de la reacción antígeno-anticuerpo en las membranas se empleó un método de quimioluminiscencia, utilizando luminol, basado en la oxidación del luminol por el complejo peroxidasa de rábano-anti-IgG en presencia de H₂O₂, formándose un intermediario que se estabiliza mediante la emisión de luz (Thorpe y col., 1985). Esta emisión de luz se potencia con la presencia de 4-yodofenol, que actúa como transmisor de radicales de oxígeno al luminol (Rosell y White, 1978).

Tras la transferencia de las proteínas, las membranas se incubaron con metanol 100 % (v/v) durante unos segundos, tras lo cual se lavaron con agua destilada. Con objeto de bloquear los lugares inespecíficos de unión de las IgGs, las membranas se incubaron de 1 a 3 h a temperatura ambiente, o durante toda la noche a 4°C en tampón TBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7,8, y NaCl 0,18 M), al que se le adicionó leche en polvo desnatada (Sveltesse, Nestlé) al 1,5 % (p/v). Tras lavar las membranas con TBS, se

incubaron de 1 a 3 h con el anticuerpo primario correspondiente, convenientemente diluido, a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavaron las membranas con TBS y se incubaron durante 1 h con anti-IgG ligada a la peroxidasa de rábano. Para el revelado, las membranas se incubaron en una solución que contenía 8 mg de luminol en 20 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,6, NaCl 150 mM, con 3,2 µl de H₂O₂ al 30 % (v/v) y 200 µl de una solución de 4-yodofenol (10 mg/ml en DMSO), durante unos minutos. Posteriormente, las membranas se exponían en una película para autoradiografía tipo “Hyperfilm” (Amersham), con ayuda de un “cassette” para autorradiografía (Kodak). El tiempo de exposición variaba desde segundos hasta 30 minutos, dependiendo de la intensidad de la señal obtenida.

3.7 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS S-NITROSILADAS: S-NITROSILACIÓN

Las proteínas S-nitrosiladas se determinaron en peroxisomas de hojas de guisante. El método utilizado fue el denominado “biotin switch”, descrito por Perazzolli y col., (2004), basado en la conversión de las cisteínas nitrosiladas en cisteínas biotiniladas, bloqueando previamente los grupos tioles libres con un agente metiltiolizante específico de los grupos tioles. Tras la biotinilación, las proteínas inicialmente S-nitrosiladas fueron identificadas mediante Western-blot utilizando un anticuerpo anti-biotina, dilución (1/10000) o bien fueron purificadas en agarosa neutravidina y selectivamente eluidas con 2-β mercaptoetanol (Fig. 3.3). Posteriormente, las proteínas S-nitrosiladas purificadas se separaron mediante electroforesis 2D. Para identificar las proteínas obtenidas a partir de los geles 2D, estos se tiñeron con Sypro y posteriormente se cortaron y enviaron a secuenciar las bandas de proteínas aparecidas en el gel. Para ello, se empleó la espectrometría de masas MALDI-TOF (Matriz Assisted Lase Desorption Ionisation-Time Of Flight) del servicio de proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) Carlos III.

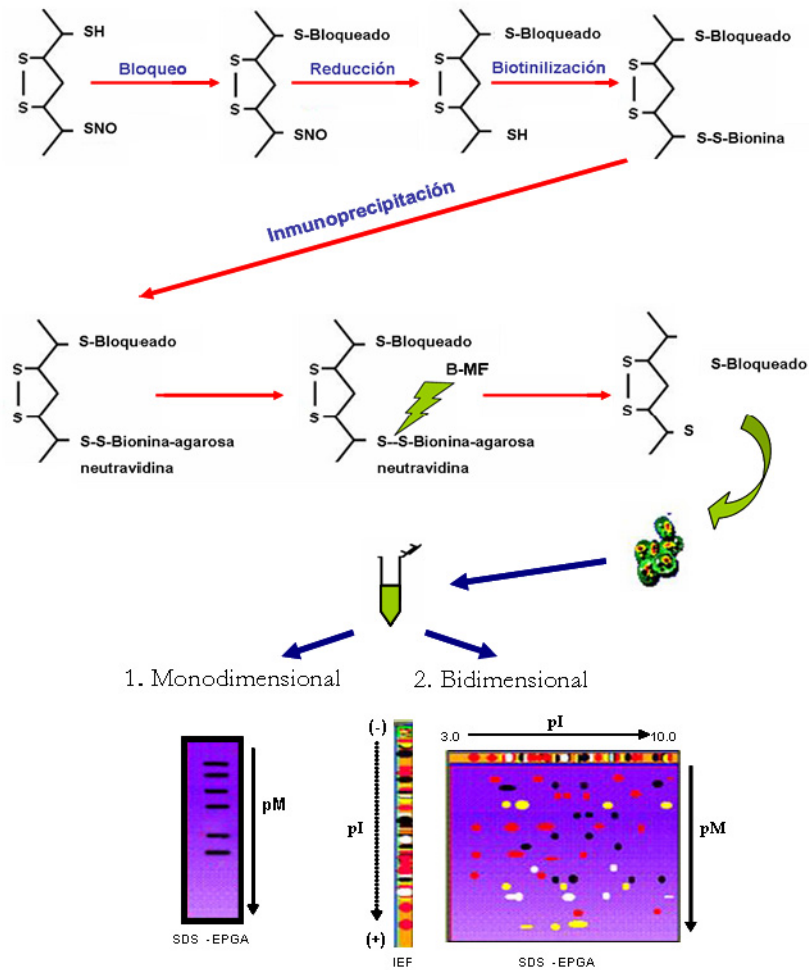


Figura 3.3: Esquema de purificación e identificación de proteínas S-nitrosiladas. Tomado de Romero-Puertas y col., 2004c.

3.8 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS FOSFORILADAS

El patrón de proteínas fosforiladas, se estudió en extractos de hojas de guisante. Para la extracción y purificación de las mismas se utilizó el kit de enriquecimiento de fosfoproteínas de BD biosciences, compuesto por el tampón de homogeneización (A) y el tampón de elución (B) y las columnas de afinidad para purificar las proteínas fosforiladas.

Los extractos de hojas se realizaron mediante homogeneización en mortero, partiendo de 200 mg de tejido congelado y 250 mg de Aluminia (Sigma) en 4 ml del tampón A, suministrado por la casa comercial. El extracto se separó en dos fracciones

de 2 ml y se centrifugaron a 10000 g durante 20 min. Todo el proceso se llevó a cabo a 4°C. Para la purificación de las proteínas por afinidad las columnas se lavaron con 5 ml de H₂O y se equilibraron con 5 ml de tampón A en dos o más pases, hasta alcanzar el eluido un pH igual o inferior a 6,0. Una vez equilibrada la columna, el sobrenadante obtenido con anterioridad se introdujo en la misma, y se incubó durante 20 min a 4°C y en agitación constante en posición horizontal. Posteriormente, la columna se dispuso en posición vertical para llevar a cabo la elución del contenido. La columna se lavó tres veces con 5 ml del tampón A y por último se añadieron 4 ml del tampón B de elución, uno a uno, recogiendo cuatro fracciones en volúmenes de 1 ml. La mayor proporción de proteínas fosforiladas se encontraba en las fracciones 2 y 3. Las proteínas fosforiladas contenidas en estas fracciones 2 y 3, se precipitaron según el protocolo descrito por Wessel y Fluegge (1984), basado en la precipitación de proteínas mediante el uso de cloroformo-metanol. El procedimiento completo se llevó a cabo a 4°C. Las fracciones que contenían las proteínas diluidas, se mezclaron con cuatro volúmenes de metanol, uno de cloroformo y tres de agua ultrapura. Tras mezclar las fracciones vigorosamente, se centrifugaron a 12000 g durante 1 min para separar las fases. Con una pipeta se eliminó la fase superior que contenía las proteínas, las cuales se precipitaron con tres volúmenes de metanol. Tras centrifugar nuevamente a 12000 g durante 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se secó al aire a temperatura ambiente. Por último, las proteínas se solubilizaron en tampón de muestra para electroforesis en condiciones desnaturizantes, descrito en el apartado 3.5.2.

3.8.1 Tinción con ProQ-Diamon

La identificación de las proteínas fosforiladas se efectuó mediante separación de las mismas en EGPA-SDS al 12 % (p/v) y las proteínas fosforiladas se identificaron en el gel mediante tinción específica con Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Molecular Probes). Los geles se fijaron con metanol 50 % (v/v) y ácido acético al 10 % (v/v) durante 30 min, y se lavaron con agua destilada durante 15 min. Los geles se tiñeron durante 2 h en oscuridad con el Pro-Q-Diamon y se destiñeron con una solución que contenía 50 ml de acetato sódico 1 M, pH 4,0, 750 ml de agua ultrapura y

200 ml de acetonitrilo, durante 1,5 h, cambiando dicha solución cada 30 min. Por último, los geles se revelaron con luz ultravioleta.

3.9 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

3.9.1 Superóxido Dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1)

3.9.1.1 Actividad en Solución

Para medir la actividad SOD se empleó el método de McCord y Fridovich (1969), basado en la medida de la tasa de inhibición, por la SOD, de la reducción del citocromo c por los radicales libres O_2^- generados por el sistema enzimático xantina/XOD. La reacción se desarrolló a 25°C y la medida de la densidad óptica se realizó a 550 nm en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 640. El ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 3 ml de una mezcla de reacción que contenía citocromo c $1,35 \times 10^{-5}$ M, xantina $9,67 \times 10^{-5}$ M en tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM y 25- 100 μ l de muestra. Para comprobar el estado de oxidación del citocromo c de esta mezcla, se midió la absorbancia a 550 nm en presencia de ditionito sódico, debiendo estar la lectura comprendida entre 0,22 y 0,24 unidades. Para determinar el volumen óptimo de XOD se ensayaron distintos volúmenes de la enzima (Roche, 20 U/ml) (4-15 μ l) en la mezcla de reacción hasta obtener una tasa de reducción del citocromo c entre 0,024 y 0,026 unidades de abs/min. Finalmente, en la reacción problema se añadió la muestra a la mezcla de reacción, así como el volumen de XOD determinado anteriormente, midiéndose el cambio de absorbancia a 550 nm durante 2 min.

En la determinación de actividad SOD en extractos crudos es conveniente incluir CN^- 10^{-5} M a fin de evitar posibles interferencias en la reducción del citocromo c .

Una unidad de actividad SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para producir una inhibición del 50% en la velocidad inicial de reducción del citocromo c en la reacción control a 25°C.

La actividad enzimática se calculó según el tanto por ciento de inhibición:

$$\% I = \left[\frac{A550/min (control) - A550/min (problema)}{A550/min (control)} \right] \times 100$$

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

Siendo v el volumen de muestra utilizado (ml), y f es el factor de dilución de la muestra.

3.9.1.2 Actividad en Geles de Poliacrilamida

Las distintas isoenzimas de superóxido dismutasa fueron individualizadas mediante EGPA nativa en geles al 10% (p/v). La actividad enzimática se localizó mediante un método fotoquímico basado en la reducción del NBT por los radicales libres O_2^- generados por la acción de la luz sobre una solución de riboflavina y tetrametiletilendiamina (TEMED) (Beauchamp y Fridovich, 1971). Una vez terminada la electroforesis, los geles se incubaron en una solución con NBT 2,45 mM preparada en tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8, durante 20 min en oscuridad, tras lo cual se incubaron en otra solución con riboflavina 28 μ M y TEMED 28 mM preparada en el mismo tampón, durante 15 min en oscuridad. Finalmente, los geles se lavaron en tampón y se expusieron a la luz durante unos min hasta que los geles se teñían de un color azul excepto en aquellas zonas donde había actividad SOD que daban bandas acromáticas. La cuantificación de las distintas bandas de actividad obtenidas se llevó a cabo con un fotodensitómetro Shimadzu CS-9000.

3.9.2 Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6)

Se midió espectrofotométricamente tanto en homogeneizados como en peroxisomas, según el método descrito por Aebi (1984) basado en la medida de la disminución de la absorbancia a 240 nm, ocasionada por la desaparición del H_2O_2 . La determinación se efectuó a 25°C en una mezcla de reacción que contenía 10,6 mM de H_2O_2 en tampón fosfato-K 50 mM a pH 7,0 y en un volumen de 3 ml. La reacción se inició añadiendo la muestra convenientemente diluida con el tampón de reacción conteniendo Triton X-100

al 0,2% (v/v). La actividad enzimática, expresada en $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ proteína (o $\times \text{ml}^{-1}$), se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el H_2O_2 de $39,58 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (del Río y col., 1977).

3.9.3 Glicolato Oxidasa (GOX; EC 1.1.3.1)

Se midió espectrofotométricamente según el método de Kerr y Groves (1975). La mezcla de reacción, en un volumen final de 1 ml, contenía tampón fosfato-K 50 mM, pH 8,3, fenilhidracina 10 mM y glicolato 5 mM. La reacción se inició por adición de la muestra, midiéndose la formación del complejo glioxilato-fenilhidrazona a 324 nm durante 3 min. La actividad enzimática se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el complejo de $1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Kerr y Groves, 1975).

3.9.4 Peroxidasa Total

Se siguió el método descrito por Quessada y Macheix (1984), basado en la detección a 470 nm del guayacol oxidado producido por la acción de las peroxidasas en presencia de H_2O_2 . La mezcla de reacción, en un volumen final de 1,1 ml, contenía tampón fosfato-K 50 mM, pH 6,1, guayacol- H_2 6,25 mM, H_2O_2 0,025 mM y la muestra convenientemente diluida. La reacción se inició por adición de H_2O_2 y la actividad se expresó en unidades $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ proteína.

3.9.5 Glutation Reductasa (GR; EC 1.6.4.2)

Para su determinación se empleó el método de Edwards y col., (1990), basado en la medida del descenso de absorbancia a 340 nm, debido a la oxidación del NADPH. La mezcla de reacción contenía tampón Hepes-NaOH 100 mM, pH 7,8, EDTA 1 mM, MgCl_2 3 mM, y glutacion oxidado 0,5 mM, en un volumen final de 1 ml. La reacción se iniciaba por adición del NADPH 0,2 mM, registrándose su oxidación durante 2 min a 25°C. Se utilizó un blanco de reactivos (sin la muestra correspondiente) y un blanco para cada muestra en tampón de reacción sin glutacion oxidado. La actividad enzimática expresada en nmoles de NADPH oxidado $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ prot, se calculó a partir de la

velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el NADPH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Jiménez y col., 1997).

3.9.6 *S*-Nitrosoglutatión reductasa

3.10.6.1. Actividad en solución

La actividad enzimática de la *S*-Nitrosoglutatión reductasa se determinó según el método de Sakamoto y col., (2002), basado en la medida de la oxidación del NADH a 340 nm y a 25°C . La mezcla de reacción contenía tampón Tris-HCl 20 mM , pH $8,0$, NADH $0,2 \text{ mM}$ y EDTA $0,5 \text{ mM}$, y la reacción se inició por adición del GSNO (Calbiochem) a una concentración final de $400 \mu\text{M}$. La actividad enzimática, expresada en nmol de NADH consumido $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ proteína, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar de $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

3.9.6.2. Actividad en Geles de Poliacrilamida

La actividad enzimática de la *S*-Nitrosoglutatión reductasa se determinó en EGPA nativa utilizando geles al 6% (p/v) en tampón Trisbórico-EDTA, pH 8 , descrito por Laemmli (1970). Para la detección de la actividad GSNOR se utilizó una modificación del método descrito por Seymour y Lazarus (1989). Los geles se incubaron en frío durante 15 min en tampón fosfato sódico $0,1 \text{ M}$, pH $7,4$ y NADH 2 mM . Una vez eliminado el exceso de tampón los geles se cubrieron con un papel de filtro embebido en GSNO 3 mM . Tras 10 min de incubación se retiró el papel de filtro y los geles se revelaron mediante iluminación con luz ultravioleta, detectando la desaparición de la fluorescencia del NADH (Fernández y col., 2003).

3.10 ANÁLISIS DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

La concentración de peróxido de hidrógeno en extractos crudos se determinó según el método fluorimétrico descrito por Creissen y col., (1999) con modificación de Romero-Puertas y col., (2004a). Los extractos crudos de hojas se prepararon en HCl 25 mM ($1/3$, p/v) usando un mortero, se filtraron por dos capas de nylon, y se le añadió carbón activo con objeto de eliminar pigmentos que pudieran interferir en la reacción. El

carbón activo y los pigmentos se eliminaron por centrifugación a 5.000 g durante 5 min. El sobrenadante resultante se neutralizó con NaOH y se utilizó para medir la concentración de H₂O₂. La mezcla de reacción, en un volumen final de 3 ml, contenía tampón Hepes 50 mM, pH 7,6, ácido homovanilínico (HVA) 5 mM y 20-100 µl de muestra. La reacción se inició por adición de peroxidasa de rábano 40 µM. La concentración de H₂O₂ se determinó midiendo la fluorescencia en un espectrofluorímetro con excitación a 315 nm y emisión a 425 nm, frente a una curva patrón de peróxido de hidrógeno (1-80 µM), preparada en HCL 25 mM neutralizado con NaOH. Para prevenir interferencias con compuestos presentes en la muestra, capaces de reaccionar con el H₂O₂, se analizó el porcentaje de recuperación de una solución de H₂O₂ de concentración conocida (1,5 µM) añadida al extracto. Con estos datos se ajustaron los resultados obtenidos en ausencia de H₂O₂ exógeno.

3.11 DETERMINACIÓN DE GRUPOS CARBONILO

La determinación de grupos carbonilos, utilizado como índice de las proteínas modificadas oxidativamente, se realizó según el método de Romero-Puertas y col., (2002), basado en la reacción de los grupos C=O con la 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) con formación de 2,4-dinitrofenilhidrazona que absorbe a 370 nm.

Se prepararon homogeneizados de raíces de guisante en tampón fosfato-Na 10 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 0.2% (v/v) y PMSF 1 mM, con una relación p/v de 1/4. Los homogeneizados se filtraron y centrifugaron a 27.000 g durante 20 min y los sobrenadantes se utilizaron para las determinaciones. Los extractos, conteniendo 0,5 mg de proteína se incubaron con sulfato de estreptomicina al 1% (p/v) durante 20 min para eliminar ácidos nucleicos y se centrifugaron a 2.000 g durante 10 min. Posteriormente, los homogeneizados se incubaron durante 1 h con DNPH 10 mM preparada en HCl 2 M. Los blancos se incubaron con HCl sin DNPH. Las proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v) y el exceso de DNPH se eliminó por lavados con etanol/acetato de etilo (1:1). Finalmente, el precipitado se resuspendió en guanidina 6 M preparada en KH₂PO₄ 20 mM a pH 2,3 (ajustado con ácido trifluoroacético) y se midió la absorbancia a 370 nm. Como control del contenido

de proteínas al final del ensayo se midió la absorbancia de los blancos a 280 nm, utilizando una curva patrón de albúmina de suero bovino (ASB) preparada en guanidina 6 M. El contenido de carbonilos se calculó usando un coeficiente de extinción molar para las hidrazonas alifáticas de $22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Levine y col., 1991).

3.12 DETERMINACIÓN DE GLUTATION

Para la determinación de GSH y GSSG se prepararon extractos ácidos de las raíces. El tejido se homogeneizó con nitrógeno líquido y posteriormente se añadió metafosfórico al 5 % (p/v) utilizando una relación p/v de 1/2,5. El extracto se centrifugó a 19,000 g durante 30 min a 4°C. El contenido de glutation total se determinó según el método de Griffith (1980) basado en la oxidación del GSH por el DTNB con formación de TNB y GSSG. El GSSG es reducido de nuevo por la glutation reductasa con consumo de NADPH. Para la medida de GSSG las muestras se derivatizaron por adición de 2 μl de 2-vinilpiridina y 6 μl de trietanolamina 1,5 M a 100 μl de muestra e incubación durante 1 h a temperatura ambiente. Se preparó un blanco sin muestra conteniendo ácido metafosfórico al 5%. Ambas muestras conteniendo el GSH total y el GSSG se utilizaron para las determinaciones. La mezcla de reacción contenía tampón fosfato sódico 143 mM, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 6,3 mM (pH 7,5), NADPH (0,248 mg/ml), DTNB 6 mM, 25 μl de muestra y la reacción se inició por adición de GR 266 U/ml. La formación de TNB se midió a 412 nm. Se prepararon dos curvas patrón para GSH y GSSG en el rango de 5-50 μM . El contenido de GSH se determinó por la diferencia del glutation total y el GSSG (muestras derivatizadas).

3.13 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO

Se emplearon los mismos extractos ácidos descritos en el apartado anterior (3.12) y se utilizó básicamente el método de Okamura (1980). Para la determinación del ascorbato total se preparó la siguiente mezcla de reacción: 125 μl de extracto, 25 μl de trietanolamina 1,5 M, 150 μl de tampón fosfato-Na 150 mM (pH 7,4), 75 μl de DTT 10 mM, se incubó con agitación durante 15 min a temperatura ambiente. Con este tratamiento se reducía todo el deshidroascorbato a ascorbato. Para eliminar el DTT se

añadieron 75 µl de N-etilmaleimida 0,5 %, se agitó e incubó durante 30 s. Posteriormente se añadieron 300 µl de TCA 10 % (p/v), 300 µl de ácido fosfórico 44 %, 300 µl de 2,2'-dipiridil al 4 % (p/v) preparado en etanol al 70 % (v/v) y 150 µl de FeCl₃ al 3 % (p/v). Se incubó durante 1 h a 37°C y se midió la absorbancia a 525 nm. Para la determinación del ácido ascórbico reducido (ASC) los extractos se sometieron al mismo proceso salvo la adición de DTT y N-acetilmaleimida. Para el cálculo de la concentración de ambos, se utilizó una curva patrón de ácido ascórbico en el rango de 5-100 µM preparada en ácido metafosfórico 5 %, siguiendo el mismo tratamiento que el indicado para las muestras. El contenido de ascórbico oxidado se determinó por diferencia entre el total y el reducido.

3.14 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

La tasa de peroxidación lipídica se determinó midiendo la concentración de malondialdehído (MDA) con ácido tiobarbitúrico según el método de Buege y Aust (1978). Todos los reactivos de este ensayo se prepararon en agua Milli-Q. Para el ensayo se añadieron 200 µl de muestra a 1 ml de la siguiente mezcla de reacción: ácido tricloroacético al 15 % (p/v), ácido tiobarbitúrico al 0,375 % (p/v) y butilhidroxitolueno al 0,01 % (p/v) preparado en HCl 0,25 N. Posteriormente, la mezcla se calentó durante 15 min a 95°C con agitación, se dejó enfriar y se centrifugó a 2.000 g durante 5 minutos, efectuándose la lectura de la densidad óptica a 535 nm. La concentración de MDA en las muestras problema se calculó a partir de una recta de calibración con distintas concentraciones de MDA dimetil acetal (0,1-10 µM).

3.15 DETERMINACIÓN DE ETILENO

Para determinar la producción endógena de etileno, el material vegetal fresco (raíces y hojas) se dispuso en botes de 250 ml herméticamente cerrados con tapones de goma y se incubaron durante 3 h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se extrajo de cada bote 1 ml del gas con una jeringa que se inyectó en un cromatógrafo de gases Perkin

Elmer 8600, con un detector de ionización de llama y una columna Poropack-R. Como patrón se utilizó una concentración conocida de etileno.

El contenido de etileno se determinó según la siguiente fórmula;

$$\text{nmol de etileno / h cm}^2 = \frac{n \text{ muestra} \times V \text{ frasco}}{V \text{ inyeccion} \times t \text{ incubación} \times \text{area foliar}}$$

donde $V \text{ frasco}$ es el volumen del aire en el bote o frasco y $n \text{ de la muestra}$ es:

$$n \text{ de la muestra} = \frac{n \text{ patron}}{\text{Area patron}} \times \text{Area muestra}$$

y donde $n \text{ del patron}$ es el número de moles del patrón de etileno pinchado en el cromatógrafo de gases.

En el caso de la raíz, los nmol de etileno se expresaron por hora y por gramos de peso fresco.

3.15 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO SALICÍLICO Y ÁCIDO JASMÓNICO

La medida de salicílico y jasmónico se llevó a cabo en hojas y raíces de guisante, según el método descrito por Vigliocco y col., (2002) con algunas modificaciones. Se partió de 5 g de tejido que se homogeneizó en un Omnimixer con 10 ml de acetona, mediante cuatro pulsos de un minuto cada uno. Posteriormente se centrifugó a 15000 g durante 15 minutos. Al sobrenadante obtenido se le añadieron 0,6 ml de agua y se eliminó la acetona mediante “speed vacuum” a 40°C. Una vez eliminada la acetona, el precipitado se resuspendió en agua saturada de éter etílico al 5 %. Posteriormente se purificó mediante extracción en fase sólida, en un cartucho SPE-C18 de 1g y se eluyó con 25 ml de éter etílico. Dicho eluato se pasó por un filtro conteniendo 15 g de sulfato sódico anhidro, para eliminar el agua de la muestra. Esta fracción etérea se evaporó a sequedad en un rotavapor a 25°C e inmediatamente se disolvió en 5 ml de hexano:éter 95:5. Posteriormente se purificó nuevamente por extracción en fase sólida en un cartucho SPE-SiO₂, y se eluyó primero, con 50 ml de hexano:éter 90:10, obteniéndose un eluato denominado fracción I, que contenía el JAMe y SAMe libres. Posteriormente se realizó una segunda elución con 50 ml de éter, la cual fue metilada con diazometano, dando lugar a la fracción II, a partir de la cual se determinó el SA y JA libres, que se miden

como ésteres metílicos. La cuantificación se llevó a cabo mediante GC-EM (cromatografía de gases-espectrometría de masas) mediante SIM (selected ion monitoring) a m/z 120 y 152 para el SAME y a 224 y 151 para JAMe, contra curvas de calibrado de SAME y JAMe patrones, dentro del rango de entre 10 y 500 ng. Para el análisis se inyectó 1 μ l sin división de flujo (splitless) en una columna DB5-MS de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, usando helio como gas portador, a 1 ml/min., con las siguientes condiciones: Temperatura inicial 40°C, a 20°C/min hasta 150°C, donde se mantuvo 3 min y a 5°C/min hasta 230°C.

3.17 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

3.17.1 Preparación de muestras para citoquímica de H₂O₂

Para la localización a nivel subcelular del acumulo de H₂O₂ en hojas de guisante, se procedió a la tinción citoquímica con CeCl₃ según el método descrito por Bestwick y col., (1997) y modificado por Romero-Puertas y col., (2004a). Las hojas de guisante se cortaron en fragmentos de 1 mm² y se incubaron en una solución de CeCl₃ 5 mM en tampón Mops 50 mM, pH 7,2, durante 1 h. Las piezas se fijaron en una solución de glutaraldehído al 2,5 % (v/v) preparada en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 6,8, y se mantuvieron durante 2 h y 30 min a temperatura ambiente. Las muestras fueron fijadas posteriormente en OsO₄ al 1% (v/v) preparado en tampón cacodilato sódico 50 mM, pH 7,2, tras lo cual se deshidrataron en una serie escalonada de etanol del 30 al 100% (v/v), y fueron embebidas en resina Spurr. Se prepararon cortes ultrafinos que se contrastaron con citrato de plomo y acetato de uranilo para su observación en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 10C.

3.17.2 Inmunolocalización de proteínas por marcaje con oro coloidal

Cortes de hojas de aproximadamente 1 mm², se fijaron durante una hora a 4°C en una solución de glutaraldehído al 0,2 % (v/v) y formaldehído al 4 % (v/v) en tampón Pipes-KOH 50 mM (pH 7,4). Los cortes se lavaron tres veces con el mismo tampón y se deshidrataron por incubación en soluciones crecientes de etanol (30-50-70 y 100 %;

v/v) con intervalos de 20 min. A partir del 70 % de etanol, las muestras se mantuvieron a -20°C . Seguidamente los cortes fueron infiltrados en series graduales de resina LR White (LRW) en etanol (25-100 %; v/v) con intervalos de 4 h e infiltración final de 12 h. Por último, la polimerización se realizó a -20°C en luz ultravioleta (Sandalio y col., 1997).

Una vez obtenidos los cortes ultrafinos, a partir de los bloques preparados, se incubaron durante 2 h en un tampón de bloqueo (TBSTA) que contenía Tris-ClH 10 mM pH 7,6, NaCl 0,9 % (p/v), Tween-20 0,95 % (v/v), azida sódica 0,02 % (p/v) y albúmina de suero bovino (ASB) al 2 % (p/v). Una vez bloqueados, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario diluido convenientemente en el TBSTA de 2 a 5 h y a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron 3 veces con el tampón sin albúmina (TBST) y se incubaron con el anticuerpo secundario unido a oro coloidal de 15 nm (diluido 1/50) durante 1 h a temperatura ambiente. Por último, se lavaron con agua ultrapura y se tiñeron con acetato de uranilo al 2 % (v/v) durante 3 min y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 10C.

3.18 MICROSCOPIA LASER CONFOCAL

3.18.1 Visualización de H_2O_2 , O_2^- y NO

La detección *in vivo* de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión superóxido (O_2^-) y óxido nítrico (NO), se realizó en cortes transversales de hojas y raíces de guisante y hojas de *Arabidopsis*. Para ello el tejido se cortó en fragmentos de aproximadamente 25 mm^2 que se lavaron con agua ultrapura durante unos minutos. Seguidamente se añadió el fluorocromo correspondiente, durante el tiempo y temperatura adecuadas de incubación, descritas a continuación.

Para detectar **peróxido de hidrógeno**, se utilizó la carboxi-diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA), (Brul y col., 1997). Este es un compuesto no fluorescente que es capaz de atravesar las membranas biológicas, y una vez dentro de la célula los grupos acetato son hidrolizados por esterasas intracelulares, convirtiéndose así en un compuesto fluorescente capaz de reaccionar con el H_2O_2 . Como control de la

especificidad del fluorocromo (control negativo) las muestras se incubaron con ASC, secuestrador de H_2O_2 .

Los cortes se incubaron con o sin ASC 1 mM durante 1 h a temperatura ambiente, y posteriormente se incubaron en una solución con DCF-DA 25 μM preparada en tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), durante 30 min a 37°C y en oscuridad. Por último, las muestras se lavaron durante 30 min con el mismo tampón.

Para detectar el **anión** $O_2^{\cdot-}$ se utilizó el dihidroetidio (DHE). Este fluorocromo es capaz de atravesar pasivamente las membranas celulares, reaccionando con el $O_2^{\cdot-}$, dando lugar a un compuesto oxidado fluorescente denominado oxietidio (Oxy-E) (Fink y col., 2004). La formación de Oxy-E requiere la participación de 2 $O_2^{\cdot-}$, con la formación de un radical libre de etidio (E^{\cdot}) como intermediario de la reacción. La oxidación del Oxy-E es irreversible (Fig. 3.4). La formación de oxietidio puede inhibirse por acción de SODs pero no por catalasa, además no se forma oxietidio por adición de H_2O_2 , peroxinitrito o ácido hipocloroso, lo cual demuestra la especificidad del fluorocromo por el $O_2^{\cdot-}$ (Fink y col., 2004).

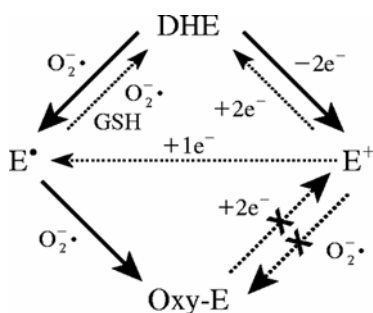


Figura 3.4: Mecanismo de oxidación del DHE. Tomado de Fink y col., 2004. E^{\cdot} , radical libre de etidio; E^+ , etidio; DHE, dihidroetidio; Oxy-E, oxietidio.

Para comprobar la especificidad del fluorocromo por el anión superóxido, las muestras se incubaron con tetrametilpiperidina (TMP), secuestrador de $O_2^{\cdot-}$ (control negativo). Los cortes se incubaron con o sin TMP 1 mM durante 1 h a temperatura ambiente, posteriormente se incubaron en una solución con DHE 10 μM preparado en tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), durante 30 min a 37°C y en oscuridad. Por último, las muestras se lavaron durante 30 min con el mismo tampón.

Para **detectar NO** se siguió el método descrito por Kojima y col., (1998a y 1998b), que consistió en la utilización de 4,5-diacetato de diaminofluoresceína (DAF-2

DA,) como marcador de óxido nítrico. Las diaminofluoresceínas no reaccionan con ROS y presentan un límite de detección para el NO de 5 nM. Este compuesto es hidrolizado por esterasas citosólicas hasta DAF-2, el cual a pH fisiológico no es fluorescente, pero si reacciona con el NO intracelular da lugar a la aparición de una forma triazólica altamente fluorescente que emite en la zona del verde (DAF-2T) (Kojima y col., 1998a). La especificidad del fluorocromo por el NO ha sido previamente demostrada en nuestro laboratorio mediante el uso de 2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido (PTIO), secuestrador de NO (Corpas y col, 2006). Para determinar la fuente del NO las muestras se incubaron con aminoguanidina (AG), inhibidor de la oxido nítrico sintasa (NOS). De igual forma que los descritos anteriormente, los cortes se incubaron con o sin 1mM de AG durante 1 h a temperatura ambiente, posteriormente se incubaron en una solución con DAF-2DA 10 μ M preparada en tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), durante 1 h a 25°C y en oscuridad. Por último, las muestras se lavaron durante 30 min con el mismo tampón.

Una vez incubadas las muestras con los respectivos fluorocromos, los cortes se incubaron durante 3-4 h en una solución de infiltración compuesta por acrilamida/bisacrilamida 30 % (15 %, p/v), PBS (fosfato-K 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM) 5 veces concentrado, y TEMED 10 % (v/v). Posteriormente se realizaron bloques conteniendo el tejido mediante la polimerización de la solución de infiltración con persulfato al 2 % (p/v) en moldes de 1,5 x 0,9 x 0,5 mm (Sorvall). Los bloques se cortaron con un vibratomo Leica VT 1000 ST, en secciones de 60-100 μ m.

Los cortes obtenidos se montaron sobre portas con una solución de glicerol en PBS al 50 % (v/v) y se observaron al microscopio confocal (Leica TCS SL) [Servicios Técnicos de la Universidad de Jaén], utilizando las longitudes de onda de excitación y emisión correspondientes a cada fluorocromo y descritas en la tabla 3.4

FLUOROCROMO	λ de EXITACIÓN	λ de EMISIÓN
DCF-DA	485	530
DHE	488	520
DAF-2DA	495	515

Tabla 3.4: Longitudes de onda de excitación y emisión de fluocromos

3.18.2 Estudio del movimiento de peroxisomas

Para el análisis del movimiento de peroxisomas, se utilizaron mutantes de *Arabidopsis* que contenían una proteína de fusión GFP-SKL, obtenidas durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral (apartado 3.31.2 de Material y Métodos), así como otros mutantes cedidos por el Prof. Chris Hawes de la Universidad de Oxford Brookes (Oxford, Reino Unido). Las imágenes se obtuvieron mediante visualización de fragmentos de hoja completa en un microscopio láser confocal. Para estudiar el movimiento de los peroxisomas, se tomaron imágenes en el plano X, Y, Z, y a lo largo del tiempo, para poder seguir el desplazamiento de los orgánulos tanto en el espacio como en el tiempo (Fig. 3.5). Una vez obtenidas las imágenes, se analizaron con el programa de análisis de imagen Volocity 3, el cuál es capaz de seguir la señal fluorescente y medir la velocidad de desplazamiento de cada uno de los orgánulos.

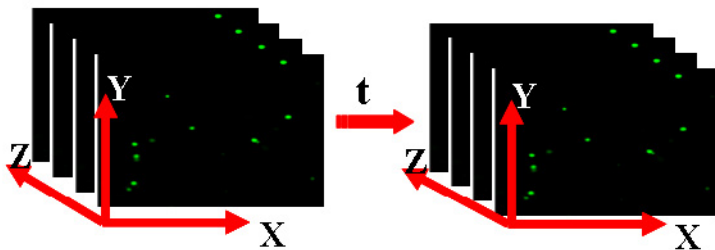


Figura 4.5: Esquema de la toma de imágenes y el análisis del movimiento de peroxisomas en el programa Volocity.

3.19 MICROSOPIA DE FLUORESCENCIA

La microscopía óptica de fluorescencia se utilizó para visualizar la producción *in vivo* de H_2O_2 , O_2^- y NO en raíces completas de guisante. Para ello, se utilizaron cortes de 2 cm de longitud de la zona apical de la raíz que se incubaron con los fluorocromos descritos en el apartado anterior, utilizando las mismas concentraciones y tiempos de incubación. Las raíces se visualizaron en un microscopio Zeiss Axioplan.

3.20 DETECCIÓN DE MUERTE CELULAR

Como marcador de muerte celular en raíz completa se utilizó el colorante impermeable, “Evan’s blue”, que sólo penetra en las células que tienen dañada la membrana. Para ello, se infiltraron secciones de raíz de 2 cm de la zona apical en una solución de “Evan’s

blue' al 0,25 % (p/v) en agua destilada durante 5 h, según el método descrito por Romero-Puertas y col., (2004a). Posteriormente se lavaron y observaron en lupa estereoscópica.

3.21 AISLAMIENTO DE RNA TOTAL Y DNA PLASMÍDICO

El aislamiento de RNA total se llevó a cabo utilizando el reactivo comercial Trizol (GIBCOBRL, Life Technologies), compuesto por una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi 1987). El material vegetal se homogeneizó en un mortero con nitrógeno líquido. Se pesó el polvo obtenido y se añadió 1 ml del reactivo comercial por cada 100 mg de tejido. Tras una incubación de 5 min a temperatura ambiente, se añadió 0,2 ml de cloroformo por cada ml de Trizol y se agitó por inversión durante 15 s y se incubaron nuevamente 5 min a temperatura ambiente. Tras centrifugar a 12.000 g durante 15 min a 4°C, al sobrenadante, que contenía el RNA, se le añadió 0,5 ml de isopropanol por ml de trizol y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente se centrifugó a 12.000 g durante 10 min a 4°C y el precipitado, conteniendo el RNA, se lavó con 1 ml de etanol al 75% (v/v), se centrifugó de nuevo a 12.000 g durante 5 min y el precipitado se secó al aire. Por último, el RNA precipitado se resuspendió en agua DEPC (dietilpirocarbonato) libre de ribonucleasas.

La cuantificación del RNA se realizó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 260 nm, asumiendo que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 µg/ml de RNA. Para comprobar el estado del RNA se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8 % (p/v) en tampón Tris-HCl 45 mM (pH 8,0), ácido bórico 45 mM y EDTA 1 mM.

3.22 TRANSCRIPCIÓN INVERSA

La obtención de los cDNAs se realizó a partir del RNA total aislado de hojas y raíces según el protocolo descrito en el apartado anterior. Se partió de 2,5 µg de RNA al que se añadió 40 µg/ml de oligo-dT. Se incubó a 70°C durante 10 min y, posteriormente, se

adicionaron dNTPs 1 mM, inhibidor de ribonucleasas 1U/μl, 1x de tampón de la enzima y 200 U/ml de la enzima (AMV Reverse Transcriptase, Finnzymes), en un volumen final de 25 μl. La reacción se incubó a 42°C durante 40 min.

3.23 DISEÑO Y SÍNTESIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA OBTENCIÓN DE cDNAs

En el transcurso de esta Tesis se ha abordado la clonación de distintos cDNAs parciales de guisante. Para la obtención de estos cDNAs, se identificaron secuencias conocidas de plantas con cierto grado de identidad, depositadas en la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Posteriormente, se realizó un alineamiento tipo *clustal* entre dichas secuencias, utilizando el programa OMIGA2 (Oxford Molecular), para localizar zonas conservadas interespecíficas. Así se diseñaron cebadores degenerados de 20-25 pares de bases. La síntesis de los mismos se llevó a cabo en la empresa ROCHE. La secuencia de los oligonucleótidos diseñados, se muestran en la tabla 3.5

cDNA	F-Oligonucleótido 5'-3'	R-Oligonucleótido 5'-3'
FeSOD	T(C-T)CACTGGGG(T-G)AAGCA(T-C)CA	TC(A-C)A(A-G)(A-G)TAGTAAGCATGCTCCCA
GSNOR	GGC AAG GAT CCT GA(A-G)GGT CT	G(A-G)A ACA CC(A-G)GT(G-T)CCA AG(A-C) AG

Tabla 3.5 Secuencia de cebadores degenerados, utilizados para la clonación parcial de cDNAs

3.24 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para la realización de la PCR se utilizó un termociclador Eppendorf. La enzima utilizada fue la Hot Master taq polimerasa de Eppendorf y la mezcla de reacción contenía de 20-50 ng de cDNA, dNTPs 0,25 mM, 0,10 μM de cebadores, 1x de tampón de la enzima, MgCl₂ 1,5 mM y 0,125 U/ μl de enzima.

Los programas de PCR utilizados fueron diversos, cambiando la temperatura de alineamiento, los tiempos de extensión y alineamiento, en función de los requerimientos de los cebadores y de la longitud del fragmento de cDNA amplificado, calculando la temperatura de alineamiento según el porcentaje de bases AT-GC de los cebadores (N°

de bases AT x 2°C + N° de bases GC x 4°C) y teniendo en cuenta que, teóricamente, se requiere un minuto de alineamiento por Kb de DNA amplificado.

3.25 PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA DE GELES DE AGAROSA

Una vez realizadas las amplificaciones necesarias, se realizó una electroforesis en geles de agarosa del 0,8 al 2 % en función del tamaño del amplificado. Los geles se tiñeron en bromuro de etidio y las bandas de DNA se visualizaron mediante iluminación con luz UV. Las bandas de interés se cortaron con un escarpelo. Para extraer el cDNA de la agarosa se utilizaron diferentes métodos comerciales, el sistema QIAEX II de QIAGEN y el GFX™ de Amersham. En ambos casos el método fue similar, y se fundamenta en la extracción y purificación del DNA a través de la disolución de la agarosa y la absorción de los ácidos nucleicos a partículas de sílice en presencia de una alta concentración de sales. El DNA purificado se eluyó de la resina con H₂O ultrapura y estéril.

3.26 LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA EN VECTORES DE CLONACIÓN

Tras la purificación de los fragmentos de DNA, se utilizaron distintos vectores de clonación en función de las necesidades de experimentación:

3.26.1 pGEM-T® Easy de Promega: Para optimizar las reacciones se empleó una relación estequiométrica inserto:vector de 3:1. Se utilizaron 50 ng del plásmido, el fragmento de DNAC, 3 U de la enzima T4 ligasa y el correspondiente tampón comercial. Se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente.

3.26.2 Directional -TOPO de Invitrogen: Para clonar el fragmento de cDNA en este vector, se modificó el cebador con el que se obtiene el fragmento, mediante la introducción en el cebador 5' de los nucleótidos CACC, para que el DNA entre en el vector con una orientación determinada (Fig. 3.6). Para ello, se incubó el vector, el

cDNA y la topoisomerasa I, durante 5 min, quedando así el fragmento introducido y correctamente orientado en el vector.

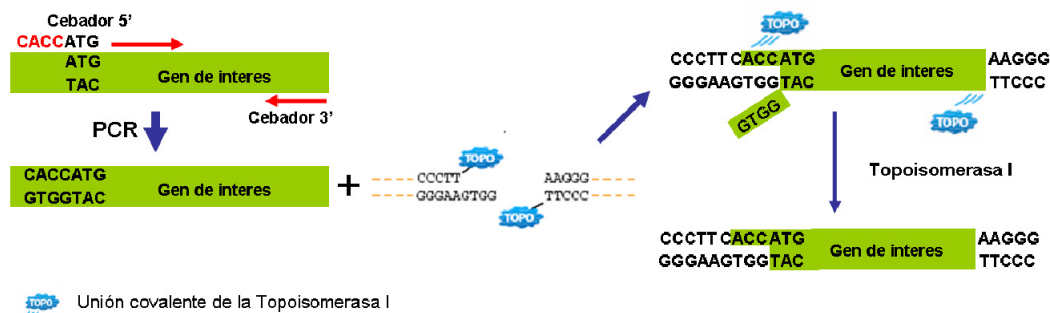


Figura 3.6: Mecanismo de clonación de Directional-TOPO de Invitrogen (Gateway® technology)

3.27 PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

El método utilizado fue el descrito por Hanahan (1983). Se cultivaron bacterias de *E. coli* DH5 α en 5 ml de medio LB [Luria-Bernati: Triptona 1 % (p/v), extracto de levadura 0,5 % (p/v) NaCl 1 % (p/v), pH 7,0] a 37°C durante 12-15 h. Posteriormente, se inocularon 4 ml de este cultivo en 100 ml de medio LB suplementado con MgSO₄ 10 mM. Se incubó a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,6 a 600 nm, momento en el cual se detuvo el crecimiento del cultivo colocándolo en hielo durante 15 min. Las bacterias se recuperaron por centrifugación a 4300 g durante 10 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 32 ml de una solución compuesta por RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, CaCl₂ 10,2 mM, acetato potásico 30 mM y glicerol al 12 % (v/v), pH 5,8, preenfriada a 4°C. El precipitado se incubó en esta solución durante 15 min en hielo. Se volvió a centrifugar a 4300 g durante 10 min a 4°C y el precipitado se resuspendió en una solución compuesta por CAPS 100mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM y glicerol al 12% (v/v), pH 6,8, también preenfriada a 4°C. Se hicieron alícuotas de las bacterias y se guardaron a -80°C.

3.28 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES Y AISLAMIENTO DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

Las bacterias se transformaron mediante choque térmico, según el método descrito por Lucotte y Baneyx (1993). Las bacterias competentes *E. Coli* DH5 α , conservadas a -80°C, se descongelaron en hielo, se les añadió entre 20-200 ng del plásmido de interés y se incubaron 30 min a 4°C. Posteriormente, las bacterias se sometieron a un choque térmico consistente en un calentamiento de las muestras a 42°C durante 90 s, y posterior baño de hielo durante 10 min. Seguidamente se añadió 0,5 ml de medio LB y se incubaron a 37°C durante 1-2 h en un agitador orbital (Gallenkamp) a 170 rpm. Una vez alcanzada una densidad óptica adecuada a 600 nm (0,4-0,6), las bacterias se sembraron en placas de Petri con un medio de cultivo adecuado para la selección de bacterias transformadas. En el caso de usar el pGEM-T, se utilizó un medio comercial denominado S-Gal/LB Agar Blend (SIGMA), que contenía LB, 3,4-ciclohexenoesculetina- β -D-galactopiranosido (S-Gal) al 0,03 % (p/v), citrato de amonio férrico al 0,05 % (p/v), 1-isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) al 0,003 % (p/v), y agar al 25 % (p/v), suplementado con ampicilina 100 μ g/ml. En el caso del vector TOPO, para la transformación se utilizaron células competentes comerciales TOP-10 de Invitrogen y tras el choque térmico se sembraron en placas de Petri con LB y ampicilina 100 μ g/ml. Las bacterias se dejaron crecer en las placas durante 12-16 h a 37°C. Las bacterias transformadas se seleccionaron según el tipo de vector insertado, en el caso del TOPO, mediante la resistencia a la ampicilina conferida por el plásmido a la célula competente, o bien por la denominada selección blanco-azul en el caso de pGEM-T. Las colonias blancas son las que contenían el plásmido, ya que el inserto se coloca en el gen que codifica para la β -galactosidasa, impidiendo así la degradación de la galactosa del medio. Aunque teóricamente las colonias positivas han de tener el plásmido con el inserto, pueden darse casos de falsos negativos por la ligación de dos vectores. Por este motivo, antes de purificar el plásmido recombinante se hicieron pruebas de los positivos mediante PCR en colonia con los cebadores del vector que flanquean el lugar de inserción del fragmento de DNA.

Una vez seleccionados los positivos reales, a partir de la colonia seleccionada se inocularon tubos de ensayo con 3 ml de LB líquido y ampicilina (100 µg/ml), que se mantuvieron en un agitador orbital a 190 rpm y 37°C hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0,6 a 600 nm (12-16 h).

Utilizando estos cultivos se inició el aislamiento del plásmido (Miniprep) con un método comercial de Promega (Wizard Plus SV Minipreps, DNA Purification Systems). Con el fin de romper las células, extraer y aislar el cDNA, los 3 ml de cultivo se centrifugaron a 10.000 g durante 3 min para precipitar las bacterias. El precipitado celular se resuspendió en 250 µl de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), con EDTA 10 mM y RNAsa A (100 µg/ml). A continuación se añadieron 250 µl de solución de lisis (0,2 M NaOH, 1% SDS) y se incubó durante 1-5 min. Seguidamente, se adicionó 10 µl de una solución alcalina con proteasas (conteniendo entre otros, 25-50 % subtilisina, 20-25 % de propano-1,2-diol, 1-5 % tetraborato de disodio anhidro) para inactivar endonucleasas y degradar proteínas, y 350 µl de solución de neutralización (4,09 M hidrocloreuro de guanidina, 0,759 M acetato potásico, 2,12 M acético glacial, pH 2,4), después de incubar 5 min se centrifugó a 14.000 g durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a una columna suministrada por Promega que contenía una resina a la que se unía el DNA, después se centrifugó a 14.000 g durante 1 min y posteriormente, se añadieron 750 µl de solución de lavado (60 % etanol, 60 mM acetato potásico, 8,3 mM Tris-HCl, 0,04 mM EDTA) y se realizó una centrifugación igual a la anterior. El paso anterior se repitió con 250 µl de solución de lavado y se centrifugó en las mismas condiciones durante 2 min. Por último, se eluyó el DNA de la columna añadiendo 50 µl de agua y centrifugando a 14.000 g durante 1 min. Las muestras se conservaron a -20°C.

3.29 RT-PCR SEMICUANTITATIVA

Para los experimentos de PCR-Semicuantitativa se diseñaron cebadores específicos a partir de las secuencias obtenidas durante el desarrollo de este trabajo y a partir de otras existentes en las bases de datos. Los cebadores utilizados, para guisante y *Arabidopsis*, así como la temperatura de alineamiento, el número de acceso y el tamaño del fragmento amplificado, se especifican en la tabla 3.6a y 3.6b.

cDNA	F-Oligonucleótido (5'-3')	R-Oligonucleótido (5'-3')	T.A	Nº acceso
CuZnSOD2	GAACAATGGTGAAGGCTGTG	GTGACCACCTTTCCAAGAT	55	AB087845
GR-1	ACAGTATTTGGTGGGCAAGC	AAACTGCGCTTTCTAGCTC	60	X98274
MnSOD	GGAGCAAGTTTGGTTCCATT	AAGGTTATTTCGGCCAGATTG	58	X60170
CAT	ATCCCTATCTTCTGCTCC	GACATACACCGATTTTCC	54	X60169
chitinasa	CCAAGCTGGTGGAGCTGTA	TCAGGAGCCACATGGCCAATC	55	X63899
PrP4a	ATGGAGAGCGTACAGAGAAG	CTCTAATGGTGGACTGGACT	55	AF137351
Pal	TGGATGAGGTGAAGCGTATG	ATCTCCGGAAGCTGTGATTG	55	D10001
HSP 71.2	ACCTCGGCACAACCTACAGC	GAGATAGCACCGGCGTCTT'	56	U08848
Actina 2	AATGGTGAAGGCTGGATTTG	AGCAAGATCCAAACGAAGGA	65	X68649

Tabla 3.6 a Cebadores específicos de guisante utilizados en la PCR semicuantitativa

cDNA	F-Oligonucleótido (5'-3')	R-Oligonucleótido (5'-3')	T.A	Nº acceso
CuZnSOD2	ATTCTCTCTTCTCCAATCC	CATCCTTAAGCTCGTGAACC	58	AT2G28190
pRP-1	GTAGGTGCTCTTGTCTTCC	CATCCGAGTCTCACTGACTT	60	AT2G14610
HSP 15,7	CGGTCTAGAATGGCAGACAGAGGAATATTCTTG	AATCCCGGGTCAAAGCTTGCTAGTAAT	56	AT5G37670
Actina 2	AATGGTGAAGGCTGGATTTG	AGCAAGATCCAAACGAAGGA	65	X68649

Tabla 3.6 b Cebadores específicos de *Arabidopsis* utilizados en la PCR semicuantitativa

El método utilizado para la PCR semicuantitativa fue el descrito por Marone y col., (2001). Esta técnica permite comparar la cantidad de mRNA entre muestras distintas, ya que la reacción se detiene en la fase exponencial de amplificación, donde la cantidad de DNA amplificado es directamente proporcional a la cantidad de cDNA inicial de la muestra. Además es imprescindible el uso de un gen control, cuya expresión sea constitutiva y no varíe entre las distintas situaciones, para normalizar la intensidad de las bandas con respecto a ese control. En este estudio se utilizó la actina-II de guisante como gen control, tanto para guisante como para *Arabidopsis*.

Una vez obtenido el cDNA de las distintas plantas, se cuantificaron y se realizaron distintas diluciones de los mismos para asegurar que se partía de la misma concentración de cDNA en cada una de las muestras. Mediante una PCR normal preparando mezclas comunes de reacción para minimizar el error de experimentación, se seleccionó el número de ciclos correspondientes para cada uno de los genes

ensayados así como para el control, realizando amplificaciones de los mismos a 25, 28, 30 y 33 ciclos, con el fin de seleccionar un ciclo de amplificación correspondiente a la fase exponencial de la misma.

Por último, una vez ajustadas las concentraciones de cDNA inicial y los ciclos de amplificación (entre 28-30 en todos los casos), se realizaron las PCR según el protocolo descrito anteriormente.

3.30 HIBRIDACIÓN *in situ*

Para estudiar de la distribución tisular de mensajeros correspondientes a la proteína de defensa PrP-4a se llevó a cabo la hibridación *in situ* de los mismos en hojas de guisante utilizando el método descrito por Massonneau y col., (2005). Para ello, se realizaron los siguientes pasos:

3.30.1 Obtención de la sonda RNA marcada con digoxigenina

Para la obtención de la sonda, se utilizó el DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) de Roche. El fragmento de la PrP-4a se amplificó a partir del cDNA obtenido del RNA aislado de hojas de guisante mediante PCR, utilizando cebadores específicos. Este fragmento amplificado se clonó en un vector pGEM-T que contenía un sitio de clonación flanqueado por un fragmento T7 en un extremo y un fragmento SP6 en el otro, y se transformó en células dH5 α mediante choque térmico, con el fin de obtener un mayor número de copias del vector con el fragmento clonado. Tras purificar dichas copias mediante MiniPrep, se linearizó el vector mediante enzimas de restricción. Para realizar este tipo de hibridación es necesaria una sonda sentido, como control negativo, y otra antisentido, que será la que hibridará al mensajero complementario. Para ello, era necesario obtener el vector linearizado en ambos sentidos, lo cual se consiguió mediante restricción del vector en el fragmento SP6, en un caso, y en el fragmento T7 en el caso contrario (Fig. 3.7). Una vez linearizado el vector en ambos sentidos, se obtuvieron las sondas sentido y antisentido marcadas con digoxigenina, mediante la acción de una RNA polimerasa, que retrotranscribe el cDNA insertado en el vector, en RNA marcado

con digoxigenina, utilizando para ello nucleótidos trifosfato marcados con digoxigenina (Fig. 3.7). Una vez obtenidas las sondas, estas se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

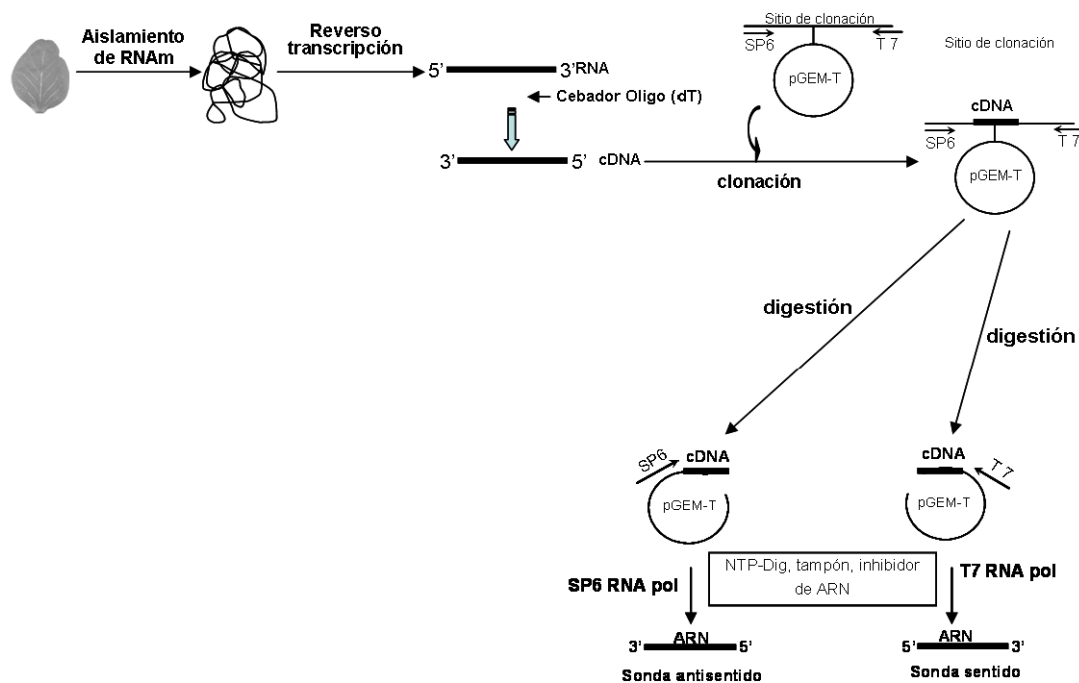


Figura 3.7: Obtención de la sonda RNA marcada con digoxigenina

3.30.2 Preparación de las muestras

Las hojas de guisante se cortaron en fragmentos de aproximadamente 25 mm^2 y se fijaron durante 18 h a 4°C en una solución de paraformaldehído al 4 %. Tras la fijación los cortes se lavaron tres veces con PBS durante 10 min y se conservaron a 4°C en PBS con paraformaldehído al 0,1 %. Las muestra fueron crioprotegidas mediante inmersiones sucesivas en concentraciones crecientes de sacarosa; 0,1 M en PBS durante 30 min, 1 M en PBS durante 1 h y 2,3 M en PBS durante toda la noche. Todos los pasos se efectuaron 4°C y en agitación.

3.30.3 Obtención de criocortes

Para preparar los bloques se hicieron moldes con nieve carbónica sobre papel de aluminio. A estos moldes se añadió el OCT (“*Optimal Cutting Temperature*”); que contiene entre otros, polivinil alcohol 12,24 % y polietilen-glicol 4,26 % y que solidifica cuando se congela. La muestra se introdujo en el molde cuando el OCT estaba casi congelado, para poder así orientarla y evitar que se hunda. Los cortes de un grosor de de 30-40 μm se realizaron en un criostato (Leica CM 1800), y se recogieron en un porta silanizado con pocillos. Una vez obtenidos los cortes, se eliminó el OCT con agua y se conservaron a -20°C durante al menos una noche, para favorecer la permeabilización y su conservación hasta la hibridación.

3.30.4 Deshidratación-Rehidratación

Los cortes se deshidrataron y rehidrataron mediante la incubación de los mismos en series crecientes y decrecientes de metanol (30%, 50%, 70%, 100%, 70%, 50%, 30%) preparado en PBS, durante 5 min en cada solución. Para digerir parcialmente las paredes celulares, y favorecer la penetración del anticuerpo, las muestras se incubaron durante 60 min con celulasa al 2 % (p/v). Tras cada tratamiento las muestras se lavaron con PBS y con agua durante 5 min. Las muestras se deshidrataron de nuevo mediante incubación de los cortes con concentraciones crecientes de metanol (30%, 50%, 70%, 100%) y se dejaron secar totalmente a temperatura ambiente.

3.30.5 Hibridación

Las sondas sentido y antisentido, previamente sintetizadas, se diluyeron entre 1/20 y 1/50 en el tampón de hibridación (formamida 50 %, NaCl 300 mM, Tris 100 mM y EDTA 10 mM). A cada muestra se añadió 20 μl de la sonda, se taparon los pocillos con una tira de parafina y se incubaron durante toda la noche a 50°C , en una cámara húmeda. Una vez terminado el proceso de hibridación, se lavaron las muestras 4 veces con SSC (NaCl 0,6 M; citrato sódico 0,06 M) durante 2 min, 4 veces con SSC dilución 1/2, durante 2 min y 2 veces con SSC dilución 1/40 a 50°C durante 15 min.

3.30.6 Inmunodetección de los híbridos por microscopía de fluorescencia

Las muestras hibridadas con la sonda se lavaron con suero de albúmina bovino (ASB) al 5 % durante 5 min, para bloquear uniones inespecíficas del anticuerpo. Posteriormente, se incubaron durante 90 min con el anticuerpo Mouse Anti-digoxigenina diluido 1/5000 en ASB al 1% (p/v). Tras tres lavados de 5 min cada uno, con ASB al 1%, se incubaron durante 45 min con el anticuerpo Anti-Mouse IgG-alexa 488 diluido 1/25 en PBS. Nuevamente se lavaron las muestras tres veces con PBS y se incubaron con DAPI (diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol) durante 5 min, para marcar los núcleos y comprobar que la sonda no está detectando ácidos nucleicos del núcleo. Por último, tras lavar las muestras con PBS se montaron con mowiol y se observaron al microscopio láser confocal, Leica TCS SP2.

3.31 OBTENCIÓN DE MUTANTES DE *Arabidopsis*

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se ha abordado la obtención de tres mutantes de *Arabidopsis thaliana* en colaboración con el Dr Maximo Delledonne, de la Università degli Studi di Verona (Italia), mediante tecnología Gateway de Invitrogen: dos líneas transgénicas deficientes en glicolato oxidasa (GOX) y una línea transgénica que contenía una proteína de fusión GFP-SKL, para detectar los peroxisomas mediante microscopía de fluorescencia.

La tecnología Gateway está basada en el sistema de recombinación específica del Fago Lambda mediante el cual este se integra en el cromosoma de *E. coli*. El fago Lambda incorpora su genoma en el de *E. coli* mediante un proceso de lisogénesis, que consiste básicamente en una recombinación específica entre secuencias de DNA. Estas secuencias específicas se denominan sitios att, y contienen dominios de unión para proteínas de recombinación. El proceso de recombinación tenía lugar entre los sitios attP (del fago) y attB (de *E. coli*) en presencia de 2 proteínas de recombinación, la integrasa (Int) y el factor IHF (Integration Host Factor). Cuando tiene lugar la recombinación, el genoma del fago queda integrado en el genoma de *E. coli* y al mismo tiempo se reconfiguran los sitios att, dando lugar a dos sitios att nuevos, el attR y el attL. Mediante la recombinación de estos dos nuevos sitios att, y en presencia de las dos proteínas de

recombinación y una excionasa (Xis), el fago es liberado del genoma de *E. coli*, recircularizándose el ciclo lítico y regenerándose los sitios att B y attP (Landy y col., 1989; Fig. 3.8).

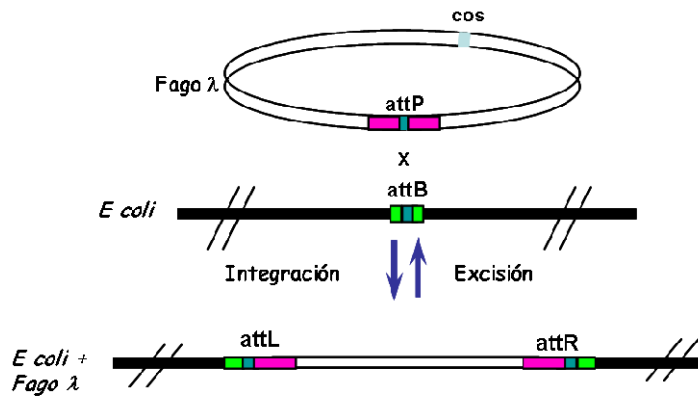


Figura 3.8: Esquema de recombinação específica del fago λ en *E. coli* (Tomado de Live Technologies™)

Mediante este sistema de recombinação homóloga de sitios att, el gen de interés, previamente clonado en el vector D-TOPO, según se ha descrito en el apartado 3.26.2, queda introducido en el vector secundario, el cual se transformará en *Agrobacterium tumefaciens* y será finalmente introducido en la planta (Fig.3.9).

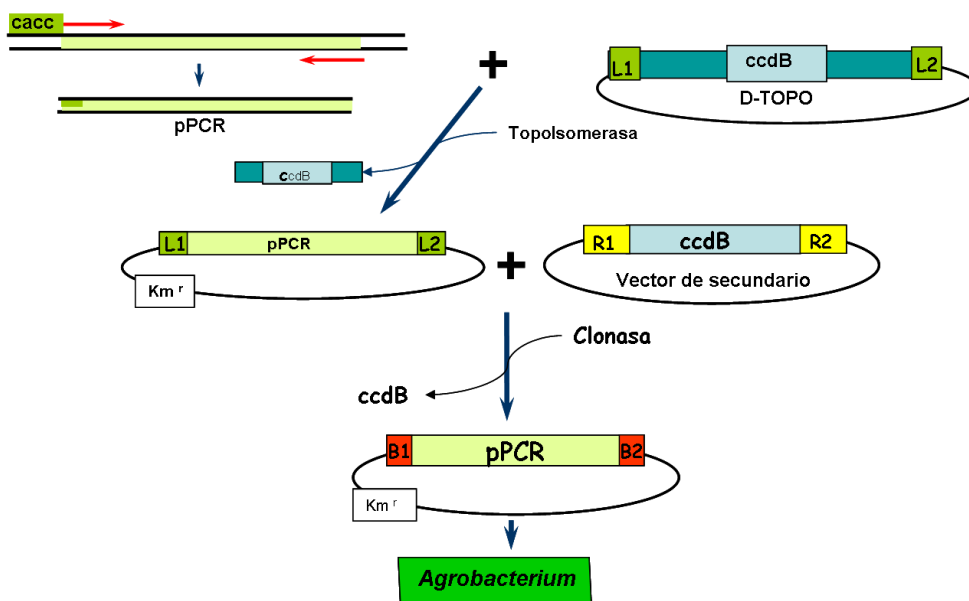


Figura 3.9: Clonación mediante tecnología Gateway. (Gateway® Technology)

3.31.1 Obtención de mutantes deficientes en GOX

La reducción de la expresión de GOX se realizó mediante RNA de interferencia (RNAi), basado en la respuesta antiviral. Ciertos virus están compuestos por RNA de doble cadena y la presencia de este RNA ajeno desencadena en plantas e invertebrados una respuesta liderada por la enzima denominada Dicer, que corta el RNA invasor en pequeños fragmentos. Otras proteínas forman el Complejo Silenciador Inducido por el RNA (RISC) y son las encargadas de separar los fragmentos de RNA y usarlos como guía para buscar y aparearse con cualquier secuencia de RNA que coincida con ellas, bloqueando así el proceso de traducción del mRNA. De esta forma la célula se asegura que no se sinteticen proteínas virales (Zamore, 2001), (Fig. 3.10).

Según el protocolo recomendado por la casa comercial, para bloquear la traducción de una determinada proteína es necesario introducir en el vector secundario un fragmento de cDNA de unos cuatrocientos pares de bases, que después serán cortados en pequeños fragmentos de unos 15-25 nucleótidos. En plantas de *Arabidopsis* existe una familia génica constituida por seis genes que codifican para la GOX, cuatro en el cromosoma 3 (At3g14130, At3g14420, At3g14415, At3g-14150), una en el cromosoma 4 (At4g-18360) y otra en el cromosoma 5 (At5g-53910). Tras realizar un alineamiento de dichas secuencias se observó que no existían regiones de homología de al menos, 25 nucleótidos, lo cual, hacía imposible bloquear la traducción de todas ellas con una sola construcción, motivo por el cual se decidió realizar dos líneas diferentes, y una vez obtenidas ambas líneas homocigotas, se procedería al cruce entre ellas.

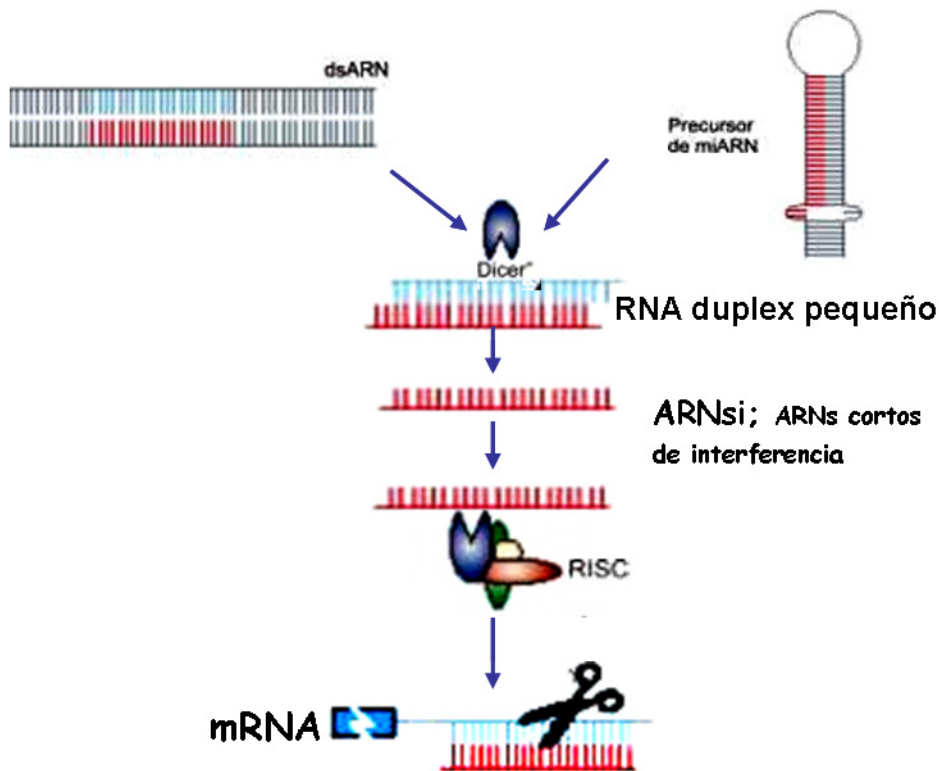


Figura 3.10: Respuesta antiviral, de células superiores frente a RNA de cadena doble (www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)

Las líneas transgénicas construidas se denominaron: Goxi-I que bloquea las isoenzimas At3g14130 y At3g14150 y la Goxi-II que bloquea las isoenzimas At3g14415, At3g14420 y At4g18360. Para ello se realizaron alineamientos de cada grupo y se seleccionó un fragmento de unos 400 pares de bases con homología entre sí, a partir del cual se diseñaron los cebadores específicos. Se amplificó la región seleccionada, en cada uno de los casos y se clonaron en TOPO. Una vez en este vector, y siguiendo el protocolo de recombinación homóloga descrito anteriormente, se clonaron los fragmentos en dos vectores secundarios proporcionados por la casa comercial para el silenciamiento por RNAi (Fig.3.11). Estos vectores solo difieren entre sí en la selección de líneas transgénicas en la planta, uno de ellos le confiere a la planta resistencia a la ampicilina, mientras que el otro le confiere resistencia a un herbicida denominado BAR (glufosinato sódico).

Estos vectores están diseñados de tal forma que cuando se realiza la clonación con el fragmento insertado en TOPO, se introducen dos copias del cDNA complementarias, que cuando se insertan en el genoma de la planta y son transcritos por la maquinaria de la misma, se unen formando un RNA de doble cadena que será degradado por la planta tal y como se ha explicado anteriormente.

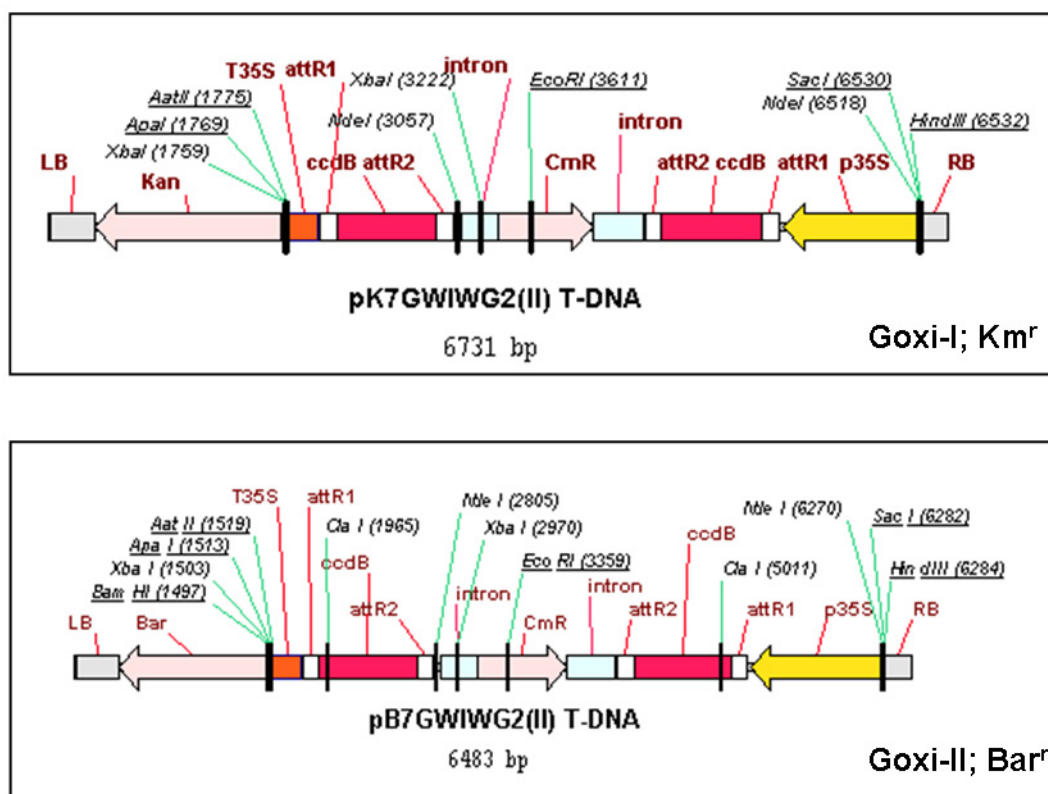


Figura 3.11: Vectores para RNA de interferencia utilizados para la obtención de Goxi-I y Goxi-II.

3.31.2 Obtención de mutanes GFP-SKL

Para la obtención de plantas transgénicas que expresan la proteína de fusión GFP-SKL, se amplificó el extremo 3' de la hidroxipiruvato reductasa, enzima exclusiva del peroxisoma que contiene el péptido señal SKL en el extremo 3' de su secuencia codificadora. Una vez amplificado el fragmento adecuado, de unas 300 pb, se clonó en TOPO y este, en el vector secundario proporcionado por la casa comercial. Este vector denominado pF7KWG2 T-DNA (Fig. 3.12), está diseñado de tal forma que el

fragmento clonado en TOPO, entra por recombinación homóloga en el extremo 5' del gen de la proteína verde fluorescente (GFP) insertada en el plásmido, de forma que cuando se inserte en el genoma de la planta y se transcriba y traduzca con la maquinaria de la misma, se expresará una proteína verde fluorescente que irá al peroxisoma, dirigida por el péptido señal SKL. Una vez obtenidos los vectores secundarios, estos fueron introducidos en *Agrobacterium tumefaciens* competentes.

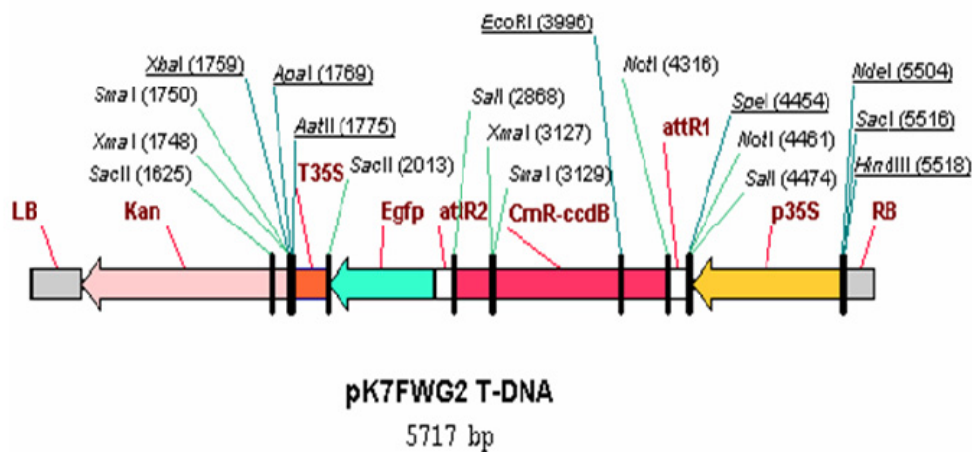


Figura 3.12: Vector utilizado para proteínas de fusión con GFP

3.31.3 Transformación de *Agrobacterium*

Los vectores secundarios se transformaron en células de la cepa GV3100 de *Agrobacterium tumefaciens* mediante electroporación. Los cultivos de *Agrobacterium*, crecidos en LB con rifampicina 50 µg/ml, durante 2 d a 28°C, se precipitaron mediante centrifugación a 14000 rpm durante 1 min. El precipitado se lavó tres veces con 500 ml de una solución de glicerol al 10 %, a 4°C estéril. Una vez eliminados los restos de medio de cultivo y de antibiótico, el precipitado se resuspendió en 40 ml de la solución de glicerol utilizada para los lavados. A este volumen se le añadió 1-2 ml del vector secundario transformado y previamente purificado por MiniPrep, resuspendido en tampón TE (Tris-HCl 1 M, EDTA 0,1 M, pH 8,0). El proceso de transformación se

realizó en un electroporador mediante una descarga de 25 mF, 25 Kvol y 200 Ohm durante 4-5 s.

Las células de *Agrobacterium* transformadas, se sembraron en placas de Petri con LB sólido y con los correspondientes antibióticos de selección. Dichas placas se incubaron a 28°C durante 2 d aproximadamente. Una vez seleccionadas las colonias se comprobaron los positivos mediante PCR en colonia, utilizando los cebadores específicos de los genes introducidos en el plásmido.

3.31.4 Transformación de *Arabidopsis thaliana* mediante “Dipping” o inmersión

La transformación de las plantas de *Arabidopsis* se realizó mediante la técnica de “Dipping” o inmersión. Las plantas se utilizaron para transformación cuando presentaban varias ramas florales una vez aparecida la primera flor. El *Agrobacterium* transformado se cultivó a 28°C en Erlenmeyer con 50 ml de LB conteniendo los antibióticos correspondientes y el cultivo se mantuvo hasta alcanzar una densidad óptica de 1,8-1,9 a 600 nm.

Una vez crecido el cultivo se separaron las células centrifugando a 4000 rpm durante 10 min y se lavaron con 25 ml de sacarosa al 5% (p/v). Se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min y el precipitado se resuspendió en 80 ml de sacarosa al 5 % (p/v) y se midió la densidad óptica que debía estar entre 0,6-0,8. La solución anterior se pasó a un vaso de precipitado de 100 ml y se le añadió un permeabilizante (Silwet L-77). Por último, la planta completa, se introdujo por inmersión en la solución de *Agrobacterium* transformado y se mantuvo durante 15 min.

Una vez realizada la transformación, las flores se cubrieron con una película transparente para mantener la humedad y se mantuvieron durante 24-48 h en oscuridad y a 18°C. Posteriormente, las plantas se llevaron a una cámara de cultivo y se dejaron en

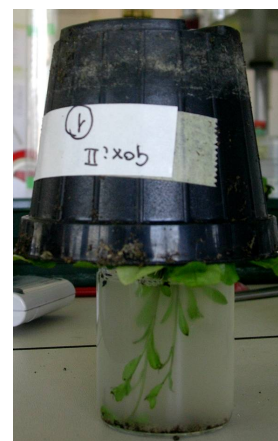


Figura 3.13: Transformación de *Arabidopsis* por inmersión o dipping

día largo, hasta obtener las silicuas bien secas para obtener las semillas. Las plantas se mantuvieron sin regar durante la semana siguiente a la transformación.

3.31.5 Selección de plantas transformadas

Una vez obtenida la primera generación de semillas, estas se sembraron en placas Petri conteniendo kanamicina 100 µg/ml en el caso de las líneas Goxi-I y GFP-SKL. Las plantas transformadas eran resistentes a la kanamicina y crecían normalmente, frente a las plantas no transformadas que no sobrevivían en estas condiciones. Las plantas resistentes, se transplantaron a tierra y se cultivaron hasta la obtención de semillas, repitiendo el proceso anterior hasta que se obtuvieron líneas homocigotas. Se consideró que la planta era homocigota para el gen introducido, cuando la proporción de resistentes era superior al 95%, lo cual suele obtenerse tras tres o cuatros generaciones. Las plantas transformadas con la construcción denominada Goxi-II, eran resistentes a Bar (Glufosinato sódico), y se seleccionaron por pulverización de la parte aérea de la planta con el herbicida (40 g/L), cada dos días y un total de cinco pulverizaciones. La primera generación de semillas obtenidas tras la transformación se sembró directamente en tierra y cuando la planta fue adulta, se pulverizó con el herbicida. Las plantas que sobrevivieron al tratamiento se cultivaron hasta la obtención de semillas y se repitió el procedimiento hasta la obtención de líneas homocigotas para el gen introducido.

RESULTADOS

4.1 EFECTO DEL CADMIO SOBRE RAÍCES DE GUISANTE

El cadmio es rápidamente asimilado por la planta a través de la raíz y en parte, es transportado hasta las hojas a través del xilema. La mayor parte del cadmio asimilado por la planta, se acumula en la raíz, mientras que las hojas solo acumulan una mínima parte del metal asimilado por la planta (100-180 veces menos que la raíz) (Sandalio y col., 2001). En este trabajo se ha estudiado el efecto de este metal sobre la raíz, a nivel de crecimiento y estructura, así como a nivel bioquímico, mediante el análisis de marcadores de estrés oxidativo. También se ha estudiado el efecto del cadmio sobre distintas moléculas implicadas en la respuesta de la planta frente a la toxicidad del cadmio.

4.1.1 Crecimiento, Morfología y Estructura de la Raíz

En plantas de guisante, el cadmio inducía una reducción del crecimiento de la raíz, como consecuencia de una disminución del número y longitud de las raíces secundarias (Fig.4.1-A).

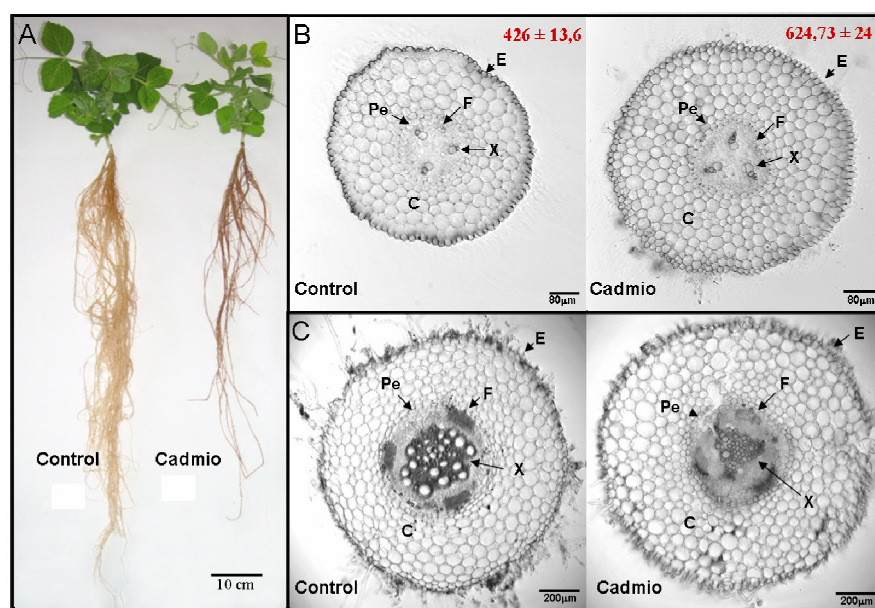


Figura 4.1: Efecto de Cd sobre el crecimiento y estructura de la raíz de plantas de guisante. Las plantas fueron crecidas durante 15 días con CdCl_2 50 μM en cultivo hidropónico A; plantas completas. B; secciones transversales de raíces secundarias, los valores en rojo corresponden a la medida del diámetro de la raíz en μm . C; secciones transversales de raíces principales. E; epidermis, C; corteza, Pe; periciclo, F; floema, X; xilema.

El Cd también producía un engrosamiento de las raíces secundarias. Así, el diámetro medio de las raíces de plantas control era de $426,0 \pm 13,6 \mu\text{m}$, mientras que en las tratadas con Cd aumentaba a $624,73 \pm 24,00 \mu\text{m}$. Este incremento se debía fundamentalmente a un aumento del número de células de la corteza (Fig. 4.1-B). Estos cambios estaban acompañados de un pardeamiento de las raíces inducido por el cadmio (Fig. 4.1-A).

En raíces principales, el Cd provocaba cambios en los haces vasculares que afectaban tanto al tamaño, como a la distribución de vasos del xilema (Fig. 4.1-C). El floema también parecía estar menos desarrollado en las raíces de plantas tratadas con cadmio (Fig. 4.1-C).

4.1.2 Estudio de Parámetros Oxidativos en Raíces de Plantas de Guisante

4.1.2.1 Antioxidantes Enzimáticos

El análisis de la actividad de antioxidantes enzimáticos en raíces se llevó a cabo en extractos crudos de plantas de guisante control y tratadas con cadmio. Las raíces tratadas con cadmio mostraron una reducción significativa de las actividades GR, GPX y en menor grado de la CAT, mientras que la actividad SOD total mostró un ligero aumento.

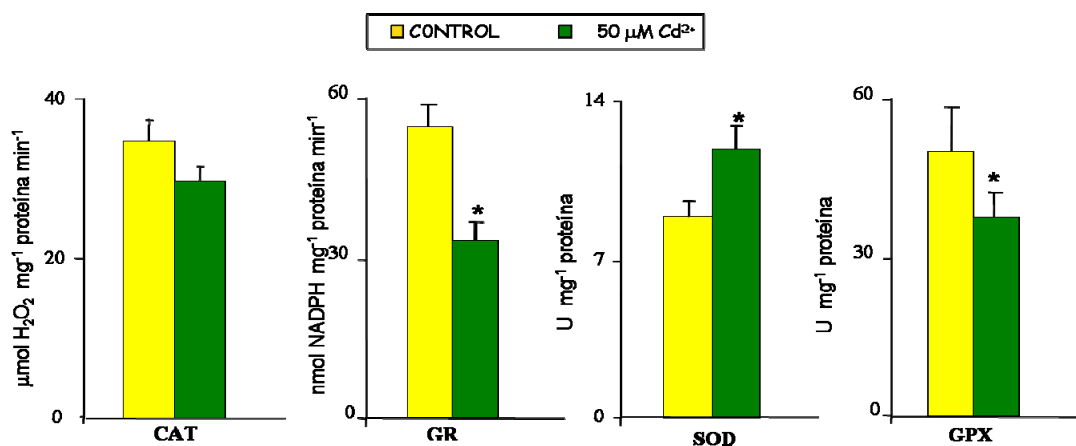


Figura 4.2: Efecto del cadmio sobre enzimas antioxidantes de raíces de guisante. Las determinaciones se llevaron a cabo en extractos crudos de raíces. CAT, catalasa; GR, glutatión reductasa; SOD, superóxido dismutasa; GPX, guayacol peroxidasa. Cada valor representa la media \pm EEM de al menos tres réplicas. Las diferencias fueron significativas a $P < 0,05$ (*) según el test de Duncan.

El análisis de la actividad de las isoformas de SOD mediante electroforesis nativa en geles de poliacrilamida, mostró una fuerte reducción de las dos CuZn-SODs, mientras que la Mn-SOD presentaba un ligero aumento en plantas tratadas con cadmio y la Fe-SOD no se modificaba (Fig. 4.3).

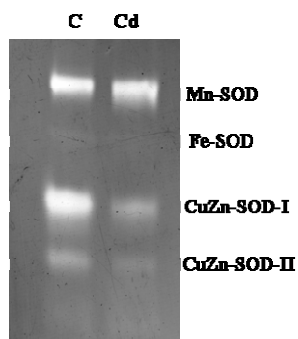


Figura 4.3: Actividad de isoenzimas de SOD. Las proteínas (45 µg) se separaron mediante electroforesis nativa en geles de poliacrilamida (10%) y las isoenzimas se visualizaron mediante tinción fotoquímica con NBT. C, control; Cd, CdCl₂ 50 µM

El análisis de la expresión de algunos de estos antioxidantes mediante RT-PCR semicuantitativa mostraba una disminución del 40% y 50% de la expresión de la CAT y de la CuZn-SOD, respectivamente, lo que coincide con la disminución de la actividad de dichas enzimas. Por el contrario, el Cd inducía la expresión de la Fe-SOD (40%), la Mn-SOD (70%) y de la GR (40%). Sin embargo, esta inducción no coincidía con los datos de actividad observados, lo que sugiere que el Cd provoca modificaciones postraduccionales que afectan a la actividad de estas proteínas.

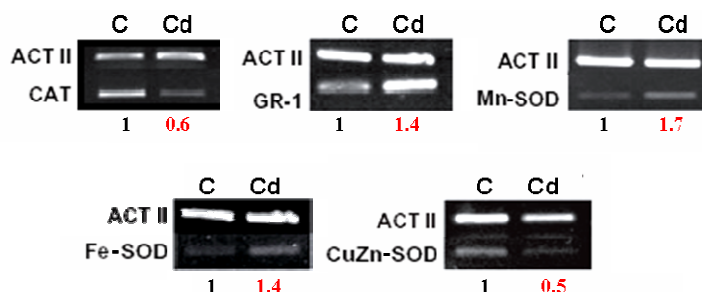


Figura 4.4: Efecto del Cd sobre la expresión del mRNA de antioxidantes enzimáticos. El análisis se realizó mediante RT-PCR semicuantitativa. Los productos de amplificación fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa (0,8%) y posterior tinción con bromuro de etidio. La intensidad de las bandas se cuantificó en el analizador de imágenes con el software *Quantity one* de Bio-Rad. Los resultados se expresan como la razón entre el cDNA y la ACT II utilizada como control interno después de su normalización y expresa el número de veces respecto al control, al que se asigna el valor 1. CAT, catalasa; GR, glutation reductasa; Mn-SOD, Fe-SOD, CuZn-SOD, manganeso, ferro y cuprozinc superóxido dismutasas. ACT-II, actina 2; C, control; Cd, CdCl₂ 50 µM.

4.1.2.2 Antioxidantes no Enzimáticos

El análisis del contenido de ascorbato total (ASC+DHA) y glutatión total (GSH+GSSG) mostró una reducción significativa de ambos en las raíces de plantas tratadas con cadmio, respecto a las controles. La reducción de ascorbato total dependiente del Cd fue de un 20% (Fig. 4.5-A), mientras que la de glutatión total fue del 50% (Fig. 4.5-B). En plantas tratadas con Cd la forma predominante del ascorbato era la forma oxidada (DHA), mientras que el glutatión se encontraba fundamentalmente en su forma reducida (GSH).

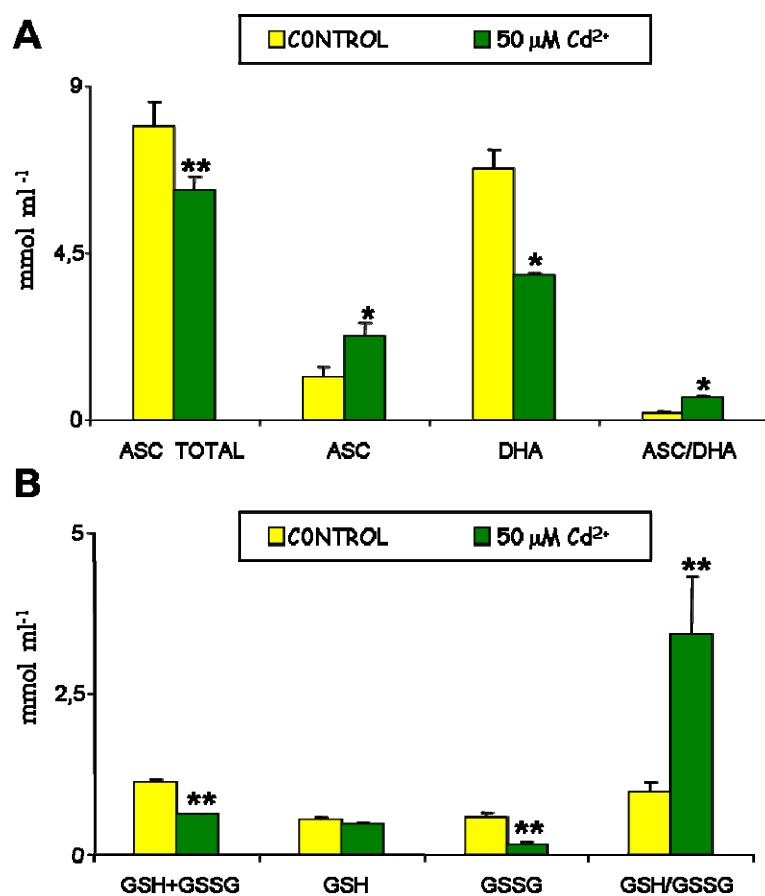


Figura 4.5: Efecto del Cd sobre el contenido de antioxidantes no enzimáticos en raíces de plantas de guisante control y tratadas con Cd. Cada valor representa la media \pm EEM de al menos tres réplicas. ASC, ascorbato reducido; DHA, ascorbato oxidado; GSSG, glutatión oxidado; GSH, glutatión reducido. Las diferencias fueron significativas a $P < 0.05$ (*) y $P < 0.01$ (**) según el Test de Duncan.

4.1.2.3 Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂)

La concentración de H₂O₂ en extractos crudos de raíces de guisante control y tratadas con cadmio se determinó mediante fluorimetría utilizando ácido homovanilínico. Como se muestra en la figura 4.6, el tratamiento con cadmio provocaba un aumento del contenido del H₂O₂, de dos veces, respecto a las plantas control.

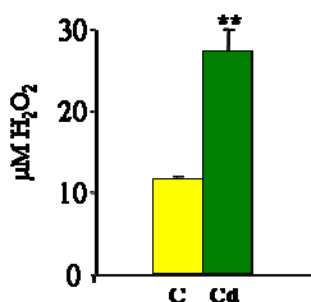


Figura 4.6: Efecto del cadmio sobre la producción de H₂O₂ en extractos crudos de raíces de guisante. Cada valor representa la media \pm EEM de al menos tres réplicas. Las diferencias fueron significativas a $P < 0.01$ (**) según el test de Duncan. C, control; Cd, CdCl₂ 50 µM.

4.1.2.4 Daños Oxidativos a Macromoléculas

Como marcadores de estrés oxidativo se determinaron la tasa de peroxidación lipídica, y la modificación oxidativa de proteínas. La peroxidación lipídica se cuantificó mediante el análisis del contenido de malondialdehído (MDA). En la figura 4.7-A se muestra un aumento significativo del contenido de MDA en raíces de plantas tratadas con cadmio. El contenido en grupos carbonilo, utilizado como marcador de daños oxidativos a proteínas, también mostraba un ligero incremento, aunque no significativo, en la raíces de plantas tratadas con cadmio.

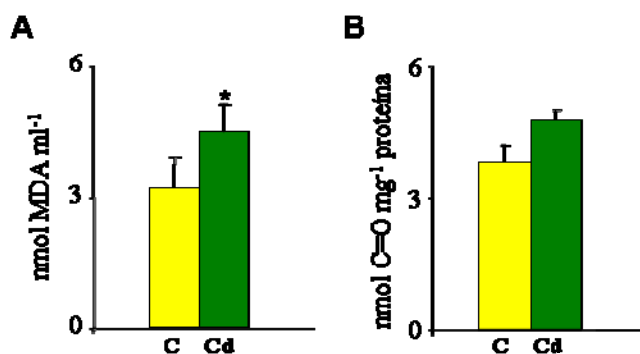


Figura 4.7: Efecto del cadmio sobre la tasa de peroxidación lipídica (A) y el contenido de grupos carbonilos de proteínas (B) en extractos de raíces de guisante. Cada valor representa la media \pm EEM de al menos tres réplicas. Las diferencias fueron significativas a $P < 0.05$ (*) según el test de Duncan. C, control; Cd, CdCl₂ 50 µM.

Los resultados obtenidos, tanto de actividad y contenido de antioxidantes, como de los marcadores de estrés oxidativo sugieren que el Cd induce una reducción de las defensas antioxidantes, lo que se traduciría en un incremento de especies de oxígeno reactivo y por tanto de daños oxidativos.

4.1.3 Visualización de la Producción de ROS y NO

Para la determinación de la producción de ROS en situaciones de estrés por Cd, en esta memoria se ha optimizado un método que permite visualizar la producción de H_2O_2 y O_2^- a nivel tisular, *in vivo*, en cortes transversales de tejido, mediante el uso de sondas fluorescentes específicas y observación mediante microscopio láser confocal. Este método ha permitido la observación de la acumulación de H_2O_2 , O_2^- y NO en respuesta al suministro de Cd a la planta y determinar la contribución de los distintos tipos de células a la respuesta celular frente a este metal.

4.1.3.1 Producción de O_2^-

La detección de O_2^- se realizó mediante el uso de DHE. La especificidad del fluorocromo por los aniones O_2^- , se ensayó mediante la incubación de las raíces con TMP 1 mM, que actúa como secuestrador de O_2^- anulando la fluorescencia dependiente de este anión.

La producción de O_2^- en raíz secundaria completa se estudió mediante microscopía de fluorescencia en fragmentos de 2 cm de la zona apical de la raíz. En estas condiciones, las raíces secundarias de plantas tratadas con cadmio mostraban un incremento de la fluorescencia, lo que indica un acúmulo de O_2^- en este órgano (Fig. 4.8) y este incremento se anulaba por incubación con TMP. Para determinar los procesos implicados en la producción de O_2^- y la fuente de este radical, las raíces se incubaron con inhibidores de canales de calcio ($LaCl_3$) y de proteínas fosfatasa (cantaridina), e inhibidores de NADPH oxidasa (DPI) y peroxidasas (NaN_3). En la figura 4.8 se observa como el bloqueo de los canales de calcio mediante el tratamiento con $LaCl_3$ 1mM reducía el acúmulo de O_2^- inducido por el cadmio, lo que sugiere la implicación de los canales de calcio y más concretamente cambios en los niveles intracelulares de Ca^{2+}

en la producción de O_2^- . Sin embargo, la incubación con cantaridina 5 μ M, inhibidor de fosfatasa, no provocaba cambios importantes en la acumulación de O_2^- dependiente de Cd, lo que demuestra que la desfosforilación de proteínas no está directamente implicada en la producción de O_2^- en raíces. Para determinar el origen de la producción de O_2^- , las raíces secundarias se incubaron con DPI 10 μ M, inhibidor de NADPH oxidasa y con NaN_3 1 mM, inhibidor de fosfatasa. Ambos compuestos inducían una reducción de la fluorescencia, lo que sugiere la implicación de ambas, NADPH oxidasa y peroxidasas en la producción de O_2^- y por tanto de H_2O_2 (Fig. 4.8).

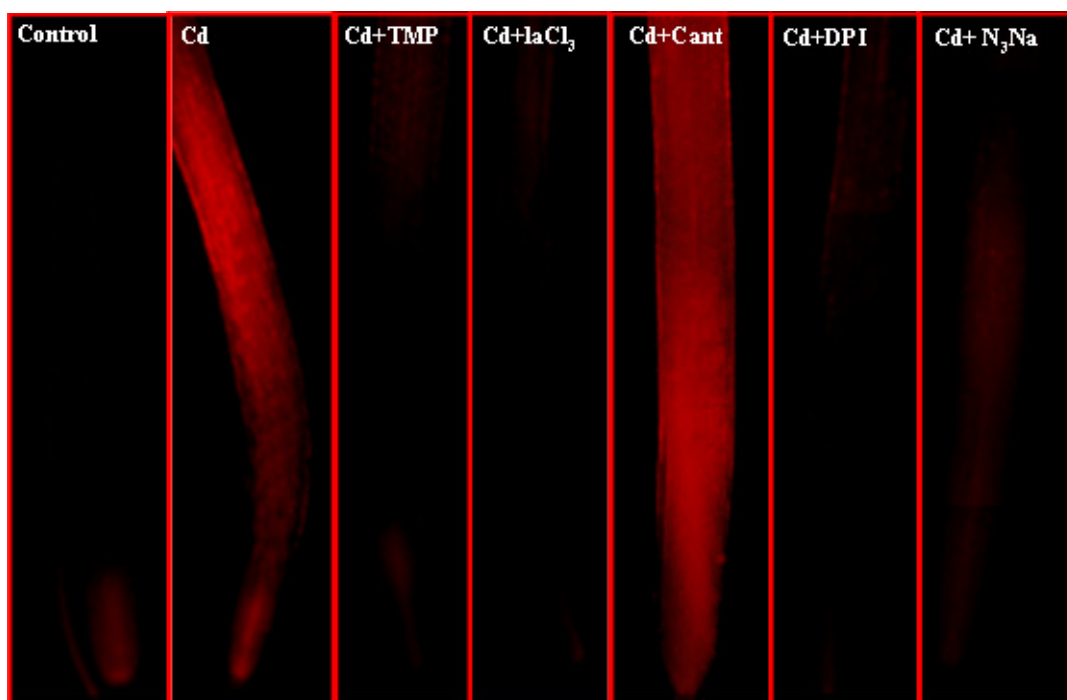


Figura 4.8: Visualización *in vivo* de la acumulación de O_2^- en raíces secundarias de plantas de guisante. La producción de O_2^- se visualizó mediante la fluorescencia del DHE en plantas control (C) y tratadas con $CdCl_2$ 50 μ M (Cd). Como control negativo, las raíces se incubaron con TMP (tetrametilpiperidina), secuestrador de O_2^- . Se incubaron fragmentos de raíces de 2 cm con los siguientes inhibidores antes de la incubación con DHE: cant 5 μ M (cantaridina, inhibidor de fosfatasa), $LaCl_3$ 1mM (inhibidor de canales de Ca^{2+}), DPI 10 μ M (difenileniodonio, inhibidor de NADPH oxidasa) y NaN_3 1 mM (inhibidor de peroxidasas).

El análisis de la producción del anión superóxido dependiente del Cd también se llevó a cabo en secciones transversales y longitudinales de raíces principal y secundaria

mediante microscopía láser confocal. Como se observa en la figura 4.9, en raíces secundarias la mayor acumulación de O_2^- tenía lugar en la corteza, el periciclo y el floema. En cortes transversales de raíces principales, se observaba una mayor acumulación de O_2^- en células de epidermis, corteza y periciclo. A nivel de haces vasculares, la mayor acumulación de O_2^- tenía lugar en el xilema.

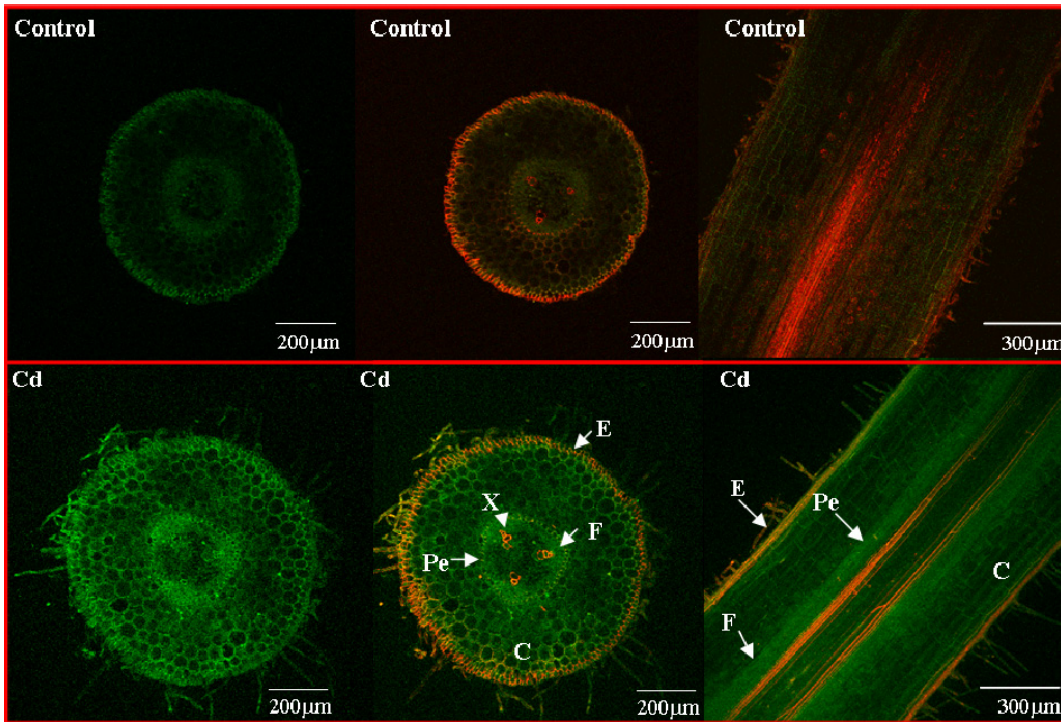


Figura 4.9: Visualización *in vivo* de la acumulación de O_2^- en cortes transversales (imágenes izquierda y central) y longitudinales (imagen derecha) de raíces secundarias de plantas de guisante control (C) y tratadas con $CdCl_2$ 50 μM (Cd). En verde se muestra la fluorescencia del DHE y en rojo la autofluorescencia de la raíz. La imagen central y la de la derecha muestran la superposición de ambas fluorescencias. Las imágenes corresponden a reconstrucciones tridimensionales de imágenes obtenidas mediante microscopía láser confocal. Pe, periciclo; C, corteza; F, floema; X, xilema; E, epidermis.

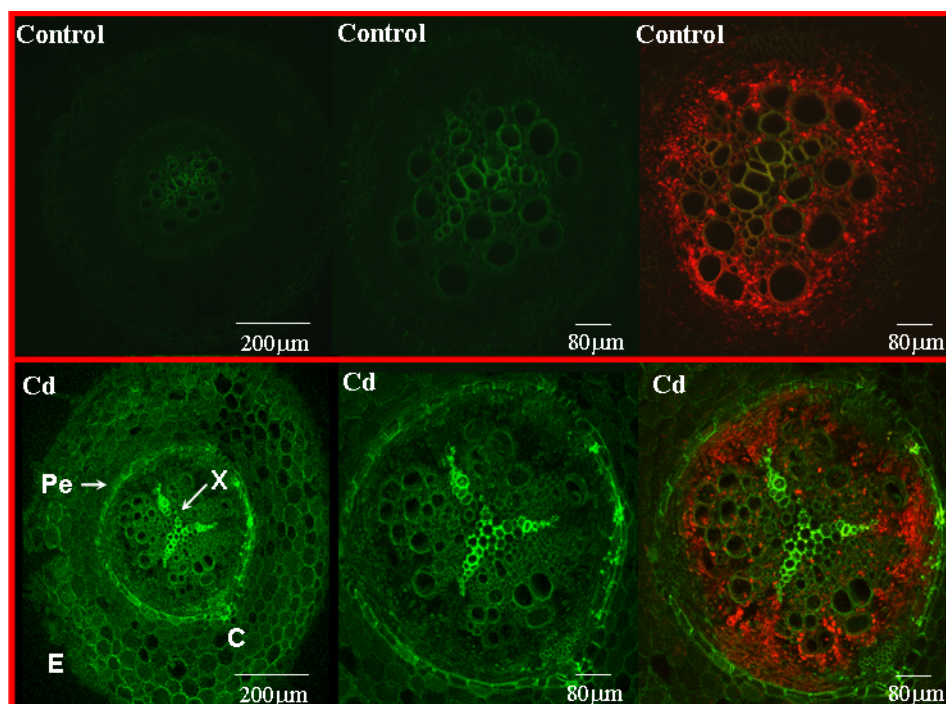


Figura 4.10: Visualización *in vivo* de la acumulación de O_2^- en cortes transversales de raíces principales de plantas de guisante control (C) y tratadas con $CdCl_2$ 50 μM (Cd). Las imágenes corresponden a reconstrucciones tridimensionales obtenidas por microscopía láser confocal. La imagen central corresponde a una mayor magnificación del cilindro vascular y la de la derecha a la superposición con la imagen correspondiente a la autofluorescencia (rojo). Pe, periciclo; C, corteza; X, xilema; E, epidermis.

4.1.3.2 Producción de H_2O_2

La detección de H_2O_2 se llevó a cabo en raíces secundarias y principales de plantas control y tratadas con cadmio, mediante el uso de DCF-DA. La especificidad del fluorocromo se comprobó mediante la incubación de la raíz tratada con cadmio, con ascorbato 1 mM, que actúa como secuestrador de H_2O_2 .

Como se muestra en la figura 4.11, las raíces secundarias de plantas tratadas con cadmio presentaban un considerable aumento de la fluorescencia del DCF-DA, que se corresponde con un mayor acúmulo de H_2O_2 , si bien, en las raíces de plantas control, se observaba acúmulo de H_2O_2 en el ápice de la raíz. Esta fluorescencia se reducía considerablemente en presencia de ASC, lo que demuestra que la fluorescencia es específica para el H_2O_2 .

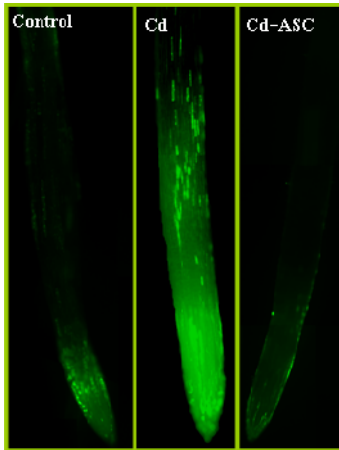


Figura 4.11: Visualización *in vivo* de la acumulación de H_2O_2 en raíces de plantas de guisante control y tratadas con cadmio. Como control negativo, las raíces se incubaron con ASC 1 mM, que actúa como secuestrador de H_2O_2 . C, control; Cd, $CdCl_2$ 50 μM .

La determinación de H_2O_2 en cortes transversales y longitudinales de raíces secundarias se muestra en la figura 4.12, donde se puede observar una mayor acumulación del peróxido en raíces tratadas con cadmio, a nivel de epidermis y haces vasculares, xilema y floema.

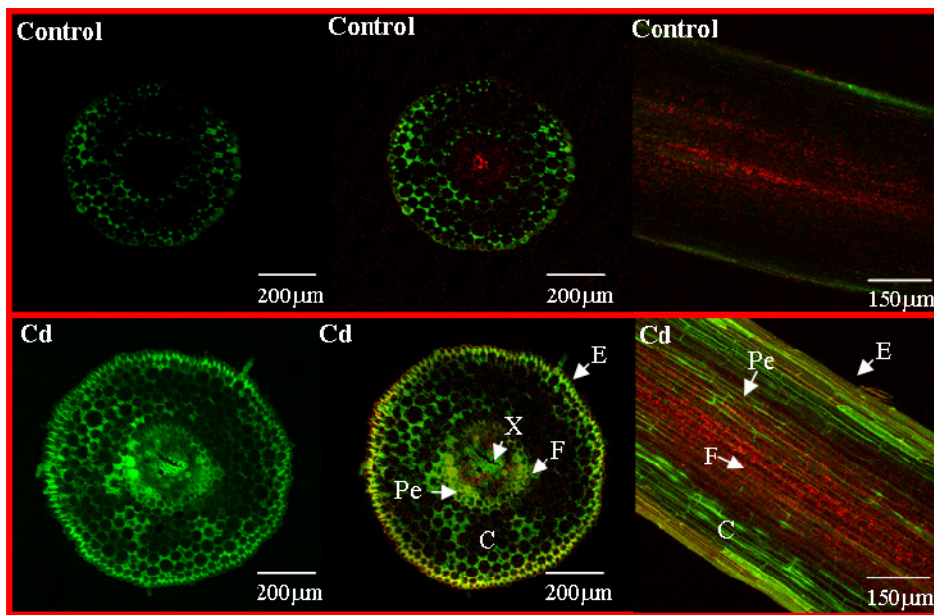


Figura 4.12: Visualización *in vivo* de la acumulación de H_2O_2 en cortes transversales (imagen izquierda y central) y longitudinales (imagen derecha) de raíces secundarias de plantas de guisante control (C) y tratadas con $CdCl_2$ 50 μM (Cd). En verde se muestra la fluorescencia de la DCF-DA y en rojo la autofluorescencia de las células de la raíz. La imagen central y la de la derecha muestran la superposición de ambas fluorescencias. Las imágenes corresponden a la reconstrucción tridimensional de imágenes obtenidas por microscopía láser confocal. Pe; periciclo. C; corteza. F; floema; X, xilema, E, epidermis.

En cortes transversales de raíces principales, se observaba acúmulo de H_2O_2 en plantas controles a nivel de haces vasculares (Fig. 4.13). Sin embargo, en presencia de Cd la acumulación de H_2O_2 era superior en epidermis, corteza y a nivel de haces vasculares y xilema (Fig. 4.13).

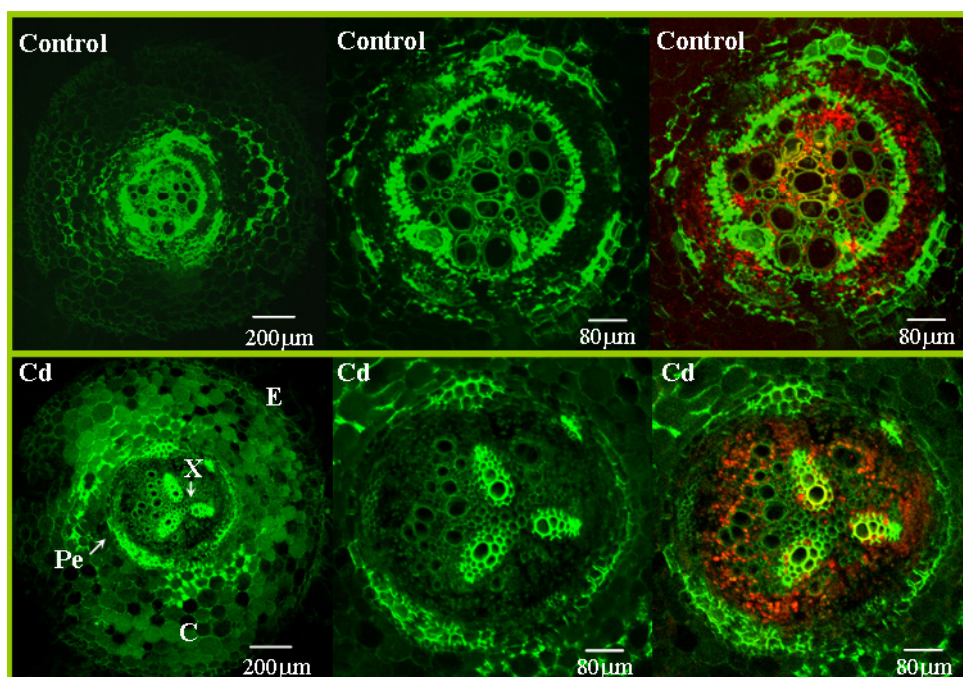


Figura 4.13: Visualización *in vivo* de la acumulación de H_2O_2 en cortes de raíces principales de plantas control (C) y tratadas con $CdCl_2$ 50 μM (Cd). Las imágenes corresponden a una reconstrucción tridimensional de imágenes obtenidas por microscopía láser confocal. La imagen central corresponde a una mayor magnificación del cilindro vascular y la de la derecha a la superposición con la imagen correspondiente a la autofluorescencia (rojo). Pe; periciclo. C; corteza. X; xilema. E; epidermis.

El análisis de la producción de H_2O_2 y O_2^- en raíces tratadas con Cd mostraba resultados similares, localizándose principalmente en haces xilemáticos, lo que indica que ambos (H_2O_2 y O_2^-) proceden de una misma fuente (peroxidasas y NADPH oxidasas).

4.1.3.3 Producción de Óxido Nítrico (NO)

La detección de NO se realizó mediante el uso de DAF-2DA. La especificidad del fluorocromo por el NO se había puesto de manifiesto previamente en nuestro laboratorio mediante el uso de PTIO, secuestrador específico de NO. Para determinar la fuente del NO las raíces se incubaron con aminoguanidina 1mM (AG), inhibidor de la óxido nítrico sintetasa. Como se observa en la figura 4.14, en plantas control tenía lugar acumulación de NO especialmente en el ápice y esta acumulación disminuía considerablemente por efecto del tratamiento con cadmio. La fluorescencia del DAF-2DA se reducía considerablemente en raíces de plantas control en presencia de AG lo que sugiere que la producción de NO en raíces se debe mayoritariamente a una actividad NOS.

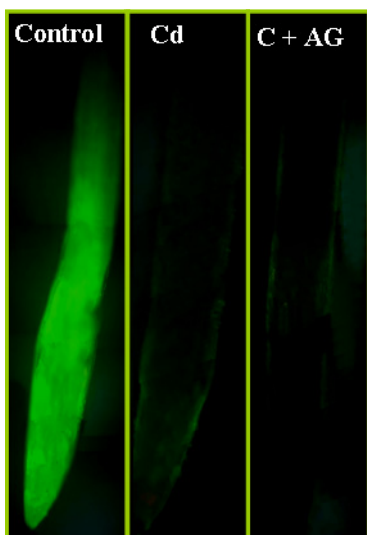


Figura 4.14: Visualización *in vivo* de la acumulación de NO en raíces secundarias de plantas de guisante control (C) y tratadas con CdCl₂ 50 μM (Cd), mediante microscopía de fluorescencia. AG, aminoguanidina 1mM.

En cortes transversales y longitudinales de raíces secundarias, analizados mediante microscopía láser confocal, se observaba que la acumulación de NO en plantas control tenía lugar preferentemente a nivel de la epidermis, y en el corteza, mientras que en plantas tratadas con Cd la fluorescencia debida al NO se reducía considerablemente quedando restringida a la epidermis y los pelos radicales (Fig. 4.15).

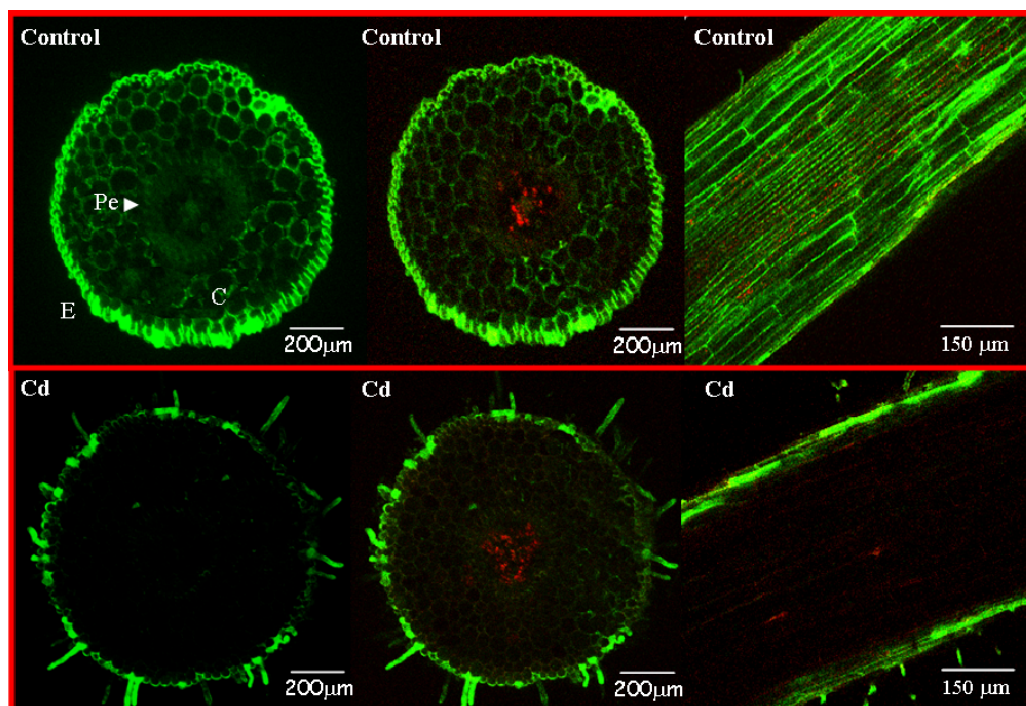


Figura 4.15: Visualización *in vivo* de la acumulación de NO en cortes transversales (imágenes izquierda y central) y longitudinales (imagen derecha) de raíces secundarias de plantas de guisante control (C) y tratadas con CdCl_2 $50\mu\text{M}$ (Cd). Las imágenes corresponden a reconstrucciones tridimensionales de imágenes obtenidas por microscopía láser confocal. Las imágenes central y derecha muestran la superposición de la fluorescencia verde del DAF-2DA y la autofluorescencia de las células de la raíz. E, epidermis; Pe, periciclo; C, corteza.

En relación a la producción de NO en raíces principales, el análisis de cortes transversales mediante microscopía láser confocal, demuestra que el principal acúmulo del NO en plantas control tiene lugar en el xilema, la corteza y la epidermis (Fig. 4.16), y el tratamiento con Cd reducía este acúmulo, detectándose tan solo una débil fluorescencia en xilema y floema (Fig. 4.16). La reducción de la acumulación de NO, dependiente del Cd, era revertida por la adición de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 10 mM a la solución nutritiva, recuperándose la fluorescencia detectada en plantas control. Además de la producción de NO, el suministro de calcio restablecía prácticamente el patrón de distribución de haces vasculares observado en plantas control (Fig. 4.16). Resultados similares se obtuvieron cuando las plantas se cultivaron en presencia de una fuente exógena de NO, SNP $10\ \mu\text{M}$ (Fig. 4.16). Estos resultados sugieren que los cambios morfológicos observados en el cilindro vascular, como consecuencia del tratamiento

con Cd, eran debidos a una reducción de la producción de NO y una posible deficiencia de Ca^{+2} inducida por el metal.

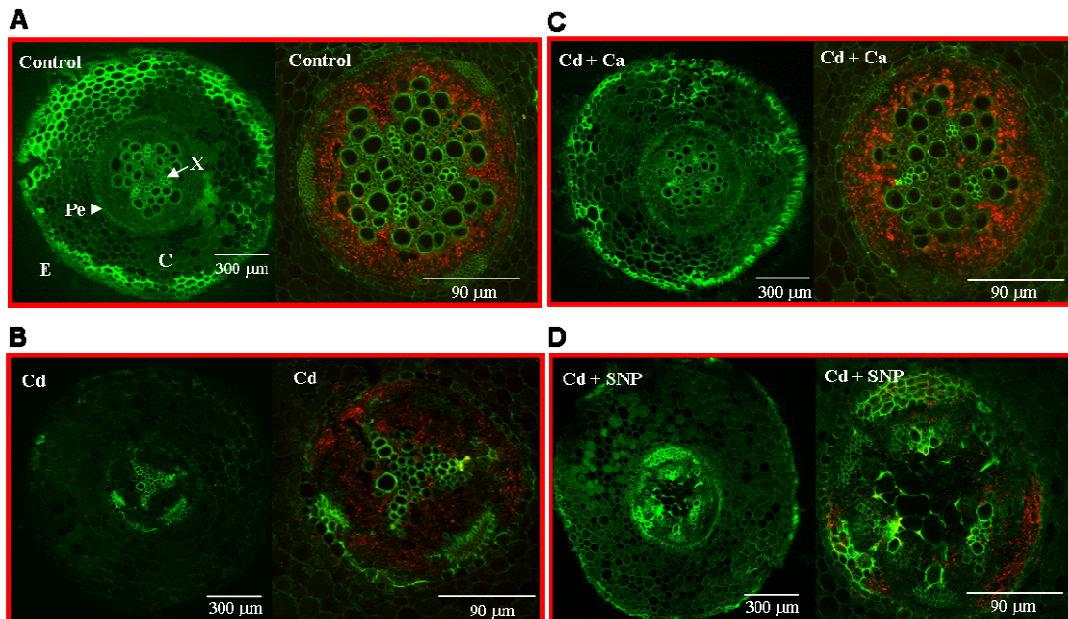


Figura 4.16: Visualización *in vivo* de la acumulación de NO en cortes transversales de raíces principales de plantas control (C) y tratadas con $CdCl_2$ 50 μM (Cd). Para determinar el efecto del Ca^{+2} (Ca, $Ca(NO_3)_2$ 10 mM) y del SNP (10 μM) sobre la producción de NO, las plantas se cultivaron en presencia de estos elementos según se ha descrito en el apartado de Material y Métodos. La fluorescencia verde corresponde al DAF-2DA y la roja a la autofluorescencia. Las imágenes de la derecha en ambos paneles, corresponden a imágenes obtenidas a mayor magnificación para mostrar el cilindro vascular y muestran además el solapamiento de ambas fluorescencias. Las imágenes corresponden a reconstrucciones tridimensionales de imágenes obtenidas por microscopía láser confocal. E, epidermis; Pe, periciclo, C, corteza; X, xilema.

4.1.4 Detección de Muerte Celular en Raíces Tratadas con Cadmio

Como marcador de muerte celular en raíces se utilizó un colorante impermeable, el “Evan’s Blue”, que sólo penetra en aquellas células que presentan daños en la membrana. Para ello, las raíces secundarias se incubaron en el colorante y tras sucesivos lavados, se observaron en una lupa estereoscópica. Como se observa en la figura 4.17, el Cd inducía una fuerte absorción del colorante por encima del ápice, lo cual es indicativo de daños celulares y posiblemente muerte celular, en esta zona de la raíz.



Figura 4.17: Detección de muerte celular en raíces secundarias de plantas control (C) y tratadas con CdCl_2 50 μM (Cd), mediante tinción con Evan's Blue.

4.1.5 Niveles de Etileno (ET), Ácido Salicílico (SA) y Ácido Jasmónico (JA)

El ET, el SA y el JA son componentes importantes en la transducción de señales en situaciones de estrés biótico y abiótico (Ecker, 1995; Devoto y Turner, 2003; Álvarez, 2000). Con objeto de profundizar en los mecanismos implicados en la respuesta celular frente al Cd se analizaron los niveles de estos compuestos mediante cromatografía de gases, en el caso del ET y cromatografía gases-masas en el caso del SA y el JA.

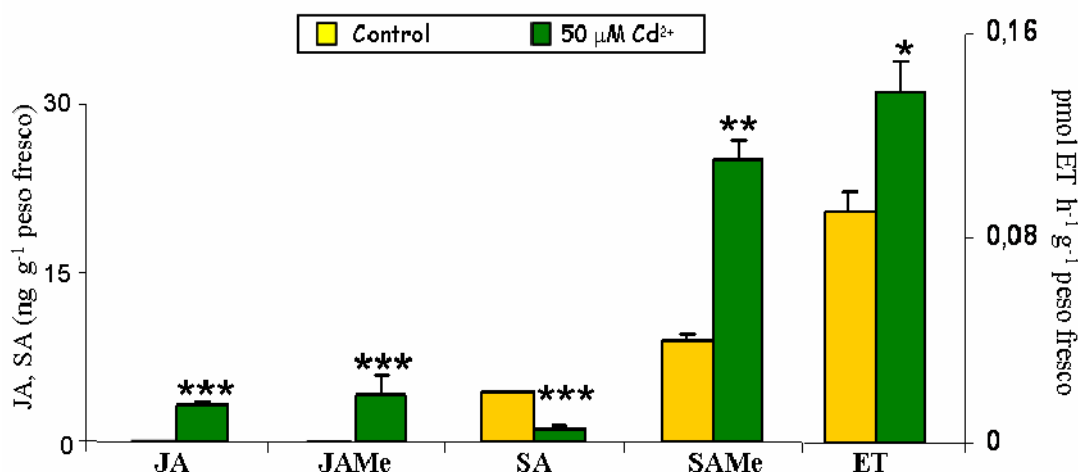


Figura 4.18: Efecto del cadmio sobre el contenido de ácido salicílico, jasmónico y etileno en raíces de plantas de guisante. JA, ácido jasmónico; JAMe, jasmónico metilado; SA, ácido salicílico; SAMe, salicílico metilado; ET, etileno. Cada valor representa la media \pm EEM de al menos diez réplicas. Las diferencias eran significativas para $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) y $P < 0.001$ (***), según el test de Duncan.

En condiciones de estrés por Cd tenía lugar un incremento de 2 veces en la emisión de etileno y en el contenido de JA, tanto libre (JA), como metilado (JAMe) (Fig. 4.18). El salicílico también se incrementaba por efecto del Cd, si bien este incremento se debía a la forma metilada (SAME) que era la más abundante en raíces de guisante (Fig. 4.18).

4.2 EFECTO DEL CADMIO SOBRE HOJAS DE GUISANTE

4.2.1 Efecto del Cadmio sobre Sistemas Antioxidantes

El análisis de la actividad de antioxidantes enzimáticos de hojas se llevó a cabo en extractos crudos de plantas de guisante control y tratadas con cadmio. Las hojas de plantas tratadas con cadmio mostraron una reducción significativa de la actividad CAT de un 50%, así como de todas las isoformas de SOD presentes en el tejido, siendo la CuZn-SOD la más afectada con una reducción del 90% (Fig. 4.19-A).

El análisis de la expresión de estas proteínas se determinó mediante RT-PCR semicuantitativa, utilizando la expresión de la ACT-II como control constitutivo. Como se observa en la figura 4.19-B, el Cd inducía un aumento del 90% en el nivel de transcritos de la CAT y en menor medida (20%) de la Fe-SOD. Por el contrario, la expresión de la CuZn-SOD disminuía en un 50% y el nivel de transcritos correspondiente a la Mn-SOD, se reducía en un 40%. Estos datos contrastan con los resultados obtenidos de actividad, lo que sugiere que el Cd, además de regular estas enzimas a nivel transcripcional, también induce modificaciones postraduccionales que afectan la actividad de las mismas.

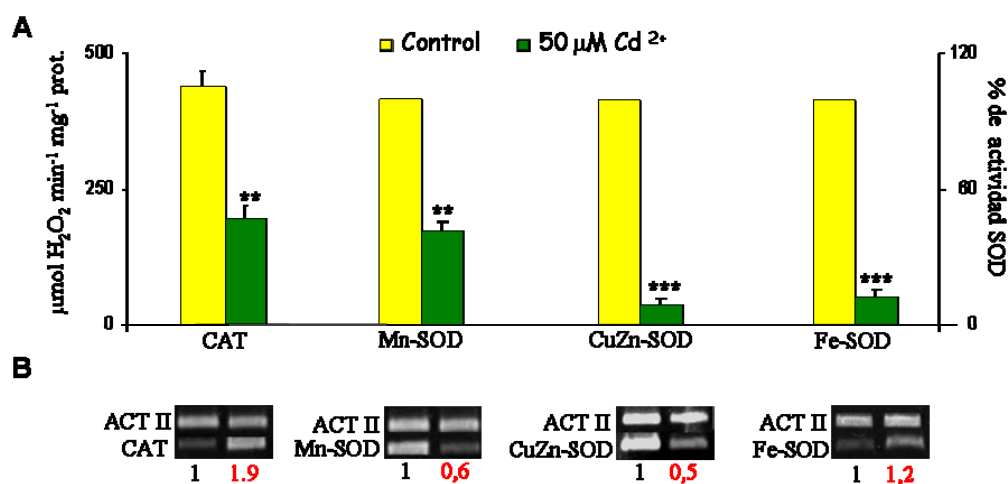


Figura 4.19: Efecto del cadmio sobre enzimas antioxidantes de hojas de guisante. A; Efecto del Cd sobre enzimas antioxidantes. Las determinaciones se llevaron a cabo en extractos crudos de hojas. Cada valor representa la media \pm EEM de al menos cuatro réplicas. La actividad catalasa (CAT) se determinó en solución y se expresa en $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$. Las SODs se separaron mediante electroforesis nativa y la actividad de cada una se determinó mediante la medida del área de la banda y se expresó como el porcentaje del área respecto al control. Las diferencias fueron significativas para $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***). B; Efecto del Cd sobre la expresión del mRNA de enzimas antioxidantes. El análisis se realizó mediante RT-PCR semicuantitativa. Los productos de amplificación fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio. La intensidad de las bandas se midió mediante unidades de absorbancia y los resultados se expresan como la razón entre el cDNA y la ACT II utilizada como control interno, después de su normalización y expresa el número de veces, respecto al control, al que se asigna el valor 1.

4.2.2 Efecto del Cadmio sobre la Producción de ROS y NO

El estudio de la producción de ROS y NO dependiente del Cd en hojas, se realizó mediante la visualización *in vivo* de la fluorescencia dependiente de estas especies reactivas usando fluorocromos específicos y microscopía láser confocal. Las hojas de plantas control y tratadas con Cd se incubaron con los distintos fluorocromos, anteriormente mencionados, se cortaron en vibratomo y se observaron en un microscopio láser confocal, según se describe en el apartado 3.19 de Material y Métodos.

4.2.2.1 Producción de O₂⁻

La visualización de la producción de O₂⁻ dependiente del Cd, se llevó a cabo mediante el uso de DHE y observación al microscopio láser confocal. Para comprobar la

especificidad del fluorocromo por los aniones O_2^- se incubaron las hojas con TMP 1 mM, secuestrador de aniones superóxido.

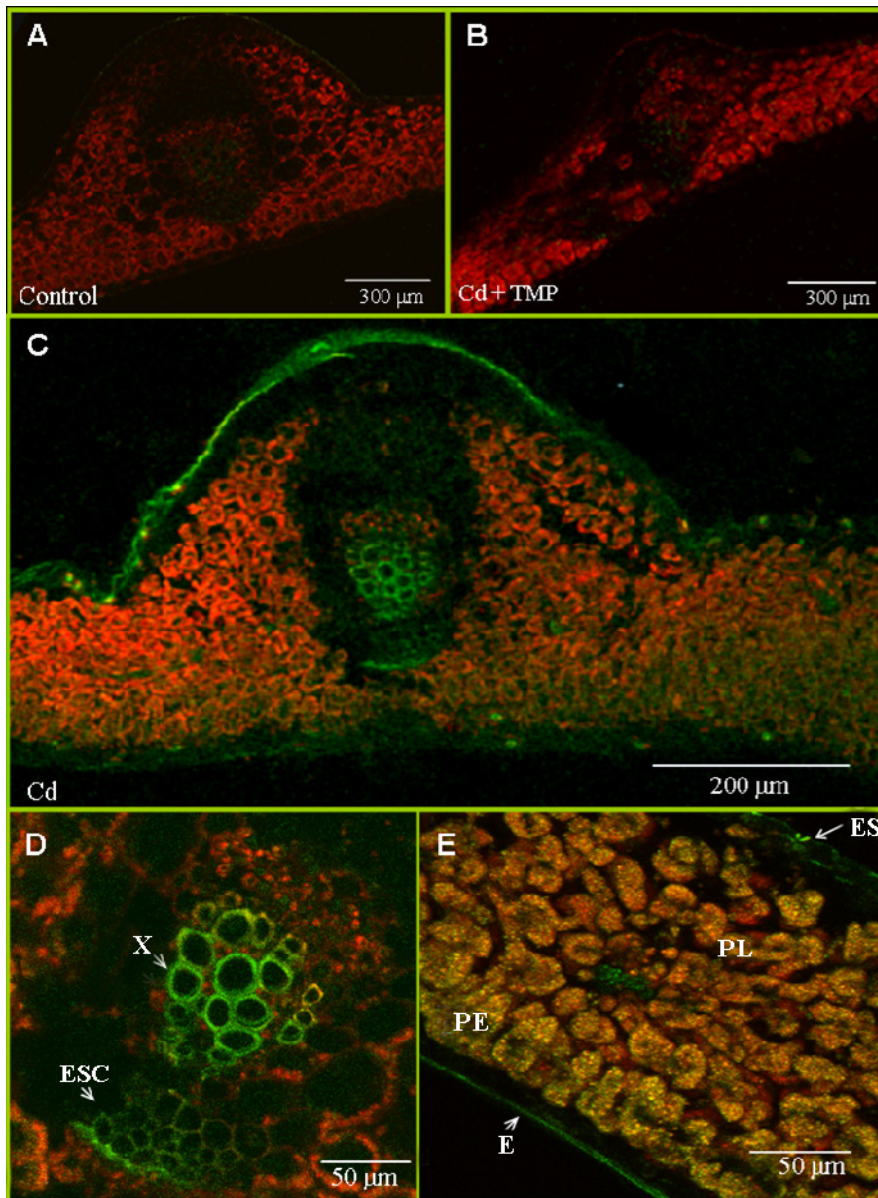


Figura 4.20: Visualización *in vivo* de la acumulación de O_2^- en cortes de hojas de guisante control (C) y tratadas con $CdCl_2$ 50 μM (Cd). A; Hojas de plantas control. B-E; hojas de plantas tratadas con Cd. Las fotografías corresponden a reconstrucciones tridimensionales de imágenes obtenidas en microscopio láser confocal y muestran la superposición de la fluorescencia verde del DHE y la autofluorescencia en rojo. TMP, tetrametilpiperidina 1 mM; E, epidermis; X, xilema; ES, estoma; PL, parénquima lagunar; PE, parénquima en empalizada; ESC, esclerénquima.

Como se puede observar en la figura 4.20, la fluorescencia dependiente de O_2^- era prácticamente inapreciable en hojas de plantas control (Fig. 4.20-A), mientras que aumentaba considerablemente en hojas de plantas tratadas con cadmio (Fig. 4.20-C), siendo especialmente visible a nivel de epidermis (Fig. 4.20-C) y haces vasculares (Fig. 4.20-C y D). Este incremento de fluorescencia, dependiente del Cd, era revertido por la incubación con TMP (Fig. 4.20-B), lo que demuestra la especificidad del DHE por el O_2^- . A mayor magnificación de la imagen del nervio central, se observa una mayor acumulación de O_2^- en la pared celular del xilema, y en el esclerénquima adaxial, asociada fundamentalmente a la pared celular y zonas de interconexión entre células (Fig. 4.20-D). Una magnificación de la zona lateral de la hoja permitía visualizar la acumulación de O_2^- en las células de la epidermis y células del estoma y un marcaje punteado en células del mesófilo. Este marcaje punteado podría corresponder a pequeños orgánulos como mitocondrias y peroxisomas (Fig. 4.20-E).

4.2.2.2 Producción de H_2O_2

El análisis de H_2O_2 , se realizó mediante citoquímica con $CeCl_3$ y mediante visualización *in vivo*, en cortes de hojas en microscopía confocal.

La producción de H_2O_2 *in vivo*, se llevó a cabo mediante el uso del fluorocromo DCF-DA. Para demostrar la especificidad del fluorocromo por el H_2O_2 , los cortes de hojas tratadas con cadmio se incubaron con una solución de ASC 1 mM, como secuestrador de peróxido de hidrógeno (Fig. 4.21-B). Como se puede observar en la figura 4.21-A, las plantas controles presentan acumulación de H_2O_2 en el xilema y en la epidermis, en menor grado se observa algo de fluorescencia en el mesófilo. En plantas tratadas con cadmio, la fluorescencia aumentaba considerablemente en xilema, epidermis y mesófilo (figura 4.21-C). A mayor magnificación del mesófilo (Fig. 4.21-E), se observa la correspondencia de la fluorescencia con los cloroplastos, pero también hay una fluorescencia puntual, que no se colocaliza con los cloroplastos, que podría corresponder a los peroxisomas y mitocondrias. En el caso de la señal a nivel de esclerénquima, es apoplástica, localizada en el espacio intercelular, y en haces vasculares se localiza en la pared celular del xilema (Fig. 4.21-D).

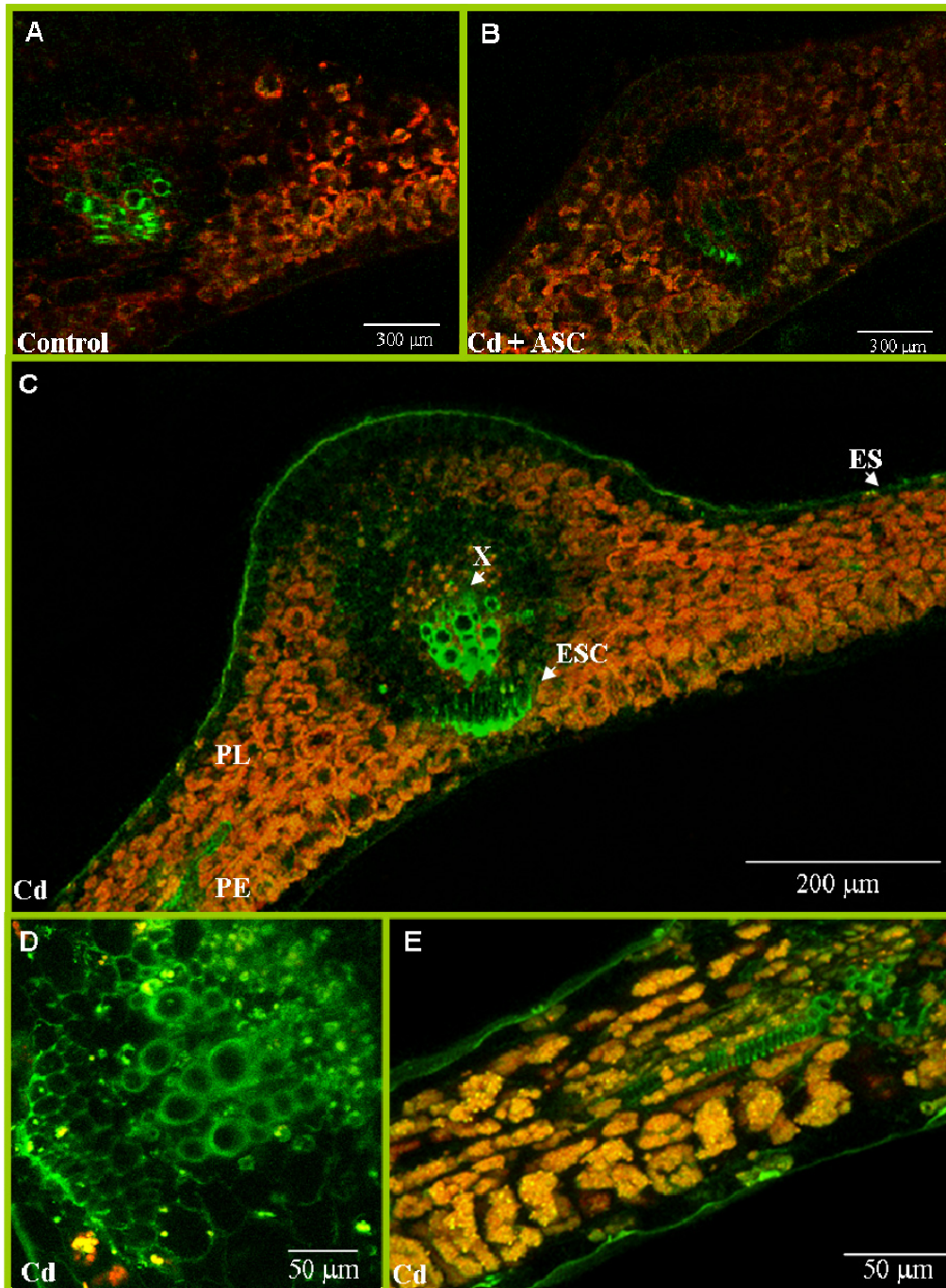


Figura 4.21: Visualización *in vivo* de la acumulación de H_2O_2 en cortes de hojas de guisante control (C) y tratadas con cadmio. A; plantas control. B-E; plantas tratadas con $CdCl_2$ 50 μM (Cd). Las fotografías corresponden a reconstrucciones tridimensionales de imágenes obtenidas en microscopio láser confocal y muestran la superposición de la fluorescencia verde del DCF-DA y la autofluorescencia en rojo. ASC, ascorbato 1 mM; X, xilema; ES, estoma; PL, parénquima lagunar; PE, parénquima en empalizada; ESC, esclerénquima.

El análisis de la producción de H_2O_2 en haces vasculares también se realizó mediante citoquímica con $CeCl_3$ y observación al microscopio electrónico. La figura 4.22 muestra la presencia de precipitados dependientes de H_2O_2 en la cara interna de la pared celular en contacto con la membrana plasmática, en elementos xilemáticos (Fig. 4.22)

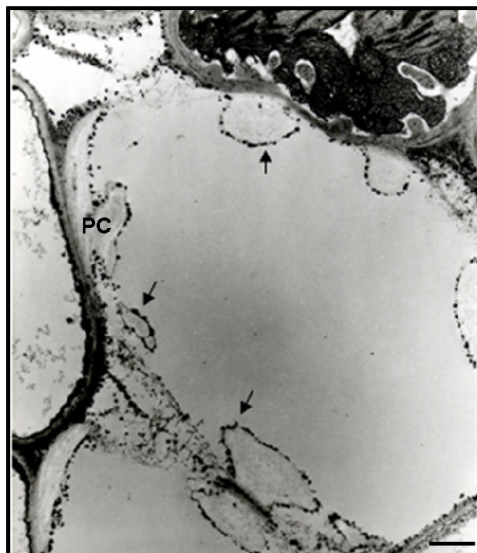


Figura 4.22: Citoquímica de H_2O_2 en haces vasculares de hojas de guisante control. El H_2O_2 se localizó mediante tinción con $CeCl_3$ y observación al microscopio electrónico. PC, pared celular. La barra indica $1 \mu m$. Las flechas indican los depósitos de $CeCl_3$.

4.2.2.3 Producción de NO

Para el estudio del efecto del Cd sobre la producción intracelular de NO se visualizó el acúmulo de NO mediante el uso del DAF-2DA. En la figura 4.23 se muestra que en condiciones fisiológicas normales, tiene lugar una producción constitutiva de NO en mesófilo, epidermis y haces vasculares (Fig. 4.23-A). Sin embargo, el tratamiento con cadmio reducía considerablemente el acúmulo de NO en hojas (Fig. 4.23-C).

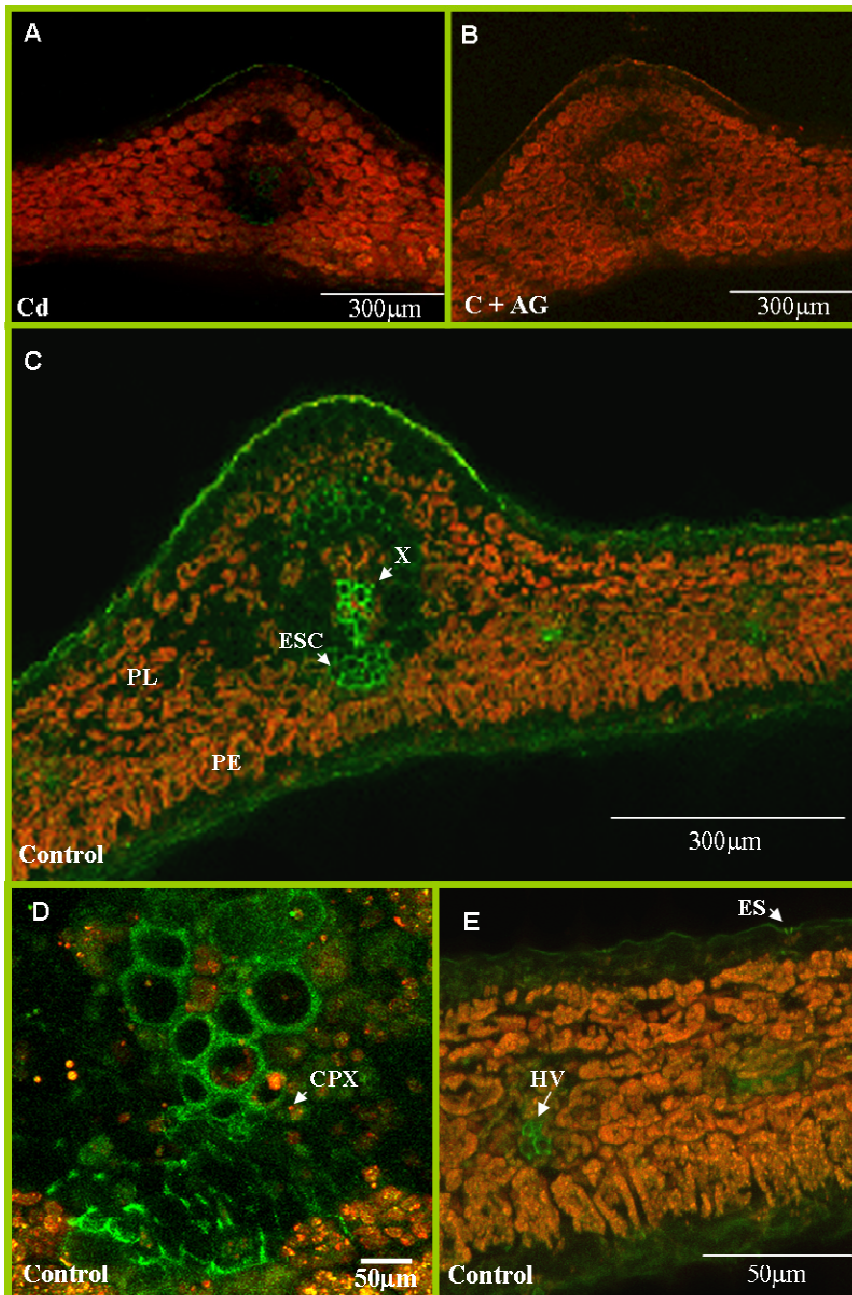


Figura 4.23: Visualización *in vivo* de la acumulación de NO en cortes de hojas de guisante control (C) y tratadas con CdCl_2 50 μM (Cd). Las fotografías corresponden a reconstrucciones tridimensionales de imágenes obtenidas en microscopio láser confocal y muestran la superposición de la fluorescencia del DAF-2DA en verde y la autofluorescencia en rojo. A; hoja de planta control. B; hoja de planta control + AG. C-E; hojas de plantas tratadas con Cd.AG, aminoguanidina 1 mM; X, xilema; ES, estoma; PL, parénquima lagunar; PE, parénquima en empalizada; ESC, esclerenquima; HV, haces vasculares; CPX, células del parénquima asociado al xilema.

La incubación de las hojas de plantas control con aminoguanidina 1 mM (AG), inhibidor de la actividad NOS, anulaba prácticamente la fluorescencia, lo que sugiere la implicación de una actividad NOS constitutiva como la fuente principal de NO (Fig. 4.23-B). Una mayor magnificación de la imagen correspondiente a las hojas control (Fig. 4.23-C y D) mostraba que la acumulación de NO tenía lugar en estomas, xilema, esclerénquima y mesófilo.

En las células del mesófilo, el acúmulo de NO seguía un patrón punteado, que podría corresponder a peroxisomas, mientras que en el xilema y el esclerenquima, la producción de NO estaba asociada al apoplasto.

4.2.3 Determinación de la Actividad S-Nitrosoglutation Reductasa

Recientemente se ha descrito en plantas de *Arabidopsis*, que la actividad formaldehído dehidrogenasa, dependiente de glutation, también tiene actividad S-nitrosoglutation reductasa (GSNOR) pudiendo utilizar como sustrato el GSNO que es reducido por el NADH a GSSG con liberación de N_3 (Sakamoto y col., 2002). El GSNO puede funcionar como reservorio de NO, por ello se ha determinado esta actividad en plantas control y tratadas con Cd. Para ello se realizaron dos aproximaciones, se analizó la actividad en extractos crudos mediante espectrofotometría y en geles de poliacrilamida.

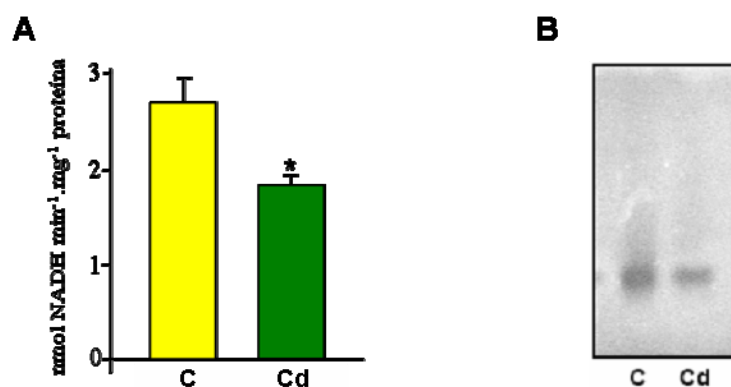


Figura 4.24: Actividad S-nitrosoglutation reductasa en hojas de plantas control (C) y tratadas con cadmio (Cd, $CdCl_2$ 50 μM). A; La actividad GSNOR se determinó mediante espectrofotometría en extractos crudos de hojas. Cada valor representa la media \pm EEM de al menos cuatro replicas. Las diferencias fueron significativas según el test de Duncan $P < 0.05$ (*). B; Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas y tinción específica de GSNOR. Las proteínas (200 μg) se separaron mediante electroforesis en geles al 6%.

Como se observa en la figura 4.24, en extractos de hojas tratadas con cadmio, tiene lugar una reducción de un 30% de la actividad (Fig. 4.24-A). El análisis de isoenzimas mediante la separación de las proteínas en geles de poliacrilamida mostraba la presencia de una única banda de actividad que también se reducía por efecto del Cd (Fig. 4.24-B).

Estos resultados concuerdan con la reducción de NO, descrita anteriormente y la reducción de GSH que se había descrito previamente en esta misma especie (Romero-Puertas y col., 2006b). La localización subcelular del GSNO y el GSH se determinó mediante inmunomicroscopía utilizando anticuerpos específicos frente a ambos compuestos.

El GSNO se localizaba en peroxisomas y cloroplastos (Fig. 4.25-C). A su vez, el GSH se localizaba en todos los compartimentos celulares, destacando su presencia en peroxisomas (Fig.4.25-A). La presencia de ambas formas derivadas del glutatión sugiere la presencia de la actividad GSNOR en estos orgánulos, donde ya se ha descrito la presencia de NOS y tiene lugar la producción de NO.

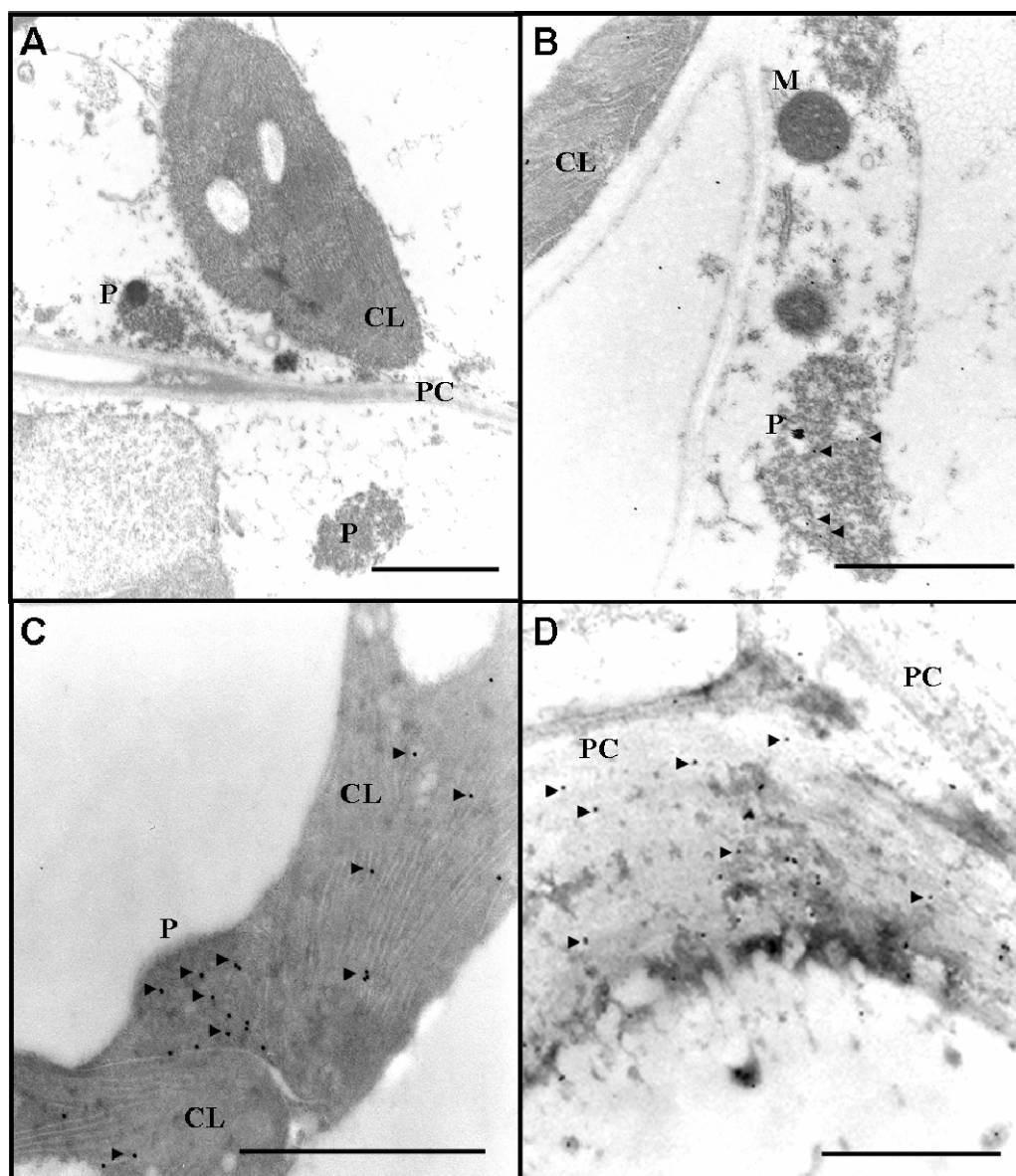


Figura 4.25: Inmunolocalización de GSNO y GSH mediante marcaje con oro coloidal en hojas de guisante. A; marcaje con el suero preinmune. B; marcaje con Anti-GSNO dilución 1:250; C y D; marcaje con Anti-GSH dilución 1:250. P, peroxisoma; PC, pared celular; CL, cloroplasto; M, mitocondria. La barra indica 1 μ m. Las flechas indican el marcaje con oro coloidal.

4.2.4 Efecto del Cadmio sobre el Patrón de Proteínas Fosforiladas

En estudios previos se observó que la producción de ROS en hojas de guisante, inducida por el Cd, era dependiente de fosfatasas, a juzgar por la inhibición ejercida por la cantaridina (Romero-Puertas y col., 2004a).

Con objeto de poder arrojar más luz sobre la regulación de la producción de ROS en respuesta al cadmio, se estudió el patrón de proteínas fosforiladas en extractos crudos de plantas de guisante control y tratadas con cadmio.

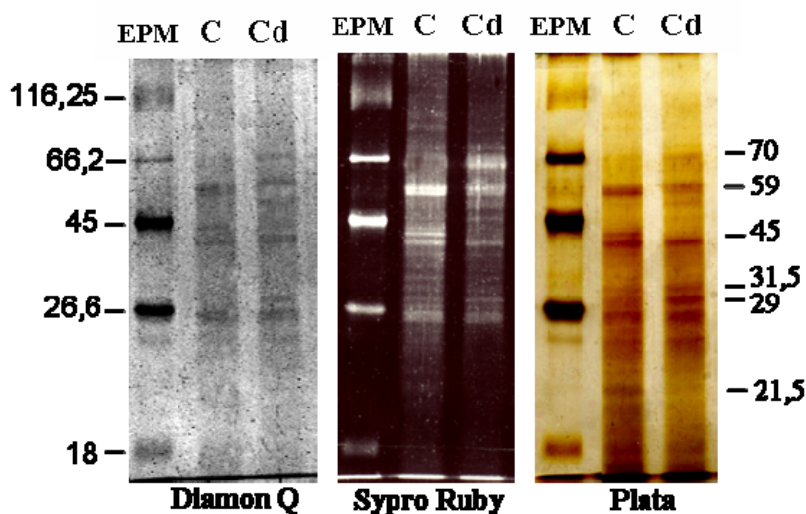


Figura 4.26: Patrón de proteínas fosforiladas en extractos crudos de plantas control (C) y tratadas con CdCl₂ 50 μM (Cd). Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad y posteriormente las proteínas (50 μg) se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes. Los geles se tiñeron para proteínas totales (Sypro Ruby y Plata) y con una tinción específica para proteínas fosforiladas (Diamon Q). EPM, estándar de peso molecular. A la derecha se indican los valores de peso molecular de los principales polipéptidos fosforilados que se modifican por el tratamiento con Cd.

Como se observa en la figura 4.26, el tratamiento con Cd producía algunos cambios en el patrón de proteínas fosforiladas con una reducción de la intensidad de las bandas correspondientes a las proteínas de 59, 45 y 21,5 kDa y, por el contrario, una intensificación de las bandas de 70, 31,5 y 29 kDa.

4.2.5 Niveles de Etileno (ET), Ácido Salicílico (SA) y Ácido Jasmónico (JA)

Para establecer los mecanismos de respuesta celular frente al Cd, se determinaron los niveles de ET, SA y JA, en hojas de plantas control y tratadas con cadmio.

Como se observa en la figura 4.27, los niveles de etileno aumentaban dos veces en hojas de plantas tratadas con cadmio, y un resultado similar se obtuvo para el JAME.

El JA libre no se detectó ni en hojas control, ni en las tratadas con cadmio, por lo que deducimos que en hojas de plantas de guisante la principal forma del jasmónico es la forma metilada. Por el contrario, el SA se encontraba fundamentalmente en su forma libre (SA), siendo la forma metilada (SAME), minoritaria. El Cd producía una ligera disminución, aunque no significativa, del SA y en mayor medida del SAME.

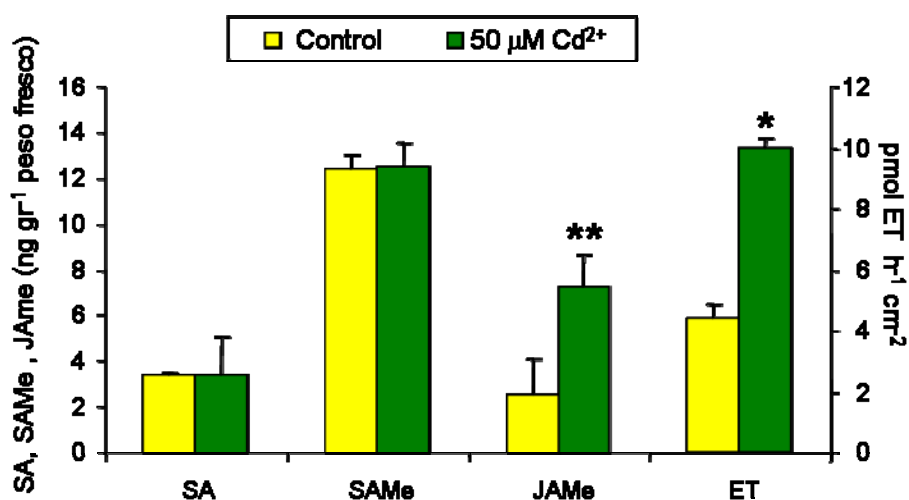


Figura 4.27: Efecto del Cd sobre el contenido de salicílico, jasmónico y la emisión de etileno en hojas de guisante. Cada valor representa la media \pm EEM de al menos 10 réplicas. Las diferencias fueron significativas a $P < 0.05$ (*) y $P < 0.01$ (**) según el test de Duncan. JAMe, jasmónico metilado; SA, ácido salicílico; SAMe, salicílico metilado y ET, etileno.

4.2.6 Expresión de Proteínas de Defensa

La identificación de genes regulados diferencialmente frente a distintos factores de estrés es importante en el estudio de la regulación de los mecanismos de defensa en cada circunstancia. Es por ello, que se ha estudiado la expresión de algunos genes que codifican para proteínas relacionadas con la patogénesis (PRPs), mediante RT-PCR semicuantitativa, en hojas de plantas control y tratadas con Cd. Como se observa en la figura 4.28, el cadmio inducía un aumento de un 80% en la expresión de la quitinasa, respecto a las plantas control. En el caso de la HSP 71.2 y la PrP-4a, el aumento era superior al 100%, ya que son genes inducibles cuya expresión en condiciones

fisiológicas, es muy baja o nula. En cuanto a la PAL, no se observaron variaciones en la expresión en plantas tratadas con cadmio.

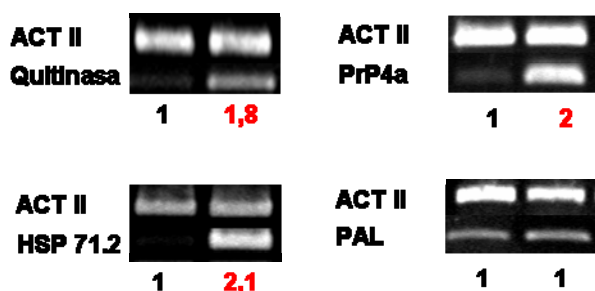


Figura 4.28: Efecto del Cd sobre la expresión de PRPs en hojas de guisante. El análisis se realizó mediante RT-PCR semicuantitativa. Los productos de amplificación fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio. La intensidad de las bandas se midió mediante unidades de absorbancia y los resultados se expresan como la razón entre el cDNA y la ACT II, utilizada como control interno después de su normalización y expresa el número de veces respecto al control, al que se asigna el valor 1. PrP4a, patogénesis related protein; HSP, heat shock protein; PAL, fenilalanina amonio liasa; ACT-II, actina II. C, control; Cd, CdCl₂ 50 μM (Cd).

4.2.6.1 Expresión de PrP-4a, Mediante Hibridación *in situ*

Con objeto de determinar si existe una distribución diferencial de transcritos de las proteínas de defensa en la hoja, se seleccionó la PrP-4a como una de las que se incrementa en mayor medida en respuesta al metal. Para ello, se visualizó el acúmulo de transcritos de la PrP-4a mediante hibridación *in situ* en secciones de hojas de guisante control y tratadas con cadmio y observación al microscopio láser confocal.

Como control negativo de la técnica, se hibridó la muestra con la sonda sentido y como se observa en la figura 4.29-A, no hay ningún tipo de señal dependiente de digoxigenina (marcador de la hibridación) y tan solo se observaba la fluorescencia azul del DAPI, utilizado como marcador de los núcleos. La hibridación con la sonda antisentido, sin embargo, producía una fluorescencia verde tanto en hojas de plantas control, como en plantas tratadas con Cd, siendo la intensidad de la fluorescencia muy superior en las plantas tratadas con el metal. (Fig. 4.29-B y C).

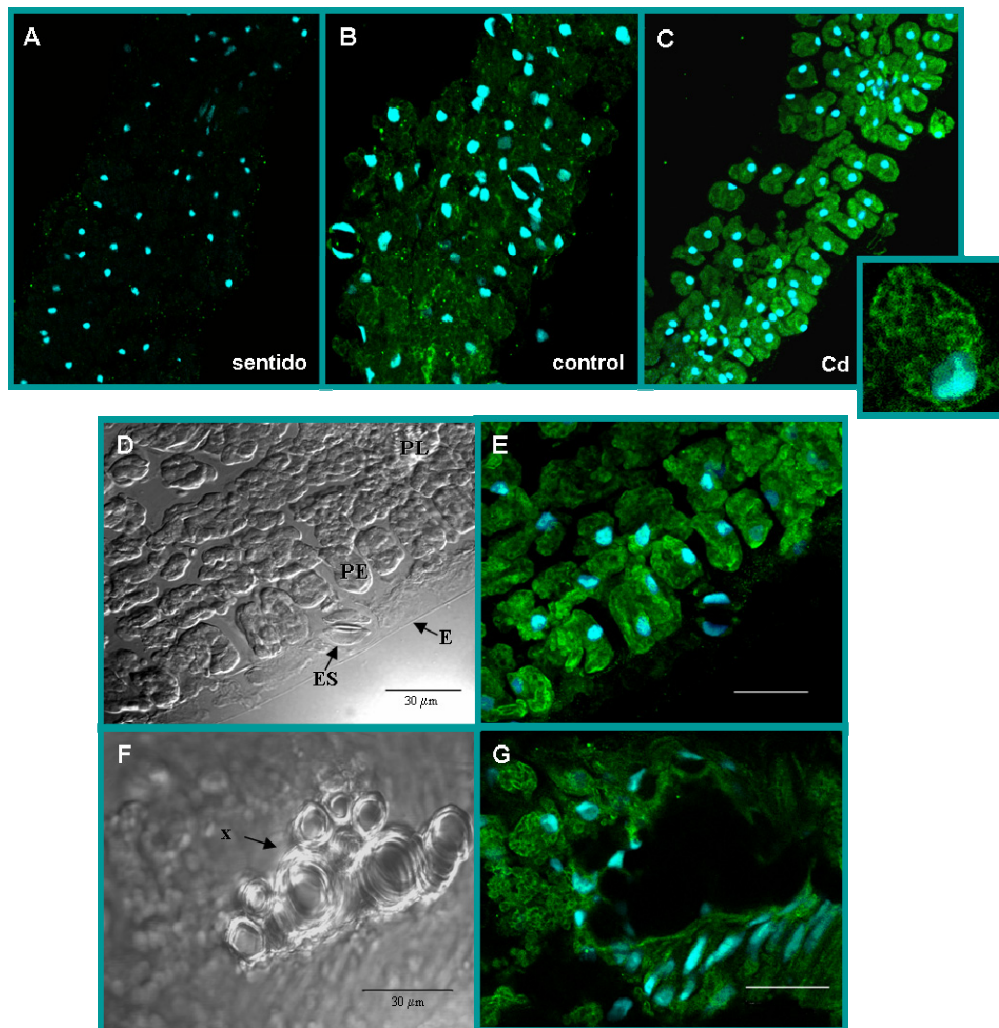


Figura 4.29: Hibridación *in situ* de la PrP-4a en hojas de plantas de guisante. La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la digoxigenina marcada con Alexa fluor 488, utilizada como marcador de la hibridación. A; control negativo, hibridación con la sonda sentido. B; hibridación con sonda antisentido en hoja control. C; hibridación con sonda antisentido en hoja de planta tratada con CdCl₂ 50 μM (Cd). El recuadro muestra una mayor magnificación de una célula del mesófilo mostrando la expresión distribuida por el citosol. D y F: imagen del corte obtenido con luz transmitida. E; detalle del mesófilo de hoja tratada con cadmio. G; detalle del xilema de hoja tratada con cadmio. E, epidermis; X, xilema; ES, estoma; PL, parénquima lagunar; PE, parénquima en empalizada.

Mediante una magnificación de la imagen (Fig. 4.29-C), se aprecia que la expresión es citosólica, y está ausente en el núcleo, lo que demuestra que la hibridación de la sonda no es inespecífica con ácidos nucleicos del núcleo. A nivel de mesófilo, la

señal era más intensa en el parénquima en empalizada que en el lagunar (Fig. 4.29-E). También se observa señal en las células acompañantes del estoma, pero no en la epidermis (Fig. 4.29-E). En cuanto a los haces vasculares, la señal solo aparecía en células del parénquima asociado al xilema, pero no se observaba ninguna señal en las células xilemáticas (Fig. 4.29-G) y tampoco se observó en esclerénquima.

4.2.7 Efecto del Calcio sobre la Respuesta de la Hoja al Estrés por Cadmio

En trabajos previos, se había observado que el tratamiento con cadmio producía una reducción del 40% del contenido de calcio (Sandalo y col., 2001). Dado que hay un gran número de proteínas dependientes de Ca^{2+} , entre ellas la NOS, hemos abordado el estudio del papel de este elemento en la respuesta de la planta frente al tratamiento con cadmio. Para ello se han suplementado las plantas con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 10 mM, un día antes de añadir el cadmio a la solución nutritiva y se mantuvo hasta el final del tratamiento.

4.2.7.1 Efecto del Calcio sobre la Producción de O_2^- y NO

Se ha estudiado el efecto del calcio sobre la acumulación *in vivo* de NO y O_2^- , mediante microscopía láser confocal, utilizando para ello los fluorocromos DAF-2DA y DHE, respectivamente. Como se puede observar en la figura 4.30, la reducción de la producción de NO causada por el cadmio era revertida por efecto del Ca^{2+} , obteniéndose los mismos niveles de NO que en plantas control, de igual forma que se había observado en raíces.

A mayor magnificación de la imagen del corte de hoja tratada con Cd y con Ca^{2+} , se observan unos orgánulos esféricos en el parénquima en empalizada, fuertemente marcados con el fluorocromo DAF-2DA. En función del número y tamaño de estos orgánulos podría tratarse de peroxisomas (Fig. 4.30-F). Estos resultados demuestran que la reducción de la producción de NO dependiente del Cd podría deberse a una deficiencia de Ca^{2+} inducida por el metal, que afectaría a la actividad NOS ya que esta proteína necesita este elemento y la calmodulina para su actividad (Corpas y col., 2004).

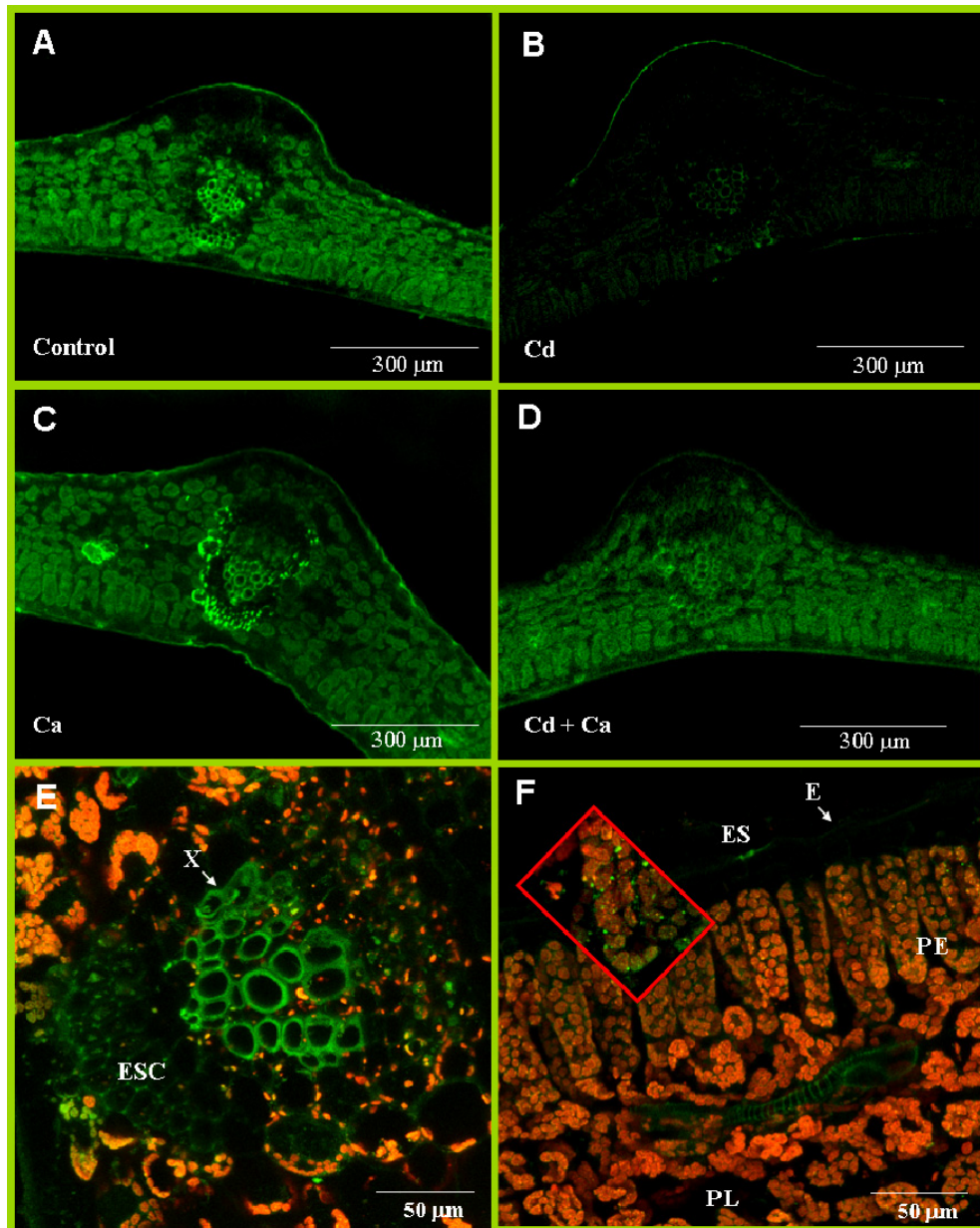


Figura 4.30: Visualización *in vivo* de la acumulación de NO en hojas de plantas de guisante tratadas con cadmio (Cd, CdCl₂ 50 μM) y calcio (Ca²⁺, Ca(NO₃)₂ 10 mM). A; hoja control. B; hoja tratada con Cd. C; hoja tratada con Ca²⁺. D; hoja tratada con Cd y Ca²⁺. E y F; Magnificación de haces vasculares y mesófilo, respectivamente, de hojas tratadas con Cd y Ca²⁺. Dentro del cuadro rojo se muestra una magnificación de una célula del parénquima en empalizada. En verde se muestra la fluorescencia del DAF-2DA y en rojo la autofluorescencia. Los paneles E y F muestran la superposición de ambas fluorescencias. Las fotografías corresponden a reconstrucciones tridimensionales de imágenes obtenidas en microscopio láser confocal. E, epidermis; X, xilema; ES, estoma; PL, parénquima lagunar; PE, parénquima en empalizada; ESC, esclerénquima.

La producción de O_2^- inducida por el tratamiento con cadmio, se reducía en el mesófilo de hojas tratadas con calcio (Fig. 4.31-D). Sin embargo, la acumulación de O_2^- se mantenía en la epidermis, esclerénquima y haces vasculares (Fig. 4.31-D).

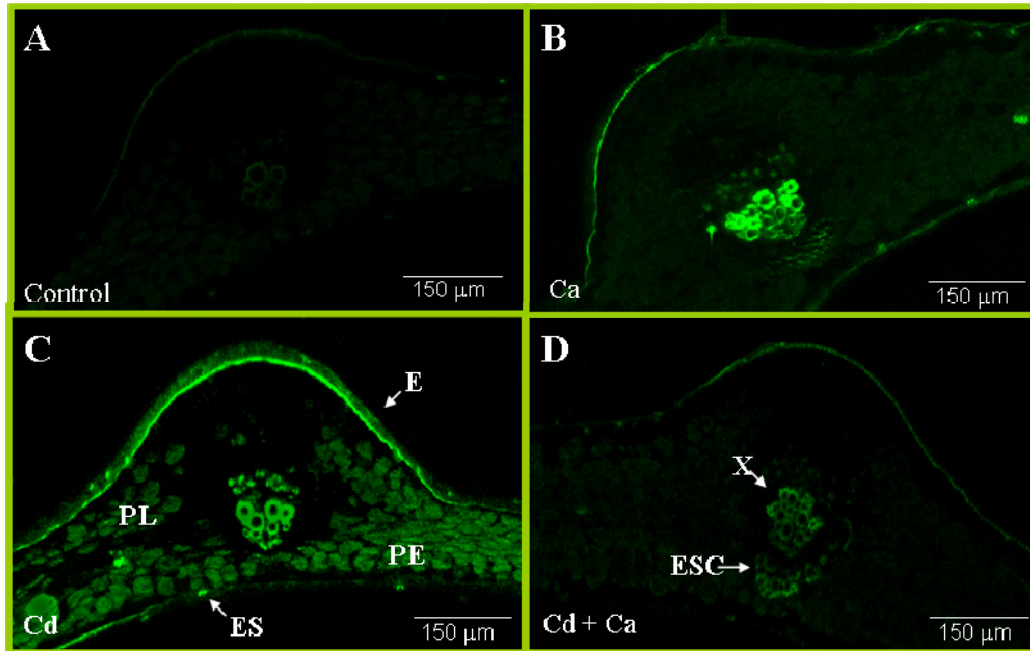


Figura 4.31: Efecto del Ca^{2+} sobre la producción de O_2^- dependiente de cadmio en hojas de plantas de guisante. A; hoja control. B; hoja tratada con $Ca(NO_3)_2$ 10 mM (Ca). C; hoja tratada con $CdCl_2$ 50 μ M (Cd). D; hoja tratada con Cd y Ca. En verde se muestra la fluorescencia del DHE. Las fotografías corresponden a reconstrucciones tridimensionales de imágenes obtenidas en microscopio láser confocal. E, epidermis; X, xilema; ES, estoma; PL, parénquima lagunar; PE, parénquima en empalizada; ESC, esclerénquima.

En plantas control tratadas con Ca^{2+} , y en ausencia de Cd, tenía lugar una intensificación de la fluorescencia del DHE en haces vasculares y epidermis (Fig. 4.31-B). Estos resultados sugieren que el Ca^{2+} es imprescindible tanto en la producción de NO como de superóxido dependiente del Cd, especialmente en el mesófilo. Si bien, un exceso de Ca^{2+} promueve la producción de O_2^- y NO en epidermis y xilema, en ausencia del metal.

4.2.7.2 Efecto del Calcio sobre la Expresión de CuZn-SOD

La reducción de la expresión de la CuZn-SOD, inducida por el cadmio, era revertida por el suministro de calcio exógeno (Fig. 4.32). Estos resultados sugieren que en parte, la toxicidad del Cd podría deberse a la deficiencia de Ca^{2+} inducida por el metal, que puede afectar a la expresión y a la actividad de determinadas proteínas, como la CuZn-SOD.

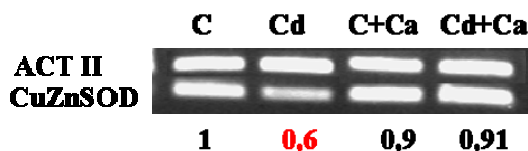


Figura 4.32: Efecto del Ca^{2+} sobre la expresión de CuZn-SOD, en plantas tratadas con Cd. El análisis se realizó mediante RT-PCR semicuantitativa. Los productos de amplificación fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio. La intensidad de las bandas se midió mediante unidades de absorbancia y los resultados se expresan como la razón entre el cDNA y la ACTII, utilizada como control interno después de su normalización y expresa el número de veces respecto al control, al que se asigna el valor 1. C, control; Cd, CdCl_2 50 μM ; Ca, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 10 mM; ACT-II, actina II.

4.2.7.3. Efecto del Cadmio y del Calcio sobre Mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes en NADPH Oxidasa

La NADPH oxidasa asociada a membranas es una de las principales fuentes de producción de ROS en la célula, es por ello, que se ha abordado el estudio de la respuesta de la planta frente al estrés por Cd en mutantes deficientes en esta actividad (Atrboh-DF). Las plantas de *Arabidopsis* cultivadas en presencia de Cd reducían su crecimiento considerablemente, respecto a las plantas control (Fig. 4.33). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las silvestres y las mutantes DF (Fig. 4.33), si bien, la nerviación central de las plantas silvestres se oscurecía en presencia de Cd, posiblemente como consecuencia de la acumulación de ROS.

La adición de Ca^{2+} a la solución nutritiva llevaba consigo un incremento del crecimiento de las plantas en ausencia del Cd, siendo este más acusado en las plantas DF, y por otro lado, protegía parcialmente a la planta frente a los efectos nocivos del Cd (Fig. 4.33), no observándose diferencias importantes entre las plantas silvestres y las DF.

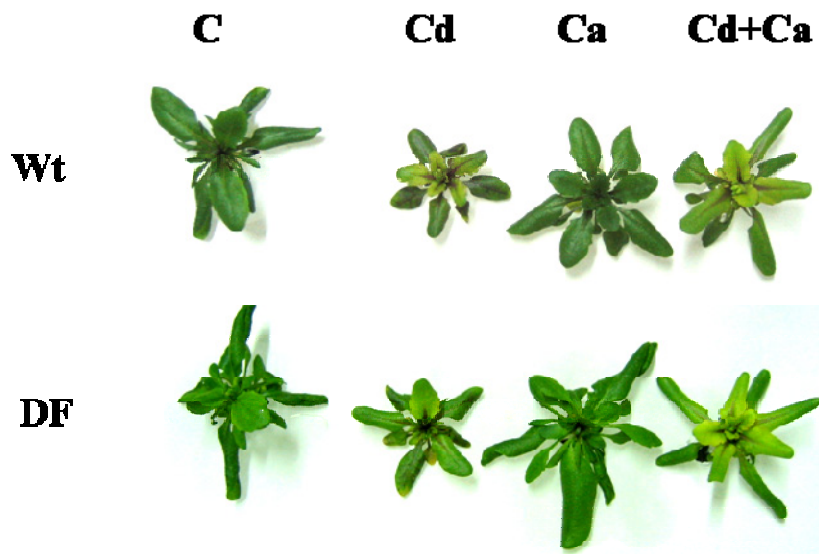


Figura 4.33: Efecto del cadmio y el calcio sobre el crecimiento de plantas de *Arabidopsis* silvestres (Wt) y mutantes deficientes en NADPH oxidasa (DF). C, control; Cd, CdCl₂ 50 μM; Ca, Ca(NO₃)₂ 10 mM.

4.2.7.3.1 Producción de O₂⁻

Con objeto de establecer la contribución de la NADPH oxidasa a la producción de ROS dependiente del Cd, se analizó la acumulación de O₂⁻ en mutantes DF y en plantas silvestres mediante microscopía láser confocal. En plantas control, tanto silvestres como DF, no se observan diferencias en cuanto a la producción de superóxido (Fig.4.34). El tratamiento con Cd producía un fuerte incremento de la fluorescencia dependiente de O₂⁻ en las plantas silvestres (Fig. 4.34), similar a la observada en hojas de plantas de guisante, mientras que en las plantas DF se observaba una reducción considerable de la producción de O₂⁻ en las células del mesófilo y epidermis, hasta niveles similares a los observados en las plantas control. Estos resultados sugieren que la principal fuente de O₂⁻, inducida por el metal en estos tejidos, es la NADPH oxidasa asociada a la membrana plasmática.

La adición de Ca²⁺ exógeno a plantas tratadas con Cd revertía la producción de O₂⁻ dependiente del metal (Fig. 4.34), de forma similar a lo descrito anteriormente en hojas de guisante, lo que demuestra que el Ca²⁺ es necesario para la producción de O₂⁻.

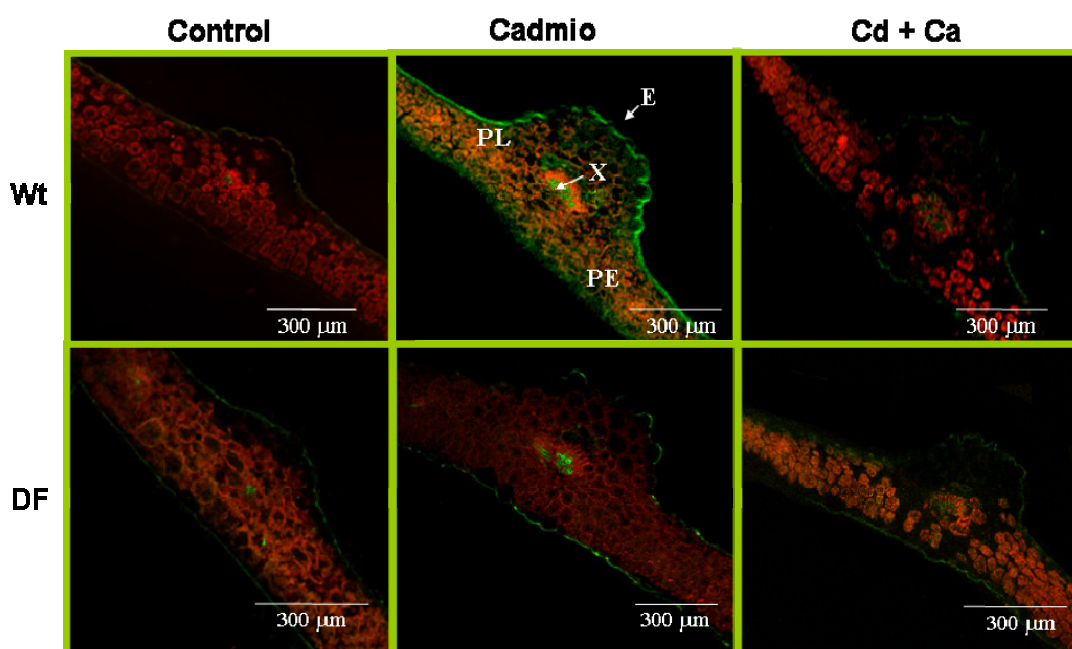


Figura 4.34: Visualización *in vivo* de la acumulación de O_2^- en cortes de hojas de *Arabidopsis* silvestres (Wt) y mutantes DF. Las imágenes corresponden a la superposición de la fluorescencia verde del DHE y la roja de la autofluorescencia. Las fotografías corresponden a reconstrucciones tridimensionales de imágenes obtenidas en microscopio láser confocal. C, control; Cd, $CdCl_2$ 50 μM , Ca, $Ca(NO_3)_2$ 10 mM; E, epidermis; X, xilema; PL, parénquima lagunar; PE, parénquima en empalizada.

4.2.7.3.2 Expresión de Proteínas de Defensa y Antioxidantes

Para determinar el papel de las ROS y del Ca^{2+} en la regulación de la respuesta celular frente al Cd, se analizó la expresión de la CuZn-SOD y las siguientes proteínas de defensa: HSP 15.7 y PR-1, en plantas silvestres y mutantes DF, en presencia y en ausencia de Cd y Ca^{2+} . Tanto en plantas silvestres, como en las mutantes DF, la expresión de la CuZn-SOD estaba reducida por efecto del tratamiento con Cd y esta reducción era revertida por la adición de Ca^{2+} en plantas silvestres (Fig. 4.34). Sin embargo, en las plantas DF la adición de Ca^{2+} no revertía la represión de la CuZn-SOD (Fig. 4.34), lo que sugiere que además de Ca^{2+} , la intervención directa o indirecta de ROS es necesaria en la regulación de la expresión de este antioxidante. La HSP 15.7 se incrementaba en las plantas silvestres en presencia de Cd y esta inducción no se veía

afectada tras el tratamiento con Ca^{2+} exógeno. En las mutantes DF, la expresión de HSP 15.7, no se modificaba tras el tratamiento con Cd, lo que sugiere que las ROS son necesarias para la inducción de la HSP. En cuanto a la PR-1, el Cd no afectaba su expresión, aunque niveles altos de Ca^{2+} parecen regular negativamente la expresión de este gen, tanto en los mutantes como en los silvestres (Fig. 4.35).

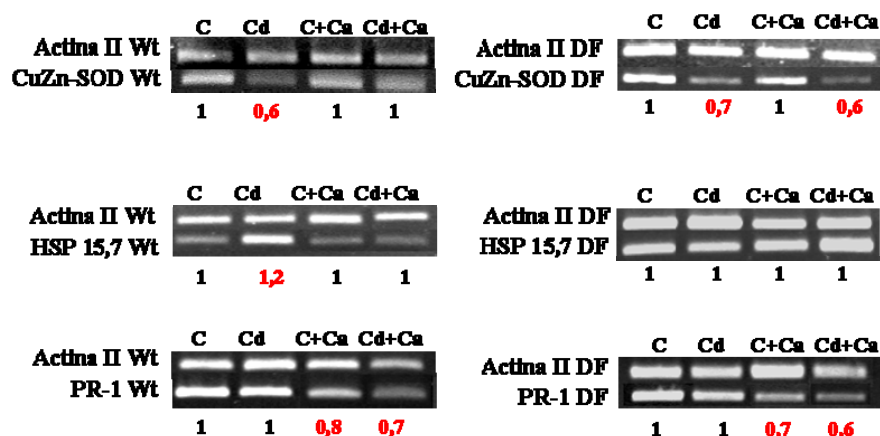


Figura 4.35: Efecto del Cd y el Ca^{2+} sobre la expresión de PRPs y CuZn-SOD en hojas de *Arabidopsis* silvestres (Wt) y deficientes en NADPH oxidasa (DF). El análisis se realizó mediante RT-PCR semicuantitativa. Los productos de amplificación fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio. La intensidad de las bandas se midió mediante unidades de absorbancia y los resultados se expresan como la razón entre el cDNA y la Actina II, utilizada como control interno después de su normalización y expresa el número de veces respecto al control, al que se asigna el valor 1. PR-1 patogenesis related protein; HSP 15,7, heat shock protein. C, control; Cd, CdCl₂ 50 μM, Ca, Ca(NO₃)₂ 10 mM.

4.3 ESTUDIOS EN PEROXISOMAS

4.3.1 Efecto del Cadmio sobre la S-Nitrosilación de Proteínas en Peroxisomas de Hojas de Guisante

Los peroxisomas son una fuente constitutiva de NO (Corpas y col., 2004). Dado que el Cd induce una reducción considerable de la producción de NO, se investigó el efecto del metal sobre el patrón de proteínas S-nitrosiladas en estos orgánulos. Para la purificación de los orgánulos se ensayaron distintos métodos, utilizando gradientes de densidad de Percoll y gradientes de densidad de sacarosa. A diferencia del Percoll, la sacarosa producía interferencias en el método de análisis de S-nitrosilación, por lo que

finalmente se procedió al uso de gradientes de Percoll. En los orgánulos purificados por este método, se analizaron las proteínas *S*-nitrosiladas mediante EGPA-SDS (Fig. 4.36). Como control de carga, las proteínas se tiñeron con azul Coomassie (Fig. 4.36-A). En peroxisomas se observaron al menos 5 proteínas *S*-nitrosiladas con pesos moleculares de aproximadamente 55, 41,2, 34, 31,1 y 19 kDa, siendo la de 55 kDa la mayoritaria (Fig. 4.36-B). El Cd producía una reducción de la intensidad de las bandas de proteínas *S*-nitrosiladas que afectaba principalmente a las proteínas de 19, 34 y 31,1 kDa. (Fig. 4.36-B). Estos resultados concuerdan con la reducción de la producción de NO previamente observada.

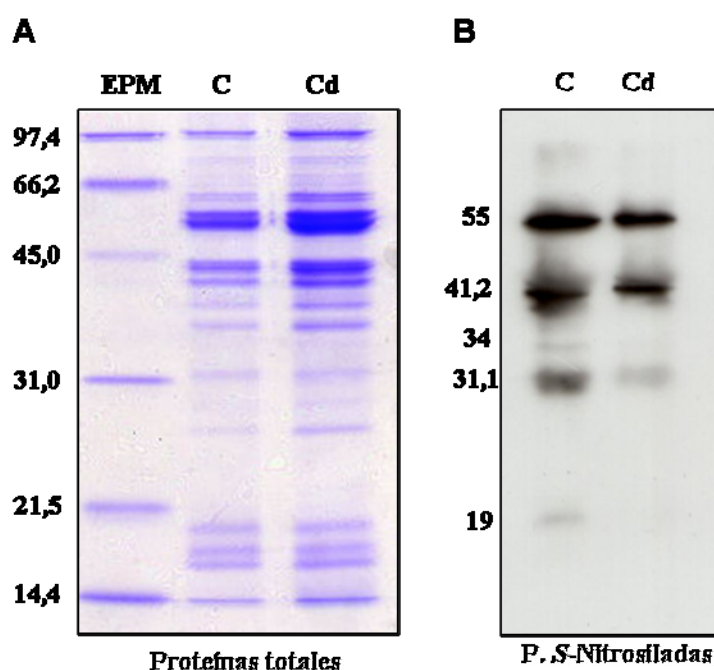


Figura 4.36: Patrón de proteínas *S*-nitrosiladas en peroxisomas de hojas de plantas de guisante control y tratadas con Cd. A; EGPA-SDS de proteínas totales (50 µg) teñidas con azul Coomassie. B; Western-Blot de proteínas *S*-nitrosiladas. EPM, estándar de peso molecular. C, control; Cd, CdCl₂ 50 µM. A la izquierda de la figura B, se muestran los valores de peso molecular de las proteínas *S*-nitrosiladas.

Para determinar el patrón de proteínas susceptibles de *S*-nitrosilación, los peroxisomas de hojas control se incubaron con GSNO como donador de NO, tal y como se indica en el apartado 3.7 de Material y Métodos, y las proteínas se separaron mediante electroforesis bidimensional. De esta forma se obtuvo un perfil más amplio de

proteínas con al menos 18 proteínas o grupos de proteínas (Fig. 4.37). La mayoría de estas proteínas estaban comprendidas entre pH 5 y 9, y con pesos moleculares de 40 a 65 kDa, y una proteína de aproximadamente 19 kDa. Para identificar estas proteínas, se llevó a cabo un análisis por Maltitof, sin embargo, la cantidad de proteína de cada una de las bandas obtenidas no fue suficiente para obtener resultados, por lo que será necesario partir de muestras más concentradas. No obstante, por el peso molecular y pI, y por la presencia de varias isoformas, se puede intuir que una de las proteínas mayoritarias (1) podría corresponder a la catalasa, que se encuentra en cinco isoformas, en peroxisomas.

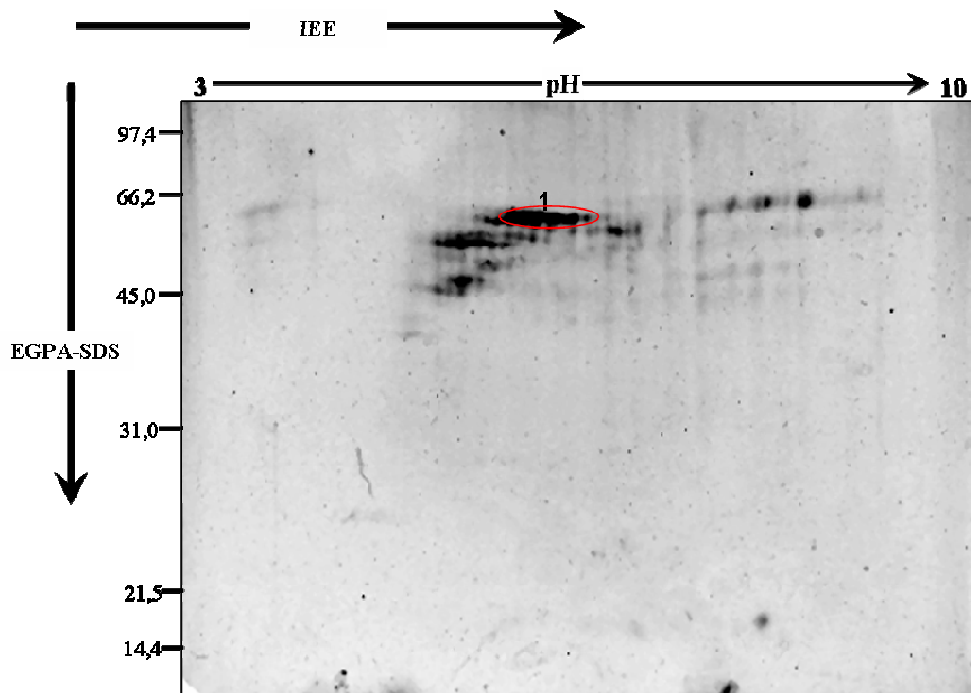


Figura 4.37: Separación de proteínas (100 μ g) S-nitrosiladas de peroxisomas de hoja de plantas de guisante control en EGPA-SDS bidimensional. A la derecha se muestran los valores de los estándar de peso molecular. El óvalo rojo (1) señala posiblemente las cinco isoformas de la catalasa.

4.3.2 Movimiento de Peroxisomas en Situaciones de Estrés por Cadmio

Con el fin de estudiar el papel de los peroxisomas en respuesta al estrés por cadmio, se planteó el estudio del movimiento de dichos orgánulos y su funcionalidad en células epidérmicas de hojas de plantas de *Arabidopsis*. Para ello se utilizaron mutantes estables

de *Arabidopsis* que expresaban una proteína fluorescente verde unida al péptido señal del peroxisoma SKL. Los experimentos se realizaron en plantas transgénicas obtenidas durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral y otras cedidas por el Prof. Chris Hawes de la universidad de Oxford Brookes (Oxford, UK). Las plantas se crecieron en cultivo hidropónico, tal y como se describe en el apartado correspondiente de Material y Métodos.

Como se observa en la figura 4.38, el patrón de movimiento no era uniforme, algunos orgánulos se movían en zig-zag (nº 1), mientras que otros lo hacían en una única dirección (nº 3 y 4), o en dos direcciones opuestas (nº 5 y 2). La longitud de la trayectoria también era variable, apareciendo peroxisomas que realizaban largos recorridos (nº 4 y 3), intermedios (nº 5) y cortos recorridos (nº 2 y 6).

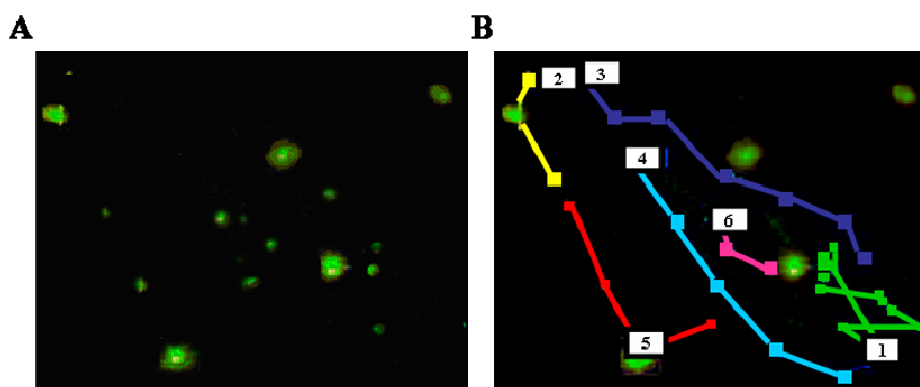


Figura 4.38: Esquema del análisis del movimiento de peroxisomas de hojas de *Arabidopsis* en el programa Volocity. A; imagen de los peroxisomas (verde) en la posición inicial antes de iniciar el registro del movimiento. B; trayectoria de cada uno de los orgánulos en todas las direcciones del espacio. Cada número representa un orgánulo y las líneas marcan el recorrido de cada uno de ellos, señalando con un cuadro, la posición del mismo en cada plano Z.

Mediante el análisis del movimiento con el programa Volocity, se obtuvieron los valores medios de la velocidad de desplazamiento de los peroxisomas en hojas control y tratadas con cadmio (Fig. 4.39). Las determinaciones se efectuaron a 24 y 72 h y a 7 y 15 d después del tratamiento, y en todos los casos la velocidad de los orgánulos era significativamente superior en las hojas de plantas tratadas con cadmio. Sin embargo, a partir de los 7 d de tratamiento, las plantas empezaban a presentar síntomas de clorosis,

probablemente debido a las condiciones experimentales utilizadas, ya que las plantas estaban cultivadas en medio MS líquido, pero sin ningún tipo de aireación.

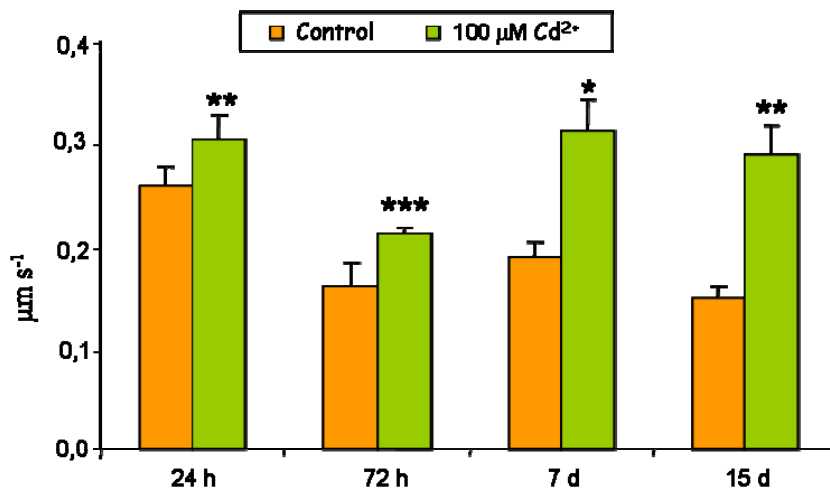


Figura 4.39: Efecto del tratamiento con Cd sobre la velocidad de desplazamiento de peroxisomas. Las determinaciones se efectuaron a distintos intervalos de tiempo de tratamiento (24 h- 15 d). Los datos representan los valores medios del análisis de 10 plantas \pm EEM. Las diferencias fueron significativas a $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) y $P < 0.001$ (***) según el test de Duncan.

A la vista de los resultados obtenidos, se repitió de nuevo el experimento a tiempos cortos e introduciendo aireación en los medios hidropónicos de cultivo. Se realizaron análisis de movimiento a 24, 48 y 72 horas tras el tratamiento (Fig. 4.40). Nuevamente en todos los casos, el movimiento de los peroxisomas tras el tratamiento con cadmio, aumentaba significativamente, observándose la mayor diferencia a las 48 horas, motivo por el cual, se seleccionó dicho tratamiento para los posteriores ensayos.

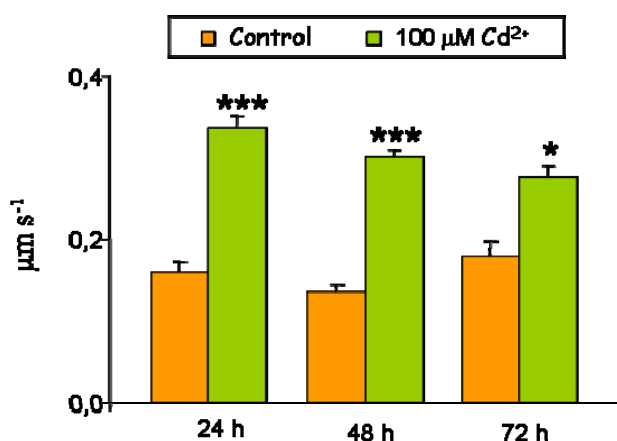


Figura 4.40: Efecto del tratamiento con Cd sobre la velocidad de desplazamiento de peroxisomas. Las determinaciones se efectuaron a distintos intervalos de tiempo de tratamiento (24 - 72h). Los datos representan los valores medios del análisis de 10 plantas \pm EEM. Las diferencias fueron significativas a $P < 0.01$ (**) según el test de Duncan.

Con objeto de determinar qué factor, o factores dirigen este cambio en el movimiento de los peroxisomas en respuesta al Cd, se ensayó el efecto de un antioxidante, el ASC (10 mM), que se ha demostrado es un eficiente secuestrador de ROS. Para ello, se administró el ASC un día antes de la administración del cadmio y las plantas se mantuvieron durante 48 h en estas condiciones. El ASC reducía la velocidad de desplazamiento de los peroxisomas, tanto en las plantas control, como en las tratadas con Cd, revirtiendo los efectos dependientes del Cd (Fig. 4.41).

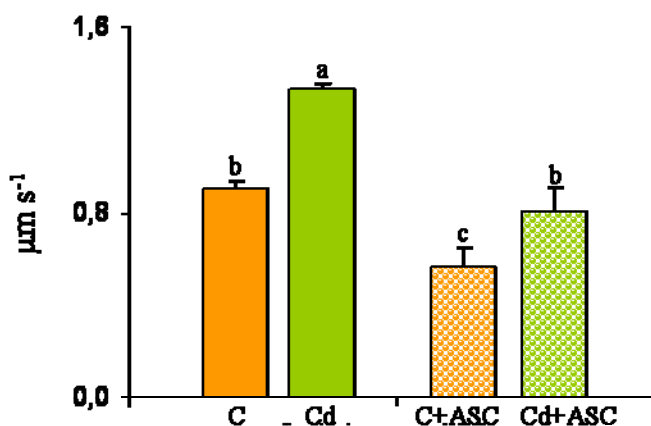


Figura 4.41: Efecto del tratamiento con ascorbato (ASC) 10 mM sobre la velocidad de desplazamiento de peroxisomas. Las determinaciones se efectuaron en presencia y ausencia de CdCl₂ 100 µM (Cd) a 48 h. Los datos representan los valores medios del análisis de 5 plantas ± EEM. Las diferencias fueron significativas a $P < 0.001$ según el test de Duncan. C, control; Cd, cadmio CdCl₂ 100 µM; ASC, ascorbato 10 mM.

Estos resultados sugieren que la velocidad de los peroxisomas está regulada por cambios en la producción endógena de ROS en la célula.

Para determinar otros factores que puedan regular el movimiento de estos orgánulos, se ensayó el papel del Ca²⁺. Para ello, las plantas se trataron con EGTA 2 mM, que actúa como quelante de Ca²⁺ (Fig. 4.42-A), y con Ca(NO₃)₂ 10 mM (Fig. 4.42-B), 24 h antes de la adición del CdCl₂ 100 µM.

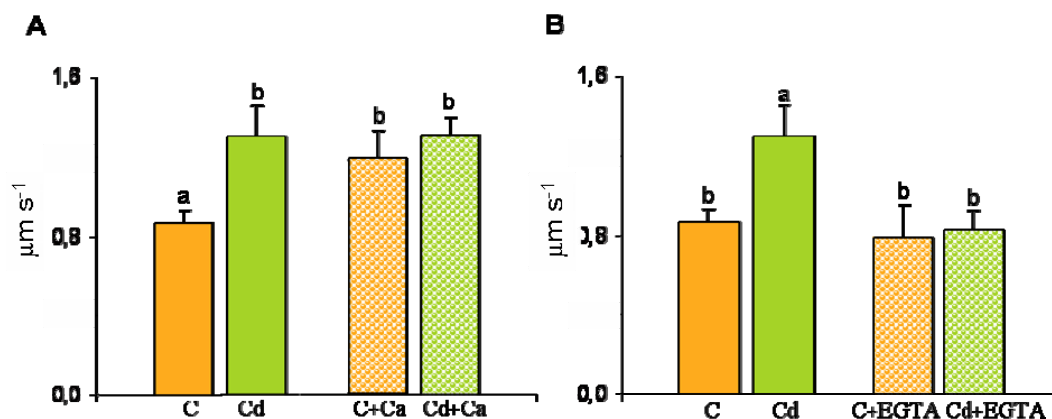


Figura 4.42: Efecto del tratamiento con calcio exógeno y EGTA sobre la velocidad de desplazamiento de peroxisomas. Las determinaciones se efectuaron en presencia y ausencia de Cd a 48 h. Los datos representan los valores medios del análisis de 5 plantas \pm EEM. Las diferencias fueron significativas a $P < 0.05$ según el test de Duncan. C, control; Cd, CdCl₂ 100 μM ; Ca, Ca(NO₃)₂ 10 mM; EGTA, ácido [etilenbis(oxietilenonitrilo)] quelante de calcio 2 mM.

El Ca²⁺ exógeno aumentaba la velocidad del movimiento de los peroxisomas en hojas controles hasta llegar a los mismos niveles que en hojas tratadas con cadmio, mientras que no tenía efecto sobre el movimiento de peroxisomas de hojas tratadas con Cd. Sin embargo, la adición de EGTA, que actúa como quelante de Ca²⁺, reducía el movimiento de los orgánulos en plantas tratadas con Cd y no tenía efecto sobre las plantas control.

4.4 CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DEFICIENTES EN GLICOLATO OXIDASA

4.4.1 Mutantes Goxi-I

En trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio se demostró que el Cd produce alteraciones en algunos de los sistemas implicados en la producción de ROS en peroxisomas (Romero-Puertas y col., 1999). Una de estas proteínas era la glicolato oxidasa (GOX), que se inducía en presencia de este metal, lo que conducía a un aumento de la producción de H₂O₂ en estos orgánulos (Romero-Puertas y col., 1999). Es por ello, que en esta Memoria de Tesis se abordó la obtención de mutantes

deficientes en esta actividad, para posteriormente determinar el papel de las ROS, dependientes de esta enzima, en la respuesta celular frente al Cd y otros estreses abióticos.

Las semillas correspondientes a las plantas transformadas se sembraron en placas Petri con medio MS y kanamicina, tal y como se ha indicado en el apartado 3.1.2 de Material y Métodos, de manera que sólo las plantas que llevaban la construcción resultaron resistentes. Cada una de estas plantas, constituyó una línea, generándose en total 8 líneas independientes. De cada transformante primario, se recogieron semillas de manera independiente y se sembraron nuevamente en medio MS suplementado con kanamicina. Una vez germinadas se analizó el número de semillas resistentes al antibiótico. Se seleccionaron solo aquellas líneas que presentaron un 75% de resistencia, ajustándose este fenotipo a una relación 3(Kan+):1(Kan-), establecida por las leyes mendelianas para una única inserción del transgén. El análisis de la descendencia de estas plantas que presentaban un 75% de resistencia, nos permitió seleccionar las líneas homocigotas, que son las que presentaron un 100% de resistencia a kanamicina, resultando finalmente cinco líneas independientes.

Para seleccionar las líneas que presentasen un efecto de deficiencia en glicolato oxidasa, se analizó esta actividad y se seleccionaron aquellas cuya actividad aparecía más reducida con respecto a las plantas silvestres. Como resultado de ello se seleccionaron tres líneas independientes, las cuales fueron caracterizadas.

Una vez identificadas las líneas que mostraban niveles reducidos de actividad GOX, se procedió a realizar un análisis fenotípico y bioquímico de las mismas. Se analizaron los parámetros siguientes: Porcentaje de germinación, peso fresco de la parte aérea, longitud de la raíz, tiempo de floración, actividad GOX y fotosíntesis.

4.4.1.1 Porcentaje de Germinación

El estudio del porcentaje de germinación se llevó a cabo en semillas sembradas en medio MS con sacarosa. En las tres líneas analizadas, el porcentaje de germinación fue del 90 al 95%, similar al de la cepa silvestre.

4.4.1.2 Peso Fresco de la Parte Aérea

Las plantas Goxi-I no mostraron diferencias fenotípicas con respecto a las plantas silvestres, por lo que respecta al tamaño (Fig. 4.43-A); sin embargo, el peso fresco de la parte aérea de plantas Goxi-I, se reducía en torno a un 18% con respecto a las plantas control (Fig. 4.43-B).

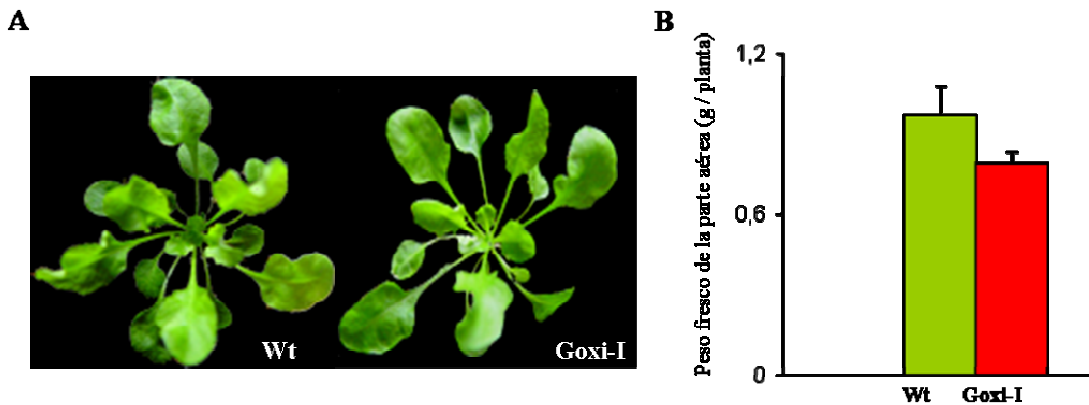


Figura 4.43: A, Imagen de las plantas de *Arabidopsis* silvestres (Wt) y mutantes deficientes en glicolato oxidasa (Goxi-I). B, Peso fresco de la parte aérea de plantas control (Wt) y mutantes (Goxi-I)

4.4.1.3 Longitud de la Raíz

Para comparar la longitud de la raíz de las plantas silvestres y las mutantes Goxi-I, ambas plantas se germinaron en placas cuadradas con medio MS y en posición vertical. Como se observa en la figura 4.44, no existen diferencias apreciables entre las plantas silvestres (Wt) y las mutantes Goxi-I.

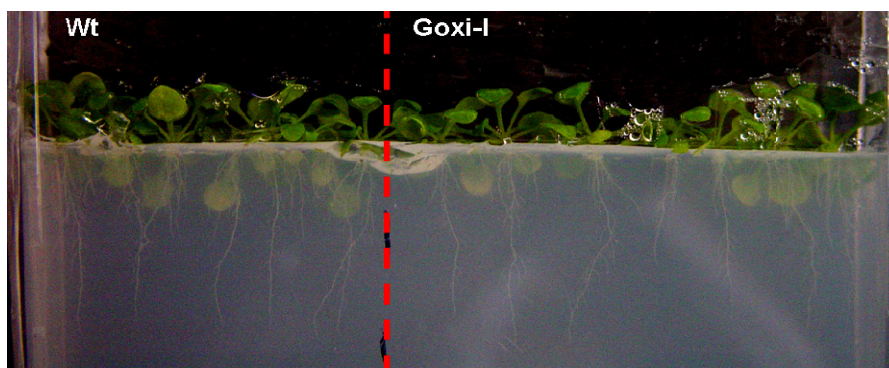


Figura 4.44: Imagen de la parte aérea y la raíz de plantas silvestres (Wt) y mutantes Goxi-I

4.4.1.4 Tiempo de Floración

La aparición del botón floral en las plantas Goxi-I se adelantó aproximadamente una semana con respecto a las plantas silvestres.

4.4.1.5 Actividad Glicolato Oxidasa

La medida de la actividad GOX, se realizó según el protocolo descrito en el apartado 3.10.6 de Material y Métodos. Las mutantes Goxi-I, presentaron una reducción de la actividad GOX de aproximadamente el 17%, lo cual demuestra que el mutante es correcto. La reducción de la actividad es baja, sin embargo hay que tener en cuenta que este mutante solo tiene afectadas dos isoenzimas de las seis presentes en *Arabidopsis*.

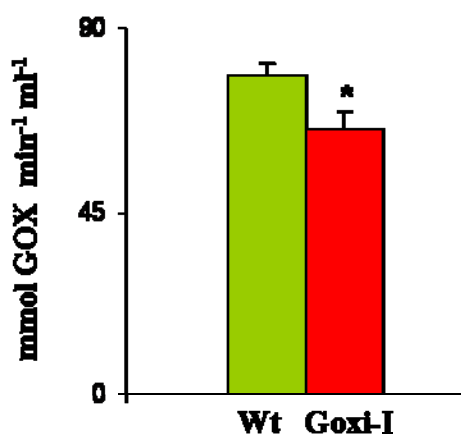


Figura 4.45: Actividad GOX en hojas de *Arabidopsis* silvestres (Wt) y mutantes Goxi-I. Los datos representan los valores medios del análisis de 10 plantas \pm EEM. Las diferencias fueron significativas a $P < 0.05$ (*) según el test de Duncan.

4.4.1.6 Actividad Fotosintética

La actividad fotosintética, se realizó mediante el análisis del consumo de CO₂, según el protocolo descrito en el apartado 3.1.4 de Material y Métodos. Los mutantes Goxi-I, presentaron una reducción de la tasa fotosintética de aproximadamente el 35% con respecto a las plantas control.

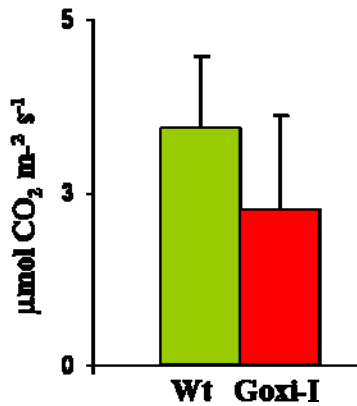


Figura 4.46: Actividad fotosintética en hojas de *Arabidopsis silvestres* (Wt) y mutantes Goxi-I. Los datos representan los valores medios del análisis de 10 plantas \pm EEM.

4.4.1 Mutantes GFP-SKL

Del mismo modo que se ha descrito anteriormente, se seleccionaron líneas homocigotas de plantas transformadas GFP-SKL. La selección de las líneas que expresan la GFP-SKL se realizó mediante germinación en presencia de kanamicina y mediante la observación de la fluorescencia de la GFP al microscopio láser confocal (Fig. 4.47-A). La localización de la proteína de fusión GFP-SKL se corroboró mediante inmunocitoquímica utilizando anticuerpos frente a la GFP y observación al microscopio electrónico (Fig. 4.47-B).

Todas las líneas se comportaron de la misma manera y no presentaron diferencias fenotípicas con respecto a las plantas silvestres. Además, se comportaron de igual forma que las mutantes de las mismas características suministradas por el laboratorio del Prof. Chris Hawes de la Universidad de Oxford Brookes (Oxford, Reino Unido).

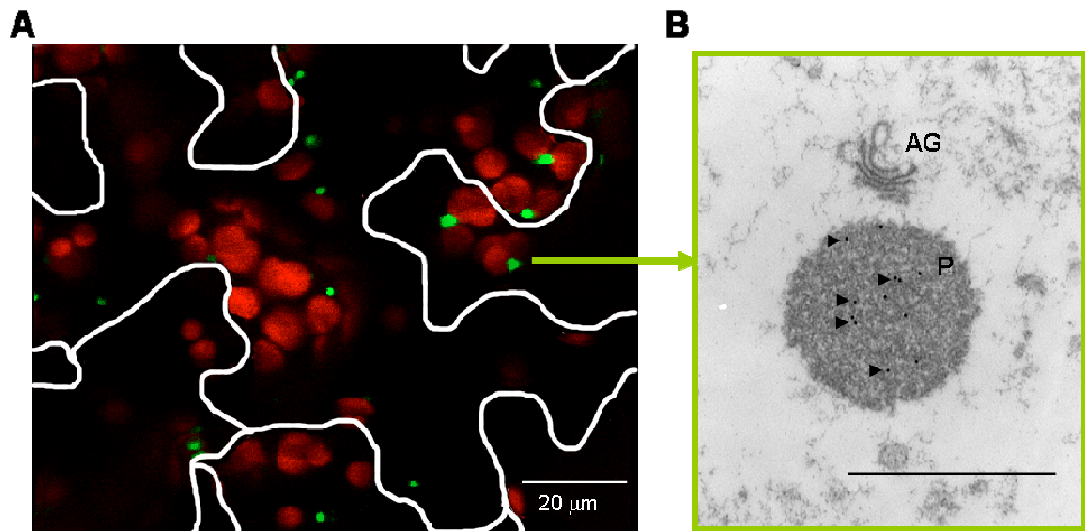


Figura 4.47: Localización de la proteína de fusión GFP con el péptido señal del peroxisoma SKL en hojas de mutantes GFP-SKL de *Arabidopsis*. A; Imagen confocal de la planta transformada; en rojo se muestra la autofluorescencia de la planta, en verde la fluorescencia de la GFP en peroxisomas y las líneas blancas representan los contornos de las células epidérmicas. B; Inmunolocalización de GFP mediante marcaje con oro coloidal. Dilución del anti-GFP 1:500. La barra indica 1 μm.

DISCUSIÓN

El propósito del trabajo que se presenta en esta Memoria Doctoral, ha sido profundizar en la identificación de la secuencia de eventos implicados en la transducción de señales en respuesta al estrés por cadmio (Cd) en plantas de guisante, dedicando especial interés al estudio de la participación de especies de oxígeno reactivo (ROS) y óxido nítrico (NO) en la respuesta celular, así como el papel de los peroxisomas como fuente de señales celulares. Los estudios se llevaron a cabo en hojas y raíces de plantas de guisante y durante un periodo largo de tratamiento. Además, se han utilizado plantas de *Arabidopsis* cuando fue necesario el uso de mutantes, ante la imposibilidad de obtener mutantes de plantas de guisante.

Cambios en el Crecimiento y Estructura de la Raíz de Plantas de Guisante

El cadmio provoca una reducción significativa del crecimiento de la planta de guisante, dependiente de la concentración del metal en el medio (Dixit y col., 2001; Sandalio y col., 2001). En trabajos previos se observó que el efecto más acusado del metal se apreciaba en hojas (Sandalio y col., 2001), mientras que en las raíces se detectó una reducción menor del crecimiento. En este trabajo se ha demostrado que esta reducción del crecimiento de la raíz se debe a la disminución del número y longitud de raíces secundarias; si bien, el grosor de las mismas era aproximadamente 1,5 veces mayor que en las raíces de plantas control, como consecuencia del aumento del número de células de la corteza. El tratamiento con Cd, producía también el pardeamiento de las raíces, que podría ser debido a la formación de complejos S-Cd, tal y como se ha descrito en *Arabidopsis* (Howden y col., 1995), o bien a la formación de fenoles que actúan como secuestradores de metales o como antioxidantes, contribuyendo a la eliminación de H₂O₂ con la intervención de peroxidasas (Schützendübel y col., 2001; Lavid y col., 2001). La reducción del crecimiento de raíces secundarias coincide con procesos de muerte celular detectada en estas raíces en la zona de elongación de la misma. Resultados similares han sido observados en raíces de plantas de *Arabidopsis* (Suzuki, 2005) y de *Pinus sylvestris* (Schützendübel y col., 2001). En el caso de las plantas de *Arabidopsis*, tanto la muerte celular como la reducción del crecimiento de la raíz por Cd eran revertidos completa o parcialmente por la adición exógena de Ca²⁺ (Suzuki,

2005). El Ca^{2+} también alivia la inhibición del crecimiento de la raíz por Al (Kinraide y Parker, 1987). La reducción del crecimiento de células de *Glycine max* se ha relacionado con la reducción de los niveles de transcritos de ciclina B1, responsable de la división celular (Sobkowiak y Deckert, 2003)

Cambios en la arquitectura del sistema radicular, a nivel de crecimiento y de formación de raíces secundarias y pelos radicales, se han observado en situaciones ambientales adversas tales como escasez de agua y de nutrientes (López-Bucio y col., 2003). El contenido de nitratos, sulfatos, fosfatos y hierro se ha demostrado que puede actuar como señales celulares provocando cambios hormonales que van a determinar la estructura de la raíz (López-Bucio y col., 2003). Los cambios observados en guisante podrían deberse a la reducción de la disponibilidad de algunos elementos como el P, K, Ca, Mn o Fe inducida por el Cd (Sandalio y col., 2001; Zornoza y col., 2002). Concretamente, la reducción del Ca^{2+} puede afectar a numerosos procesos de señalización celular, y también a la solubilidad de nutrientes como el P, lo que podría limitar su translocación a la parte aérea de la planta (López-Bucio y col., 2003). De hecho el tratamiento con Cd produce una disminución significativa de P en hojas, pero no en raíces (Sandalio y col. 2001).

Las raíces principales de plantas tratadas con Cd presentaban alteraciones en la estructura del cilindro vascular, mostrando vasos xilemáticos de menor tamaño y el floema menos desarrollado que en raíces de plantas control. Estas modificaciones eran revertidas por la adición de Ca^{2+} en la solución nutritiva, lo que sugiere que este elemento desempeña un papel importante en la arquitectura de la raíz.

Los cambios en el crecimiento y la estructura de la raíz podrían deberse también a cambios hormonales inducidos por el metal. Así, el incremento de etileno en la raíz podría conducir a la inhibición de auxinas, responsables del crecimiento y formación de raíces (Salisbury y Ross, 1992). Poschenrieder y col., (1989) han descrito cambios en el tamaño de haces vasculares debidos a un incremento en los niveles de ABA dependientes de Cd. El NO, a su vez, desempeña diversos papeles en la señalización celular, y se ha visto que induce el crecimiento y formación de raíces laterales y adventicias (Pagnussat y col., 2002; Correa-Aragunde y col., 2004), siendo este proceso

dependiente de Ca^{2+} , proteínas quinasas e IAA (Lanteri y col., 2006; Pagnussat y col., 2003). Por tanto la disminución de NO observada en raíces de plantas tratadas con Cd podría ser otro factor responsable de la modificación de la arquitectura de la raíz de plantas dependiente de este metal. De hecho, el tratamiento de las plantas con donadores de NO revertía el efecto causado por el Cd, en la estructura del cilindro vascular. Un efecto protector del NO también ha sido descrito en raíces de plantas de *Glycine max* expuestas a Cd, NaCl, etileno y paraquat (Kopyra y Gwódz, 2003) y en plantas de *Casia tora* expuestas a Al (Wang y Yang 2005), si bien, los mecanismos responsables de la protección no han sido elucidados. Estos resultados sugieren que el Ca^{2+} y el NO podrían ser elementos clave en la respuesta de la planta al Cd.

El cadmio Provoca Alteraciones en la Defensa Antioxidante y Estrés Oxidativo

El tratamiento con Cd produjo disminución de algunas actividades antioxidantes lo que se traduciría en daños oxidativos a macromoléculas. En términos generales, el Cd produjo una reducción de los antioxidantes encargados de eliminar el H_2O_2 . Resultados similares se obtuvieron en plantas de *Populus canescens* (Schützendübel y col., 2002), mientras que en *Phragmites australis*, tolerante al Cd, se ha descrito un incremento de estas actividades (Ianneli y col., 2002). La actividad CAT se vio disminuida tanto en raíces como en hojas de guisante tratadas con cadmio. Sin embargo, el análisis mediante RT-PCR semicuantitativa del nivel de transcritos, demostró diferencias en la regulación de esta proteína entre ambos órganos. Así, la reducción de la actividad CAT en raíces, por efecto del Cd, se debía a una represión de la expresión, mientras que en hojas la expresión se encontraba inducida, por lo que la reducción de la actividad observada se debería a modificaciones postraduccionales de la proteína dependientes de cadmio. En trabajos previos (Romero-Puertas y col., 2002) se demostró que el Cd inducía la oxidación y degradación proteolítica de la CAT en hojas de guisante. Por otro lado, el Ca^{2+} y la calmodulina (CaM) podrían jugar un papel importante en la activación de ciertas isoformas de CAT, tal y como demostraron Yang y Poovaiah (2002), por lo que una disminución del Ca^{2+} provocada por el tratamiento con Cd (Sandalio y col., 2001) podría conducir a la disminución de la actividad CAT. Estos resultados sugieren que la

actividad CAT está regulada a nivel transcripcional en raíces y a nivel transcripcional y postraducciona en hojas. La reducción de la actividad CAT ha sido observada también en la misma especie vegetal (Dixit y col., 2001), en *Pinus sylvestris* (Scützendübel y col., 2001), *Helianthus annuus* (Laspina y col., 2005), *Oryza sativa* (Kuo y Kao, 2004), *Arabidopsis* (Cho y Seo, 2004), y hojas de *Capsicum annuum* (León y col., 2002), mientras que resultados opuestos han sido descritos en raíces de *Raphanus sativus* (Vitória y col., 2001), y cultivos de células de *Glycine max* (Sobkowiak y col., 2004). Un aumento del nivel de expresión y de la actividad de la CAT han sido descritos en hojas de diferentes genotipos de guisante sometidos a concentraciones bajas del metal y durante tiempos cortos de tratamiento (Metwally y col., 2005), lo que demuestra una respuesta diferencial dependiendo de la concentración del metal y tiempo de tratamiento.

Como mediada de la actividad peroxidasa total, se utilizó el ensayo de la actividad guayacol peroxidasa (GPX). El tratamiento con Cd, produjo una reducción de la actividad GPX en raíces de guisante, lo que coincide con una reducción de la misma actividad observada previamente en hojas, en las mismas condiciones experimentales (Sandalo y col., 2001). Sin embargo, estos resultados difieren de los obtenidos en hojas de *Phaseolus vulgaris* (Smeets y col., 2005) *Capsicum annuum* (León y col., 2002) y en cultivos de células de *Glycine max* (Sobkowiak y col., 2004). La GR, enzima clave en el ciclo ASC-GSH (Jiménez y col., 1997; Noctor y Foyer, 1998), se encontraba disminuida en raíces de plantas tratadas con Cd, a pesar del incremento de sus niveles de expresión, lo que demuestra que en estas condiciones la enzima está sujeta a modificaciones postraduccionales, como la oxidación de la proteína con formación de grupos carbonilo (Romero-Puertas y col., 2002). En trabajos previos se demostró que en hojas, en las mismas condiciones de experimentación, la GR no experimentaba cambios significativos en su actividad (Romero-Puertas y col., 2006a). Una reducción de la actividad GR también se ha descrito en plantas de *Helianthus annuus* y *Ceratophyllum demersum* (Gallego y col., 1996; Aravind y Prasad, 2005), mientras que resultados opuestos se han observado en *Triticum aestivum*, donde la actividad GR de raíces aumentaba, sin que hubiera un aumento paralelo de su nivel de transcritos, mientras que en hojas no se apreciaban cambios significativos (Yannarelli y col., 2007). Resultados

contradictorios también se han descrito en otras especies vegetales, donde la actividad GR se incrementaba tras el tratamiento con Cd (Vitória y col., 2001; León y col., 2002; Kuo y Kao, 2004; Smeets y col., 2005).

Los niveles de glutatión y ascorbato totales también se encontraban disminuidos en raíces de plantas de guisante tratadas con Cd, siendo las formas oxidadas las más afectadas, si bien la tasa de formas reducidas frente a las oxidadas era superior en presencia del metal. La reducción del contenido total de GSH podría deberse a la síntesis de fitoquelatinas inducida por el metal (Howden y col., 1995; Xiang y Oliver, 1998; Domínguez-Solís y col., 2001), que ha sido descrita en distintas especies vegetales (Ortega-Villasante y col., 2005). La reducción de los niveles de GSH y ASC observados, podría conducir a la disminución de la eficiencia del ciclo ASC-GSH en raíces de plantas tratadas con Cd. Resultados similares se han descrito en hojas de guisante en las mismas condiciones experimentales utilizadas en esta Memoria (Romero-Puertas y col., 2006b). Además de su papel en la defensa antioxidante, el GSH controla un gran número de procesos celulares, a través de cambios en el balance redox (Maughan y Foyer, 2006) y en el mutante de *Arabidopsis* rml1, deficiente en GSH, se ha demostrado que es necesario para el desarrollo de la raíz (Vernoux y col., 2000).

Las SODs son enzimas clave en la defensa antioxidante de la planta, llevando a cabo la dismutación del O_2^- con formación de H_2O_2 y O_2 (Alscher y col., 2002). En raíces de plantas de guisante tratadas con Cd, se observó un ligero aumento de la actividad total SOD; sin embargo, en estudios llevados a cabo en hojas se observó que el análisis de esta actividad en extractos crudos está sujeto a interferencias por compuestos inducidos por el Cd y que tienen actividad SOD mimética (Sandalo y col., 2001). Es por ello, que se analizaron las distintas isoformas de SOD mediante geles de poliacrilamida. Los resultados obtenidos demuestran que la CuZn-SOD es muy sensible al Cd, experimentando reducciones importantes de su actividad, tanto en hojas como en raíces, mientras que la Mn-SOD no se afectaba o incluso se incrementaba ligeramente en raíces y se reducía un 50% en hojas. La Fe-SOD se reducía en hojas y no se modificaba prácticamente en raíces. La reducción de la actividad SOD por el Cd se ha descrito en *Triticum aestivum* (Milone y col., 2003) y *Phaseolus vulgaris* (Cardinaels y col., 1984),

mientras que el efecto opuesto se ha observado en *Helianthus annuus* (Laspina y col., 2005), *Oryza sativa* (Kuo y Kao, 2004) y cultivos de células de *Glycine max* (Sobkowiak y col., 2004). En plantas de *Allium sativum* se han observado aumentos de la actividad SOD a tiempos cortos de exposición, mientras que a tiempos largos tenía lugar una reducción de la actividad (Zang y col., 2005). Cambios en la proporción de las isoformas de SOD inducida por Cd, también han sido descritas en plantas de *Capsicum annuum* (León y col., 2002) y de *Arabidopsis* (Drazkiewicz y col., 2007), siendo la reducción de la actividad CuZn-SOD el hecho más destacable en ambos casos. El análisis de expresión de las distintas isoformas demostró que la Fe-SOD se inducía a nivel transcripcional, tanto en hojas como en raíces, si bien en ambos casos modificaciones postraduccionales conducen a una reducción de la actividad. En cuanto a las modificaciones postraduccionales, que pueden experimentar estas proteínas, podemos mencionar la oxidación de la proteína por H₂O₂; disponibilidad de metales y cambios en el balance redox, especialmente de la relación GSH-GSSG (Wingsle y Karpinski, 1996; Romero-Puertas y col., 2002 y 2006b). La Mn-SOD de raíces se encontraba inducida a nivel transcripcional, lo que coincide con un ligero incremento de la actividad, mientras que en hojas la reducción de la actividad se correspondía con una represión de la expresión. La reducción de la actividad CuZn-SOD, tanto en raíces como en hojas, se debía a una represión de la expresión, y este efecto del metal era revertido por la adición de Ca²⁺ exógeno, lo que sugiere un papel de este elemento en la regulación a nivel transcripcional de esta proteína. Con objeto de profundizar en los mecanismos implicados en la regulación de la expresión de la CuZn-SOD en estrés por Cd, se analizaron mutantes de *Arabidopsis* deficientes en NADPH oxidasa (DF). Esta enzima ha sido considerada como una de las principales fuentes de ROS en situaciones de estrés por Cd (Olmos y col., 2003; Romero-Puertas y col., 2004a; Garnier y col., 2006). En plantas silvestres se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en plantas de guisante, observándose una reducción de la expresión en presencia de Cd y una recuperación del nivel de transcritos por adición de Ca²⁺. Sin embargo, en mutantes DF la adición de Ca²⁺ no era suficiente para restablecer los niveles de CuZn-SOD, lo que sugiere que además del Ca²⁺, en la regulación de la expresión de esta proteína

intervienen ROS procedentes de la NADPH oxidasa. El papel regulador del H₂O₂ en la expresión de la CuZn-SOD en estrés por Cd ha sido recientemente descrito por Romero-Puertas y col., (2006b) mediante el uso de ASC como secuestrador de H₂O₂.

Las diferencias observadas en las actividades antioxidantes estudiadas, en distintas especies vegetales, probablemente se deban a la concentración del metal y el periodo de tratamiento utilizado en cada caso, además, el efecto del Cd depende del órgano o tejido analizado y también de la especie vegetal de que se trate (Sobkowiak y col., 2004; Benavides y col., 2005). Así, a tiempos cortos de tratamiento la actividad de los antioxidantes generalmente aumenta como mecanismo secundario de defensa frente al metal, mientras que a tiempos largos de tratamiento la producción de ROS puede sobrepasar la capacidad antioxidante de la planta. Los resultados obtenidos en esta Memoria, podrían representar la adaptación de las células al metal, tras largos periodos de tratamiento.

La reducción observada de algunas actividades antioxidantes podría conducir a un aumento de la producción de ROS lo que explicaría el aumento en la tasa de peroxidación lipídica y oxidación de proteínas que se observó en raíces de plantas tratadas con Cd. Resultados similares se observaron previamente en hojas de guisante en las mismas condiciones experimentales (Sandalio y col., 2001; Romero-Puertas y col., 2002). Un incremento de peroxidación lipídica dependiente de la actividad lipoxigenasa, se ha demostrado en situaciones de estrés por metales pesados en *Phaseolus vulgaris* (Somashekaraiah y col., 1992) y *Arabidopsis* (Skórzynska-Polit y Krupa, 2006).

El análisis comparativo de raíces y hojas sugiere que la raíz, a pesar de acumular Cd en mayor concentración que las hojas (Sandalio y col., 2001), presenta menos daños oxidativos, a juzgar por los niveles de antioxidantes y marcadores de daños oxidativos. Este hecho, podría deberse a la capacidad de la raíz para acumular el metal de forma no activa, en la pared celular, vacuola o formando complejos con fitoquelatinas (Vázquez y col., 2006). Por otro lado, la diferencia en la expresión de las distintas enzimas analizadas en ambos órganos, podría responder a diferencias en el nivel y la localización de la producción de ROS en distintos compartimentos celulares, especialmente la presencia de cloroplastos en hojas.

El Cd Produce Acumulación de ROS y Reducción del Contenido de NO en Plantas de Guisante

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se ha puesto a punto un método de detección de ROS *in vivo*, mediante microscopía láser confocal, usando fluorocromos específicos para detectar H_2O_2 y O_2^- en cortes transversales de hojas y raíces. La especificidad de estas tinciones se demostró mediante el uso de secuestradores específicos de ambas ROS. Este método ha permitido localizar y observar diferencias en el acúmulo de ROS simultáneamente en distintos tipos de células.

En raíces secundarias completas de plantas control se observó un acúmulo de H_2O_2 a nivel del ápice, mientras que en las plantas tratadas con cadmio la producción de H_2O_2 se extendía a toda la raíz. Resultados similares se obtuvieron con el acúmulo de O_2^- . La acumulación de ROS a nivel del ápice de raíces control, podría estar asociada a procesos de elongación y diferenciación celular de la raíz (Ogawa y col., 1997; Potikha y col., 1999; Córdoba-Pedregosa y col., 2003), mientras que en las raíces tratadas con cadmio, el incremento de la acumulación de ROS por toda la raíz podría deberse a daños oxidativos causados por el metal, lo que coincide con la tinción con Evan's blue, utilizada como marcador de muerte celular. Un incremento en la producción de H_2O_2 dependiente del Cd se ha observado también en raíces de *Medicago sativa* (Ortega-Villasante y col., 2005), *Pinus sylvestris* (Schützendübel y col., 2001), o *Hordeum vulgare* (Durgeková y col., 2007). El uso de DHE también ha permitido visualizar incrementos en la acumulación de O_2^- en respuesta al Cd, en raíces de *Lupinus luteus* (Kopyra y Gwozdz, 2003) y en respuesta al Al en raíces de *Pisum sativum* (Yamamoto y col., 2002).

En cortes transversales de raíces secundarias, se observó una mayor acumulación de H_2O_2 a nivel de la pared celular de las células de la corteza, epidermis, periciclo y xilema, mientras que el acúmulo de H_2O_2 en raíces sin tratar, se limitó a las células de la corteza y epidermis. El acúmulo de O_2^- en raíces secundarias seguía un patrón similar al de acumulación de H_2O_2 , salvo que en raíces tratadas con Cd el marcaje fue mayor en el floema. En cortes de raíces principales, la acumulación de H_2O_2 en raíces sin tratar se observó a nivel de la corteza, periciclo y xilema, mientras que en raíces tratadas con Cd, este acúmulo se extendió también a la epidermis. Algo similar se observó en el acúmulo

de O_2^- , aunque en raíces sin tratar solo se observó este radical a nivel de la pared celular del xilema.

Con el fin de profundizar en los mecanismos responsables del aumento en los niveles de ROS causados por el Cd, se abordaron estudios en raíces secundarias utilizando inhibidores de canales de Ca^{2+} ($LaCl_3$), de fosfatasa (cantaridina), de NADPH oxidasa (DPI) y de peroxidasas (NaN_3). El tratamiento de raíces con inhibidores de canales de Ca^{2+} redujo la producción de O_2^- causada por el Cd, lo que demuestra que este proceso es dependiente de cambios en los niveles intracelulares de Ca^{2+} , de igual forma que se ha descrito en hojas de guisante (Romero-Puertas y col., 2004a). La producción de ROS en respuesta al Cd en cultivos de células de *Nicotiana tabacum* también se ha observado que es dependiente de Ca^{2+} (Olmos y col., 2003; Garnier y col., 2006). En raíces, la producción de O_2^- no era dependiente de fosfatasa, al contrario de lo que se había descrito previamente en hojas de guisante (Romero-Puertas y col., 2004a). Este hecho pone de manifiesto posibles diferencias de regulación de la producción de ROS en hojas y raíces. En plantas de *Solanum tuberosum* se ha demostrado la existencia de una red compleja de transducción de señales en respuesta a la herida mediada por JA, que es dependiente de proteínas fosfatasa en hojas e independiente de las mismas en la raíz (Dammann y col., 1997). La producción de O_2^- era dependiente de NADPH oxidasa pero también intervenían peroxidasas, a juzgar por la reducción de la fluorescencia del DHE en presencia de inhibidores de ambas actividades. La producción de ROS dependiente de Cd en células de *Nicotiana tabacum* se ha demostrado que se debe a la activación de una NADPH oxidasa de membrana, que requiere Ca^{2+} y es dependiente de proteínas quinasas (Olmos y col., 2003); sin embargo, la muerte celular inducida por Cd en estas mismas células requiere tres *burst oxidativos* bien diferenciados y espacialmente separados (Garnier y col., 2006). El primero de ellos tiene lugar en la membrana y es dependiente de NADPH oxidasa, el segundo implica la acumulación de ROS en mitocondrias y el tercero consiste en un acúmulo de hidroperóxidos de membrana (Garnier y col., 2006). Estos procesos tienen lugar en horas, sin embargo en tratamientos largos, como los efectuados en esta Memoria, un solapamiento de estos procesos tiene lugar lo que explica la producción simultánea de ROS en distintos

compartimentos celulares. La producción de ROS en las células de la corteza podría estar asociada a un aumento de la lignificación de las paredes celulares, tal y como se ha descrito en raíces de *Pinus sylvestris* (Schützendübel y col., 2001) y *Hordeum vulgare* (Durceková y col., 2007), estando implicadas en este proceso las peroxidasas. La lignificación de la pared celular puede considerarse como un mecanismo secundario de defensa para limitar la entrada del metal, de una manera similar a lo que ocurre en la respuesta a patógenos (Neill y col., 2002b; Blee y col., 2003). En relación a los haces vasculares, en estudios llevados a cabo en hipocotilos de *Spinacia oleracea* y tallos de *Zinnia elegans*, se ha demostrado que la principal fuente de ROS es la NADPH oxidasa (Ogawa y col., 1997; Ros-Barceló, 1999), el H₂O₂ producido sería a su vez utilizado por peroxidasas para la síntesis de lignina (Ros-Barceló, 1998). Ros-Barceló (2005) sugiere que la generación de H₂O₂ en haces vasculares tendría lugar en la cara externa de la membrana plasmática de células xilemáticas en diferenciación y en células del parénquima asociado al xilema. El incremento de la acumulación de ROS en haces vasculares por efecto del Cd, se vería favorecido por la reducción de la capacidad antioxidante. Este acúmulo de ROS o bien otras señales celulares derivadas, o dependientes de ROS, podrían inducir el programa de senescencia con la aceleración de xilogénesis, al igual que se ha descrito en raíces de *Pinus sylvestris* (Schützendübel y col., 2001) y *Hordeum vulgare* (Durceková y col., 2007).

El análisis de ROS en secciones transversales de hojas mostró una mayor acumulación de H₂O₂ y O₂⁻, provocado por el Cd, a nivel del mesófilo, epidermis y esclerénquima. Además el acúmulo de H₂O₂ en mesófilo estaba asociado a cloroplastos, a juzgar por la colocalización con la fluorescencia de la clorofila, pero también se observaba en otros compartimentos celulares de menor tamaño que podrían ser mitocondrias, y peroxisomas, y en la membrana plasmática. Recientemente mediante técnicas de citoquímica utilizando CeCl₃ y DAB, y observación al microscopio electrónico, se ha demostrado la producción de depósitos de H₂O₂ en mitocondrias, peroxisomas y membrana plasmática de células del mesófilo y en la membrana plasmática de células de la epidermis en hojas de plantas tratadas con Cd (Romero-Puertas y col., 2004a). En cuanto a los haces vasculares, a diferencia de las raíces, en

hojas el Cd aparentemente no produce modificaciones importantes de la distribución de vasos. La mayor acumulación de ROS en haces vasculares se observó a nivel de la pared celular de vasos xilemáticos, lo que se corroboró con los resultados obtenidos mediante citotóxica de CeCl₃ y observación al microscopio electrónico. La participación de NADPH oxidasas en la producción de O₂⁻ dependiente de Cd en hojas, fue confirmada en mutantes de *Arabidopsis* DF, deficientes en esta actividad, donde la fluorescencia del DHE se reducía especialmente en mesófilo. Sin embargo, la producción de ROS en haces vasculares no se modificaba significativamente en los mutantes, lo que sugiere que otras fuentes de ROS, como las peroxididasas, también podrían intervenir.

En trabajos anteriores se demostró que la producción de ROS en hojas, inducida por el Cd, era dependiente de fosfatasas (Romero-Puertas y col., 2002). La regulación de la expresión de algunos antioxidantes, en condiciones de estrés por cadmio, también es dependiente de procesos de fosforilación/desfosforilación de proteínas (Romero-Puertas y col., 2006b). Para profundizar en este punto, se ha analizado el patrón de proteínas fosforiladas en hojas de guisante y se ha observado que el tratamiento con Cd produce una reducción en la intensidad de las bandas correspondientes a las proteínas de 57, 45 y 15 kDa y, por el contrario, producía una intensificación de las bandas de 32 y 29 kDa. Estos resultados demuestran que tanto la fosforilación como la desfosforilación de proteínas están implicadas en la respuesta celular frente al cadmio. La identificación de estas proteínas mediante fosfoproteómica podrá arrojar más luz sobre la regulación de la respuesta de la planta al Cd a través de procesos de fosfo y desfosforilación de proteínas y su relación con la producción de ROS.

El análisis de la producción de NO en plantas de guisante mediante microscopía de fluorescencia utilizando DAF-2DA, mostró que tanto en raíces como en hojas de plantas control, tiene lugar la producción constitutiva de NO dependiente de una actividad NOS, a juzgar por la inhibición con aminoguanidina, y el tratamiento con Cd, reducía casi totalmente la producción de NO en ambos órganos. La presencia de una actividad NOS constitutiva se ha descrito en hojas de guisante siendo esta actividad dependiente de Ca²⁺ y CaM (Barroso y col., 1999; Corpas y col., 2006). Como se ha

comentado anteriormente, el Cd produce una deficiencia de Ca^{2+} en hojas y raíces de plantas de guisante (Sandalio y col., 2001), lo que podría explicar una reducción de la actividad NOS y por tanto de la producción de NO en ambos órganos. Este hecho viene avalado por los resultados obtenidos tras la adición de Ca^{2+} exógeno a las plantas tratadas con Cd, obteniéndose una recuperación de la producción de NO en raíces y hojas. En plantas de *Raphanus sativus* se ha observado que el Ca^{2+} amortigua los efectos deletéreos del Cd por desplazamiento de este metal unido a la CaM previniendo así la inactivación de proteínas dependientes de Ca-CaM (Rivetta y col., 1997). En cuanto a otras posibles fuentes de NO, en animales el GSNO es considerado como un reservorio natural de NO (He y col., 2004; Zhang y Hogg, 2005) y en plantas de *Arabidopsis* se ha descrito que la formaldehído deshidrogenasa, dependiente de glutation, tiene actividad S-nitrosoglutation reductasa (GSNOR) (Sakamoto y col., 2002). La actividad GSNOR analizada en hojas de plantas de guisante se reducía por cadmio, lo que concuerda con la reducción de NO observada por microscopía láser confocal, y con la reducción de GSH descrita anteriormente en hojas de guisante (Romero-Puertas y col., 2006b). Estos resultados sugieren que, bajo situaciones de estrés por Cd, el GSNO no es una fuente de producción de NO. Reducción de la GSNOR se ha descrito en situaciones de estrés por herida, y el efecto opuesto se ha observado en tratamiento con SA (Díaz y col., 2003). Mediante inmunocitoquímica y observación al microscopio electrónico se observó que el GSNO se localizaba en peroxisomas y cloroplastos en el mesófilo. A su vez el GSH se localizaba en todos los compartimentos celulares, incluidos los peroxisomas y pared celular de vasos del xilema, lo que sugiere que puede regular la producción de H_2O_2 probablemente a través del ciclo ascorbato-glutation. La presencia de GSNO en los peroxisomas sugiere la existencia de actividad GSNOR en estos orgánulos, donde ya se ha descrito la producción de NO (Corpas y col., 2004).

El estudio del acúmulo de NO en secciones transversales de raíces y hojas demostró un patrón similar al descrito con ROS en plantas control, siendo máxima la producción en haces vasculares. La elevada producción de NO en células del xilema podría ser el resultado de procesos de apoptosis que tienen lugar en este tipo de células durante el proceso de diferenciación del xilema (Gabaldón y col., 2005). Gabaldón y

col., (2005) han demostrado que este proceso lleva consigo un *burst* de NO, si bien la fuente de NO no está clara ya que la producción de NO era parcialmente inhibida por L-NAME y no por aminoguanidina. Respecto a la reducción de la producción en el cortex de raíces y mesófilo de hojas podría deberse a procesos de senescencia acelerada por el metal (Sandalio y col., 2001; Romero-Puertas y col., 2002). La reducción de la producción de NO en maduración de frutos y senescencia ha sido previamente establecida por Leshem y col., (1998) y recientemente corroborada en hojas senescentes de guisante (Corpas y col., 2004). El aumento de la emisión de etileno dependiente del Cd en raíces y hojas corrobora la inducción de senescencia por el metal.

El NO, es un radical libre considerado como antioxidante, por su capacidad para combinarse con el radical O_2^- y prevenir daños oxidativos (Delledonne y col., 2001; Romero-Puertas y Delledone, 2003). La sobreproducción de O_2^- junto con la reducción de NO, provocadas por el Cd, podrían favorecer la aparición de daños oxidativos. Esta idea es apoyada por el hecho de que la restauración de los niveles de NO por adición de Ca^{2+} producía una reducción de la producción de O_2^- en hojas de guisante y *Arabidopsis*. El papel protector del NO frente al Cd y Pb, salinidad y paraquat se ha observado en raíces de *Lupinus luteus*, (Kopyra y Gwózdź, 2003) y frente al Cd en hojas de *Helianthus annuus* (Laspina y col., 2005). En plantas de *Lupinus* el uso de donadores de NO reducía también la producción de O_2^- dependiente del Cd (Kopyra y Gwózdź, 2003). El NO es además una molécula señal implicada en la respuesta de defensa de la planta frente a diferentes situaciones de estrés (Romero-Puertas y Delledonne, 2003) y desequilibrios en la proporción de los niveles de O_2^- /NO también podrían interferir en el mecanismo de transducción de señales frente a estrés (Delledonne y col., 2001).

La producción de ROS y NO a nivel de xilema y epidermis en raíces y xilema, epidermis y esclerénquima en hojas, además de estar relacionada con procesos de lignificación y apoptosis, podría estar implicada en la transducción de señales celulares frente a situaciones de estrés para activar respuestas de defensa en el resto de los tejidos. De especial interés es la producción de ROS y NO en esclerénquima que hasta la fecha no había sido descrita y cuya función se desconoce. La acumulación de proteínas de defensa relacionadas con la patogénesis (PRPs) se ha demostrado en el floema y en

epidermis, (Wubben y col., 1996; Lee y Hwang, 2003), lo que sugiere la participación de estos tejidos en la defensa de la planta frente a situaciones de estrés biótico y abiótico. Sin embargo, la localización de transcritos de una PRP, la PrP-4a en cortes transversales de hojas de guisante mediante hibridación *in situ* puso de manifiesto que la expresión de dicha proteína tenía lugar exclusivamente en el mesófilo y no en tejidos vasculares, ni epidermis, ni en el esclerénquima, lo que cuestiona el papel de estos tejidos en la defensa frente a metales pesados. El esclerénquima es un tejido de soporte y la mayor producción de ROS y NO en estas células podría estar relacionada con el engrosamiento de la pared celular y reforzamiento de la estructura de la hoja en situaciones de estrés.

La Respuesta Celular Frente al Cd Puede Estar Mediada por Etileno, Jasmónico y Salicílico

Con objeto de profundizar en los mecanismos implicados en la respuesta celular frente a la toxicidad por Cd, se ha analizado el contenido de jasmónico y salicílico y la emisión de etileno en hojas y raíces de plantas de guisante. El JA es una oxilipina que puede actuar como una señal inter e intracelular en respuesta a patógenos y a herida (Wasternack y Parthier, 1997), pero también frente a estrés abiótico por luz UV, u ozono (Devoto y Turner, 2005). El análisis de este compuesto en raíces de guisante demostró la presencia de la forma libre, el JA y su forma metilada, el MeJA, sólo en plantas tratadas con Cd, siendo la forma metilada la que predominaba. En hojas sin embargo, no se detectó la forma libre pero si se detectó el MeJA en plantas control cuyo contenido se incrementaba por efecto del tratamiento con Cd. El incremento de jasmonatos dependiente de Cd y Cu también se ha descrito en plantas de *Arabidopsis* y *Phaseolus coccineus* (Maksymiec y col., 2005). El JA se obtiene a partir del ácido linolénico en peroxisomas y su producción está asociada con daños a membranas y peroxidación lipídica, por tanto su incremento podría deberse a los daños oxidativos dependientes del Cd observados en membranas de raíces y también en hojas (Sandalio y col., 2001). El incremento de la producción de JA Me por Cd podría también deberse al incremento de la población de peroxisomas inducida por el metal (McCarthy y col., 2001). La implicación del JA en la regulación génica en respuesta al Cd se ha descrito en

Arabidopsis donde el JA induce la expresión de genes implicados en la síntesis de GSH y fitoquelatinas (Xiang y Oliver, 1998). Por otro lado, la activación de los receptores de JA, dependientes de patógenos, se ha demostrado que dependen de ROS (McDowell y Dangl, 2000; Garrido y col., 2003). El incremento de los niveles de JA podría contribuir a la toxicidad de metales ya que se ha observado que el tratamiento con jasmonatos aumenta los niveles de H₂O₂, peroxidación lipídica y la actividad lipoxigenasa en plantas de *Arabidopsis* (Wang y Wu, 2005; Maksymiec y col., 2007).

El etileno desempeña un papel pleiotrópico en el desarrollo y crecimiento de la planta y está implicado en numerosos procesos incluyendo germinación, senescencia y maduración de frutos, pero también participa en una variedad de respuestas de defensa (Guo y Ecker, 2004; Arteca y Arteca, 2007). El tratamiento con Cd también estimula la producción de ET en hojas y raíces. La emisión de etileno también se incrementa en células y plantas de *Daucus carota* (Sanità di Toppi y col., 1998) y en plantas de *Arabidopsis* (Arteca y Arteca, 2007) en respuesta al Cd, y la inhibición de la producción de etileno por AVG reduce la actividad fitoquelatina sintetasa en plantas de *Daucus carota* (Sanità di Toppi y col., 1998). No obstante, la relación molecular entre Cd y biosíntesis de ET no ha sido establecida, aunque se ha especulado que el ET podría inducirse como consecuencia de daños a membranas inducidos por el metal (Sanita di Toppi y Gabbrielli, 1999). Leshem y col., (1998) establecieron la existencia de un antagonismo entre el NO y el ET, lo que podría explicar la reducción de NO y el aumento de ET observado en esta Memoria. Lindermayr y col., (2005) han demostrado que la metionina adenosil transferasa (MAT1), implicada en la biosíntesis de etileno, se inhibe reversiblemente por S-nitrosilación, por tanto, en presencia de NO se favorecería la inhibición de la enzima y la reducción de S-adenosil metionina, necesario para la biosíntesis de ET. De esta forma, la reducción de la producción de NO dependiente de Cd, observada en este trabajo, podría ser responsable de la activación de la MAT1 dando lugar a un incremento de la biosíntesis de ET. El aumento de ET y de JA en respuesta al Cd concuerda con la inducción de senescencia dependiente del metal, previamente observada en plantas de guisante (Sandalio y col., 2001; McCarthy y col., 2001; Romero-Puertas y col., 2002).

El ácido salicílico (SA) desempeña un papel importante en la transducción de señales celulares, especialmente en la respuesta hipersensible (Álvarez, 2000). El incremento de SA observado en raíces de guisante sugiere que esta hormona podría regular la respuesta de la planta al metal, sin embargo, en hojas no parece tener relevancia ya que los niveles de SA y SAME se reducían por efecto del Cd. Otra diferencia entre ambos órganos es la forma en que se encuentra esta molécula, así en hojas se encuentra fundamentalmente en forma libre (SA), mientras que la forma mayoritaria en raíces era la forma conjugada (SAME). El SA se ha observado que tiene efecto protector en diferentes condiciones de estrés como luz UV, altas temperaturas, salinidad o sequía (Yalpani y col., 1994; Janda y col., 1999; Mishra y Choudhuri, 1999) y recientemente también se ha descrito que puede proteger frente al Cd (Metwally y col., 2003), sin embargo, los mecanismos responsables de este efecto protector no se conocen bien. Metwally y col., (2003) han sugerido que el SA podría aliviar la toxicidad del Cd a través de la inducción de sistemas de reparación de daños celulares.

Inducción de Proteínas de Defensa Frente al Cadmio

Las proteínas de defensa (PRPs) son un grupo amplio y complejo de proteínas intra y extracelulares que se acumulan en los tejidos de la planta tras el ataque de un patógeno o bajo determinadas condiciones de estrés abiótico (Van Loon, 1985). Se han clasificado en varios grupos atendiendo a sus propiedades bioquímicas e inmunológicas (Kombrink y Somssich, 1997). De alguna de estas proteínas se desconoce su función biológica, y por tanto su papel en la defensa de la planta, como es el caso de las PR-1.

Las PR-1 fueron las primeras en identificarse (Antoniw y Pierpoint, 1978) y se sabe que se inducen frente a hongos (Niderman y col., 1995; Rauscher y col., 1999) y que también juegan un papel importante en la respuesta en determinadas situaciones de estrés abiótico, aunque su función es desconocida. El SA es un componente esencial en la señal de regulación de la expresión de PR-1 en estrés biótico y abiótico (Dempsey y Klessig 1994, Klessig y Malamy, 1994; Klessig y col., 2000), al igual que ocurre con las ROS (Klessig y col., 2000), sin embargo, existe gran controversia sobre si la señal del SA tiene lugar antes o después de la señal de ROS (Klessig y col., 2000). En hojas de plantas

de *Arabidopsis* tratadas con cadmio, no se detectó alteraciones en la expresión de la PR-1, ni en plantas silvestres ni en mutantes deficientes en NADPH oxidasa. Este hecho podría deberse a una posible reducción de los niveles de SA inducida por el metal, tal y como se ha observado en hojas de plantas de guisante en esta Memoria. La adición de Ca^{2+} exógeno tenía un efecto negativo sobre el nivel de transcritos de la PR1, tanto en plantas de *Arabidopsis* silvestres como en los mutantes DF, independientemente del Cd. Estos resultados demuestran que la regulación de estas proteínas es más compleja y no solo intervienen las ROS, SA y el Ca^{2+} . Probablemente el balance hormonal está también implicado.

Las quitinasas son enzimas que catalizan la ruptura de los enlaces de dos residuos de N-acetil- β -D-glucosamina consecutivos, presentes en los polímeros de N-acetilglucosamina, en quitina (Kasprzewska, 2003). Las quitinasas están implicadas en procesos relacionados con la defensa de la planta o estrés en general, así como en procesos de crecimiento y desarrollo (Kasprzewska, 2003). Las plantas superiores presentan 7 clases de quitinasas diferentes que difieren en la estructura de la proteína, sustrato específico, mecanismos de catálisis y sensibilidad a inhibidores (Kasprzewska, 2003). Las plantas de guisante tratadas con cadmio, mostraron un aumento de la expresión de la quitinasa I. Incrementos en la actividad de esta proteína también se han detectado en hojas de la misma especie vegetal expuesta al Cd (Metwally y col., 2003). Esta enzima también se induce en situaciones de estrés osmótico (Tateishi y col., 2001), por bajas temperaturas (Stressmann y col., 2004) y herida (Wu y Bradford, 2003). En cuanto a la regulación de la quitinasa I parece no existir un patrón general, ya que varía en función del tipo de estrés y de la especie vegetal. En el caso de herida en *Solanum lycopersicon*, parece que la quitinasa está regulada por la vía del JA (Wu y Bradford, 2003), mientras que en el caso de plantas de guisante tratadas con Cd, se ha visto que la adición de SA exógeno produce una disminución de la actividad quitinasa (Metwally y col., 2003). Por otro lado, los promotores de las quitinasas de clase I de muchas especies vegetales, presentan elementos de respuesta al ET y se ha observado que la expresión de dichas proteínas se induce tras el tratamiento con ET exógeno (Ohme-Takagi y col.,

2000; Kasprzewska, 2003). Los incrementos de ET y JAME observados en esta Memoria, en respuesta al Cd, podrían ser responsables de la inducción de la expresión de quitinasa observada en hojas de guisante.

Las PR-4 son quitinasas de clase I y II, que se diferencian en la presencia (clase I) o ausencia (clase II) de un dominio N-terminal, que se corresponde con la heveína madura, una pequeña proteína antifúngica aislada del latex del árbol de caucho (Broekaert y col., 1990). La PrP-4a es una quitinasa de clase I, cuya expresión se indujo en hojas de guisante tratadas con Cd. La CBP20, incluida en el grupo de las PR-4 también se inducía a nivel transcripcional por metales, incluyendo el Cd, y daños mecánicos en plantas de *Nicotiana* (Hensel y col., 1999). Resultados similares se han observado en otras situaciones de estrés abiótico por luz UV y ozono en plantas de guisante (Savénstrand y col., 2000), por herida y luz UV en *Nicotiana tabacum* (Ponstein y col., 1994) y en zonas de abscisión de hojas de *Solanum lycopersicon* (Harris y col., 1997) y *Prunus persica* (Rupert y col., 2002). La expresión de PRP-4a está regulada por una vía dependiente de JA y/o ET e independiente de SA (Chung y col., 2005; Thomma y col., 2001). El aumento del ET inducido por el Cd podría ser el responsable de la inducción de la expresión de PrP-4a, lo que coincide con los resultados obtenidos por Chung y col., (2005) en *Brassica rapa pekinensis*. Mediante hibridación *in situ*, se observó que la localización de la expresión de PrP-4a en hojas de guisante, tenía lugar mayoritariamente en el citoplasma de células del mesófilo, observándose una clara inducción del nivel de transcritos por efecto del Cd, lo que sugiere que las células del mesófilo son las más afectadas por la toxicidad del metal en las hojas. Por el contrario, en epidermis, xilema y esclerenquima no se observó acúmulo de transcritos, a pesar de localizarse en estas células la mayor producción de ROS, aunque si se observó una señal leve en células del parénquima asociadas al xilema.

Las HSP-70s (Heat Shock Protein 70 kDa), son chaperonas moleculares de plantas, que constituyen una familia multigénica cuyos miembros están regulados durante el desarrollo de la planta y diferencialmente expresados en respuesta a estrés térmico o a otras situaciones que producen una interrupción del plegamiento normal de proteínas o que conducen a la desnaturalización de las mismas tales como estrés

oxidativo, metales pesados, o salinidad (Sung y col., 2001; Miller y Mittler, 2006). El Cd produjo un incremento en la expresión de la HSP 71.2 citosólica de guisante, probablemente como consecuencia del aumento de H_2O_2 , ya que parece que los factores de transcripción que las regulan actúan como sensores directos del H_2O_2 (Miller y Mittler, 2006). El análisis de la expresión de otra proteína de choque térmico peroxisomal, la HSP 15,7, en plantas de *Arabidopsis* mostró una inducción de la misma en las plantas silvestres en presencia de Cd, mientras que en las mutantes deficientes en NADPH oxidasa no se observó variación alguna en los niveles de mensajero, lo que corrobora el papel de las ROS en la regulación de las HSPs (Miller y Mittler, 2006). Por otro lado, el tratamiento de dichas plantas con calcio exógeno, revertía la inducción por Cd de la HSP 15,7 en plantas silvestres y no modificaba su expresión en los mutantes lo que demuestra que el Ca^{2+} no interviene directamente en la activación de estos genes, pero sí indirectamente favoreciendo la producción de NO y a su vez reduciendo los niveles de ROS. El aumento de JAME, observado en plantas de guisante tratadas con Cd, también podría intervenir en la inducción de la expresión de la HSP-71,2, ya que se ha observado que en *Arabidopsis* el tratamiento con JA, induce la expresión de HSP 70 (Cheong y col., 2002). El incremento de la HSP 17,0 por Cd y otros metales (Hg^{2+} , Cu^{2+}) ha sido descrito en plantas de *Solanum lycopersicon* y *Silene* (Wollgiehn y Neumann, 1999) y en una búsqueda de genes que modifican su expresión por Cd en *Arabidopsis*, se ha observado una inducción de genes implicados en plegamiento de proteínas, como la SSP81-3, la HSC-G8 y el CdI 16 (isomerasa cis-trans) (Suzuki y col., 2001). Las HSP también se expresan en respuesta a distintos tipos de estreses bióticos y abióticos, como herida, choque osmótico o luz (Wang y col., 2004) y en estrés oxidativo (Ma y col., 2006). Concretamente, la HSP 15,7 de *Arabidopsis* se induce por estrés térmico y estrés oxidativo y se localiza en peroxisomas (Ma y col., 2006). Estas proteínas podrían actuar como chaperonas previniendo la agregación de proteínas dañadas por oxidación (Ma y col., 2006), lo que sugiere que en parte, la toxicidad del metal se debe a la inducción de desnaturalización de proteínas.

La fenilalanina amonio liasa (PAL) es una enzima clave en el metabolismo de los fenilpropanoides de plantas. Está implicada en la síntesis de una gran variedad de

metabolitos secundarios importantes para el crecimiento normal de la planta y para la respuesta a estrés biótico y abiótico (Lee y col., 2003). La PAL se induce en situaciones de estrés abiótico como UV, paraquat, herida, y frente a JA y ET (Lee y col., 2003); sin embargo, en plantas tratadas con cadmio no se observó inducción de dicha enzima. En plantas de *Nicotiana tabacum* se ha descrito que el NO y el H₂O₂ inducen la actividad PAL conjuntamente, pero no por separado (de Pinto y col., 2002). En plantas de *Taxus baccata* también se ha demostrado que la expresión de PAL es dependiente de NO y el acúmulo de sus transcritos se inhibe por la adición de secuestradores de NO (Wang y Wu, 2005).

El Cd por tanto, induce proteínas de defensa posiblemente a través de rutas de señalización mediadas por JA, ET y ROS, aunque los mecanismos concretos no se conocen, podría ser el resultado de la convergencia de diferentes rutas de señalización. La inducción de PRPs, tanto frente a patógenos como estrés abiótico sugiere que diferentes situaciones pueden compartir los mismos efectores de regulación génica dando lugar a la inducción del mismo grupo de genes. El incremento de JA, ET, inducción de proteínas de defensa y reducción de NO, provocadas por el Cd, tiene lugar también en procesos de senescencia (Leshem y col., 1998; Obregón y col., 2001).

Papel de los Peroxisomas en la Respuesta al Cd

Los peroxisomas son una fuente importante de ROS y NO (del Río y col., 2006). En trabajos previos se ha demostrado que el Cd induce cambios en los niveles de antioxidantes de los peroxisomas y un incremento en la producción de H₂O₂ que se debía fundamentalmente a un incremento de la actividad glicolato oxidasa (GOX) (McCarthy y col., 2001; Romero-Puertas y col., 2004a). Como se ha indicado en el apartado de Introducción, el H₂O₂ desempeña una doble función en situaciones de estrés, así puede inducir estrés oxidativo con daños a macromoléculas (proteínas, membranas y DNA), pero también puede actuar como molécula señal induciendo la respuesta celular frente a condiciones adversas. El NO también es una molécula señal y a su vez puede regular la actividad de un gran número de proteínas mediante nitrosilación de grupos SH (Wang y col., 2006). Teniendo en cuenta que el Cd reduce la

acumulación de NO en hojas, se abordó el estudio del patrón de proteínas *S*-nitrosiladas en peroxisomas. En orgánulos purificados de plantas control se detectó la presencia de al menos 5 proteínas *S*-nitrosiladas mediante electroforesis desnaturizante en una dimensión, de estas proteínas al menos tres se reducían en intensidad por efecto del tratamiento con Cd. Esta reducción de la *S*-nitrosilación de proteínas concuerda con la reducción de la producción de NO anteriormente observada y sugiere modificaciones postraduccionales dependientes de NO e inducidas por el metal, de algunas proteínas peroxisomales. Mediante análisis bidimensional de las proteínas susceptibles de *S*-nitrosilación en peroxisomas, se pudo observar la existencia de al menos 18 proteínas o grupos de proteínas, sin embargo, el rendimiento en proteína de las manchas no fue suficiente para poder identificar las mismas por análisis en *Malditof*, por lo que este estudio se abordará en un futuro. No obstante, en base a su pI, peso molecular y presencia de isoformas, se puede especular que la proteína mayoritaria (mancha 1) puede ser la catalasa. En células animales (Dobashi y col., 1997) y en vegetales (Clark y col., 2000) se ha demostrado que la CAT se inhibe por NO de una forma reversible, si bien no se ha establecido si este efecto negativo del NO está determinado por procesos de *S*-nitrosilación. No obstante, en hígado de rata se ha observado que la catalasa se *S*-nitrosila tras la incubación con GSNO (Foster y Stamler, 2004). Respecto a la proteína de 18 kDa, la única proteína de peroxisomas con este peso molecular descrita en estos orgánulos es un citocromo tipo b presente en la membrana del peroxisoma y que está implicado en la producción de O_2^- en la membrana del orgánulo (López-Huertas y col., 1999). La *S*-nitrosilación del grupo hemo del citocromo c ha sido demostrada en mitocondrias de células animales durante la apoptosis (Schonhoff y col., 2003). La *S*-nitrosilación en peroxisomas está favorecida por la presencia en estos orgánulos de una fuente de NO, una actividad tipo NOS (Barroso y col., 1999; Corpas y col., 2004), y como se ha demostrado en esta memoria por la presencia de un pool de GSH y en menor medida de GSNO. La presencia de GSNO en estos orgánulos sugiere la existencia de actividad GSNOR que podría regular los niveles de su sustrato y por tanto regular la actividad de proteínas dependientes de *S*-nitrosilación.

La nitrosilación de grupos SH de proteínas hoy día se acepta como una modificación postraduccional de gran relevancia, del mismo orden que la fosforilación, en la regulación de procesos celulares. Sin embargo es escasa la información disponible sobre las proteínas susceptibles de nitrosilación y la función fisiológica de esta modificación postraduccional. Recientemente Lindermayr y col., (2005) han realizado un estudio de proteómica en células y hojas de *Arabidopsis* y han podido identificar al menos 52 proteínas que pueden nitrosilarse, entre ellas están proteínas relacionadas con estrés, metabolismo redox, señalización, citoesqueleto y procesos metabólicos. De estas proteínas, la gliceraldehído 3-P-deshidrogenasa y la metionina adenosil transferasa, se ha demostrado que se inhiben de una forma reversible por nitrosilación (Lindermayr y col., 2005, 2006). Recientemente se ha demostrado que la metacaspasa 9 de *Arabidopsis* se mantiene inactiva por nitrosilación y se activa por desnitrosilación, de esta forma la nitrosilación puede regular aquellos procesos en los que las metacaspasas están implicadas (Belenghi y col., 2007).

Con objeto de determinar la función del H₂O₂ de origen peroxisomal en respuesta al Cd, en esta Memoria se ha abordado la obtención de mutantes de *Arabidopsis* deficientes en GOX mediante la técnica de RNA de interferencia. Dado que esta actividad es necesaria para la fotorrespiración y teniendo en cuenta que existen 6 genes que codifican esta proteína, se ha procedido a la obtención de dos mutantes que tienen bloqueados 2 y 3 genes, respectivamente. De esta forma, se permite la supervivencia de la planta con niveles bajos de GOX. Una vez caracterizados ambos mutantes, se cruzarán las dos líneas seleccionadas para obtener un mutante que sólo exprese 1 gen de GOX, lo que permitirá realizar estudios de cambios en la expresión génica en plantas deficientes en esta fuente de H₂O₂ y por tanto, establecer el papel señalizador de esta molécula en distintas situaciones de estrés. Durante el desarrollo de esta Memoria de Tesis se ha podido caracterizar parcialmente uno de estos mutantes, la Goxi-I que expresa 4 de las 6 GOX presentes en *Arabidopsis*. Los mutantes Goxi-I mostraban una reducción de la actividad GOX del 17% y una reducción de la tasa fotosintética de un 35%, respecto a las plantas silvestres. No se observaron diferencias fenotípicas en cuanto al número y tamaño de las hojas, aunque en mutantes Goxi-I la

floración se adelanta casi una semana respecto a las plantas silvestres. Respecto a las mutantes Goxi-II, actualmente se encuentran en fase de caracterización.

Los peroxisomas intervienen en muchos procesos metabólicos que se encuentran compartimentalizados, lo cual implica un flujo de sustratos entre distintos orgánulos celulares y un posible papel regulador indirecto de los peroxisomas sobre otras vías metabólicas (Tolbert y col., 1987). Por otro lado, los peroxisomas son una buena fuente de ROS y NO y contienen una amplia batería de antioxidantes, lo que les confiere un papel esencial en procesos de señalización y de desintoxicación celular en situaciones de estrés. En los últimos años se ha observado un interés creciente por el estudio de la dinámica de los orgánulos y en particular de los peroxisomas, sin embargo la mayoría de estos trabajos se han centrado en el estudio del citoesqueleto y las proteínas de unión de los orgánulos al mismo. Por el contrario, no tenemos constancia de ningún estudio de movimiento de peroxisomas en situaciones de estrés y de la regulación del mismo. En esta Memoria se ha demostrado que el Cd aumenta considerablemente la velocidad de movimiento de los peroxisomas en plantas de *Arabidopsis*, con respecto a las plantas sin tratar. Esta tendencia se mantenía en todos los ensayos realizados, variando el nivel de aumento en función de la edad de la planta, condiciones de cultivo y duración del tratamiento, siendo en general más acusada a las 24 y 48 horas del tratamiento con Cd.

Con objeto de determinar que factores determinan el cambio del movimiento en respuesta al Cd, las plantas se sometieron a tratamientos con diversos agentes químicos. Así la incubación con ASC, potente secuestrador de ROS, condujo a una reducción del movimiento tanto en plantas controles como en las tratadas con Cd, revertiéndose los efectos sobre el movimiento causados por el Cd, lo que sugiere que el movimiento de los peroxisomas está regulado por modificaciones en la producción endógena de ROS en las células. Esta constituye la primera referencia tanto en tejidos vegetales como animales de la regulación del movimiento de los peroxisomas por ROS. El aumento del movimiento de los peroxisomas en estas condiciones, podría explicarse en base a tres supuestos: 1) facilitar el importe de proteínas o compuestos relacionados con cambios metabólicos en el orgánulo impuestos por el estrés por el metal. Así, el Cd se ha

demostrado que promueve la interconversión de peroxisomas tipo hoja a glioxisomas, lo que implica cambios importantes en el contenido de proteínas del orgánulo. 2) Los peroxisomas pueden actuar en la protección frente a daños oxidativos en la célula gracias a la batería de antioxidantes presentes en el orgánulo. En este sentido, un aumento de la producción de ROS podría dirigir y regular el movimiento de los orgánulos para mejorar la eficiencia en la eliminación de ROS y la protección frente a daños oxidativos. 3) La producción endógena de ROS en el orgánulo podría regular el movimiento del orgánulo para facilitar procesos de señalización, interconexión entre otros orgánulos y en definitiva regular la respuesta de defensa de la planta frente al estrés.

El papel del calcio en la regulación del movimiento de los peroxisomas es complejo. Así, el cultivo de las plantas con un aporte exógeno de Ca^{2+} producía incremento de la velocidad de los orgánulos en plantas control, hasta alcanzar la velocidad en plantas tratadas con Cd, pero no modificaba la velocidad en plantas expuestas al metal. Sin embargo, la adición de EGTA, que actúa como quelante de Ca^{2+} , reducía el movimiento de los orgánulos en plantas tratadas con Cd hasta alcanzar los mismos niveles observados en plantas control. Estos resultados sugieren que el movimiento de los peroxisomas puede estar diferencialmente regulado por el Ca^{2+} en condiciones fisiológicas normales y en situaciones de estrés. Las diferencias observadas entre plantas control y tratadas con Cd podrían deberse al papel desempeñado por distintos reservorios endógenos de Ca^{2+} , o bien puede que existan distintos sensores de Ca^{2+} que interaccionan con las proteínas motoras. El movimiento de los orgánulos también es dependiente del citoesqueleto y a su vez, la dinámica del mismo está regulada por GTPasas y MAPKs (Wasteneys y Yang, 2004). Existen evidencias que sugieren que metales como el Al pueden afectar al citoesqueleto, especialmente a los microtúbulos (Blancaflor y col., 1998; Sivaguru y col., 1999). En células vegetales se ha observado que las corrientes citoplasmáticas se regulan por los niveles de Ca^{2+} , de manera que altas concentraciones de este elemento producen inhibición reversible de las corrientes (Yokota y col., 1999). Este hecho podría deberse a la inactivación de una proteína quinasa sensible a altas concentraciones de Ca^{2+} , que a su vez es responsable de la

fosforilación de la miosina (Yokota y col., 1999). La miosina de 135 kDa del tubo polínico de *Lilium longiflorum* regula su actividad a través del Ca^{2+} mediante la CaM unida a la molécula (Yokota y col., 1999). En este sentido una reducción del Ca^{2+} y de la CaM mediada por Cd, podría explicar el aumento de la velocidad de los peroxisomas en estrés por Cd, como consecuencia de una activación de la miosina por fosforilación, sin embargo, no explica los resultados obtenidos con la adición de Ca^{2+} exógeno. Recientemente se ha descrito la presencia de miosina XI en peroxisomas de *Arabidopsis* con una masa molecular de 170 kDa (Hashimoto y col., 2005), si bien no se ha descrito que pueda estar asociada a CaM. También se ha demostrado la presencia en estos orgánulos de proteínas quinasas (Dammann y col., 2003). En células animales se ha observado el cese del movimiento de mitocondrias y ER como consecuencia de un aumento de los niveles de Ca^{2+} y reducción del contenido de ATP (Broud y col., 2005). El requerimiento de ATP para el movimiento de mitocondrias también se ha demostrado en plantas de *Arabidopsis* (Logan y Leaver, 2000).

Interrelación Calcio, ROS y NO en la Respuesta Celular Frente al Cd

El cadmio produce alteraciones en la entrada y distribución de macro y microelementos en plantas (Sandalo y col., 2001; Metwally y col., 2005). Uno de estos elementos es el Ca^{2+} , cuyo contenido se reduce tanto en raíces, como en hojas en presencia de Cd y otros metales pesados (Metwally y col., 2005; Perfus-Barbeoch y col., 2002). En trabajos previos se observó que este elemento se reducía en plantas de guisante expuestas a CdCl_2 50 μM durante 15 días, en concreto, en raíces la reducción era de 1,53 veces, mientras que en la hoja esta reducción era superior, de 2,3 veces respecto a las plantas control. El Ca^{2+} es un elemento esencial para mantener la integridad de las membranas, la división celular y también es clave en la transducción de señales celulares (White y Broadley, 2003). Existen evidencias de que los efectos fitotóxicos del Cd se reducen por aporte exógeno de Ca^{2+} si bien, los mecanismos implicados no se conocen con exactitud. Ambos elementos, Cd y Ca^{2+} compiten por los canales de transporte a la célula (Perfus-Barbeoch y col., 2002), por la unión a determinadas proteínas que son

dependientes de Ca^{2+} (Rivetta y col., 1997), o bien por la unión a la membrana plasmática (Kinraide 1998).

A lo largo de esta Memoria de Tesis, se ha demostrado que el Cd induce una acumulación de ROS y una reducción de NO, y que la adición exógena de Ca^{2+} revierte ambos procesos. En la figura 5.1 se muestra un esquema que muestra las posibles relaciones entre el Ca^{2+} , ROS y NO y su papel en la regulación de la respuesta celular al Cd. Según este esquema, el Cd provocaría, entre otros efectos, una reducción del contenido de Ca^{2+} y como consecuencia de ello, pueden tener lugar alteraciones en la expresión de algunas proteínas, como la CuZn-SOD lo que conlleva la reducción de la defensa antioxidante de la célula, o bien la inactivación de algunas proteínas dependientes de Ca^{2+} -CaM, entre ellas la CAT y las quinasas. Una de estas proteínas dependiente de Ca^{2+} y CaM es la NOS, que en estas condiciones podría inactivarse bien por la falta de Ca^{2+} , bien por la unión del Cd a la CaM. Ello explicaría la reducción de la producción de NO en respuesta al Cd. A su vez, la reducción del contenido de NO podría alterar la actividad de proteínas que se regulan por nitrosilación, entre estas proteínas, la MAT1, implicada en la biosíntesis de ET. Esta enzima en su forma nitrosilada es inactiva y la reducción de NO podría activar la proteína por desnitrosilación, lo que explicaría el aumento de la síntesis de ET observado. El NO ya hemos mencionado que actúa como antioxidante al reaccionar con el O_2^- , por tanto, una reducción de la producción de NO podría promover un incremento de los niveles de ROS. A su vez, el incremento de la producción de ROS promueve daños oxidativos a macromoléculas. Entre ellos, la peroxidación lipídica que puede considerarse como promotor de la síntesis de JA. La inducción de JA, ET y ROS desencadenaría una respuesta de defensa celular que conlleva la inducción de proteínas de defensa (PRPs) que podrían intervenir en la reparación de proteínas dañadas por el tratamiento con el metal.

Este esquema demuestra la interrelación del Ca^{2+} con la producción de ROS y NO en respuesta al Cd y la regulación de la respuesta de defensa de la planta frente al metal. Este esquema permite relacionar entre sí procesos que habían sido estudiados de una forma independiente en distintas especies vegetales y aporta nuevas vías para el

entendimiento de la toxicidad del metal que implican al Ca^{2+} , ROS y NO. El estudio de reservorios endógenos de Ca^{2+} será de gran utilidad en el conocimiento de la regulación de la respuesta celular frente a metales pesados. En este sentido, recientemente se ha descrito en células animales que los peroxisomas pueden actuar como reservorio de Ca^{2+} (Raychaudhury y col., 2006), este papel de los peroxisomas está completamente inexplorado y su participación en la regulación de los niveles endógenos de este elemento podría ser de gran relevancia en la respuesta al estrés por metales pesados y otros agentes abióticos.

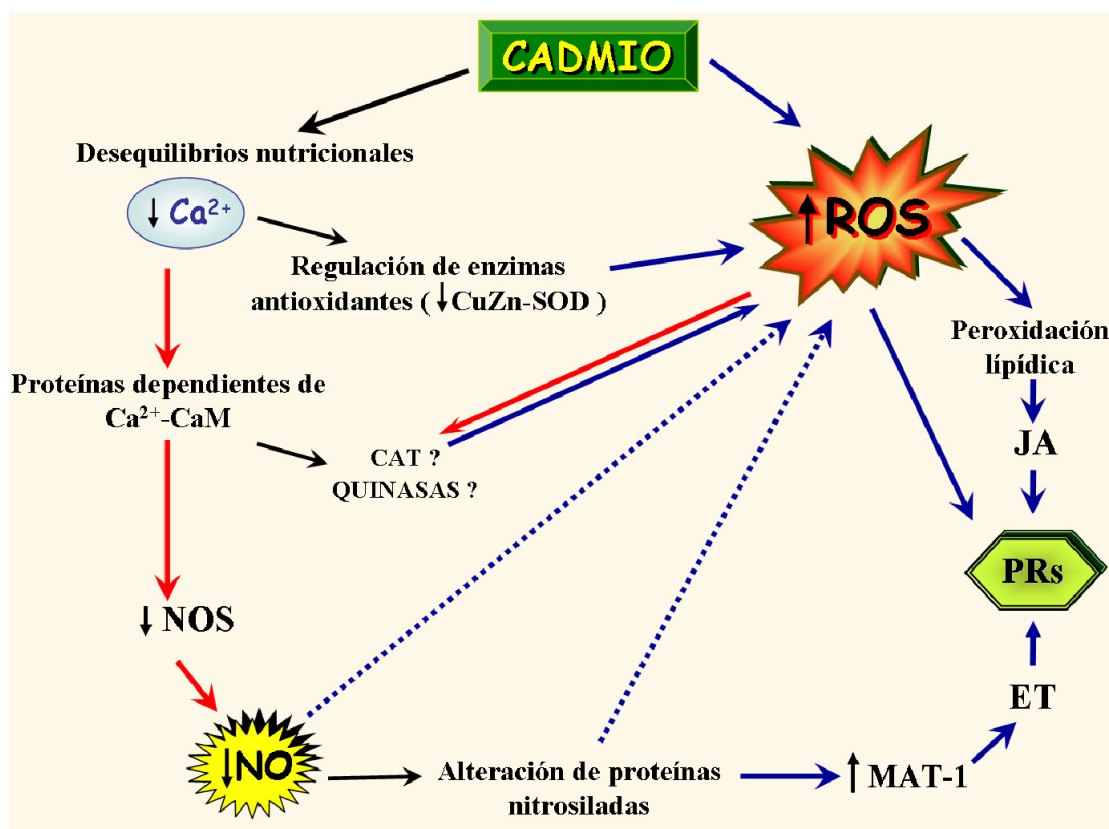


Figura 5.1: Esquema de las posibles relaciones entre el Ca^{2+} , ROS y NO y su papel en la regulación de la respuesta celular al Cd. Las flechas rojas indican represión y las azules inducción.

CONCLUSIONES

1. En plantas de guisante el Cd produce estrés oxidativo en raíces y hojas como consecuencia de la reducción de las defensas antioxidantes y del incremento de la relación ROS/NO. En ambos órganos, la reducción de la producción de NO podría deberse a la inhibición de la actividad NOS por una deficiencia de Ca^{2+} , y el aumento de ROS parece estar asociado a NADPH oxidasas de membrana y peroxidasas, y es dependiente de Ca^{2+} y de procesos de fosforilación/desfosforilación de proteínas. En el caso de la raíz, estas alteraciones conducen a modificaciones de la estructura de la misma que afectan especialmente a la organización del xilema.
2. El incremento de la producción de ROS, la reducción de la producción de NO y el aumento de la emisión de etileno y producción de JA, inducidas por el Cd, sugiere que este metal promueve una aceleración de la senescencia.
3. El Cd provoca una respuesta similar a la descrita en patógenos y otros factores abióticos que se caracteriza por la inducción de proteínas de defensa, algunas de ellas implicadas en el ensamblaje de proteínas y en la prevención de agregación de proteínas dañadas. La regulación de la expresión de estas proteínas es dependiente de ROS y Ca^{2+} , y probablemente de cambios en los niveles de jasmónico, etileno y salicílico. La acumulación de estas proteínas tiene lugar en el mesófilo lo que sugiere que este tejido es el más afectado por la toxicidad del Cd.
4. El Cd promueve una aceleración del movimiento de los peroxisomas que es dependiente de la producción endógena de ROS y de los niveles de Ca^{2+} , que podría estar relacionada con la defensa celular frente al estrés oxidativo generado por el metal.
5. El Ca^{2+} desempeña un importante papel en la toxicidad del Cd. La deficiencia de este elemento inducida por el Cd, regula la expresión de sistemas antioxidantes como la CuZn-SOD, y la funcionalidad de algunas proteínas como la NOS. Indirectamente, el Ca^{2+} regularía la actividad de proteínas a través de procesos de *S*-nitrosilación/*S*-desnitrosilación.

BIBLIOGRAFÍA

- Aebi H** (1984) Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* **105**: 121-126
- Affek HP, Yakir D** (2002) Protection by isoprene against singlet oxygen in leaves. *Plant Physiol* **129**: 269-277
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG** (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* **357**: 593-615
- Alfenito MR, Souere, 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
- Ali G, Srivastava PS, Iqbal M** (2000) Influence of cadmium and zinc on growth and photosynthesis of *Bacopa monniera* cultivated *in vitro*. *Biol Plant* **43**: 599-601
- Alloway BJ, Steinnes E** (1999) Antropogenic additions of cadmium to soils. Capítulo 5. En: *Cadmium in Soils and Plants*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands
- Alscher RG, Erturk N, Lenwood SH** (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* **53**: 1331-1341
- Alvarez ME** (2000) Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol Biol* **44**: 429-442
- Anbar M, Neta P** (1967) A compilation of specific biomolecular rate constants for the reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals with inorganic and organic compounds in aqueous solution. *Int J Appl Radiat Isot* **18**: 493-523
- Anderson JV, Hess JL, Chevone BI** (1990) Purification, characterization, and immunological properties of two isoforms of glutathione reductase from Eastern white pine needles. *Plant Physiol* **94**: 1402-1409
- Annanyev G, Reuger G, Wacker V, Klimov V** (1994) The photoproduction of superoxide radicals and the superoxide dismutase activity of photosystem II. The possible involvement of cytochrome *b559*. *Photosyn Res* **41**: 327-338
- Antoniw JF, Pierpoint WS** (1978) Purification of a tobacco leaf protein associated with resistance to virus infection. *Biochem Soc Trans* **6**: 248-250
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373-399
- Apostol I, Heinstein PF, Low PS** (1989) Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Role in defense and signal transduction. *Plant Physiol* **90**: 109-116
- Aravind P, Prasad MNV** (2005) Cadmium-Zinc interactions in a hydroponic system using *Ceratophyllum demersum* L.: adaptive ecophysiology, biochemistry and molecular toxicology. *Braz J Plant Physiol* **17**: 3-20
- Arnér ESJ, Holgren A** (2000) Physiological function of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* **267**: 6102-6109
- Arouma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J** (1989) The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Rad Biol Med* **6**: 593-597
- Arteca RN, Arteca JM** (2007) Heavy-metal-induced ethylene production in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol* doi:10.1016/j.jplph.2006.09.006
- Asada K** (1984) Chloroplast: Formation of active oxygen and its scavenging. *Methods Enzymol* **105**: 422-429
- Asada K** (1992) Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide- scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* **85**: 235-241
- Asada K** (1994) Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. En: *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants* (Foyer CH, Mullineaux PM eds.), pp 77-104. CRC Press, Boca Raton
- Asada K, Takahashi M** (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. En: *Photoinhibition*. (Kyle DJ, Osmond CB, Arntzen CJ, eds.), pp 227-287. Elsevier, Amsterdam
- Astolfi S, Zuchi S, Passera C** (2005) Effect of cadmium on H(+)-ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from roots of

different S-supplied maize (*Zea mays* L.) plants. *Plant Sci* **169**: 361-368

Axelsen K, Palmgren M (2001) Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **126**: 696-706

Baier M, Dietz KJ (1999) Protective function of chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in photosynthesis. Evidence from transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **119**: 1407-1414

Baker A, Graham IA, Holdsworth M, Smith SM, Theodoulou FL (2006) Chewing the fat: β -oxidation in signaling and development. *TRENDS Plant Sci* **11**: 124-132

Baker AJM, Graham I (2002) *Plant Peroxisomes, Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications*. (Baker A, Graham I, eds), pp 221-258. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands

Baker AJM, McGrath SP, Sidoli CMD, Reeves RD (1994) The possibility of *in situ* heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metalaccumulating plants. *Resources Conserv Recycl* **11**: 41-49

Balestrasse KB, Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML (2003) Effect on cadmium stress on nitrogen metabolism in nodules and roots of soybean plants. *Func Plant Biol* **30**: 57-64

Balestrasse KB, Gallego SM, Tomaro ML (2004) Cadmium-induced senescence in nodules of soybean (*Glycine max* L.) plants. *Plant Soil* **262**: 373-381

Barceló J, Poschenrieder C, Andreu I, Gunsé B (1986) Cadmium-induced decrease of water stress resistance in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender). I. Effects of Cd on water potential, relative water content and cell wall elasticity. *J Plant Physiol* **125**: 17-25

Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A, Sandalio LM, Valderrama R, Palma JM, Lupiáñez JA, del Río LA (1999) Localization of nitric oxide synthase in plant peroxisomes. *J Biol Chem* **274**: 36729-36733

Barth C, Moeder W, Klessig DF, Conklin PL (2004) The timing of senescence and response to pathogens is altered in the ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant vitamin c-1. *Plant Physiol* **134**: 1784-1792

Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase. Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* **44**: 276-287

Beckman JS, Koppenol W (1996) NO[•], O₂⁻ and ONOO⁻: the good, the bad and the ugly. *Am J Physiol* **271**: C1424

Beevers H (1982) Glyoxysomes in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* **38**: 243-253

Belenghi B, Romero-Puertas MC, Vercammen D, Brackenier A, Inzé D, Delledonne M, Breusegem FV (2007) Metacaspase Activity of *Arabidopsis thaliana* Is Regulated by S-Nitrosylation of a Critical Cysteine Residue. *J Biol Chem* **282**: 1352-1358

Benavides MP, Gallego SM, Tomaro M (2005) Cadmium toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol* **17**: 21-34

Berna B, Bernier F (1999) Regulation by biotic and abiotic stress of a wheat germin gene encoding oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme. *Plant Mol Biol* **39**: 539-549

Bestwick CS, Brown IR, Bennett MHR, Mansfield JW (1997) Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Plant Cell* **9**: 209-221

Blancaflor EB, Jones DL, Gilroy S (1998) Alterations in the Cytoskeleton Accompany Aluminum-Induced Growth Inhibition and Morphological Changes in Primary Roots of Maize *Plant Physiol* **118**: 159-172

Blee KA, Choi JW, O'connel AP, Schuch W, Lewis NG, Bolwell GP (2003) A lignin-specific peroxidase in tobacco whose antisense suppression lead to vascular tissue modification. *Phytochem* **64**: 163-176

Blum WH (1997) Cadmium uptake by higher plants. En: *Proceedings of extended abstracts from the Fourth International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements*, pp 109-110. Berkeley, USA. University of California

Bodannes RS, Chan PC (1979) Ascorbic acid as a scavenger of singlet oxygen. *FEBS Lett* **105**: 195-196

- Bolwell GP** (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 287-294
- Bolwell GP, Buti VS, Davies DR, Zimmerlin A** (1995) The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radic Res* **23**: 517-532
- Bolwell GP, Wojtaszek P** (1997) Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence - a broad perspective. *Physiol Mol Plant Pathol* **51**: 347-366
- Bonini C, D'Auria M, Ferri R** (2002) Singlet oxygen mediated degradation of lignin. Isolation of oxidation products from steam-exploded lignin from pine. *Photochem Photobiol Sci* **1**: 570-573
- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M** (1990) Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* **106**: 343-355
- Boveris A** (1984) Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol* **105**: 429-435
- Bowditch ML, Donaldson RP** (1990) Ascorbate free-radical reduction by glyoxisomes membranes. *Plant Physiol* **94**: 531-537
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive Method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Brandizzi F, Fricker M, Hawes C** (2002) A greener world: The revolution of plant bioimaging. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 520-530
- Breidenbach RW, Beevers H** (1967) Association of glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particles from castor bean endosperm. *Biophys Biochem Res Comm* **27**: 462-469
- Brewer EP, Saunders JA, Angle JS, Chaney RL, McIntosh MS** (1999) Somatic hybridization between the zinc accumulator *Thlaspi caerulescens* and *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* **99**: 761-771
- Broekaert W, Lee H, Kush A, Chua NH, Raikhel NV** (1990) Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Proc Natl Acad Sci* **87**: 7633-7637
- Brooks RR** (1998) Plants that hyperaccumulate heavy metals. CAB International, Wallingford, UK
- Brough D, Schell MJ, Irvine RF** (2005) Agonist-induced regulation of mitochondrial and endoplasmic reticulum motility. *Biochem J* **392**: 291-297
- Brul S, Nussbaum SK, Dielbandhoesing SK** (1997) Fluorescent probes for wall porosity and membrana integrity in filamentous fungi. *J Microbiol Methods* **28**: 169-178
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL** (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, 15501 Monona Drive, Rockville, MD 20855-2768 USA
- Buege JA, Aust SD** (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* **52**: 302-310
- Buettner GR** (1989) Spin trapping of hydroxyl radical. En: *Handbook of Methods for oxygen radical research* (RA Greenwald ed.) pp 151-155. CRC Pres, Boca Raton
- Bunkelmann R, Trelease RN** (1996) Ascorbate peroxidase. A prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes. *Plant Physiol* **110**: 589-598
- Butt** (1980) Metabolism and Respiration. En: *The Biochemistry of Plants* (David D, Davies eds.), Vol. 2, capítulo 3. Academic Press
- Cabot C, Poschenrieder CH, Barceló J** (1988a) Cadmio I. Presencia natural y antropogénica del Cd en el medio ambiente. *Cir Far* **298**: 91-108
- Cabot C, Poschenrieder CH, Barceló J** (1988b) Cadmio II. El Cd en los seres vivos. *Cir Far* **300**: 233-252
- Cardinaels C, Put C, Van Asche F, Clijsters H** (1984) The superoxide dismutase as a biochemical indicator, discriminating between zinc and cadmium toxicity. *Biol Plant* **40**: 131-135
- Casano LM, Gómez LD, Lascano HR, González CA, Trippi VS** (1997) Inactivation and degradation of CuZn-SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photooxidative stress. *Plant Cell Physiol* **38**: 433-440

- Castillo MC, Martínez C, Buchala A, Metraux JP Y León J** (2004) Gene-specific involvement of β -oxidation in wound-activated responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **135**: 85-94
- Chance B, Sies H, Boveris A** (1979) Hydroperoxide metabolism in mamalian organs. *Physiol Rev* **59**: 527-535
- Chen A, Komives EA, Schroeder JI** (2006) An improved grafting technique for mature *Arabidopsis* plants demonstrates long-distance shoot-to-root transport of phytochelatin in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **141**: 108-120
- Chen GX, Asada K** (1989) Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiol* **30**: 987-998
- Cheong YH, Chang HS, Gupta CR, Wang X, Zhu T, Luan S** (2002) Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **129**: 661-677
- Cho U, Seo N** (2004) Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Sci* **168**: 113-120
- Choi SM, Jeong SW, Jeong WJ, Kwon SY, Chow WS, Park YI** (2002) Chloroplast Cu/Zn-superoxide dismutase in highly sensitive site in cucumber leaves chilled in the light. *Planta* **216**: 315-324
- Chomczynski P, Sacchi N** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *N Anal Biochem* **162**: 156
- Christensen TH, Haug PM** (1999) Solid phase cadmium and the reactions of aqueous cadmium with soil surfaces. Capítulo 4. En: *Cadmium in Soils and Plants*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands
- Chung SY, Lee KA, Oh KJ, Cho TJ** (2005) Molecular characterization of PR4 gene in Chinese cabbage. *Integrative Biosciences* **9**: 239-244
- Chuong SD, Mullen RT, Muench DG** (2002) Identification of a rice RNA- and microtubule-binding protein as the multifunctional protein, a peroxisomal enzyme involved in the beta - oxidation of fatty acids. *J Biol Chem* **277**: 2419-2429
- Clark D, Durner J, Navarre DA, Klessig DF** (2000) Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 1380-1384
- Clark D, Durner J, Navarre DA, Klessig DF** (2000) Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 1380-1384
- Clarkson DT, Lüttge U** (1989) Mineral nutrition. Divalent cations, transport and compartmentalization. *Prog Bot* **51**: 93-112
- Clemens S** (2006) Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* **88**: 1707-1719
- Clemens S, Antosiewicz DM, Ward JM, Schachtman DP, Schroeder JI** (1998) The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12043-12048
- Clemens S, Palmgren MG, Krämer U** (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci* **7**: 309-315
- Clementi E** (1998) Role of nitric oxide and its intracellular signalling pathway in the control of Ca^{2+} homeostasis. *Biochem Pharmacol* **55**: 713-718
- Cobbett CS** (2000) Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 211-216
- Cobbett CS, Goldsbrough P** (2002) Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **53**: 159-182
- Collings DA, DI Harper J, Marc J, Overall RL Mullen RT** (2002) Life in the fast lane: actin-based motility of plant peroxisomes *Can J Bot* **80**: 430-441
- Conklin PL, Barth C** (2004) Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant Cell Environm* **27**: 959-970
- Connolly EL, Fett JP, Guerinot ML** (2002) Expression of the IRT1 metal transporter is

controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* **14**: 1347-1357

Córdoba-Pedregosa MD, Córdoba F, Villalba JM, González-Reyes JA (2003) Differential distribution of ascorbic acid, peroxidase activity, and hydrogen peroxide along the root axis in *Allium cepa* L. and its possible relationship with cell growth and differentiation. *Protoplasma* **221**: 57-65

Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Quirós M, León AM, Romero-Puertas MC, Esteban FJ, Valderrama R, Palma JM, Sandalio LM, Gómez M Y del Río LA (2004) Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiol* **136**: 2722-2733

Corpas FJ, Barroso JB, del Río LA (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci* **6**: 145-150

Corpas FJ, Barroso JB, Sandalio LM, Distefano S, Palma JM, Lupiáñez JA, del Río LA (1998a) A dehydrogenase-mediated recycling system of NADPH in plant peroxisomes. *Biochem J* **330**: 777-784

Corpas FJ, Barroso JB, Sandalio LM, Palma JM, Lupiáñez JA, del Río LA (1999) Peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase. Characterization and activity regulation during natural senescence. *Plant Physiol* **11**: 921-928

Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Valderrama R, Palma JM, León AM, Sandalio LM, del Río LA (2006) Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta* **224**: 246-54

Corpas FJ, Gómez M, del Río LA (1989) Actividad xantina oxidoreductasa (formas O y D) en peroxisomas de *Vigna unguiculata* L. XVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Bioquímica (Alicante): Abst. 22-5

Correa-Aragund N, Graziano M, Lamattina L (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* **218**: 900-905

Creissen G, Edwards EA, Enard C, Wellburn A, Mullineaux PM (1992) Molecular characterization of glutathione reductase cDNAs from pea (*Pisum sativum* L.) *Plant J* **2**: 129-131

Creissen G, Edwards EA, Mullineaux PM (1994) Glutathione reductase and ascorbate peroxidase. En: *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants* (Foyer CH, Mullineaux PM, eds), pp 343-364. CRC press, Inc

Creissen G, Firmin J, Fryer M, Kular K, Leyland N, Reynolds H, Pastori G, Wellburn F, Baker N, Wellburn A, Mullineaux PM (1999) Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplast of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *Plant Cell* **11**: 1277-1291

Creissen G, Jiménez A, Mullineaux PM (2001) Characterization and genetic manipulation of dehydroascorbate reductase in *Arabidopsis thaliana*. En: *Oxygen, Free Radicals and Oxidative Stress in Plants*. Nice

Creissen G, Mullineaux PM (2002) The Molecular Biology of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Higher Plants. En: *Oxidative Stress in Plants* (Inzé D, Van Montagu M, eds), pp 247-269. Taylor and Francis, London

Cueto M, Hernández-Perera O, Martín R, Bentura ML, Rodrigo J, Lamas S, Golavano MP (1996) Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Lett* **398**: 159-164

Dahmani-Müller, H, Van Oort F, Gélie B, Balabane M (2000) Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environ Pollut* **109**: 231-238

Dalurzo HC, Sandalio LM, Gómez M, del Río LA (1997) Cadmium infiltration of detached pea leaves: effect on its activated oxygen metabolism. *Phyton* **37**: 59-64

Dammann C, Rojo E, Sánchez-Serrano JJ (1997) Abscisic acid and jasmonic acid activate wound-inducible genes in potato through separate organ-specific signal transduction pathways. *Plant J* **11**: 773-782

Dammann, C, Ichida, A, Hong, BM, Romanowsky SM, Hrabak EM, Harmon AC, Pickard BG, Harper JF (2003) Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein

kinase isoforms from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **132**: 1840-1848

Das P, Samantaray S, Rout GR (1997) Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environ Pollut* **98**: 29-36

Dat JF, Vandenberghe S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* **57**: 779-795

De Duve C (1965) Function of microbodies (peroxisomes). *J Cell Biol* **27**: 25

de Duve C, Baudhuin P (1966) Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* **46**: 323-357

de Gara L, Pinto MC, Arrigoni O (1997) Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. *Physiol Plant* **100**: 894-900

de Pinto MC, Tommasi F, De Gara L (2002) Changes in the antioxidant systems as part of the signalling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco bright-yellow 2 cells. *Plant Physiol* **130**: 698-708

Dean JW, Harper JE (1988) The conversion of nitrite to nitrogen oxide(s) by the constitutive NAD(P)H-nitrate reductase enzyme from soybean. *Plant Physiol* **88**: 389-395

Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585-588

Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 13454-9

Dempsey DA, Klessig DF (1994) Salicylic acid, active oxygen species and systemic acquired resistance in plants. *Trends Cell Biol* **4**: 334-338

Desikan R, Mackerness S, Hancock JT, Neill SJ (2001) Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol* **127**: 159-72

Devoto A, Turner JG (2003) Regulation of jasmonate-mediated plant responses in *Arabidopsis*. *Annals of Botany* **9**: 329-337

Devoto A, Turner JG (2005) Jasmonate-regulated *Arabidopsis* stress signalling network. *Physiol Plant* **123**: 161-172

Díaz M, Achkor H, Titarenko E, Martínez MC (2003) The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. *FEBS Lett* **543**: 136-9

Dietz KJ, Jacob S, Oelze ML, Laxa M, Tognetti V, de Miranda SM, Baier M, Finkemeier I (2006) The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *J Exp Bot* **57**: 1697-1709

Dipierro S, Borranccino G (1991) Dehydroascorbate reductase from potato tubers. *Phytochem* **30**: 427-429

Dixit V, Pandey V, Shyam R (2001) Differential oxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L cv. Azad). *J Exp Bot* **52**: 1101-1109

Dixit V, Pandey V, Shyam R (2001) Differential oxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L cv. Azad). *J Exp Bot* **52**: 1101-1109

Dobashi K, Pahan K, Chahal A, Singh I (1997) Modulation of endogenous antioxidant enzymes by nitric oxide in rat C6 glial cells. *J Neurochem* **68**: 1896-1903

Domínguez-Solís JR, Gutiérrez-Alcalá G, Vega JM, Romero LC, Gotor C (2001) The cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance. *J Biol Chem* **276**: 31474-31474

Domínguez-Solís JR, López-Martin MC, Ager FJ, Ynsa MD, Romero LC, Gotor C (2004) Increased cysteine availability is essential for cadmium tolerance and accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnol J* **2**: 469-476

Donaldson RP (1982) Nicotinamide cofactors (NAD and NADP) in glyoxysomes, mitochondria, and plastids isolated from castor bean endosperm. *Arch Biochem Biophys* **215**: 274-279

Donaldson RP (1986) Transfer of reducing equivalents (electrons) through the peroxysomal membrane during β -oxidation glyoxylate cycle,

- and the conversion of triglyceride to hexose. En: *Models in Plant Biochemistry* (Newman DW ed), CRC Press
- Donelly JK, Robinson DS** (1995) Free radicals in foods. *Free Radic Res* **22**: 147-173
- Douce R, Heldt H-W** (2000) Photorespiration. En: *Photosynthesis: physiology and metabolism* (Leegood RC, Sharkey TD, von Cammerer S, eds) pp 115-136. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holland
- Douce R, Neuburger M** (1999) Biochemical dissection of photorespiration. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 214-222
- Doulis AG, Donahue JL, Alscher RG** (1998) Differential responses to paraquat-induced oxidative injury in a pea (*Pisum sativum*) protoplast system. *Physiol Plant* **102**: 461-471
- Drazkiewicz M, Skorzynska-Polit E, Krupa Z** (2007) The redox state and activity of superoxide dismutase classes in *Arabidopsis thaliana* under cadmium or copper stress. *Chemosphere* **67**: 188-193
- Droillard M, Paulin A** (1990) Isozymes of superoxide dismutase in mitochondria and peroxisomes isolated from petals of carnation (*Dianthus caryophyllus*) during senescence. *Plant Physiol* **94**: 1187-1192
- Durceková K, Huttová J, Mistrík I, Ollé M, Tamás L** (2007) Cadmium induces premature xylogenesis in barley roots. *Plant Soil* **290**: 61-68
- Durner J, Klessig DF** (1999) Nitric oxide as a signal in plants. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 369-374
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF** (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 10328-10333
- Eastmond PJ, Germain V, Lange PR, Bryce JH, Smith SM, Graham IA** (2000) Post-germinative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 5669-5674
- Ecker JR** (1995) The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* **268**: 667-675
- Edwards EA, Rawsthorne S, Mullineaux PM** (1990) Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* **180**: 278-284
- Eide DJ** (2004) The SLC39 family of metal ion transporters. *Pflügers Arch* **447**: 796-800
- Elstner EF** (1987) Metabolism of activated oxygen species. En: *The Biochemistry of Plants* (Davis DD, ed.), pp 253-315. Academic Press, San Diego
- Escher CL, Widmer F** (1997) Lipid mobilization and gluconeogenesis in plants: do glyoxylate cycle enzyme activities constitute a real cycle? A hypothesis. *Biol Chem* **378**: 803-813
- Fergusson JE** (1990) *The Heavy Elements: Chemistry, Environmental impact and Health effects*. Pergamon Press, Oxford
- Fernández MR, Biosca JA, Parés X** (2003) S-nitrosoglutathione reductase activity of human and yeast glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and its nuclear and cytoplasmic localisation. *Cell Mol Life Sci* **60**: 1013-1018
- Ferrer MA, Ros Barcelo A** (1999) Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H₂O₂ production by the xylem of *Zinnia elegans*. *Plant Cell Environ* **22**: 891-897
- Fink B, Laude K, McCann L, Doughan A, Harrison DG, Dikalov S** (2004) Detection of intracellular superoxide formation in endothelial cells and intact tissues using dihydroethidium and an HPLC-based assay. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**: 895-902
- Fodor A, Szabó-Nagy A, Erdei L** (1995) The effects of cadmium on the fluidity and H⁺-ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots. *J Plant Physiol* **14**: 787-792
- Foissner I, Wendehenne D, Langebartels C, Durner J** (2000) *In vivo* imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *Plant J* **23**: 817-824
- Fornazier RF, Ferreira RR, Vitória AP, Molina SMG, Lea PJ, Azevedo RA** (2002) Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities in sugar cane. *Biol Plant* **45**: 91-97
- Foster MW, Stamler JS** (2004) New insights into protein S-nitrosylation. Mitochondria as a model. *J Biol Chem* **279**: 25891-25897

- Foyer CH** (2001) Prospects for enhancement of the soluble antioxidants, ascorbate and glutathione. *Biofactors* **15**: 75-78
- Foyer CH, Halliwell B** (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**: 21-25
- Foyer CH, Halliwell B** (1977) Purification and properties of dehydroascorbate reductase from spinach leaves. *Phytochem* **16**: 1347-1350
- Foyer CH, Lelandais M, Galap C, Kunert KJ** (1991) Effects of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *Plant Physiol* **97**: 863-872
- Foyer CH, López-Delgado H, Dat JF, Scott IM** (1997) Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol Plant* **100**: 241-254
- Foyer CH, Noctor G** (2000) Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytol* **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 Environ* **28**: 1056-1071
- Frausto Da Silva JJR, Williams RJP** (2001) The Biological Chemistry of the Elements, second ed., Clarendon Press, Oxford
- Fridovich I** (1983) Superoxide radical. An endogenous toxicant. *Ann Rev Pharmacol* **23**: 239-257
- Fridovich I** (1986) Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* **247**: 1-11
- Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 436-442
- Gabaldon C, Gomez Ros LV, Pedreno MA, Ros Barcelo A** (2005) Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans*. *New Phytol* **165**: 121-130
- Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML** (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci* **121**: 151-159
- Garces H, Durzan D, Pedroso MC** (2001) Mechanical stress elicits nitric oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot* **87**: 567-574
- García-Mata C, Gay R, Sokolovski S, Hills A, Lamattina L, Blatt MR** (2003) Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signalling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 11116-11121
- Garnier L, Simon-Plas F, Thuleau P, Agnel JP, Blein JP, Ranjeva R, Montillet JL** (2006) Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. *Plant Cell Environ* **29**: 1956-1969
- Garrido I, Espinosa F, Córdoba-Pedregosa MG, González-Reyes JA, Alvarez-Tinaut MC** (2003) Redox-related peroxidative responses evoked by methyl-jasmonate in axenically cultured aeroponic sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedling roots. *Protoplasma* **221**: 79-91
- 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. *Cell Mol Life Sci* **59**: 708-714
- Gechev T, Willekens H, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W, Toneva V, Minkov I** (2003) Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *J Plant Physiol* **160**: 509-515
- Gelhaye E, Rouhier N, Navrot N, Jaquot JP** (2005) The plant thioredoxin system. *Cell Mol Life Sci* **62**: 24-35
- Goldbol DL, Hutterman A** (1985) Effect of zinc, cadmium and mercury on root elongation on *Picea abies* (Karst.) seedlings and the significance of these metals to forest die-back. *Environ Pollut* **38**: 375-381
- Gong JM, Lee DA, Schroeder JI** (2003) Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatin and cadmium in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 10118-10123

- González E, Brush MD, Maeshima M** (1987) The alkaline lipase of the glyoxysomal membrane is a glycoprotein. En: *Peroxisomes in Biology and Medicine* (Fahimi HD, Sies H eds), pp 141-151. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg
- González-Flecha B, Boveris A** (1995) Mitochondrial sites of hydrogen peroxide production in reperfused rat kidney cortex. *Biochim Biophys Acta* **1243**: 361-366
- Gotte G, Amelio E, Russo S, Marlinghaus E, Musci G, Suzuki H** (2002) Short-time non-enzymatic nitric oxide synthesis from L-arginine and hydrogen peroxide induced by shock waves treatment. *FEBS Lett* **520**: 153-155
- Gouia H, Ghorbal MH, Meyer C** (2000) Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of nitrate assimilation pathway in bean. *Plant Physiol Biochem* **38**: 629-638
- Gould KS, Lamote O, Klinguer A, Pugin A, Wendehenne D** (2003) Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant Cell Environ* **26**: 1851-1862
- Grant JJ, Loake GJ** (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signalling in disease resistance. *Plant Physiol* **124**: 21-29
- Green CE, Chaney RL, Bouwkamp J** (2003) Interactions between cadmium uptake and phytotoxic levels of zinc in hard red spring wheat. *J Plant Nutr* **26**: 417-430
- Gries GE, Wagner GJ** (1998). Association of nickel versus transport of cadmium and calcium in tonoplast vesicles of oat roots. *Planta* **204**: 390-396
- Griffith OW** (1980) Determination of glutathione disulfide using glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* **180**: 278-284
- Grill E, Löffler S, Winnacker E-L, Zenk MH** (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 6838-6842
- Groover A, Jones AM** (1999) Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiol* **119**: 375-384
- Groppa MD, Tomaro ML, Benavides MP** (2001) Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Sci* **161**: 481-488
- Grotz N, Fox T, Connolly E, Park W, Gueriot ML, Eide D** (1989) Identification of a family of zinc transporter genes from Arabidopsis that respond to zinc deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7220-7224
- Grün S, Lindermayr C, Sell S, Durner J** (2006) Nitric oxide and gene regulation in plants. *J Exp Bot* **57**: 507-516
- Gueriot ML** (2000) The ZIP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta* **1465**: 190-198
- Guo F, Okamoto M, Crawford NM** (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signalling. *Science* **302**: 100-103
- Guo H, Ecker JR**. (2004) The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 40-49
- Gupta R, Luan S** (2003) Redox control of protein tyrosine phosphatases and mitogen-activated protein kinases in plants. *Plant Physiol* **132**: 1149-1152
- Guy CL, Carter JV** (1984) Characterization of partially purified glutathione reductase from coldhardened and nonhardened spinach leaf tissue. *Cryobiology* **21**: 454-464
- Halliwell B, Foyer CH** (1976) Ascorbic acid, metal ions and the superoxide radical. *Biochem J* **155**: 697-700
- Halliwell B, Gutteridge JMC** (1989) *Free radicals in Biology and Medicine*, 2^a Ed. Oxford University Press, London
- Halliwell B, Gutteridge JMC** (1992) Biologically relevant metal ion dependent OH. *FEBS Lett* **307**: 108
- Halliwell B, Gutteridge JMC** (2000) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, London
- Hamer D** (1986) Metallothionein. *Annu Rev Biochem* **55**: 913-951

- Hammond-Kosack K, Jones JDG** (2000) Responses to plant pathogens. En: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. (Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, eds.) pp 1102-156. Rockville, MD: Am. Soc. Plant Physiol
- Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Biol Mol* **166**: 557-580
- Hanks JF, Tolbert NE, Schubert KR** (1981) Localization of enzymes of ureide biosynthesis in peroxisomes and microsomes of nodules. *Plant Physiol* **68**: 65-69
- Hanson MR, Kohler RH** (2001) Apr: GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants. *J Exp Bot* **52**: 529-39
- Harris N, Taylor JE, Roberts JA** (1997) Characterization and expression of an mRNA encoding a wound-induced (Win) protein from ethylene-treated tomato leaf abscission zone tissue. *J Exp Bot* **48**: 1223-1227
- Hashimoto K, Igarashi H, Mano S, Nishimura M, Shimmen T, Yokota E** (2005) Peroxisomal localization of a myosin XI isoform in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **46**: 782-789
- Hawes CR, Satiat-Jeunemaitre B** (2001) Trekking along the cytoskeleton. *Plant Physiol* **125**: 119-122
- Hayashi T, Sawa K, Kawasaki M, Arisawa M, Shimizu M, Morita M** (1988) Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *J Nat Prod* **51**: 345-348
- He J, Kang H, Yan F, Chen C** (2004) The endoplasmic reticulum-related events in S-nitrosoglutathione-induced neurotoxicity in cerebellar granule cells. *Brain Res* **1015**: 25-33
- He Y, Tang RH, Hao Y, Robert D. Stevens RD, Cook CW, Ahn SM, Jing L, Yang Z, Chen L, Guo F, Fiorani F, Jackson RB, Crawford NM, Pei ZM** (2004) Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* **305**: 1968-1971
- Helmke PA** (1999) En: *Cadmium in Soils and Plants*, Capitulo 3. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands
- Henry YA, Ducastel B, Guissani A** (1997) Basic chemistry of nitric oxide and related nitrogen oxides. En: *Nitric Oxide Research from Chemistry to Biology* (Henry YA, Guissani A, Ducastel B, ed.), pp 15-46. Landes Co. Biomed. Publ., Austin, USA
- Hensel G, Kunze G, Kunze I** (1999) Expression of the tobacco gene CBP20 in response to developmental stage, wounding, salicylic acid and heavy metals. *Plant Sci* **148**: 165-174
- Herbert M, Burkhard C, Schnarrenberger C** (1979) A survey for isoenzymes of glucosephosphate isomerase, phosphoglucomutase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in C₃-, C₄-, and CAM-plants and green algae. *Planta* **145**: 95-104
- Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS** (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 150-166
- Hewitt EJ** (1966) Sand and water culture Methods used in the study of plant nutrition. Technical Communication No. 22 (revised 2nd Edition), 237-315. *Commonwealth Agricultural Bureaux*. Farnham Royal. Bucks. England
- Hoey BM, Butler J, Halliwell B** (1988) On the specificity of allopurinol and oxypurinol as inhibitors of xanthine oxidase. A pulse radiolysis determination of rate constants for reaction of allopurinol and oxypurinol with hydroxyl radicals. *Free Radic Res Commun* **4**: 259-263
- Hooks MA** (2002) Molecular biology, enzymology and physiology of β -oxidation. En: *Plant peroxisomes. Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications* (Baker A, Graham IA, eds.), pp. 19-55. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Horling F, Köning J, Dietz KJ** (2002) Type II peroxiredoxin C, a member of the peroxiredoxin family of *Arabidopsis thaliana*: its expression and activity in comparison with other peroxiredoxins. *Plant Physiol Biochem* **40**: 491-499
- Hossain MA, Asada K** (1984a) Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: Its

- protection by ascorbate. *Plant Cell Physiol* **25**: 1285-1295
- Hossain MA, Asada K** (1984b) Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant Cell Physiol* **25**: 85-92
- Howden R, Andersen CR, Goldsbrough PB, Cobbett C** (1995) A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **107**: 1067-1073
- Huang AHC, Trelease RN, Moore TS** (1983) *Plant Peroxisomes*. Academic Press, New York, NY. ISBN 0-12-358260-1
- Huang JS, Knopp JA** (1998) Involvement of nitric oxide in *Ralstonia solanacearum*-induced hypersensitive reaction in tobacco. En: *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*. (Prior P, Elphinstone J, Allen C Eds.), pp 218-224. INRA and Springer Editions, Berlin
- Huang S, Kerschbaum HH, Engel E, Hermann A** (1997) Biochemical characterization and histochemical localization of nitric oxide synthase in the nervous system of the snail, *Helix pomatia*. *J Neurochem* **69**: 2516-2528
- Huang X, Rad UV, Durner J** (2002) Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta* **215**: 914-923
- Huang X, Stettmaier K, Michel C, Hutzler P, Mueller MJ, Durner J** (2004) Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **218**: 938-946
- Hung SH, YU C-W, Lin CH** (2005) Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot Bull Acad Sin* **46**: 1-10
- Hussain D, Haydon MJ, Wang Y, Wong E, Sherson SM, Young J, Camakaris J, Harper JF, Cobbett CS** (2004) P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 1327-1339
- Iannelli MA, Pietrini F, Fiore L, Petrilli L, Massacci A** (2002) Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. *Plant Physiol Bioch* **40**: 977-982
- Inzé D, Van Montagu M** (1995) Oxidative stress in plants. *Curr Opin Biotechnol* **6**: 153-158
- Ishikawa T, Sakai K, Takeda T, Shigeoka S** (1996) Purification and characterization of cytosolic ascorbate peroxidase from komatsuna (*Brassica rapa*). *Plant Sci* **120**: 11-18
- Jablonski PP, Anderson JW** (1981) Light dependent reduction of dehydroascorbate by ruptured pea chloroplast. *Plant Physiol* **67**: 1239-1244
- Janda T, Szalai G, Tari I, Páldi E** (1999) Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta* **208**: 175-180
- Jansen RP** (1999) RNA-cytoskeletal associations. *FASEB J* **13**:455-66
- Jedd G, Chua NH** (2002) Visualization of peroxisomes in living plant cells reveals actomyosin-dependent cytoplasmic streaming and peroxisome budding. *Plant Cell Physiol* **43**: 384-92
- Jensen A, Bro-Rasmussen F** (1992) Environmental cadmium in Europe. *Rev Environ Cont Toxicol* **125**: 101-181
- Jiang LW, Bunkelmann J, Towill L, Kleff S, Trelease RN** (1994) Identification of peroxisome membrane proteins (PMPs) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) cotyledons and influence of light on the PMP developmental pattern. *Plant Physiol* **106**: 293-302
- 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 Physiol* **114**: 275-284
- Joliot P, Joliot A** (2006) Cyclic electron flow in C3 plants. *Biochim Biophys Acta* **175**: 362-368
- Jonak C, Ökresz L, Boögre L, Hirt H** (2002) Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signaling. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 415-424
- Kaminaka H, Morita S, Tokumoto M, Masumura T, Tanaka K** (1999) Differential gene expressions of rice superoxide dismutase isoforms to oxidative and environmental stresses. *Free Radic Res* **311**: S219-S225

- Kangasjarvi J, Jaspers P, Kollist H** (2005) Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Cell Environm* **28**: 1021-1036
- Kappus H, Sies H** (1981) Toxic drug effects associated with oxygen metabolism redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia* **37**: 1233-1241
- Kasprzewska A** (2003) Plant chitinases-regulation and function. *Cell Mol Biol Lett* **8**: 809-824
- Kato Y, Urano J, Maki Y, Ushimaru T** (1997) Purification and characterization of dehydroascorbate reductase from rice. *Plant Cell Physiol* **38**: 173-178
- Keller C, Hammer D** (2004) Metal availability and soil toxicity after repeated croppings of *Thlaspi caerulescens* in metal contaminated soils. *Environ Pollut* **131**: 243-254
- Keller T, Damude HG, Werner D, Doerner P, Dixon RA, Lamb C** (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell* **10**: 255-266
- Kerr MV, Groves D** (1975) Purification and properties of glycolate oxidase from *Pisum sativum* leaves. *Phytochem* **14**: 359-362
- Kiddle G, Pastori GM, Bernard S, Pignocchi C, Antoniw J, Verrier PJ, Foyer CH** (2003) Effects of leaf ascorbate content on defense and photosynthesis gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Antioxid Redox Signal* **5**: 23-32
- Kindl H, Lazarow PB** (1982) *Peroxisomes and glioxisomes*. The New York Academy of Sciences, 386. New York, NY. ISBN 0-89766-162-1
- Kinraide TB** (1998) Three mechanisms for the calcium alleviation of mineral toxicities. *Plant Physiol* **118**: 513-20
- Kinraide TB, Parker DR** (1987) Cation amelioration of aluminium toxicity in wheat. *Plant Physiol* **83**: 546-551
- Klepper LA** (1990) Comparison between NO_x evolution mechanisms of wild-type and nr1 mutant soybean leaves. *Plant Physiol* **93**: 26-32
- Klessig DF, Durner J, Noad R, Navarre DA, Wendehenne D, Kumar D, Zhou JM, Shah J, Zhang S, Kachroo P, Trifa Y, Pontier D, Lam E, Silva H** (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 8849-55
- Klessig DF, Malamy J** (1994) The salicylic acid signal in plants *Plant Mol. Biol* **26**: 1439-1458
- Klessig DF, Noad R, Navarre DA, Wendehenne D, Kumar D, Zhou JM, Shah J, Zhang S, Kachroo P, Trifa Y, Pontier D, Lam E, Silva H** (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 8849-55
- Knight H, Knight MR** (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci* **6**: 262-267
- Knowles RG, Moncada S** (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* **298**: 249-258
- Koh S, Andre A, Edwards H, Ehrhardt D, Somerville S** (2005) *Arabidopsis thaliana* subcellular responses to compatible *Erysiphe cichoracearum* infections. *Plant J* **44**: 516-29
- Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawaraha S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T** (1998b) Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem* **70**: 2446-2453
- Kojima H, Sakurai K, Kikuchi K, Kawaraha S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata YY, Nagano T** (1998a) Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chem Pharm Bull* **46**: 373-375
- Kombrink E, Somssich IE** (1997) Pathogenesis-related proteins and plant defense. En: *The Mycota V, Part A. Plant Relationships*, (Carroll G, Tudzynski P, eds), pp 107-128. Berlin: Springer-Verlag
- Koornneef M, Hanhart CJ, Van Der Veen JH** (1991) A genetic physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **229**: 57-66
- Kopyra M, Gwózdź EA** (2003) Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiol Biochem* **41**: 1011-1017

- Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot ML, Pakras HB** (1999) The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol Biol* **40**: 37-44
- Kovtun Y, Chiu W-L, Tena G, Sheen J** (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 2940-2945
- Krämer U, Chardonnens AN** (2001) The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**: 661-672
- Krinsky NO, Deneke SM** (1982) Interaction of oxygen and oxy-radical with carotenoids. *J Natl Cancer Inst* **69**: 205-210
- Kumar D, Klessig DF** (2000) Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. *Mol Plant Microbe Interact* **13**:347-351
- Kunau WH** (1998) Peroxisome biogenesis: from yeast to man. *Curr Opin Microbiol* **1**: 232-237
- Kuo MC, Kao CH** (2004) Antioxidant enzyme activities are upregulated in response to cadmium in sensitive, but not in tolerant, rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Bot Bull Acad Sin* **45**: 291-299
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lamattina L, García-Mata C, Graziano M, Pagnussat G** (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 109-136
- Lamb C, Dixon RA** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 251-275
- Landy A** (1989) Dynamic, structural, and regulatory aspects of 1 site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* **58**: 913-49
- Lanteri ML, Graziano M, Correa-Aragunde N, Lamattina L** (2006) From cell division to organ shape: Nitric oxide is involved in auxin-mediated root development. En: *Communication in Plants: Neuronal Aspects of Plant Life* (Baluska F, Mancuso S, Volkmann D eds.) pp. 309-320. Springer, Verlag
- 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 Physiol Biochem* **36**: 321-329
- Laspina NV, Groppa MD, Tomaro ML, Benavides MP** (2005) Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. *Plant sci* **169**: 323-330
- Lavid N, Barkay Z, Tel-Or E** (2001) Accumulation of heavy metals in epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae). *Planta* **212**: 313-322
- Lee BK, Park MR, Srinivas B, Chun JC, Kwon IS, Chum IM, Yoo NH, Choi KG, Yuun SJ** (2003) Induction of phenylalanine ammonia-lyase gene expression by paraquat and stress-related hormones in *Rebmannia glutinosa*. *Mol Cells* **16**: 34-39
- Lee SC, Hwang BK** (2003) Identification of the pepper SAR8.2 gene as a molecular marker for pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annum*. *Planta* **216**: 387-96
- Leita L, de Nobili M, Cesco S, Mondini C** (1996) Analysis of intercellular cadmium forms in roots and leaves of bush bean. *J Plant Nutr* **19**: 527-533
- Leon AM, Palma JM, Corpas FJ, Gomez M, Romero-Puertas MC, Chatterjee D, Mateos RM, del Rio LA, Sandalio LM** (2002) Antioxidative enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium. *Plant Physiol Bioch* **40**: 813-820
- Leshem YY** (2000) *Nitric oxide in plants: occurrence, function and use*. Kluwer Academic Press. Dordrecht, The Netherlands
- Leshem YY, Wills RBH, Veng-Va Ku V** (1998) Evidence for the function of the free radical gas-nitric oxide (NO) as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiol Biochem* **36**: 825-833
- Leterrier M, Corpas FJ, Barroso JB, Sandalio LM, del Río LA** (2005) Peroxisomal monodehydroascorbate reductase. Genomic

clone characterization and functional analysis under environmental stress conditions. *Plant Physiol* **138**: 2111-2123

Levine A, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A-G, Ahn B-W, Shaltiel S, Stadtman R (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* **186**: 464-478

Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583-593

Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E (1991) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* **233**: 346-363

Liebler DC (1998) Antioxidant chemistry of alpha-tocopherol in biological systems. Roles of redox cycles and metabolism. *Subcell Biochem* **30**: 301-317

Lindermayr C, Saalbach G, Bahnweg G, Durner J (2006) differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *J Biol Chem* **281**: 4285-4291

Lindermayr C, Saalbach G, Durner J (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **137**: 921-930

Lisenbee CS, Lingard MJ, Trelease RN (2005) *Arabidopsis* peroxisomes possess functionally redundant membrane and matrix isoforms of monodehydroascorbate reductase. *Plant J* **43**: 900-914

Liu X, Thiele DJ (1996) Oxidative stress induces heat shock factor phosphorylation and HSF-dependent activation of yeast methionine gene transcription. *Genes Develop* **10**: 592-603

Lledías F, Rangel P, Hansberg W (1998) Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem* **273**: 10630-10637

Logan DC, Leaver CJ (2000) Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells *J Exp Bot* **51**: 865-871

Lombi E, Zhao FJ, Dunham SJ, McGrath SP (2000) Cadmium accumulation in populations of

Thlaspi caerulescens and *Thlaspi goesingense*. *New Phytol* **145**: 11-20

López-Bucio J, Cruz-Ramirez A, Herrera-Estrella L (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture *Curr Opin Plant Biol* **6**: 280-287

López-Huertas E, Baker A (1999b) Peroxisome biogenesis. En: *Transport of molecules across microbial membranes*. Cambridge UK, pp 204-238. Cambridge University Press

López-Huertas E, Charlton WL, Johnson B, Graham IA, Baker A (2000) Stress induces peroxisome biogenesis genes. *EMBO J* **19**: 6770-6777

López-Huertas E, Corpas FJ, Sandalio LM, del Río LA (1999a) Characterization of membrane polypeptides from pea leaf peroxisomes involved in superoxide radical generation. *Biochem J* **337**: 531-536

López-Huertas E, Sandalio LM, del Río LA (1995) Integral membranes polypeptides of pea leaf peroxisomes: Characterization and response to plant stress. *Plant Physiol Biochem* **33**: 295-302

Low PS, Merida JR (1996) The oxidative burst in plant defense: Function and signal. *Physiol Plant* **96**: 533-542

Lozano-Rodríguez E, Hernández LE, Bonay P, Cárpena-Ruiz RO (1997) Distribution of Cd in shoot, and root tissues of maize and pea plants: physiological distribution. *J Exp Bot* **48**: 123-128

Lucotte G, Baneyx F (1993) Introduction to molecular cloning techniques. VCH Publishers, Inc. New York.

Ma CH, Haslbeck M, Babujee L, Jahn O, Reumann S (2006) Identification and characterization of a stress-inducible and a constitutive small heat-shock protein targeted to the matrix of plant peroxisomes. *Plant Physiol* **141**: 47-60

Maksymiec W, Malgorzata W, Krupa Z (2007) Variation in oxidative stress and photochemical activity in *Arabidopsis thaliana* leaves subjected to cadmium and excess copper in the presence or absence of jasmonate and ascorbate. *Chemosphere* **66**: 421-427

- Maksymiec W, Wianowska D, Dawidowicz AL, Radkiewicz S, Mardarowicz M, Krupa Z** (2005). The level of jasmonic acid in *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus coccineus* plants under heavy metal stress. *J Plant Physiol* **162**: 1338-46
- Maksymiec W, Wojcik M, Krupa Z** (2007) Variation in oxidative stress and photochemical activity in *Arabidopsis thaliana* leaves subjected to cadmium and excess copper in the presence or absence of jasmonate and ascorbate. *Chemosphere* **66**: 421-427
- Mano S, Nakamori CH, Makoto Hayashi M, Kato A, Kondo M, Nishimura M** (2002) Distribution and Characterization of Peroxisomes in *Arabidopsis* by Visualization with GFP: Dynamic Morphology and Actin-Dependent Movement *Plant Cell Physiol* **43**: 331-341
- Marone M, Mozzetti S, De Ritis D, Pierelli L, Scambia G** (2001) Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biol Proced Online* **3**: 19-25
- Marrs KA** (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 127-158
- Massonneau A, Coronado MJ, Audran A, Bagniewska-Zadworna A, Mol R, Testillano PS, Goralski G, Dumas C, Risueño MC, Matthys-Rochon E** (2005) Multicellular structures that develop during *in vitro* maize pollen embryogenesis express both endosperm- and embryo-specific genes: which is which? *Eur J Cell Biol* **84**: 663-675
- Mathur J, Mathur N, Hulskamp M** (2002) Simultaneous Visualization of Peroxisomes and Cytoskeletal Elements Reveals Actin and Not Microtubule-Based Peroxisome Motility in Plants *Plant Physiol* **128**: 1031-1045
- Mauch-Mani B, Métraux JP** (1998) Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annal Bot* **82**: 535-540
- Maughan S, Foyer CH** (2006) Engineering and genetic approaches to modulating the glutathione network in plants. *Physiol Plant* **126**: 382-397
- McCarthy I, Romero-Puertas MC, Palma JM, Sandalio LM, Corpas FJ, Gómez M, del Río LA** (2001) Cadmium induces senescence symptoms in leaf peroxisomes of pea plants. *Plant Cell Environ* **24**: 1065-1073
- McCord JM, Fridovich I** (1969) Superoxide dismutase: and enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* **244**: 6049-6055
- McDowell JM, Dangl JL** (2000) Signal transduction in the plant immune response *Trends Biochem Sci* **25**: 79-82
- McGrath, SP** (1998) Phytoextraction for soil remediation. En: *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. R.R. Brooks. Wallingford, CAB International: 261-287
- McLaughlin MJ, Singh BR** (1999) Cadmium in soils and plants. Capítulo 1. En: *Cadmium in Soils and Plants*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands
- Meinhard M, Rodríguez PL, Grill E** (2002) The sensitivity of ABI2 to hydrogen peroxide links the abscisic acid-response regulator to redox signaling. *Planta* **214**: 775-782
- Meister A, Anderson JW** (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* **52**: 711-760
- Metwally A, Finkemeier I, Georgi M, Dietz KJ** (2003) Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiol* **132**: 272-281
- Metwally A, Safronova VI, Belimov AA, Dietz KJ** (2005) Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L. *J Exp Bot* **56**: 167-178
- Miller G, Mittler R** (2006) Could heat shock transcription factor function as hydrogen peroxide sensor in plants? *Ann Bot* **98**: 279-288
- Milone MT, Sgherri C, Clisjsters H, Navarri-Izzo F** (2003) Antioxidant responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environ Exp Bot* **50**: 265-276
- Minetti M, Forte T, Soriani M, Quaresima U, Menditto A, Ferrari M** (1992) Iron-induced ascorbate oxidation in plasma as monitored by ascorbate free radical formation. *FEBS Lett* **352**: 159-162
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA** (2000) A discussion of the chemistry of oxidative and nitrosative stress in cytotoxicity. *J Inorg Biochem* **79**: 237-240

- Mishra A, Choudhuri MA** (1999) Effects of salicylic acid on heavy metal-induced membrane deterioration mediated by lipoxygenase in Rice. *Biol Plant* **42**: 409-415
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**: 405-410
- Mittova V, Tal M, Volokita M, Guy M** (2002) Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiol Plant* **115**: 393-400
- Mittova V, Tal M, Volokita M, Guy M** (2003b) Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Plant Cell Environ* **6**: 845-856
- Mittova V, Theodoulou FL, Kiddle G, Gómez L, Volokita M, Tal M, Foyer CH, Guy M** (2003a) Coordinate induction of glutathione biosynthesis and glutathione-metabolizing enzymes is correlated with salt tolerance in tomato. *FEBS Lett* **554**: 417-421
- Miwa S, ST-Pierre J, Partridge L, Brand MD** (2003) Superoxide and hydrogen peroxide production by *Drosophila* mitochondria. *Free Rad Biol Med* **35**: 938-948
- Miyake C, Asada K** (1992) Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplast and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radical in thylakoids. *Plant Cell Physiol* **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 Cell Physiol* **39**: 821-829
- Moncada S, Higgs EA** (2006) Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol* **176**: 213-254
- Moons A** (2005) Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione *S*-transferases (GSTs). *Vitam Horm* **72**: 155-202
- Moreau RA, Liv KD, Huang AH** (1980) Spherosomes in castor bean endosperm. Membrane components, formation and degradation. *Plant Physiol* **65**: 1176-1180
- Morell S, Follmann H, De Tullio M, Häberlein I** (1997) Dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase are phantom indicators of oxidative stress in plants. *FEBS Lett* **414**: 567-570
- Moreno JL, Hernández T, García C** (1999) Effects of a cadmium-containing sewage sludge compost on dynamics of organic matter and microbial activity in an arid soils. *Biol Fert Soils* **28**: 230-237
- Mortvedt JJ** (1996) Heavy metal contaminants in inorganic and organic fertilisers. *Fert Res* **43**: 55-61
- Muench GD, Mullen RT** (2003) Peroxisome dynamics in plant cells: a role for the cytoskeleton. *Plant sci* **164**: 307-315
- Mukhopadhyay CK, Chatterjee IB** (1994) Free metal ion-independent oxidative damage to collagen. Protection by ascorbic acid. *J Biol Chem* **269**: 30200-30205
- Mullineaux PM, Creissen GP, Broadbent P, Reynolds H, Kular B, Wellburn A** (1994) Elucidation of the role of glutathione reductase using transgenic plants. *Biochem Soc Trans* **22**: 931-936
- Munné-Bosch S, Shikanai T, Asada K** (2005) Enhanced ferredoxin-dependent cyclic electron flow around photosystem I and alpha-tocopherol quinone accumulation in water-stressed ndhB-inactivated tobacco mutants. *Planta* **222**: 502-511
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497
- Murata Y, Pei ZM, Mori IC, Schroeder JI** (2001) Abscisic acid activation of plasma membrane Ca²⁺ channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. *Plant Cell* **13**: 2513-2523
- Murgia I, Delledonne M, Soave C** (2002) Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. *Plant J* **30**: 521-528

- Nagase S, Takemura K, Ueda A, Hirayama A, Aoyagi K, Kondoh M, Koyama A** (1997) A novel nonenzymatic pathway for the generation of nitric oxide by the reaction of hydrogen peroxide and D- or L-arginine. *FEBS Lett* **233**: 150-153
- Nappi AJ, Vass E** (1998) Hydroxyl radical formation resulting from the interaction of nitric oxide and hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* **1380**: 55-63
- Navari-Izzo F, Izzo R** (1994) Induction of enzyme activities and antioxidant production in barley plants as a result of SO₂ fumigation. *Plant Sci* **96**: 31-40
- Navari-Izzo F, Pinzino C, Quartacci MF, Sgherri CL** (1999) Superoxide and hydroxyl radical generation, and superoxide dismutase in PSII membrane fragments from wheat. *Free Radic Res* **31**: Suppl: S3-9
- Navari-Izzo F, Quartacci MF** (2001) Phytoremediation of metals: Tolerance mechanisms against oxidative stress. *Minerva Biotec* **13**: 73-83
- Navari-izzo F, Rascio N** (1999) Plant response to water deficit conditions. En: *Handbook of Plant and Crop Stress* (M Pessarakli Marcel Dekker eds.), pp 231-270. New York
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT** (2002b) Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 388-395
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT** (2003) Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol* **159**: 11-35
- Nguyen J** (1986) Plant xanthine dehydrogenase. Its distribution, properties and function. *Physiol Veg* **24**: 263-281
- Nguyen J, Feierabend J** (1978) Some properties and subcellular localization of xanthine dehydrogenase in pea leaves. *Plant Sci Lett* **13**: 125-132
- Nguyen J, Machal L, Vidal J, Perrotrechenmann C, Gadal P** (1986) Immunochemical studies on xanthine dehydrogenase of soybean root nodules. Ontogenic changes in the level of enzyme and immunocytochemical localization. *Planta* **167**: 190-195
- Niderman T, Genetet I, Bruy`Ere T, Gees R, Stintzi A, Legrand M, Fritig B, Mosinger E** (1995) Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal; isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.* **108**: 17-27
- Ninnemann H, Maier J** (1996) Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants, and the involvement in photocondensation of *Neurospora crassa*. *Photochem Photobiol* **64**: 393-398
- Nishikimi M** (1975) Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-oxidase system. *Biochem Biophys Res Commun* **63**: 463-468
- Nishizono H, Kubota K, Suzuki S, Ishii F** (1989) Accumulation of heavy metals in cell walls of *Polygonum cuspidatum* roots from metalliferous habitats. *Plant Cell Physiol* **30**: 595-598
- Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 249-279
- Noctor G, Veljovic-Jovanovic S, Foyer CH** (2000) Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signalling. *Phil Trans R Soc Lond* **355**: 1465-1475
- Norvell WA, WU J, Hopkins DG, Welch R** (2000) Association of cadmium in durum wheat grain with soil chlorine and chelate-extractable soil cadmium. *Soil Sci Soc Am J* **64**: 2162-2168
- Nyska A, Kohen R** (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* **30**: 620-650
- Obata H, Umebayashi M** (1997) Effects of cadmium on mineral nutrient concentrations in plants differing in tolerance for cadmium. *J Plant Nutr* **20**: 97-105
- Obregón P, Marín R, Sanz A, Castresana C** (2001) Activation of defence-related genes during senescence: a correlation between gene expression and cellular damage. *Plant Mol Biol* **46**: 67-77
- Ogawa K, Kanematsu S, Asada K** (1996) Intra- and extra-cellular localization of "cytosolic" Cu,Zn-superoxide dismutase in

spinach leaf and hypocotyl. *Plant Cell Physiol* **37**: 790-799

Ogawa K, Kanematsu S, Asada K (1997) Generation of superoxide anion and localization of CuZn-superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls: their association with lignification. *Plant Cell Physiol* **38**: 118-1126

Ohme-Takagi M, Suzuki K, Shinshi H (2000) Regulation of ethylene-induced transcription of defense genes. *Plant Cell Physiol* **41**: 1187-1192

Okamura M (1980) An improved method for determination of L-ascorbic acid and L-dehydroascorbic acid in blood plasma. *Clin Chim Acta* **103**: 259-268

Olmos E, Martinez-Solano JR, Piqueras A, Hellin E (2003) Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). *J Exp Bot* **54**: 291-301

Olsen LJ (1998) The surprising complexity of peroxisome biogenesis. *Plant Mol Biol* **38**: 163-189

Orozco-Cárdenas ML, Ryan CA (2002) Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiol* **130**: 487-93

Ortega-Villasante C, Rellán-Álvarez ZZ, Ivarez R, Del Campo FF, Carpena-Ruiz RO (2005) Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. *J Exp Bot* **56**: 2239-2251

Ortiz DF, Kreppel L, Speiser DM, Scheel G, McDonald G, OW DW (1992) Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *EMBO J* **11**: 3491-3499

Ortiz DF, Ruscitti T, Mccue KF, OW DW (1995) Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J Biol Chem* **270**: 4721-4728

Oswald WF, Kraus R, Hippeli S, Benz B, Volpert R, Elstner EF (1992) Comparison of the enzymatic activities of dehydroascorbic acid reductase, glutathione reductase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase of healthy and damaged spruce needles (*Picea abies* L. Karst.). *J Plant Physiol* **139**: 742-748

Overmyer K, Brosche M, Kangasjarvi J (2003) Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci* **8**: 335-42

Packer L, Glazer AN (1990) Oxygen radicals in biological systems. Part B. Oxygen radicals and antioxidants. *Methods enzymol* **186**: Academic Press, San Diego, CA

Pagnussat GC, Lanteri ML, Lamattina L (2003) Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiol* **132**: 1241-1248

Palma JM, Garrido M, Rodríguez-García MI, del Río LA (1991) Peroxisome proliferation and oxidative stress mediated by activated oxygen species in plant peroxisomes. *Arch Biochem Biophys* **287**: 68-74

Palma JM, Gómez M, Yanez J, del Río LA (1987) Increased Levels of Peroxisomal Active Oxygen-Related Enzymes in Copper-Tolerant Pea Plants. *Plant Physiol* **85**: 570-574

Palma JM, Sandalio LM, Corpas FJ, Romero-Puertas MC, McCarthy I, del Río LA (2002) Plant proteases, protein degradation and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiol Biochem* **40**: 521-530

Park S, Cheng NH, Pittman JK, Yoo KS, Park J, Smith RH, Hirschi KD (2005) Increased Calcium Levels and Prolonged Shelf Life in Tomatoes Expressing *Arabidopsis* H⁺/Ca²⁺ Transporters. *Plant Physiol* **39**: 1194-1206

Pascal S, Debrauwer L, Ferte MP, Anglade P, Rouimi P, Scalla R (1998) Analysis and characterization of glutathione S-transferase subunits from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci* **134**: 217-226

Pastori GM, Kiddle G, Antoniw J, Bernard S, Veljovic-Jovanovic S, Verrier PJ, Noctor G, Foyer CH (2003) Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant Cell* **15**: 939-951

Pedroso MC, Magalhaes JR, Durzan D (2000a) A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues. *J Exp Bot* **51**: 1027-1036

Pedroso MC, Magalhaes JR, Durzan D (2000b) Nitric oxide induces cell death in *Taxus* cells. *Plant Sci* **157**: 173-180

- Perazzolli M, Dominici P, Romero-Puertas MC, Zago E, Zeier J, Sonoda M, Lamb C, Delledonne M** (2004). Arabidopsis nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell* **16**: 2785-2794
- Perfus-Barbeoch L, Leonhardt N, Vavasseur A, Forestier C** (2002) Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J* **32**: 539-548
- Pilon-Smits E, Pilon M** (2002) Phytoremediation of metals using transgenic plants. *Crit Rev Plant Sci* **21**: 439-456
- Pinto AP, Mota AM, De Varennes A, Pinto FC** (2004) Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. *Sci Tot Environ* **326**: 239-274
- Pinto E, Sigaud-Kutner TCS, Leitão Mas, Okamoto OK, Morse D, Colepicolo P** (2003) Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J Phycol* **39**: 1008-1018
- Pistelli, Perata P, Alpi A** (1992) Effects of leaf senescence on glyoxylate cycle enzyme activities. *Aust J Plant Physiol* **19**: 723-729
- Planchet E, Gupta JK, Sonoda M, Kaiser WM** (2005) Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant J* **41**: 732-743
- Ponstein A, Bres-Vloemans SA, Sela-Buurlage MB, Van Den Elzen PJM, Melchers LS, Cornelissen BJC** (1994) A novel pathogen- and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity. *Plant Physiol* **104**: 109-118
- Poschenrieder C, Gunsé B, Barceló J** (1989) Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance, and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Plant Physiol* **90**: 1365-1371
- Potikha TS, Collins CC, Jhonson DI, Delmer DP, Levine A** (1999) The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers. *Plant Physiol* **119**: 849-858
- Potters G, De Gara L, Asard H, Horemans N** (2002) Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiol Biochem* **40**: 537-548
- Prince WSPM, Kumar SP, Doberschütz KD, Subburam V** (2002) Cadmium toxicity in mulberry plants with special reference to the nutritional quality of leaves. *J Plant Nutr* **25**: 689-700
- Quessada MP, Macheix JJ** (1984) Caractérisation d'une peroxidase impliquée spécifiquement dans la lignification, en relation avec l'incompatibilité au greffage chez l'abricotier. *Physiol Végét* **22**: 533-540
- Rapp S, Saffrich R, Anton M, Jäkle U, Ansoerge W, Gorgas K, Just WW** (1996) Microtubule-based peroxisomal movement. *J Cell Sci* **109**: 837-849
- Raskin I, Smith RD, Salt De** (1997) Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Curr Op Biotech* **8**: 221-226
- Rauscher M, Ádám AI, Wirtz S, Guggenheim R, Mendgen K, Deising HB** (1999) PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. *Plant J* **19**: 625-633
- Rausser WE** (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochem Biophys* **31**: 19-48
- Raychaudhury B, Gupta S, Banerjee S, Datta S** (2006) Peroxisome is a reservoir of intracellular calcium. *Biochim Biophys Acta* **1760**: 989-992
- Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M** (2004) Drought, induced responses of photosynthesis and antioxidants metabolism in higher plants. *J Plant Physiol* **161**: 1189-1202
- Reinheckel T, Noack H, Lorenz S, Wiswedel I, Augustin W** (1998) Comparison of protein oxidation and aldehyde formation during oxidative stress in isolated mitochondria. *Free Radic Res* **29**: 297-305
- Rennenberg H** (1982) Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochem* **21**: 2771-2781

- Reumann S** (2000) The structural properties of plant peroxisomes and their metabolic significance. *Biol Chem* **381**: 639-648
- Rhodin J** (1954) *Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney*. Doctoral Thesis. Karolinska Institut. Aktiebolaget Godvil, Stockholm.
- Ribeiro EA, Cunha FQ, Tamashiro WMSC, Martins IS** (1999) Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Lett* **445**: 283-286
- Richards KD, Schott EJ, Sharma YK, Davies KR, Gardner RC** (1998) Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **116**: 409-418
- del Río LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gómez M, Barroso JB** (2002b) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp Bot* **53**:1255-1272
- del Río LA, Donaldson RP** (1995) Production of superoxide radicals in glyoxysomal membranes of castor bean endosperm. *J Plant Physiol* **146**: 283-287
- del Río LA, Fernández VM, Rupérez FL, Sandalio LM, Palma JM** (1989) NADH induces the generation of superoxide radicals in leaf peroxisomes. *Plant Physiol* **89**: 728-731
- del Río LA, Gómez M, Leal A, López-Gorgé J** (1977) A more sensitive modification of the catalase assay with the Clark oxygen electrode. *Anal Biochem* **80**: 409-15
- del Río LA, Sandalio LM, Altomare DA, Zilinskas BA** (2003) Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *J Exp Bot* **54**: 923-933
- del Río LA, Sandalio LM, Corpas FJ, López-Huertas E, Palma JM, Pastori GM** (1998) Activated oxygen-mediated metabolic functions of leaf peroxisomes. *Physiol Plant* **104**: 673-680
- del Río LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB** (2006) ROS and RNS in peroxisomes: production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiol* **141**: 330-335
- del Río LA, Sandalio LM, Palma JM, Bueno P, Corpas FJ** (1992) Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Rad Biol Med* **13**: 557-580
- del Río LA, Sandalio LM, Palma JM, Corpas FJ, López-Huertas E, Romero-Puertas MC, McCarthy I** (2002a) Peroxisomes, reactive oxygen metabolism, and stress-related enzyme activities. En: *Plant Peroxisomes, Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications*. (Baker A, Graham I, eds), pp 221-258. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands
- del Río LA, Sandalio LM, Yáñez J, Gómez M** (1985) Induction of a manganese-containing superoxide dismutase in leaves of *Pisum sativum* L. by high nutrient levels of zinc and manganese. *J Inorg Biochem* **24**: 25-34
- Rivetta A, Negrini N, Cocucci M** (1997) Involvement of Ca²⁺-calmodulin in Cd²⁺ toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. *Plant Cell Environ* **20**: 600-608
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM** (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *J Exp Bot* **53**: 103-110
- Rohnert U, Schneider W, Elstner EF** (1998) Superoxide-dependent and -independent nitrite formation from hydroxylamine: inhibition by plant extracts. *Z Naturforsch* **53**: 241-249
- Romero-Puertas MC, Campostrini N, Perazzolli M, Zolla L, Ciambella C, Righetti PG, Delledonne M** (2004c) Proteomic study of plant-specific proteins S-nitrosylated in response to bacterial infection (Póster) 1st Congreso of the Italian Proteome Society. Verona
- Romero-Puertas MC, Corpas FJ, Rodríguez-Serrano M, Gomez M, del Río LA, Sandalio LM** (2006b) Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *J Plant Physiol* doi:10.1016/j.jplph.2006.06.018
- Romero-Puertas MC, Corpas FJ, Sandalio LM, Leterrier M, Rodríguez-Serrano M, Del Río LA, Palma JM** (2006a) Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New phytol* **170**: 43-52

- Romero-Puertas MC, Delledonne M** (2003) Nitric oxide signaling in plant-pathogen interactions. *UBMB life* **55**: 579-83
- Romero-Puertas MC, Mccarthy I, Sandalio LM, Palma JM, Corpas FJ, Gómez M, del Río LA** (1999) Cadmium toxicity and oxidative metabolism of pea leaf peroxisomes. *Free Rad Res* **31**: 25-31
- Romero-Puertas MC, Palma JM, Gómez M, del Río LA, Sandalio LM** (2002) Cadmium causes the modification of proteins in pea plants. *Plant Cell Environ* **25**: 677-686
- Romero-Puertas MC, Perazzoli M, Zago ED, Delledonne M** (2004b) Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions *Cellular Microbiol* **6**: 795-803
- Romero-Puertas MC, Rodríguez-Serrano M, Corpas FJ, Gómez M, Del Río LA, Sandalio LM** (2004a) Cadmium-induced subcellular accumulation of O_2^- and H_2O_2 in pea leaves. *Plant Cell Environ* **27**: 1122-1134
- Ros Barceló A** (2005) Xylem parenchyma cells deliver the H_2O_2 necessary for lignification in differentiating xylem vessels. *Planta* **220**: 747-756
- Ros-Barceló A** (1999) Some properties of the H_2O_2/O_2^- generating system from the lignifying xylem of *Zinnia elegans*. *Free Radic Res* **31**: S147-S-154
- Rosell DF, White EH** (1978) *Methods Enzymol* **57**: 409
- Rosselli W, Keller C, Boshi K** (2003) Phytoextraction capacity of trees growing on a metal contaminated soil. *Plant Soil* **256**: 265-272
- Rupert B, Cattivelli L, Pagni S, Ramina A** (2002) Ethylene-responsive genes are differentially regulated during abscission, organ senescence and wounding in peach (*Prunus persica*). *J Exp Bot* **53**: 429-437
- Ryals JA, Neuenschwander U., Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD** (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**: 1809-1819
- Rylott EL, Rogers CA, Gilday AD, Edgell T, Larson TR, Graham IA** (2003) *Arabidopsis* mutants in short- and medium-chain acyl-CoA oxidase activities accumulate acyl-CoAs and reveal that fatty acid beta-oxidation is essential for embryo development. *J Biol Chem* **278**: 21370-21377
- Sagi M, Fluhr R** (2001) Superoxide production by plant homologues of the gp91^{phox} NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* **126**: 1281-1290
- Sakamoto A, Ueda M, Morikawa H** (2002) *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Lett* **515**: 20-24
- Sakuma S, Fujimoto Y, Iwai M, Kenjiro F, Yasuda M, , Nishida H, Fujita T** (1994) Induction of the conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in rabbit liver by Cu^{2+} , Zn^{2+} , and selenium ions. *J Pharm Pharmacol* **46**: 487-490
- Salisbury FB, Ross CW** (1992) Plant Physiology, 4th ed. Wadsworth Publishing Company, Belmont, California. pp 126-127
- Salt DE, Blaylock M, Kumar NP, Dushenkov V, Ensley BD, Chet I, Raskin I** (1995b) Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotech* **13**: 468-474
- Salt DE, Prince RC, Pickering IJ, Raskin I** (1995a) Mechanism of cadmium mobility and accumulation in indian mustard. *Plant Physiol* **109**: 1427-1433
- Salt DE, Wagner GJ** (1993) Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a Cd^{2+}/H^+ antiport activity. *J Biol Chem* **268**: 12297-12302
- Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomez M, Romero-Puertas MC, del Río LA** (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J Exp Bot* **52**: 2115-2126
- Sandalio LM, del Río LA** (1987) Localization of superoxide dismutase in glyoxysomes from *Citrullus vulgaris*. Functional implications in cellular metabolism. *J Plant Physiol* **127**: 395-409
- Sandalio LM, del Río LA** (1988) Intraorganellar distribution of superoxide dismutase in plant peroxisomes (glyoxisomes and leaf peroxisomes). *Plant Physiol* **88**: 1215-1218

- Sandalio LM, López-Huertas E, Bueno P, del Río LA** (1997) Immunocytochemical localization of copper, zinc superoxide dismutase in peroxisomes from watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.) cotyledons. *Free Rad Res* **26**:187-194
- Sanità di Toppi L, Gabbrielli R** (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Bot* **41**: 105-130
- Sanità di Toppi L, Lambardi M, Pazzagli L, Cappugi G, Durante M, Gabbrielli R** (1998) Response to cadmium in carrot in vitro plants and cell suspension cultures *Plant Science* **137**: 119-129
- Sano S, Tao S, Endo Y, Inaba T, Hossain MA, Miyake C, Matsuo M, Aoki H, Asada K, Saito K** (2005) Purification and cDNA cloning of chloroplastic monodehydroascorbate reductase from spinach. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**:762-772
- Sattler SE, Gilliland LU, Magallanes-Lundback M, Pollard M, Dellapenna D** (2004) Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell* **16**: 1419-1432
- Sävenstrand H, Brosché M, Ängelagen M, Strid A** (2000) Molecular markers for ozone stress isolated by suppression subtractive hybridization: specificity of gene expression and identification of a novel stress-regulated gene. *Plant Cell Environ* **23**: 689-700
- Schillmiller AL, Howe GA** (2005) Systemic signaling in the wound response. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 369-377
- Schnarrenberger C, Oeser A, Tolbert NE** (1973) Two isoenzymes each of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in spinach leaves. *Arch Biochem Biophys* **154**: 438-448
- Schonhoff CM, Gaston B, Mannick JB** (2003) Nitrosylation of cytochrome c during apoptosis. *J Biol Chem* **278**: 18265-18270
- Schubert KR** (1986) Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. *Ann Rev Plant Physiol* **37**: 539-574
- Schulz H, Hartling S** (2001) Biochemical parameters as biomarkers for the early recognition of environmental pollution on Scots pine trees. II. The antioxidative metabolites ascorbic acid, glutathione, alpha-tocopherol and the enzymes superoxide dismutase and glutathione reductase. *Z Naturforsch* **56**: 767-780
- Schützendübel A, Nikolova P, Rudolf C, Polle A** (2002) Cadmium and H₂O₂-induced oxidative stress in *Populus x Canescens* roots. *Plant Physiol Biochem* **40**: 577-584
- Schützendübel A, Polle A** (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* **53**: 1351-1365
- Schützendübel A, Schwanz P, Terchmann T, Grossk, Langenfeld-Heyger R, Godbold DL, Polle A** (2001) Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. *Plant Physiol* **127**: 887-898
- Seregin IV, Ivanov VB** (2001) Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russ J Plant Physiol* **48**: 523-544
- Seymour JL, Lazarus RA** (1989) Native gel activity stain and preparative electrophoretic method for the detection and purification of pyridine nucleotide-linked dehydrogenases. *Anal Biochem* **178**: 243-247
- Sgherri CLM, Milone AMT, Clijsters H, Navari-Izzo F** (2001) Antioxidative enzymes in two wheat cultivars, differently sensitive to drought and subjected to sub-symptomatic copper doses. *J Plant Physiol* **158**: 1439-1447
- Shim IS, Momose Y, Yamamoto A, Kim DW, Usui K** (2003) Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. *Plant Growth Regul* **39**: 285-292
- Simontacchi M, Jasid S, Puntarulo S** (2004) Nitric oxide generation during early germination of sorghum seeds. *Plant Sci* **167**: 839-847
- Singh PK, Tewari RK** (2003) Cadmium toxicity induced changes in plant water relations and oxidative metabolism of *Brassica juncea* L. plants. *J Environ Biol* **24**: 107-112
- Sivaguru M, Baluska F, Volkmann D, Felle HH, Horst W** (1999) Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-

- term effects on the distal part of the transition zone. *Plant Physiol* **119**: 1073-1082
- Skorzynska-Polit E, Krupa Z** (2006) Lipid peroxidation in cadmium-treated *Phaseolus coccineus* plants. *Arch Environ Contam Toxicol* **50**: 482-487
- Smeets K, Cuypers A, Lambrechts A, Semanae B, Hoet P, Van Laere A, Vangrosveld J** (2005) Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after cd application. *Plant Physiol biochem* **43**: 437-444
- Smirnoff N** (2000) Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 229-235
- Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA** (1989) Properties and functions of glutathione reductase in plants. *Physiol Plant* **77**: 449-456
- Sobkowiak R, Deckert J** (2003) Cadmium-induced changes in growth and cell cycle gene expression in suspension-culture cells of soybean. *Plant Physiol Bioch* **41**: 767-772
- Sobkowiak R, Rymer K, Rucinska R, Deckert J** (2004) Cadmium-induced changes in antioxidant enzymes in suspension culture of soybean cells. *Acta Biochim Pol* **51**: 219-222
- Somashekaraiah BV, Padmaja K, Prasad ARK** (1992) Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiol Plant* **85**: 85-89
- Song F, Goodman RM** (2001) Activity of nitric oxide is dependent on, but is partially required for function of salicylic acid in the signalling pathway in tobacco systemic acquired resistance. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 1458-1462
- Stadtman ER** (1992) Protein oxidation and aging. *Science* **257**: 1220-1224
- Stamler JS, Lamas S, Fang FC** (2001) Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* **106**: 675-683
- Stöhr C, Ullrich WR** (2002) Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *J Exp Bot* **53**: 2293-2303
- Stohs SJ, Bagchi D** (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad Biol Med* **18**: 321-336
- Streller S, Wingsle G** (1994) *Pinus silvestris* L. needles contain extracellular Cu,Zn superoxide dismutase. *Planta* **192**: 195-201
- Stressmann M, Kitao S, Griffith M, Moresoli C, Bravo LA, Marangoni AG** (2004) Calcium Interacts with Antifreeze Proteins and Chitinase from Cold-Acclimated Winter Rye. *Plant Physiol* **135**: 364-376
- Sung DY, Kaplan F, Guy CL** (2001) Plant HSP70 molecular chaperones: Protein structure, gene family, expression and function. *Physiol Plant* **113**: 443-451
- Suzuki N** (2005) Alleviation by calcium of cadmium-induced root growth inhibition in *Arabidopsis* seedling. *Plant biotechnol* **22**: 19-25
- Suzuki N, Koizumi N, Sano H** (2001) Screening of cadmium-responsive genes in *Arabidopsis thaliana* Plant, Cell, Environ **24**: 1177-1188
- Suzuki N, Mittler R** (2006) Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiol plant* **126**: 45-51
- Takahashi S, Yamasaki H** (2002) Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. *FEBS Lett* **512**: 145-8
- Tateishi Y, Umenura Y, Muneharu E** (2001) A Basic Class I Chitinase Expression in Winged Bean is Up-regulated by Osmotic Stress. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**: 1663-1668
- Teixeira FK, Menezes-Benavente L, Galvao VC, Margis R, Margis-Pinheiro M** (2006) Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta* **224**: 300-314
- Thomine S, Lelievre F, Debarbieux E, Schroeder JL, Barbier-Brygoo H** (2003) AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J* **34**: 685-695
- Thomine S, Wang R, Ward J, Crawford N, Schroeder J** (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 4991-4996

- Thomma B, Penninckx I, Broekaert WF** (2001) The complexity of disease signalling in *Arabidopsis*. *Curr Opin Immunol* **13**: 63-68
- Thorpe GHG, Kricka LJ, Moseley SB, Whitehead TP** (1985) Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in
- Tischner R, Planchet E, Kaiser WM** (2004) Mitochondrial electron transport as a source for nitric oxide in the unicellular green alga *Chlorella sorokiniana*. *FEBS Lett* **576**: 151-155
- Tolbert NE** (1980) Photorespiration. En: *The Biochemistry of Plants*. (Davis DD, ed.), Vol 2, pp. 487-523. Academic Press, London
- Tolbert NE** (1981) Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxisomes. *Annu Rev Biochem* **50**: 133-157
- Tolbert NE, Essner E** (1981) Microbodies: Peroxisomes and glyoxysomes. *J Cell Biol* **91**: 271s-283s
- Tolbert NE, Gee R, Husic DH, Dietrich S** (1987) Peroxisomal glycolate metabolism and the C₂ oxidative photosynthesis carbon cycle. En: *Peroxisomes in Biology and Medicine*. (Fahimi HD, Sies H, eds.), pp 213-322. Berlin: Springer-Verlag
- Tominaga M, Kojima H, Yokota E, Orii H, Nakamori R, Katayama E, Anson M, Shimmen T, Oiwa K** (2003) Higher plant myosin XI moves processively on actin with 35 nm steps at high velocity. *EMBO J* **22**: 1263-1272
- Trebst A, Depka B, Hollander-Czytko H** (2002) A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* **516**: 156-160
- Trumper S, Follmann H, Haberlein Y** (1994) A novel dehydroascorbate reductase from spinach chloroplast homologous to plant trypsin inhibitor. *FEBS Lett* **352**: 159-162
- Urano J, Nakagawa T, Maki Y, Masumura T, Tanaka K, Murata N, Ushimaru T** (2000) Molecular cloning and characterization of a rice dehydroascorbate reductase. *FEBS Lett* **466**: 107-111
- Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D** (1998) H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance. *Trends Plant Sci* **3**: 330-334
- Van Loon LC** (1985) Pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol* **4**: 111-116
- Vangronsveld JCHM, Cunningham SD** (1998) Introduction to the concepts. En: *Metal-contaminated soils: in situ inactivation and phytoremediation*. (Vangronsveld JCHM, Cunningham SD eds.), pp 1-15. Georgetown, TX, R.G. LandesCompany
- Vanin AF, Svistunenko DA, Mikoyan VD, Serezhenkov VA, Fryer MJ, Baker NR, Cooper CE** (2004) Endogenous superoxide production and the nitrite/nitrate ratio control the concentration of bioavailable free nitric oxide in leaves. *J Biol Chem* **279**: 24100-24107
- Vázquez S, Goldsbrough P, Carpena RO** (2006) Assessing the relative contributions of phytochelatin and the cell wall to cadmium resistance in white lupin. *Physiol Plant* **128**: 487-495
- Velikova V, Pinelli P, Pasqualini S, Reale L, Ferranti F, Loreto F** (2005) Isoprene decreases the concentration of nitric oxide in leaves exposed to elevated ozone. *New Phytol* **166**: 419-426
- Verkleij JAC, Schat H** (1990) Mechanisms of metal tolerance in higher plants. En: *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*. (Shaw J. eds.), pp.179-193. CRC Press, Boca Raton
- Vernoux T, Wilson RC, Seeley KA, Reichheld JP, Muroy S, Brown S, Maughan SC, Cobbett CS, Van Montagu M, Inze D, May MJ, Sung ZR** (2000) The Root Meristemless1/Cadmium Sensitive2 Gene Defines A Glutathione-Dependent Pathway Involved in Initiation and Maintenance of Cell Division During Postembryonic Root Development. *Plant Cell* **12**: 97-109
- Verret F, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, David P, Nussaume L, Vavasseur A, Richaud P** (2004) Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Lett* **576**: 306-312
- Vert G, Grotz N, Dedaldechamp F, Gaymard F, Gueriot M, Briat J, Curie C** (2002) IRT1,

- an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* **14**: 1233-1243
- Vigliocco A, Bonamico B, Alemano S, Miersch O, Abdala G** (2002) Stimulation of jasmonic acid production in *Zea mays* L. infected by the maize rough dwarf virus-Rio Cuarto. Reversion of symptoms by salicylic acid. *Biocell* **26**: 369-374
- Villalba JM, Córdoba F, Navas P** (1995) Ascorbate and the plasma membrane: a new view of cell growth control. En: *Ascorbic acid: biochemistry and biomedical cell biology 4* (Haris JR, ed.), pp 57-81. Plenum press, New York
- Vitória AP, Lea PJ, Azevedo RA** (2001) Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochem* **57**: 701-71
- Vranová E, Inze D, Van Breusegem F** (2002) Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot* **53**: 1227-1236
- Wada M, Suetsugu N** (2004) Plant organelle positioning. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 626-631
- Wagner GJ** (1993) Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv Agron* **51**: 173-217
- Wang JW, Wu JY** (2005). Nitric oxide is involved in methyl jasmonate-induced defense responses and secondary metabolism activities of *Taxus xells*. *Plant Cell Physiol* **46**: 923-930
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A** (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci* **9**: 244-252
- Wang Y, Yun B-W, Kwon E, Hong JK, Yoon J, Loake GJ** (2006) S-Nitrosylation: an emerging redox-based post-translational modification in plants. *J Exp Bot* **57**: 1777-1784
- Wang YS, Yang ZM** (2005) Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiol* **46**: 1915-1923
- Wasteneys GO, Yang Z** (2004) New Views on the Plant Cytoskeleton. *Plant Physiol* **136**: 3884-3891
- Wasternack C, Parthier B** (1997) Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci* **2**: 1360-1385
- Weitzberg E, Lundberg J** (1998) Nonenzymatic nitric oxide production in humans. *Nitric Oxide Biol Chem* **2**: 1-7
- Wendehenne D, Durner J, Klessig DF** (2004) Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses *Curr Opin Plant Biol* **7**: 449-455
- Wessel D, Flugge UI** (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**:141-143
- White PJ, Broadley MR** (2003) Calcium in plants. *Ann Bot* **92**: 487-511
- Wiemer EA, Wenzel T, Deerinck TJ, Ellisman MH, Subramani S** (1997) Visualization of the peroxisomal compartment in living mammalian cells: dynamic behaviour and association with microtubules. *J Cell Biol* **136**: 71-80
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W** (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stresses defence in C₃ plants. *EMBO J* **16**: 4806-4816
- Wingsle G** (1989) Purification and characterization of glutathione reductase from Scots pine needles. *Physiol Plant* **76**: 24-30
- Wingsle G, Karpinski S** (1996) Differential redox regulation by glutathione reductase and Cu,Zn-superoxide dismutase gene expression in *Pinus sylvestris* L. needles. *Planta* **198**: 151-157
- Wink DA, Mitchell JB** (1998) Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Rad Biol Med* **25**: 434-456
- Winston GW** (1990) Physicochemical basis for free radical formation in cell: production and defenses. En: *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimatization Mechanism* (Alscher RG, Cumming JR eds.), pp 57-86. Wiley-liss, Inc. New York.
- Wojtaszek P** (2000) Nitric oxide in plants: To NO or not to NO. *Phytochemistry* **54**: 1-4
- Wolghemuth H, Mittelstrass K, Kschiechan S, Bender J, Weigel HJ, Overmyer K, Kangasjärvi J, Sandermann H, Langebartels C** (2002) Activation of an antioxidative burst is a

general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant Cell Environ* **25**: 717-726

Wollgiehn RD, Neumann (1999) Metal stress response and tolerance of cultured cells from *Silene vulgaris* and *Lycopersicon peruvianum*: role of heat stress proteins. *J Plant Physiol* **154**: 547-553

Wu ChT, Bradford KJ (2003) Class I chitinase and β -1-3-glucanase are differentially regulated by wounding, methyl jasmonate, ethylene, and gibberellin in tomato seeds and leaves. *Plant Physiol* **113**: 263-273

Wua F, Zhang G, Dominy P (2003) Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. *Environ Exp Bot* **50**: 63-78

Wubben JP, Lawrence CB, de Wit PJGM (1996) Differential induction of chitinase and 1,3-b-glucanase gene expression in tomato by *Cladosporium fulvum* and its race-specific elicitors. *Physiol Plant Pathol* **48**: 105-116

Xiang C, Oliver DJ (1998) Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1539-1550

Xu YC, Zhao BL (2003) The main origin of endogenous NO in higher non-leguminous plants. *Plant Physiol Biochem* **41**: 833-838

Yalpani N, Enyedi AJ, León J, Raskin I (1994) Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta* **193**: 372-376

Yamamoto Y, Kobayashi Y, Devi SR, Rikiishi S, Matsumoto H (2002) Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol* **128**: 63-72

Yamasaki H, Sakihama Y (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett* **468**: 89-92

Yamasaki H, Shimoji H, Ohshiro Y, Sakihama Y (2001) Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. *Nitric Oxide Biol Chem* **5**: 261-70

Yamazaki RK, Tolbert N (1970) Enzymatic characterization of leaf peroxisomes. *J Biol Chem* **245**: 137-144

Yang T, Poovaiah BW (2002) Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 4097-4102

Yannarelli GG, Fernandez-Alvarez AJ, Santa-Cruz,DM, Tomaro LM (2007) Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. *Phytochem* **68**: 505-512

Yannarelli GG, Noriega GO, Batlle a, Tomaro LM (2006) Heme oxygenase up-regulation in ultraviolet-B irradiated soybean plants involves reactive oxygen species. *Planta* **224**: 1154-1162

Yokota E, Muto S, Shimmen T (1999) Inhibitory regulation of higher-plant myosin by Ca^{2+} ions. *Plant Physiol* **119**: 231-239

Yokota E, Shimmen T (1994) Isolation and characterization of plant myosin from pollen tubes of lily *Protoplasma* **177**:153-162

Yu Q, Tang C, Kuo J (2000) A critical review on methods to measure apoplastic pH in plants. *Plant Soil* **219**: 29-40

Zago E, Morsa S, Dat JF, Alard P, Ferrarini A, Inze D, Delledonne M, Van Breusegem F (2006) Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. *Plant Physiol* **141**:404-411

Zamore PD (2001) RNA interference: listening to the sound of silence. *Nat Struct Biol* **8**: 746-750

Zang H, Jiang Y, He Z, Ma M (2005) Cadmium accumulation and oxidative burst in garlic (*Allium sativum*). *J Plant Physiol* **162**: 977-984

Zeidler D, Zahringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Borsw, Hutzler P, Durner J (2004) Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defence genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 15811-15816

- Zemojtel T, Fröhlich A, Palmieri MC, Kolanczyk M, Mikula I, Wyrwicz LS, Wanker EE, Mundlos S, Vingron M, Martasek P, Durner J** (2006) Plant nitric oxide synthase: a never-ending story?. *Trends Plant Sci* **11**: 524-525
- Zemojtel T, Penzkofer T, Dandekar T, Schultz J** (2004) A novel conserved family of nitric oxide synthase? *Trends Biochem Sci* **29**: 224-226
- Zhang C, Czymbek KJ, Shapiro AD** (2003) Nitric oxide does not trigger early programmed cell death events but may contribute to cell-to-cell signaling governing progression of the *Arabidopsis* hypersensitive response. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 962-972
- Zhang Y, Hogg N** (2005) *S*-Nitrosothiols: cellular formation and transport. *Free Rad Biol Med* **38**: 831-838
- Zhang Y, Wang L, Liu Y, Zhang Q, Wei Q, Zhang W** (2006) Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na⁺/H⁺ antiport in the tonoplast. *Planta* **224**: 545-555
- Zornoza P, Vázquez S, Esteban E, Fernández-Pascual M, Carpena R** (2002) Cadmium-stress in nodulated white lupin: strategies to avoid toxicity. *Plant Physiol Bioch* **40**: 1003-1009
- Zottini M, Formentin E, Scattolin M, Carimi F, Loschiavo F, Terzi M** (2002) Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality *in vivo*. *FEBS Lett* **515**: 75-78

ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1 Contribución relativa de las diferentes fuentes ambientales de emisión de cadmio-----	3
Figura 1.2 Susceptibilidad de algunos metales a la entrada de cadmio-----	5
Figura 1.3 Representación esquemática de los mecanismos de entrada, secuestro y translocación del Cd en raíces-----	9
Figura 1.4 Formación de especies de oxígeno reactivo durante la reducción del O ₂ a H ₂ O ₂ -----	14
Figura 1.5 Reacción química de Haber-Weiss -----	15
Figura 1.6 Reacciones del H ₂ O ₂ con el NO y sus derivados que dan lugar a la formación de ·OH-----	16
Figura 1.7 Producción y degradación de ROS en cloroplastos-----	18
Figura 1.8 Producción y degradación de ROS en la cadena de transporte electrónico mitocondrial -----	19
Figura 1.9 Producción de ROS en membrana plasmática y pared celular -----	20
Figura 1.10 Bioquímica del NO en sistemas biológicos-----	23
Figura 1.11 Algunos sistemas no enzimáticos generadores de NO -----	24
Figura 1.12 Modelo del H ₂ O ₂ como inductor de la cascada de señalización-----	27
Figura 1.13 Función del NO en la señalización mediada por ABA, defensa frente a patógenos y herida-----	31
Figura 1.14 Ciclo del Ascorbato-Glutation o de Foyer-Halliwel-Asada-----	37
Figura 1.15 Esquema de la β-oxidación de ácidos grasos y ciclo del glioxilato en peroxisomas-----	45
Figura 1.16 Esquema de la fotorrespiración-----	46
Figura 1.17 Esquema de la producción de ROS/RNS y sistemas antioxidantes en peroxisomas-----	48
Figur 1.18 Efecto de la Latrunculina en el movimiento de peroxisomas-----	51
Figura 3.1 Cultivo hidropónico de <i>Arabidopsis</i> en puntas-----	63
Figura 3.2 Purificación de peroxisomas en gradiente de percoll-----	67
Figura 3.3 Esquema de purificación e identificación de proteínas S-nitrosiladas-----	72

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 3.4 Mecanismo de oxidación de DHE-----	84
Figura 3.5 Esquema de la toma de imágenes y análisis del movimiento de peroxisomas-----	86
Figura 3.6 Mecanismo de clonación de Directional-TOPO-----	90
Figura 3.7 Obtención de la sonda RNA marcada con digoxigenina-----	95
Figura 3.8 Esquema de recombinación específica del fago λ en <i>E. coli</i> -----	98
Figura 3.9 Clonación mediante tecnología Gateway-----	99
Figura 3.10 Respuesta antiviral, de células superiores frente a RNA de cadena doble-----	100
Figura 3.11 Vectores para RNA de interferencia utilizados para la obtención de Goxi-I y Goxi-II-----	101
Figura 3.12 Vector utilizado para proteínas de fusión con GFP-----	102
Figura 3.13 Transformación de <i>Arabidopsis</i> por inmersión o “dipping”-----	103
Figura 4.1 Efecto del Cd sobre el crecimiento y estructura de la raíz de plantas de guisante-----	107
Figura 4.2 Efecto del Cd sobre enzimas antioxidantes de raíces de plantas de guisante-----	108
Figura 4.3 Actividad de isoenzimas de SOD en raíces de plantas de guisante---	109
Figura 4.4 Efecto del Cd en raíces de guisante sobre la expresión del mRNA de antioxidantes enzimáticos-----	109
Figura 4.5 Efecto del Cd sobre el contenido de antioxidantes no enzimáticos en raíces de plantas de guisante-----	110
Figura 4.6 Efecto del cadmio sobre la producción de H ₂ O ₂ en raíces-----	111
Figura 4.7 Efecto del Cd sobre la tasa de peroxidación lipídica y el contenido de grupos carbonilos de proteínas en raíces-----	111
Figura 4.8 Visualización <i>in vivo</i> de la acumulación de O ₂ ⁻ en raíces secundarias de guisante-----	113
Figura 4.9 Visualización <i>in vivo</i> de la acumulación de O ₂ ⁻ en cortes transversales y longitudinales de raíces secundarias de guisante-----	114
Figura 4.10 Visualización <i>in vivo</i> de la acumulación de O ₂ ⁻ en cortes transversales de raíces principales de guisante-----	115

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 4.11 Visualización <i>in vivo</i> de la acumulación de H ₂ O ₂ en raíces secundarias de guisante-----	116
Figura 4.12 Visualización <i>in vivo</i> de la acumulación de H ₂ O ₂ en cortes transversales y longitudinales de raíces secundarias de guisante-----	116
Figura 4.13 Visualización <i>in vivo</i> de la acumulación de H ₂ O ₂ en cortes transversales de raíces principales de guisante-----	117
Figura 4.14 Visualización <i>in vivo</i> de la acumulación <i>in vivo</i> de NO en raíces secundarias de guisante-----	118
Figura 4.15 Visualización <i>in vivo</i> de la acumulación de NO en cortes transversales y longitudinales de raíces secundarias de guisante-----	119
Figura 4.16 Visualización <i>in vivo</i> de la acumulación de NO en cortes transversales de raíces principales de guisante-----	120
Figura 4.17 Detección de muerte celular en raíces secundarias de guisante-----	121
Figura 4.18 Efecto del Cd sobre el contenido de SA, JA y ET en raíces de guisante-----	121
Figura 4.19 Efecto del Cd sobre enzimas antioxidantes de hojas de guisante----	123
Figura 4.20 Visualización <i>in vivo</i> de la acumulación de O ₂ ⁻ en cortes de hojas de guisante-----	124
Figura 4.21 Visualización <i>in vivo</i> de la acumulación de H ₂ O ₂ en cortes de hojas de guisante-----	126
Figura 4.22 Citoquímica de H ₂ O ₂ en haces vasculares de hojas de guisante-----	127
Figura 4.23 Visualización <i>in vivo</i> de la acumulación de NO en cortes de hojas de guisante-----	128
Figura 4.24 Actividad S-nitrosoglutatión reductasa en hojas de guisante-----	129
Figura 4.25 Inmunolocalización de GSNO y GSH en hojas de guisante-----	131
Figura 4.26 Patrón de proteínas fosforiladas en extractos de hojas de guisante--	132
Figura 4.27 Efecto del Cd sobre el contenido de SA, JA y ET en hojas de guisante-----	133
Figura 4.28 Efecto del Cd sobre la expresión de PRPs en hojas de guisante-----	134
Figura 4.29 Hibridación <i>in situ</i> de PrP-4a en hojas de guisante-----	135
Figura 4.30 Visualización <i>in vivo</i> de la acumulación de NO en hojas de plantas de guisante tratadas con Cd y Ca-----	137

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 4.31 Efecto del Ca sobre la producción de O_2^- dependiente de Cd-----	138
Figura 4.32 Efecto del Ca sobre la expresión de CuZn-SOD en hojas-----	139
Figura 4.33 Efecto del Cd y Ca sobre el crecimiento de plantas de <i>Arabidopsis</i> silvestres y deficientes en NADPH oxidasa-----	140
Figura 4.34 Visualización <i>in vivo</i> de la acumulación de O_2^- en cortes de hojas de <i>Arabidopsis</i> Wt y deficientes en NADPH oxidasa (DF)----- -	141
Figura 4.35 Efecto del Cd y del Ca sobre la expresión de PRPs y CuZn-SOD en plantas de <i>Arabidopsis</i> Wt y deficientes en NADPH oxidasa-----	142
Figura 4.36 Patrón de proteínas S-nitrosiladas en peroxisomas de hojas de guisante C y tratadas con Cd-----	143
Figura 4.37 Separación bidimensional de proteínas S-nitrosiladas de peroxisomas de hojas control de plantas de guisante-----	144
Figura 4.38 Análisis del movimiento de peroxisomas en el programa Volocity---	145
Figura 4.39 Efecto del Cd sobre la velocidad de desplazamiento de los peroxisomas de hojas de <i>A. th.</i> a tiempos largos de tratamiento----	146
Figura 4.40 Efecto del Cd sobre la velocidad de desplazamiento de los peroxisomas de hojas de <i>A.th.</i> a tiempos cortos de tratamiento-----	146
Figura 4.41 Efecto del ASC sobre la velocidad de desplazamiento de los peroxisomas de hojas de <i>Arabidopsis</i> -----	147
Figura 4.42 Efecto del Ca^{2+} y EGTA sobre la velocidad de desplazamiento de los peroxisomas de hojas de <i>Arabidopsis</i> -----	148
Figura 4.43 Imagen de las plantas de <i>Arabidopsis</i> Wt y mutantes Goxi-I-----	150
Figura 4.44 Imagen de la parte aérea y de la raíz plantas de <i>Arabidopsis</i> de Wt y Goxi-I-----	150
Figura 4.45 Actividad GOX en hojas de plantas de <i>Arabidopsis</i> Wt y Goxi-I-----	151
Figura 4.46 Actividad fotosintética en hojas de plantas de <i>Arabidopsis</i> Wt y Goxi-I-----	152
Figura 4.47 Imagen confocal de la plantas transformada GFP-----	153
Figura 5.1 Esquema de las posibles relaciones entre el Ca^{2+} , ROS y NO y su papel en la regulación de la respuesta celular al Cd-----	183

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1.1 Especies de oxígeno reactivo (ROS) -----	14
Tabla 3.1 Composición de la solución nutritiva utilizada para hidropónicos de plantas de guisante -----	62
Tabla 3.2 Composición del medio MS (Murashige y Skoog) -----	63
Tabla 3.3 Composición de la solución nutritiva para cultivos hidropónicos de <i>Arabidopsis</i> -----	64
Tabla 3.4 Longitudes de onda de excitación y emisión de flurocromos -----	86
Tabla 3.5 Secuencia de cebadores degenerados, utilizados para la clonación parcial de cDNA -----	88
Tabla 3.6a Cebadores específicos de guisante -----	93
Tabla 3.6b Cebadores específicos de <i>Arabiopsis</i> -----	93

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario
AG: Aminoguanidina
APX: Ascorbato peroxidasa
ARN: Ácido ribonucleico
ARNasa: Ribonucleasa
ARNm: ARN mensajero
ASB: Albúmina de suero bovino
ASC: Ascorbato
BPDS: Batofenantrolindosulfónico
CAPS: Ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propano sulfónico
CAT: Catalasa
CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)dimetil-amonio]-1-propanosulfonato
CuZn-SOD: Cupro-Zinc superóxido dismutasa
D.O: Densidad óptica
DAF-2 DA: 4,5 diacetato de diaminofluoresceína
DAPI: 4',6-diaminido-2-fenilindol diacetato
DCF-DA: Carboxi-diclorofluoresceína diacetato
DEPC: Dietilpirocarbonato
DHA: ASC oxidado
DHE: Dihidroetidio
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNPH: 2,4-dinitrofenilpiracina
dNTP: Desoxinucleótidos
DTNB: Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
DTT: 1,4-ditiotreitol
EDTA: Sal sódica del ácido etilendiaminotetraacético
EPGA: Electroforesis en gel de poliacrilamida
EPGA-SDS: Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante
FDNB: Fluorodinitrobenzoceno
Fe-SOD: Ferro superóxido dismutasa
GFP: Proteína verde fluorescente
GOX: Glicolato oxidasa
GPX: Guayacol peroxidasa
GR: Glutación reductasa
GSH/GSSG: Glutathion reducido (γ -glutamyl-cisteinil-glicina)/ glutathion oxidado
GSNO: S-nitrosoglutation
GSNOR: S-nitrosoglutation reductasa
HEPES: Ácido N-2-hidroxiethylpiperacina-N'-2-etanosulfónico
HPLC: Cromatografía líquida de alta presión
HVA: Ácido homovanilínico
IPG: immobilized isoelectric focusing
IPTG: 1-isopropil-b-D-1-tiogalactopiranosido
LB: Medio de cultivo de Luria-Bertani

Abreviaturas

LRW: Resina RL white
MALDI-TOF: Matriz Assisted Lase Desorption Ionisation-Time Of Flight
MDA: Malondialdehído
MDS: Mínima diferencia significativa
Mn-SOD: Manganese superóxido dismutasa
MOPS: Ácido 3-morfolino propano sulfónico
MS: Medio de cultivo Murashige y Skoog
NAD(P)/NAD(P)H: 2-fosfonucleótido de nicotinamida y adenine oxidado/reducido
NBT: Azul de nitrotetrazolio
NEM: N-etilmaleímida
OCT: (Optimal Cutting Temperature)
PAR: Radiación disponible para fotosíntesi
PBS: Tampón fosfato salino (fosfato-K 20mM, pH7.5, NaCl 150mM)
pCMS: Cloromercurifenil sulfónico
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PIPES: ácido piperazina-N,N'-bis-2-etanosulfónico
PMSF: Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PTIO: 2-Fenil-5,5- tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido
PVC: Policloruro de vinilo
PVDF: difluoruro de polivinilo
S-AL: 3,4-ciclohexenoesculetina-b-D-galactopiranosido
SDS: Lauril sulfato sódico
SNP: Nitroprusiato sódico
SOD: Superóxido dismutasa
SSC: Citrato sódico 0.06 M, pH 7.0, y 0,6 M NaCl
TBS: Tris HCl 20 mM pH 7.8, NaCl 0.18 M
TBSTA: TBS con ASB al 2% (p/v) y Tween-20 al 0.05% (v/v)
TCA: Ácido tricloroacético
TEMED: N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina
TMP: Tetrametilpeperidina
TNB: Ácido 2-nitrobenzoico
Tris: trihidroximetilaminometano
WT: cepa silvestre
XOD: Xantina oxidasa

