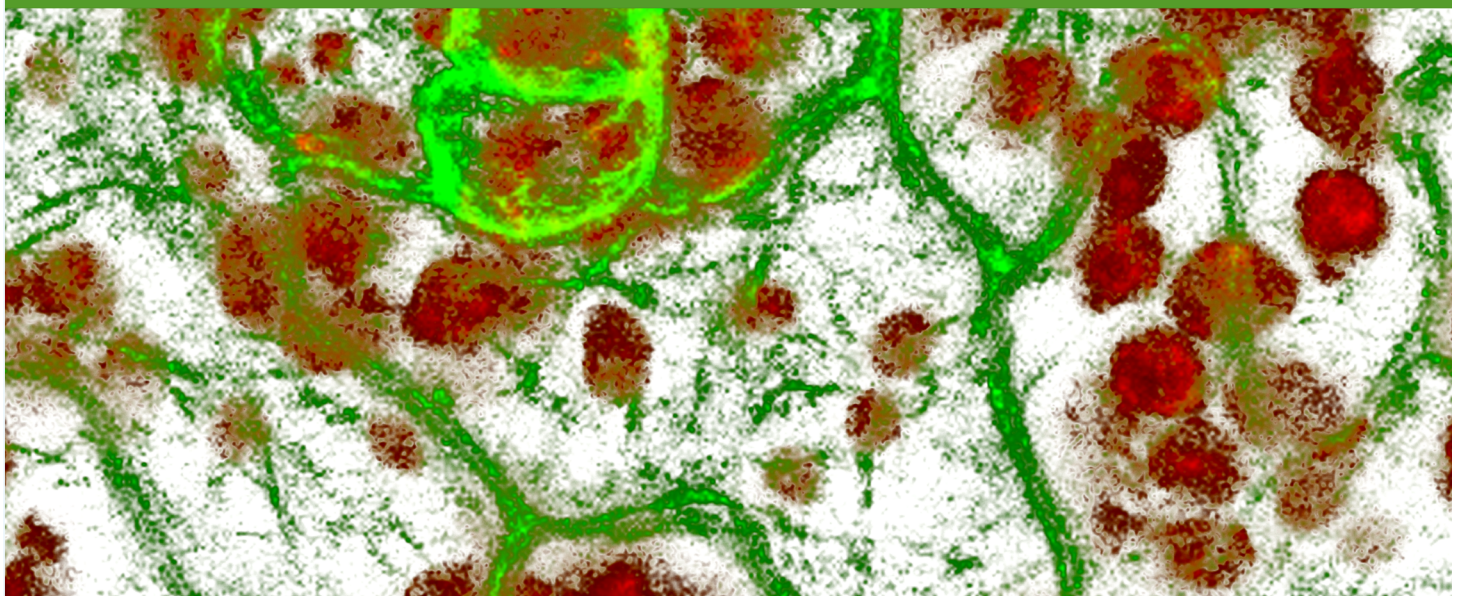


Contribución de las Especies de Oxígeno y Nitrógeno Reactivo, y de los Peroxisomas a la Toxicidad del 2,4-D en Plantas

Diana Pazmiño Mantilla
Tesis Doctoral
2009



**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC)
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN
UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS**



**CONTRIBUCIÓN DE LAS ESPECIES DE OXÍGENO Y
NITRÓGENO REACTIVO, Y DE LOS PEROXISOMAS
A LA TOXICIDAD DEL 2,4-D EN PLANTAS**

Diana Pazmiño Mantilla
TESIS DOCTORAL
2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Diana Pazmiño Mantilla
D.L.: GR 2305-2009
ISBN: 978-84-692-3106-7

CONTRIBUCIÓN DE LAS ESPECIES DE OXÍGENO Y NITRÓGENO REACTIVO, Y DE LOS PEROXISOMAS A LA TOXICIDAD DEL 2,4-D EN PLANTAS

Memoria que presenta la Licenciada en Microbiología
Diana Pazmiño Mantilla para optar al grado de Doctor.

Fdo. Diana Pazmiño Mantilla

V°B°
LOS DIRECTORES DEL TRABAJO

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

Fdo. Dra María C. Romero Puertas
Doctora en Ciencias Biológicas
Científico Titular del CSIC

Granada, Mayo de 2009

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 (CSIC), con ayuda de una beca del Programa de Itinerario Integrado de Inserción Profesional (I3P) del CSIC (2004), y ha sido financiado por la DGIMCyT (proyecto BF12002-04440-C02-01), proyecto del Plan Nacional (proyecto BIO2005-03305), y la Junta de Andalucía (grupo de investigación P06-CVI-01578).

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

- IX Congresso Luso Espanhol de Fisiologia Vegetal (Évora-Portugal, Septiembre 2005)
- Oxygen metabolism, ROS and redox signalling in plants a meeting of the Plant Oxygen Group, University of the West of England (Bristol, UK Diciembre 2005)
- SFRR Plant Oxygen meeting. ROS in Plants. "Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants". University of Gent (Belgium Septiembre 2007)
- IX Plant Molecular Biology Meeting (Santiago de Compostela, España Julio 2008)
- SFRR Plant Oxygen Group meeting on reactive oxygen and nitrogen species (Helsinki, Finland Julio 8 – 10 2009).

Agradecimientos

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que con su inestimable colaboración me han permitido realizar el presente trabajo.

Quiero dar las gracias a todos los componentes del Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas., (EEZ, Estación Experimental del Zaidín), con mención especial hacia mis Directoras de Tesis la Dra. Luisa Sandalio por su sorprendente capacidad para llevar tan diversas funciones a cargo y a la Dra. María C. Romero por su valioso aporte la fase de finalización de esta Tesis, a las dos las admiro por su talento como mujeres en la ciencia.

Al Prof. Luis Alfonso del Río, jefe y unidad del grupo. Al Prof. José M Palma por su amistad, consejos y buen humor. Al Dr Manuel Gómez por su valiosa ayuda con las plantas. Al Dr Javier Corpas y los integrantes de la Unidad asociada de la U de Jaén.

Gracias Mari Pepa por tu preocupación de madre, Carmelo por tu buena aura. Agradezco las indispensables enseñanzas de mi mini jefa María II, la amistad de todos los chicos del lab Rosa, Marina, Bea, Dani, Cris, Elena (gracias por tu interés y preocupación), las nenas Nieves y Ana que en esta última etapa me han alegrado y escuchado, el buen humor y simpatía de Morad, la buena mano de Marichu, y la disposición de David y Leo nuestros chicos de prácticas.

Es reconfortante y a la vez un poco triste, el hecho de que esta etapa de mi vida haya llegado a su fin, ya que ha significado muchos sacrificios y a la vez experiencias enriquecedoras, que han hecho de mi estancia en la EEZ una experiencia de vida única.

Resulta complicado resumir todas la vivencias y personas que me han acompañado durante estos años, ya que durante este recorrido he contado con el apoyo de muchas personas que de alguna u otra forma me han ofrecido su amistad, colaboración, consejos y compañía, personas que en muchos casos no he llegado a conocer pero que me ofrecieron una sonrisa o el saludo en los pasillos. A todos quiero dar mi más sincero agradecimiento.

Al Carlitos gracias por estar y darme tu amistad, a mi Bel la mejor hermana que nunca tuve (gracias por dejarme ser tu hija boba), a mi Miri “cositera” siempre dispuesta a escuchar, a Alejo “mi hermano de...”, a Jezú y la fragoneta por las escapadas, a Marce por sus bonitas notas, a Pablito y Juanito mis primeros compis y amigos, a Adri por su cariño, a Anita (se te echa de menos en la 2ª), a los chicos de Berlín y demás visitas turísticas Estefi, Celia, Mariu, Laura, Antonio, Luisa, Regi, Mario, Rosita, Fer, Dani.... A José el veci y a Mario (Mazinger Gatco) todavía espero serenata o bonita composición de cualquiera de los dos.

Agradecimientos

Agradezco la disposición y ayuda de Rosa Clares y Loles, siempre que pasé por la casa amarilla.

A Licy por su preocupación, a Pedro gracias por los caramelos, cocacolas... y buena energía y a Marisol por su alegría. A los informáticos Javier y César por su ayuda en el oscuro mundo de los ordenadores.

A Nieves de los servicios técnicos de la U. de Jaén, por como dicen aquí su "arte" en el manejo del confocal. A los servicios técnicos de la Universidad de Granada, Conchi por su indispensable ayuda y buena disposición siempre que necesité de ellos, a Juande y David.

A Dolo, Susana y Raquel, en la Uni, por su valiosa ayuda con el ET y los amenos ratitos de charla.

Gracias a Marisol F. del servicio de Proteómica del CNB por su valiosa ayuda y buen trabajo.

En esta larga estancia en la EEZ, más que sobre la bioquímica de los radicales libres, aprendí sobre la vida, la competencia, las relaciones y sobre todo aprendí el valor de la familia y de los amigos. Por esta razón doy gracias a mi mamá y mi papá, por aceptar que me haya ido tan lejos, por seguir resistiendo en la distancia y el tiempo, por el amor, cariño y soporte que siempre me han dado. A Domi por sus valiosos consejos, la enorme fuerza y apoyo que me ha brindado desde el principio, por su madurez para enfrentar la vida, y por el cariño, amor y comprensión que me brinda y me inspira.

Ich bin sehr glücklich, dass ich die Familie Zörner kennenlernen durfte, welche mich sehr lieb in ihren Kreis eingeschlossen hat und mich emotional bei meiner Arbeit unterstützt. Ich bedanke mich bei Sigrid und Rainer für die schönen Momente und bei Katty und Marco für die Freundschaft.

*A mis padres
A Domí*

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Auxinas: Efecto y Herbicidas Auxínicos | 3 |
| 1.2 Clasificación de los herbicidas auxínicos | 3 |
| 1.3 Empleo del 2,4-D en Sistemas de Experimentación <i>In vitro</i> | 5 |
| 1.4 Modo de Acción del 2,4-D | 7 |
| 1.4.1 Acción del 2,4-D a Nivel Subcelular | 8 |
| 1.4.1.1 Cloroplastos | 8 |
| 1.4.1.2 Mitocondrias | 9 |
| 1.4.1.3 Núcleo | 10 |
| 1.4.1.4 Peroxisomas | 10 |
| 1.4.2 Acción del 2,4-D Sobre el Balance Hormonal | 11 |
| 1.5 Señalización Dependiente de Auxinas | 13 |
| 1.6 Expresión Génica Dependiente de Auxinas | 16 |
| 1.7 Componentes del Transporte de Auxinas | 17 |
| 1.8 Efecto de las auxinas sobre el citoesqueleto de actina | 19 |
| 1.9 Especies de oxígeno reactivo (ROS) | 20 |
| 1.9.1 Producción de ROS en Sistemas Biológicos | 24 |
| 1.10 Eliminación de Especies de Oxígeno Reactivo | 28 |
| 1.10.1 Antioxidantes no Enzimáticos | 28 |
| 1.10.2 Antioxidantes Enzimáticos | 30 |
| 1.10.2.1 Superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1) | 30 |
| 1.10.2.2 Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6) | 31 |
| 1.10.2.3 Enzimas del Ciclo Ascorbato-Glutation | 31 |
| 1.10.2.4 NADP-Deshidrogenasas | 34 |
| 1.10.2.5 Otras Peroxidasas | 35 |
| 1.10.2.6 Glutation-S-Transferasas | 35 |
| 1.11 Peroxisomas | 36 |
| 1.11.1 Principales Funciones Metabólicas | 36 |
| 1.11.1.1 Degradación de ácidos grasos | 37 |
| 1.11.1.2 Fotorrespiración | 38 |
| 1.11.1.2 Metabolismo de los Ureidos | 39 |

| | | |
|---------------------------|---|-----------|
| 11.1.2 | Metabolismo del Oxígeno y Nitrógeno Reactivo y Sistemas Antioxidantes..... | 40 |
| 11.1.3 | Movimiento de Peroxisomas | 42 |
| OBJETIVOS | | 45 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | | 49 |
| 3.1 | Material Vegetal y Condiciones de Cultivo..... | 51 |
| 3.1.1 | Plantas de <i>Pisum sativum</i> L., cv <i>Lincoln</i> | 51 |
| 3.1.2 | Plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 51 |
| 3.1.3 | Tratamientos con el Ácido 2,4-diclorofenoxiacético | 52 |
| 3.1.3.1 | Vía Foliar | 52 |
| 3.1.3.2 | Tratamiento con Inhibidores y Moduladores en Brotes de Plantas de Guisante..... | 52 |
| 3.1.3.3 | Tratamiento con Inhibidores y Moduladores en Tiras de Hojas de Plantas de Guisante..... | 53 |
| 3.1.4 | Diseño Estadístico y Análisis de Resultados..... | 55 |
| 3.2 | Elaboración de Extractos Crudos..... | 55 |
| 3.2.1 | Homogenados de Hojas..... | 55 |
| 3.3 | Aislamiento y purificación de peroxisomas | 55 |
| 3.3.1 | Gradientes de Sacarosa..... | 55 |
| 3.4 | Desarrollos Electroforéticos | 56 |
| 3.4.1 | Geles de Poliacrilamida en Condiciones Nativas (EGPA) | 56 |
| 3.4.2 | Geles de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes (EGPA-SDS) | 57 |
| 3.4.3 | Tinción de Proteínas en EGPA-SDS..... | 57 |
| 3.4.3.1 | Tinción con Azul Coomassie | 57 |
| 3.4.3.2 | Tinción con Plata..... | 57 |
| 3.5 | Transferencia de Proteínas e Inmunodetección (técnica de Western-blot) | 58 |
| 3.5.1 | Transferencia de Proteínas | 58 |
| 3.5.2 | Inmunodetección | 58 |
| 3.6 | Determinación de Actividades Enzimáticas | 59 |
| 3.6.1 | Xantina Oxidorreductasa..... | 59 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.6.2 | Superoxido Dismutasa (SOD;EC 1.15.1.1) | 60 |
| 3.6.3 | Catalasa (CAT;EC 1.11.1.6)..... | 61 |
| 3.6.4 | Acil-CoA Oxidasa (ACX; EC 1.3.3.6) | 62 |
| 3.6.5 | Glutation S-transferasa (GST, EC 2.5.1.18)..... | 62 |
| 3.6.6 | Lipoxigenasa (LOXs; 1.13.11.12)..... | 63 |
| 3.6.7 | Guayacol Peroxidasa (GPX) | 63 |
| 3.6.8 | Glutation Reductasa (GR; EC 1.6.4.2) | 63 |
| 3.6.9 | Ascorbato Peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11)..... | 64 |
| 3.6.10 | Gicolato Oxidasa (GOX; EC 1.1.3.1)..... | 64 |
| 3.6.11 | S-Nitrosoglutation Reductasa..... | 64 |
| 3.7 | Peroxidación Lipídica | 64 |
| 3.8 | Determinación de Glutation Reducido y Oxidado | 65 |
| 3.9 | Determinación de Ascorbato (ASC) | 65 |
| 3.10 | Determinación de Proteínas..... | 66 |
| 3.11 | Determinación de Peróxido de Hidrógeno | 66 |
| 3.11.1 | Análisis en Solución | 66 |
| 3.11.2 | Localización <i>in situ</i> de H ₂ O ₂ | 66 |
| 3.12 | Detección Espectrofluorimetrica de NO en Solución | 67 |
| 3.13 | Análisis de Proteínas S-Nitrosiladas | 67 |
| 3.13.1 | S-Nitrosilación de la Actina | 67 |
| 3.14 | Determinación de Grupos Carbonilo..... | 67 |
| 3.14.1 | Medida en Solución..... | 68 |
| 3.14.2 | Detección Inmunoquímica..... | 68 |
| 3.14.3 | Inmunoprecipitación de Proteínas Oxidadas..... | 69 |
| 3.15 | Análisis de Emisión de Etileno | 69 |
| 3.16 | Aislamiento y Manipulación de Ácidos Nucleicos | 69 |
| 3.16.1 | Extracción de ARN | 69 |
| 3.16.2 | Cuantificación y Análisis Electroforético del ARN | 70 |
| 3.16.3 | Análisis de expresión por RT-PCR semicuantitativa..... | 70 |
| 3.17 | Obtención y Análisis de Proteínas Fosforiladas en Peroxisomas de Hojas de Guisante..... | 71 |
| 3.17.1 | Tinción de Fosfoproteínas Pro-Q [®] Diamond | 73 |

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| 3.17.2 | Análisis Diferencial de Proteínas Fosforiladas mediante 2D-DIGE e Identificación y Caracterización por MALDI-TOF | 73 |
| 3.18 | Microscopía Óptica y Confocal..... | 76 |
| 3.18.1 | Estudios Estructurales..... | 76 |
| 3.18.2 | Detección de Óxido Nítrico (NO), peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) y Superóxido (O ₂ ⁻), por Microscopía Confocal | 76 |
| 3.19 | Visualización del Citoesqueleto..... | 78 |
| 3.20 | Análisis del Movimiento de Peroxisomas | 79 |
| RESULTADOS | | 81 |
| 4.1 | Efecto del 2,4-D sobre el Fenotipo de Plantas de Guisante y <i>Arabidopsis</i> | 83 |
| 4.2 | Efecto del 2,4-D Sobre el Metabolismo de ROS en Plantas de Guisante | 85 |
| 4.2.1 | Análisis de Enzimas Generadoras de ROS..... | 85 |
| 4.2.2 | Efecto del 2,4-D Sobre Sistemas Antioxidantes..... | 88 |
| 4.2.2.1 | Antioxidantes Enzimáticos..... | 89 |
| 4.2.2.2 | Expresión de Enzimas Antioxidantes | 93 |
| 4.2.2.3 | Antioxidantes no Enzimáticos..... | 94 |
| 4.2.3 | Efecto del 2,4-D sobre la Producción de ROS | 95 |
| 4.2.3.1 | Producción de H ₂ O ₂ | 96 |
| 4.2.3.1.1 | Contenido Total de H ₂ O ₂ | 96 |
| 4.2.3.1.2 | Acumulación Tisular de H ₂ O ₂ | 97 |
| 4.2.3.2 | Visualización de la Producción de ROS y NO Mediante Microscopía Láser Confocal..... | 99 |
| 4.2.3.2.1 | Detección de H ₂ O ₂ | 99 |
| 4.2.3.2.2 | Detección de O ₂ ⁻ | 101 |
| 4.2.3.2.3 | Producción de NO | 106 |
| 4.2.3.2.3.1 | Detección de NO Mediante Fluorimetría | 110 |
| 4.2.3.3 | Marcadores de Estrés Oxidativo | 110 |
| 4.2.4 | Modificación Oxidativa y Nitrosativa de Proteínas | 111 |
| 4.2.5 | Efecto del 2,4-D Sobre la Producción de Etileno | 113 |
| 4.2.6 | Efecto del 2,4-D Sobre la Expresión de Proteínas de Defensa..... | 114 |
| 4.3 | Regulación de la Respuesta Celular Frente al 2,4-D | 114 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 4.3.1 | Regulación de la Epinastia Foliar..... | 114 |
| 4.3.1.1.1 | Producción de H ₂ O ₂ | 119 |
| 4.3.1.2 | Regulación de la Capacidad Antioxidante..... | 120 |
| 4.3.1.2.1 | Antioxidantes Enzimáticos | 120 |
| 4.3.1.2.2 | Antioxidantes no Enzimáticos | 121 |
| 4.3.2 | Regulación de la Producción de Etileno..... | 123 |
| 4.4 | Papel de los Peroxisomas en la Respuesta al 2,4-D | 124 |
| 4.4.1 | Efecto del 2,4-D sobre Peroxisomas | 124 |
| 4.4.1.1 | Movimiento de Peroxisomas en Respuesta al Estrés por 2,4-D | 124 |
| 4.4.1.2 | Análisis Estructural del Citoesqueleto | 125 |
| 4.4.1.2.1 | S-Nitrosilación de la Actina | 129 |
| 4.4.1.3 | Efecto del 2,4-D sobre la Fosforilación de Proteínas Peroxisomales..... | 130 |
| | DISCUSIÓN | 139 |
| 5.1 | El 2,4-D promueve desarrollo anormal de hojas y senescencia | 142 |
| 5.2 | El 2,4-D Promueve la Generación de ROS..... | 144 |
| 5.3 | Acumulación Tisular de ROS Dependiente del Herbicida 2,4-D | 149 |
| 5.4 | Papel del NO en la Respuesta Inducida por 2,4-D | 150 |
| 5.5 | El 2,4-D Induce la Producción de Etileno..... | 151 |
| 5.6 | El 2,4-D activa Proteínas de Defensa | 152 |
| 5.7 | Regulación de la respuesta celular al 2,4-D | 154 |
| 5.8 | Modificaciones en el Citoesqueleto de Actina..... | 156 |
| 5.9 | El 2,4-D afecta la dinámica de Peroxisomas | 158 |
| 5.10 | Patrón de proteínas fosforiladas de Peroxisomas y modificaciones por el 2,4-D | 160 |
| | CONCLUSIONES | 167 |
| | BIBLIOGRAFÍA | 171 |

INTRODUCCIÓN

1.1 Auxinas: Efecto y Herbicidas Auxínicos

El crecimiento es una de las principales funciones llevadas a cabo por la auxina, una de las primeras hormonas descubiertas en plantas, su nombre proviene del Griego *auxein*, que significa incrementar. En la actualidad se sabe que la auxina descubierta por Fritz Went en 1926 es el ácido indolacético (IAA) que es la forma predominante en plantas y junto a otros tres compuestos estructuralmente similares, el ácido 4-cloroindolacético (4-cloroIAA), el ácido fenilacético (PAA) y el ácido indolbutírico (IBA), regulan aspectos del desarrollo vegetal como el crecimiento de tallos, hojas y raíces, y el desarrollo de ramas laterales y del fruto (Salisbury y Ross, 1992). Hoy en día, la auxina es quizás la hormona de la que menos se conoce de las hormonas encontradas en plantas y es una de las más parecidas al concepto que se tiene de mensajero, sintetizada en una parte de la planta y actuando en otra.

La regulación del crecimiento en plantas es un fenómeno interactivo en el cual las fitohormonas pueden actuar ya sea sinérgicamente o antagonicamente entre sí, a nivel de señalización hormonal, concentración y respuesta fisiológica, promoviendo una respuesta bifásica y dependiente de la dosis en la planta. Uno de los principales efectos ejercidos por altas concentraciones de fitohormonas, es la inhibición fitotóxica del crecimiento (Grossmann, 2003).

El desarrollo de sustancias químicas que imitan el comportamiento de las auxinas naturales ha adquirido gran importancia práctica, no solo por su aplicación como biorreguladores sino también por el control que ejercen sobre las denominadas “malas hierbas” en la agricultura. En los últimos cincuenta años las auxinas sintéticas se han utilizado con éxito en agricultura para el control selectivo de malezas de hoja ancha, siendo los primeros herbicidas en mostrar alto grado de selectividad. Los herbicidas son esencialmente inhibidores enzimáticos que afectan a las reacciones metabólicas básicas en la vida de la planta, éstos son transportados sistémicamente en la planta y ejercen su acción selectiva en plantas dicotiledóneas, actuando básicamente como sustancias sintéticas que imitan la actividad del ácido 3- indol acético (Cobb, 1992; Devine y col., 1993; Sterling y Hall, 1997; Grossmann, 2000a; Grossmann, 2003; Romero-Puertas y col., 2004a).

1.2 Clasificación de los herbicidas auxínicos

La clasificación de herbicidas, propuesta por el “Herbicide Resistance Action Committee” (HRAC) y desarrollada en cooperación con la “Weed Herbicide Society of America”, sitúa en el grupo HRAC “O” a los herbicidas cuyo modo de acción es similar al

Introducción

del ácido indolacético en este grupo se incluyen todos los herbicidas auxínicos sintéticos. El grupo HRAC "O" se halla a su vez dividido en cinco subgrupos (Dollinger, 2005):

| | |
|---------------------------------|--|
| 1) Ácidos fenoxi-carboxílicos | 2,4-D; 2,4,5-T; 2,4,5-TP, 2,4-DB; Diclorprop (2,4-DP) MCPA; MCPB y Mecoprop, MCPP. |
| 2) Ácido benzoico | Dicamba, Cloramben y TBA |
| 3) Ácidos Piridin-carboxílicos | Clopiralida, Fluroxipir, Picloram y Triclopir |
| 4) Ácidos quinolin-carboxílicos | Quinclorac y Quinmerac |
| 5) Otros | Etil-benazolin |

Dentro de los herbicidas auxínicos, Grossman (2000a) también incluye a los ácidos indólicos (derivados del IAA) y naftalénicos. Por tanto, según esta clasificación aún vigente, el 2,4-D es un herbicida biclorado de actividad auxínica y gran similitud con el IAA (Figura 1.1), perteneciente al grupo O1 según la HRAC. Atendiendo a su estructura química, en el subgrupo de los ácidos fenoxicarboxílicos se distinguen a su vez las siguientes series: (Loos, 1975).

-Serie fenoxiacética: 2,4-D; 2,4,5-T y MCPA.

-Serie fenoxipropiónica: Mecoprop, Diclorprop y Fenoprop.

-Serie fenoxibutírica: MCPB, 2,4-B y 2,4,5-TB

-Serie fenoxibenzóica: TCB (no autorizado en España)

-Serie fenoxietílica: MCPES, Sesone; 2,4,5-TEs; 2,4-DEP; 2,4-DEB y Erbon

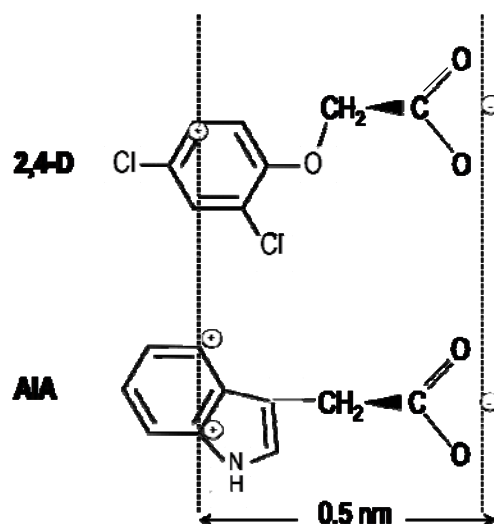


Figura 1.1: Similitudes estructurales entre la auxina IAA y el herbicida axuníco 2,4-D.

1.3 Empleo del 2,4-D en Sistemas de Experimentación *In vitro*

El cultivo de células vegetales *in vitro* requiere normalmente una fuente exógena de auxina para el crecimiento normal de la planta, mientras que los cultivos celulares obtenidos a partir de agallas inducidas por *Agrobacterium tumefaciens* crecen sin necesidad de estas. La relación entre auxinas y citoquininas es lo que en realidad influye en el tipo de crecimiento y controla la morfogénesis, de manera que se puedan obtener callos, raíces o plántones sólo con variar la relación de estas hormonas (Westhoff, 1998; Bronsema y col., 2001). La correcta elección y combinación de reguladores del crecimiento resulta ser crítica dependiendo de la especie con la que se trabaje; así, en la inducción de formación de callos y subsiguiente regeneración de plantas de trigo resulta ser más efectiva la utilización de dicamba que 2,4-D o picloram, aunque el 2,4-D sea mucho más efectivo sobre la embriogénesis (Satyavathi y col., 2004).

Las auxinas desempeñan un papel clave en el control de la división y la elongación de las células vegetales mediante la alteración del patrón de expresión génica. Así altas concentraciones de 2,4-D pueden incluso reiniciar el programa ontogénico completo en cultivos celulares (Ishida y col., 1992; Tréhin y col., 1998; Kitamiya y col., 2000). En estos sistemas el 2,4-D es usado como sustituto del IAA a concentraciones de hasta 9 μM para estimular la mitosis y mantener el crecimiento de las células vegetales no diferenciadas (Yang y col., 1999). Es por esto que el 2,4-D sólo o en combinación con otras hormonas se usa de rutina en la inducción de embriogénesis somática (Mordhorst y col., 1998; Raghavan, 2004) y en el cultivo de embriones zigóticos de *Arabidopsis thaliana* (Sangwan y col., 1992; Luo y Koop, 1997; Mordhorst y col., 1998; Ikeda-Iwai y col., 2003).

Introducción

Por otro lado, los herbicidas auxínicos se han empleado en investigación como sondas específicas para modificar el metabolismo de la planta y poder esclarecer algunos procesos bioquímicos (Bogër y Sadmann, 1988). Así se ha observado que las auxinas producen alteración del metabolismo de los ácidos nucleicos (Grossmann, 2000a). Wu y col (1996) observaron que la expresión del gen putativo de la 1,4- β endo-glucanasa (EI) EGL1, se inducía en hipocotilos de guisante, 5 h después del tratamiento con 2,4-D; la expresión del gen de la EI y la β exoglucanasa (ExoII) se inducía también por el tratamiento con IAA en hipocotilos de cebada, y en ambos casos tenía lugar una elongación del tejido muy probablemente debido a la acidificación de la pared celular también provocada por la auxina (Kotake y col., 2000).

La aplicación de 2,4-D en cultivos de células de tabaco BY-2 exentas de auxina, causa una rápida y transitoria estimulación de ciertas actividades MAP-quinasas y MAP-quinasas-quinasas, lo que sugiere que la auxina puede funcionar como activador de homólogos de MAP-quinasa, tal como lo hacen varios mitógenos en sistemas animales (Hirt, 2000; Nakagami y col., 2005). En este mismo sistema, la eliminación del 2,4-D del medio de cultivo estimulaba tanto el acúmulo de almidón (Miyazawa y col., 2002b), como la formación de amiloplastos (Sakai y col., 1996), sugiriendo que la auxina y la citoquinina ejercen efectos opuestos sobre la formación de amiloplastos, al regular de forma diferencial la expresión de los genes requeridos para la biosíntesis del almidón (Miyazawa y col., 2002a).

Las auxinas también influyen sobre el metabolismo de flavonoides; así en cultivos celulares de zanahoria (*Daucus carota*) y flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) el 2,4-D regula la actividad de la chalcón sintasa (CHS) y la acumulación de antocianina (Ozeki y col., 1987; Mizukami y col., 1989). Además, en cultivos celulares de *Flaveria bidentis*, la actividad y los niveles de transcrito de la flavonol 3-sulfotransferasa (F3ST), enzima que cataliza el primer paso en la biosíntesis de polisulfatos de flavonol, se induce por el 2,4-D, lo que sugiere una posible implicación de los conjugados de flavonoides en la regulación del transporte de auxinas (Ananvoranich y col., 1995).

Algunos estudios sobre el efecto de las auxinas en el contenido de ácidos grasos en embriones zigóticos y la composición lipídica durante la inducción de embriones somáticos, revelaron que el 2,4-D incrementa la eficiencia de procesos relacionados con la desaturación de ácidos grasos (Liu y col., 1995). Por otra parte se ha observado la activa implicación de auxinas y citoquininas en los cambios que ocurren en lípidos de membrana, en plantas de *Arabidopsis* sometidas a déficit de fosfato, además del requerimiento de auxinas para acumulación de galactolípidos y la activación de genes del tipo B *MGD* que

codifican para unos de los principales lípidos constituyentes de la membrana tilacoidal (Kobayashi y col., 2006). También se ha observado que las auxinas afectan la actividad lipoxigenasa (LOX). Así, en embriones de soja (*Glycine max*) se observó que el nivel de proteínas de LOX-1, 2 y 3, así como sus actividades, disminuyen tras 10 días de tratamiento con 2,4-D lo que afectó negativamente a la activación y desarrollo de los embriones (Liu y col., 1991), posiblemente como consecuencia del importante papel que tienen las LOXs en la movilización de triacilgliceroles durante germinación y desarrollo (Cobb, 1992; Taiz y Zeiger, 2006); por el contrario la expresión de LOX-4 y 5 se inducía por el tratamiento con IAA y NAA pero no por el 2,4-D (Wang y col., 1999).

1.4 Modo de Acción del 2,4-D

Los herbicidas auxínicos imitan el modo de acción de la principal auxina natural, el IAA, sin embargo a altas concentraciones y en dicotiledóneas sensibles su efecto es antagónico (Grossmann, 2000b; Zheng y Hall, 2001). Su modo de acción depende de la concentración, a concentraciones bajas estimulan el crecimiento y procesos de desarrollo como la división celular y la elongación, mientras que a concentraciones altas afectan el crecimiento negativamente, llegando a ser letales para la planta. Además de la concentración, el espectro de acción de los herbicidas auxínicos depende de la sensibilidad del tejido, que a su vez depende de la especie y del estado fisiológico de la planta (Hansen y Grossmann, 2000; Zheng y Hall, 2001).

Una vez que el 2,4-D es absorbido por la planta, se transloca a través del simplásto hacia los puntos de crecimiento de la misma, y a las pocas horas de su aplicación, este tipo de herbicidas causan una distorsión en el crecimiento de toda la planta, llegando incluso a lugares bastante alejados del punto en que tuvo lugar la absorción local (Grossmann, 2000a; Grossmann y col., 2001). Robertson y Kirkwood (1970) demostraron que la absorción del 2,4-D se veía fuertemente influenciada por la estructura de la cutícula en las plantas, la humedad, la luz, la temperatura, la formulación del herbicida, el pH y los surfactantes usados para su aplicación.

Se ha descrito que el 2,4-D y los herbicidas auxínicos inicialmente detienen el crecimiento de los brotes y raíces, y la apertura de las flores, posteriormente se curvan los tallos y las hojas, las raíces y los tallos se hinchan y deforman por la aparición de agallas o proliferación celular en los tejidos del córtex, la endodermis, el periciclo, el floema primario y el cámbium, causando la desorientación, desorganización y destrucción del floema (Hansen y Grossmann, 2000). Además, las células del sistema vascular en proliferación contienen un citoplasma denso, grandes núcleos y turgentes, a diferencia de las células de flores y

Introducción

hojas, que están muy plasmolizadas y vacuoladas, y parecen tener una menor división celular (Hallam y Sargent, 1970). Otro efecto es la inducción de la formación de primordios de raíces laterales (Zimmerman y Hitchcock, 1948; Vuylsteker y col., 1998).

En lo que se refiere al efecto sobre la ultraestructura, se ha observado que las aplicaciones de los fenoxiácidos, 2,4-D; 2-CPA y 2,6-D sobre hojas de *Phaseolus vulgaris* (Anderson y Thomson, 1973), *Nicotiana tabacum* (Hallam, 1970; Anderson y Thomson, 1973) y *Pisum sativum* (Romero-Puertas y col., 2004a), causan la rotura aparente de la membrana plasmática, el tonoplasto y el retículo endoplasmático en las células de la epidermis, el parénquima en empalizada y el parénquima lagunar. Asimismo, estos compuestos producen un incremento en el número de ribosomas libres y asociados al retículo endoplasmático, y un aumento en el grado de empaquetamiento del citoplasma (Anderson y Thomson, 1973).

Los herbicidas auxínicos también afectan a las membranas celulares, causando su hiperpolarización mediante la activación de la H^+ ATPasa, con la subsecuente activación de canales de K^+ (Fuchs y col., 2006; Moyon y col., 2007), además de afectarse el transporte de Ca^{2+} (Allender y col., 1997) e iones cloruro (Keller y Volkenburgh, 1996) a través de la membrana plasmática. Se ha demostrado la interacción específica del 2,4-D con la membrana plasmática en distintas especies vegetales (Morré y col., 1999; Barr y col., 2000) en las que se ha descrito su adsorción en la interfase apolar/polar de la bicapa lipídica (Bertagnolli y Nadakavukaren, 1971).

La selectividad de estos herbicidas por especies dicotiledóneas parece estar relacionada con la estructura de la planta y con la velocidad de translocación del herbicida. Estos herbicidas se transportan fundamentalmente por el floema, sin embargo, en monocotiledóneas el floema es de difícil acceso a estos herbicidas ya que se encuentra rodeado por células de esclerénquima y carece de cambium y periciclo sensibles a las auxinas (Hanson y Slife, 1969). La absorción y translocación de herbicidas por vía foliar también está más restringida en monocotiledóneas (Loos, 1975).

1.4.1 Acción del 2,4-D a Nivel Subcelular

1.4.1.1 Cloroplastos

En diferentes especies vegetales se ha demostrado que el 2,4-D afecta al desarrollo, estructura y funcionalidad de los cloroplastos, provocando el empaquetamiento de los grana tilacoidales. Este efecto es dependiente de la concentración, así a bajas concentraciones puede potenciar la actividad asimilatoria de C y la actividad fotoquímica de los cloroplastos, mientras que a altas concentraciones tiene un efecto inhibitorio (Cárdenas y

col., 1968; Bertagnolli y Nadakavukaren, 1971; Douschkova y col., 1989). Los fenoxiherbicidas también alteran el contenido de pigmentos en las plantas, produciendo inhibición del contenido de clorofila y carotenoides, disminución de la relación clorofila a/benzoquinonas y un incremento en la relación xantofila/carotenos; lo que sugiere que estos herbicidas promueven la inducción de la senescencia en el aparato fotosintético (Kleudgen, 1979; Segura-Aguilar y col., 1995; Wong, 2000). El 2,4,5-T y el 2,4-D también actúan como inhibidores de la reacción de Hill (McCracken y col., 1981) e inhibiendo el transporte electrónico en el fotosistema II (Sargent y Blackman, 1965; Nadakavukaren y McCracken, 1977).

Es bien sabido que la luz estimula la penetración del 2,4-D en la superficie de las hojas potenciando el efecto de estos herbicidas sobre los cloroplastos, ya que el 2,4-D se acumula y se metaboliza en estos orgánulos. Es por ello que se ha sugerido que los cloroplastos podrían ser el punto inicial de la acción del 2,4-D (Mannella y Bonner, 1978; McCracken y col., 1981; Laurent y col., 2006).

1.4.1.2 Mitocondrias

Uno de los principales efectos del 2,4-D es el incremento de la tasa respiratoria, que tiene lugar bien por un aumento en la tasa de incorporación de CO₂ (Fang y col., 1961; Grossmann y col., 2001) o bien por el aumento en la producción de CO₂ (Kelly y Avery, 1949; Grossmann y col., 1996). Estos efectos podrían deberse a la apertura de los estomas que afecta el balance de CO₂ en la hoja. Humphreys y Dugger (1957), observaron que el 2,4-D en raíces producía un incremento en la cantidad de glucosa catabolizada por la vía de las pentosas fosfato, sin embargo Fang (1960) observó el efecto contrario en tallos de *Phaseolus vulgaris*. Igualmente se ha sugerido que el incremento en la respiración inducido por el 2,4-D, IAA y otras sustancias reguladoras, podría ser el resultado del aumento en el crecimiento inducido por estas (Humphreys y Dugger, 1957).

A concentraciones agronómicas del herbicida, se inducía el crecimiento y la fosforilación oxidativa en las mitocondrias de hipocotilos de brotes de soja, mientras que en la zona apical del hipocotilo se observaba el efecto contrario (Anderson y Thomson, 1973). Elevadas concentraciones de 2,4-D inhiben sustancialmente la incorporación de O₂ y la fosforilación oxidativa de mitocondrias vegetales en presencia de malato, citrato, α -cetoglutarato y succinato (Pireaux y col., 1992; Oakes y Pollak, 1999).

Con respecto a la ultraestructura, las mitocondrias muestran generalmente pocos cambios estructurales en respuesta al tratamiento con herbicidas (Anderson y Thomson, 1973). Sin embargo, el tratamiento de brotes de soja con 2,4-D 0,5 mM producía

Introducción

hinchamiento de las mitocondrias del hipocotilo, si bien este hinchamiento podría deberse al crecimiento de las mitocondrias, y no de una simple entrada osmótica de agua, ya que estaba acompañado de un aumento en la actividad mitocondrial (Key y col., 1960).

1.4.1.3 Núcleo

Uno de los cambios bioquímicos más marcados en las plantas tratadas con 2,4-D y 2,4,5-T, es el incremento en el contenido de ácidos nucleicos (West y col., 1960; Basler y Hansen, 1964; Cárdenas y col., 1968; Sen, 1978). Se ha establecido que el 2,4-D en tejidos sensibles, tales como plántulas de soja, resulta en una masiva acumulación de ADN y ARN asociado con la inducción de la división celular (West y col., 1960; Key y Shannon, 1964). Experimentos llevados a cabo por Chrispeels y Hanson (1962) mostraron que el ARN de hipocotilos de soja aumentaba un 175 % 48 horas después de la aplicación del 2,4-D, siendo este ARN fundamentalmente ribosomal; si bien Verma y colaboradores (1975) demostraron que también se aumentan los niveles de ARNm específico y ARN ribosomal, al igual que el de celulasa. Elevadas concentraciones de 2,4-D o auxinas previenen la degradación del ARNr y soluble, que normalmente acompaña al crecimiento expansivo de las células jóvenes (Key y Shannon, 1964).

El 2,4-D acelera la replicación así como la síntesis de histonas en tejidos de núcleos maduros (Holm y col., 1970; Chen y col., 1972; Kahl y col., 1979). Además el 2,4-D también producía un aumento y un cambio en el patrón de fosforilación de proteínas del núcleo, el cual está correlacionado con el incremento de los niveles de actividad proteinquinasa en el núcleo (Murray y Key, 1978; Schäfer y Kahl, 1981).

1.4.1.4 Peroxisomas

En tejidos animales se ha observado que el 2,4-D produce cambios en el metabolismo oxidativo de peroxisomas e induce a la proliferación de estos orgánulos (Abdellatif y col., 1990). Por otro parte en plantas de guisante el tratamiento con este herbicida no parece tener efectos sobre la población peroxisomal, pero sí sobre enzimas del metabolismo peroxisomal, como la isocitrato liasa, la glutatión reductasa, XOD, acil-CoA oxidasa y la MnSOD, las cuales aumentan en peroxisomas de plantas tratadas con 2,4-D, con la concomitante reducción de la actividad y contenido proteico de la catalasa (del Río y col., 2002a; McCarthy, 2004; Romero-Puertas y col., 2004a).

El aislamiento y caracterización de mutantes resistentes a concentraciones inhibitorias de IBA (ácido indolbutírico) y de ácido 2,4-fenoxi hidroxibutírico (2,4-DB), precursores de IAA y 2,4-D respectivamente, han permitido evidenciar el papel de la β -

oxidación en el proceso de conversión de IBA y 2,4-DB a IAA y 2,4-D (Hayashi y col., 1998; Nyathi y Baker, 2006).

1.4.2 Acción del 2,4-D Sobre el Balance Hormonal

Se ha sugerido que compuestos como el 2,4-D pueden interferir con las auxinas endógenas, bien inhibiendo su transporte (Delbarre y col., 1996) y favoreciendo su oxidación por la indolacético oxidasa (Gordon, 1954), o compitiendo con las auxinas por sus sustratos (Loos, 1975), lo que se traduciría en una reducción del complejo auxínico necesario para el crecimiento normal (Morris y col., 2004).

El guisante contiene una cantidad elevada de 4-cloro-indolacético cuya función puede estar relacionada con la regulación de la senescencia, a través de la inducción de etileno (ET) e inhibición del crecimiento de los meristemos. Este podría ser en parte el mecanismo de acción de los herbicidas auxínicos, simulando o mimetizando los factores naturales implicados en el inicio y desarrollo de la senescencia (Engvild, 1996; Karcz y Burdach, 2002).

Los efectos de los herbicidas auxínicos podrían deberse a un desequilibrio entre auxinas y citoquininas, lo que daría lugar a la formación de tumores como consecuencia de la inducción de la división celular, pero no de la diferenciación (Masferrer y col., 2002; Grossmann, 2003). Sin embargo, la alta especificidad de la mayoría de los herbicidas por la especie vegetal, y la baja concentración a la que ejercen su acción sugieren un mecanismo más específico (Grossmann, 2000a).

Una característica de los herbicidas auxínicos es la inducción de la síntesis de ET (Jones y Kende, 1979; Morris y col., 2004). Las auxinas activan la síntesis *de novo* de la 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa (ACCS), aunque no se conoce si su acción es a nivel transcripcional o postranscripcional (McKeon y col., 1995; Wei y col., 2000). Esta enzima cataliza la conversión de S-adenosilmetionina a ACC, que es a su vez precursor del ET (Grossmann, 2000a), y está codificada por una serie multigénica que a su vez pertenece a los genes de respuesta a auxinas (Yoon y col., 1999). Los genes *acs* se expresan diferencialmente dependiendo del tejido, pero también en senescencia y en respuesta a distintas situaciones de estrés. Si bien este incremento de la síntesis de ET no es responsable del efecto fitotóxico de estos herbicidas, sí está asociado a la sintomatología relacionada con el crecimiento aberrante, la epinastia foliar, y la curvatura y estrechamiento necrótico del tallo (Grossmann, 2003). A bajas concentraciones, estos herbicidas pueden inhibir la síntesis de ACC y por tanto, la formación de ET (Grossmann y Retzlaff, 1997).

Introducción

Grossmann y col, (2001) han propuesto que la formación de CN^- , como subproducto de la síntesis de ET, podría ser responsable en parte, de la toxicidad de estos herbicidas. El ET también induce la síntesis de ABA, a través de la inducción de la degradación oxidativa de xantofilas a xantoxina (Grossmann, 2000a). Así, la administración de compuestos auxínicos a altas concentraciones producen acúmulos de ABA fundamentalmente en raíces y brotes (Grossmann y col., 2001). La inducción de ET y ABA por auxinas se detecta en primer lugar en el tallo y desde allí, el ABA es translocado al resto de la planta (Grossmann, 2000a, b). En paralelo al aumento del ABA, tiene lugar una reducción de la apertura estomática, transpiración y asimilación del carbono, y como consecuencia de ello, las plantas muestran síntomas de senescencia progresiva (Hansen y Grossmann, 2000; Veselov y col., 2003). Por todo ello, se ha propuesto que el ABA podría actuar como segundo mensajero en la señalización auxínica que tiene como resultado la inhibición del crecimiento de plantas sensibles, y la inducción de senescencia bajo altas concentraciones de herbicidas auxínicos y ácido indolacético (Liu y Wang, 2006). También se ha demostrado que los herbicidas auxínicos producen acumulo de H_2O_2 en paralelo a los niveles de ABA y ET, y coincidiendo con la aparición de daños tisulares (Grossmann y col., 2001; Romero-Puertas y col., 2004a). No obstante, no se conoce con exactitud la fuente de H_2O_2 , aunque se ha especulado que el cierre de los estomas podría favorecer su producción en cloroplastos como consecuencia del desvío de los electrones hacia el O_2 en la membrana tilacoidal (Grossmann y col., 2001). Otros autores han demostrado que el H_2O_2 podría proceder de la NADPH oxidasa de la membrana plasmática (Schopfer y col., 2002). Recientemente, Romero-Puertas y col, (2004a) han sugerido que los peroxisomas podrían ser otra fuente de H_2O_2 , ya que en estos orgánulos tiene lugar un incremento de la actividad XOD, por efecto del tratamiento con 2,4-D.

En la Figura 1.2 se muestra un modelo del mecanismo de acción de los herbicidas auxínicos propuesto por Grossmann y col, (2001) en el que se concede un papel relevante al ET, ABA y ROS. Según estos autores, la reducción de la asimilación de CO_2 , como consecuencia del cierre estomático inducido por ABA, conduciría a un acúmulo de ROS que a su vez estarían implicados en la producción de daños y muerte celular.

Recientemente y tras una larga búsqueda, se ha identificado a la proteína TIR1 (del inglés, Transport inhibitor response 1) como receptora de auxinas (Dharmasiri y col., 2005a; Kepinski y Leyser, 2005). Si bien con anterioridad han sido descritas varias proteínas con actividad de unión al IAA, entre ellas las GSTs (Bilang y col., 1993), formaldehído deshidrogenasas (Sugaya y Sakai, 1996) y otras proteínas asociadas a membrana

plasmática, pared celular o núcleo (Leyser, 2001; Zheng y Hall, 2001). Además, la ruta de transducción de señales en respuesta a auxinas y la (s) fuente (s) de ROS en este proceso no se ha identificado en detalle.

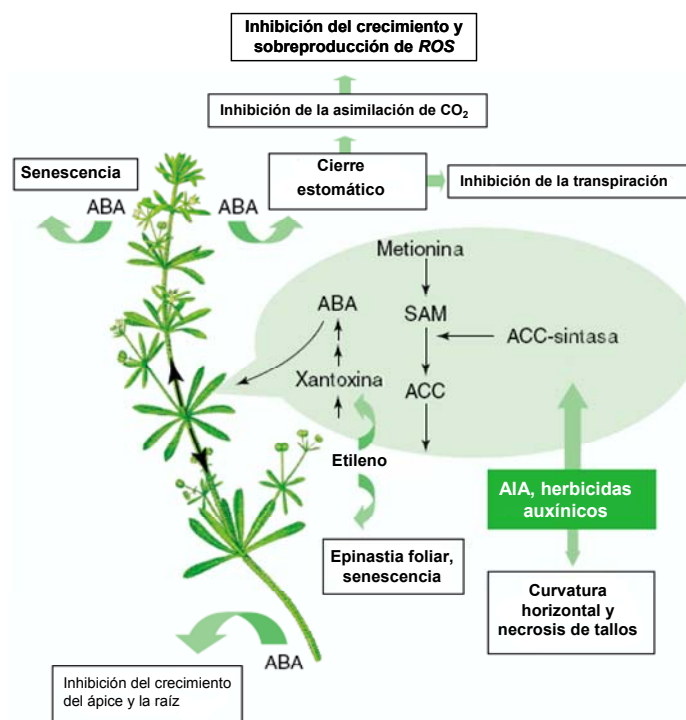


Figura 1.2: Modelo de acción de los herbicidas auxínicos. Propuesto por Grossmann y col, (2001), en el que se explica la inducción del daño tisular y senescencia en *Galium aparine*. ABA: ácido abscísico; ACC: 1-aminociclopropano 2-carboxílico; ROS: especies de oxígeno reactivo; SAM: S-adenosilmetionina.

1.5 Señalización Dependiente de Auxinas

Los herbicidas auxínicos y otros compuestos auxínicos, tienen una gran afinidad por los receptores de auxinas responsables de la transducción de señales en respuesta a IAA en condiciones fisiológicas (Grossmann, 2000b; Zheng y Hall, 2001). Estos receptores, una vez activados, desencadenan una serie de eventos que determinan la respuesta fisiológica de la planta, o su muerte en el caso de la aplicación de herbicidas auxínicos (Leyser, 2001; Zheng y Hall, 2001).

La proteína de unión a auxina mejor caracterizada es la ABP1 (del inglés, auxin binding protein) localizada en el retículo endoplasmático (Venis y col., 1996; Napier y col., 2002; Woo y col., 2002). Sin embargo no hay evidencias que relacionen la ABP1 con la regulación por auxinas de la expresión génica. Según Zhen y Hall (2001) la resistencia a

Introducción

herbicidas auxínicos de un biotipo de mostaza silvestre, puede ser debida a una alteración de un receptor de auxina como el ABP.

En la última década se ha descrito una gran variedad de proteínas de unión a la auxina, mediante el uso de técnicas de cromatografía de afinidad, y de auxinas sintéticas como el 2,4-D. Así se ha purificado una formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión que pertenece a la superfamilia “germinis”, al igual que la ABP1 y una disulfuro isomerasa (PDI) y todas ellas se localizan en el retículo endoplasmático (Napier y col., 2002).

Existen algunas moléculas y determinadas condiciones celulares que pueden tener un papel como mensajeros secundarios en la modulación de la respuesta celular de las plantas frente a auxinas, como son las proteínas quinasas, el Ca^{2+} , el complejo Ca^{2+} -calmodulina, los fosfoinosítidos, el AMPc, cambios de pH, reacciones redox en la superficie de la célula, ácidos grasos de las membranas y la metilación de proteínas. Así la transmisión de la señal al núcleo, puede ocurrir por muchas vías, incluyendo la unión a GTP, cascadas de proteínas quinasas y por canales iónicos de membrana (Mulligan y col., 1997). Se ha propuesto que la transducción de señales mediadas por auxinas actúa bajo una conservada cascada de señalización compuesta por tres proteínas-quinasa: proteína-quinasa mitógena-activada (MAPK), MAPK quinasa (MAPKK) y MAPKK quinasa (MAPKKK) (Mizoguchi y col., 1994; Kovtun y col., 1998). El movimiento de iones dentro y fuera de la célula después de la unión de la auxina a receptores transmembrana específicos parece ser un evento primario. Así por ejemplo Sterling y Hall (1997) observaron cambios en el flujo de Ca^{2+} y H^+ , tras la interacción de la auxina con sus receptores. La adición de Ca^{2+} a los medios de cultivo de plantas de mostaza reducía los efectos de herbicidas auxínicos en las variedades sensibles, por el contrario la adición de verapamil, un bloqueante de canales de calcio, incrementaba su sensibilidad (Zheng y Hall, 2001). La implicación del calcio y la calmodulina en la acción de las auxinas, se ha evidenciado gracias a la caracterización de los dominios de unión a CaM, SAUR (small auxin up RNAs) dependientes de Ca^{2+} , las proteínas SAUR experimentan una rápida inducción en respuesta a auxinas (Yang y Poovaiah, 2000).

Una gran variedad de respuestas ocurren rápidamente después del tratamiento con auxinas y estas parecen demasiado rápidas para ser causadas por cambios transcripcionales y síntesis *de novo* de proteínas. El lapso de tiempo entre la inducción transcripcional y disponibilidad de proteínas, ha sido evaluado en ensayos basados en la luciferasa como marcador de uno de los primeros genes inducidos por auxinas, el GH3.2, el cual se induce en los primeros 30 a 45 minutos de tratamiento con 2,4-D (Calderon-

Villalobos y col., 2006). Una de las respuestas tempranas consiste en una hiperpolarización de la membrana plasmática e hinchazón de protoplastos. También tiene lugar un incremento de la actividad de la fosfolipasa A₂ (André y Scherer, 1991; Scherer y col., 2007), activación de MAPK y acidificación de la pared celular (Badescu y Napier, 2006).

La inducción de respuestas por auxinas en los primeros 30 min es dependiente del receptor de auxinas TIR1 (Dharmasiri y col., 2005a), cuyo papel central en el funcionamiento inicial de las auxinas fue descrito por Ruegger y colaboradores (1998). Estos autores, en un experimento diseñado para identificar mutantes resistentes a inhibidores del transporte polar de auxinas (PAT), identificaron el gen TIR1 a partir de la selección fenotípica del mutante *tir 1-1*, el cuál estaba afectado en la señalización de auxinas. Experimentos posteriores revelaron la interacción sinérgica de TIR1 con la ya identificada ubiquitina-activada RUB (Related to ubiquitin) y ARX1 (Auxin resistant1) (Leyser y Berleth, 1999), esto sugirió la participación de TIR1 en la ruta de conjugación de la ubiquitina, en la cual se seleccionan proteínas para su degradación en el proteosoma (Leyser, 2001; Kepinski y Leyser, 2002; Delker y col., 2008). Actualmente esta bien establecido en *Arabidopsis* que TIR1 es un receptor de auxinas y que actúa como una subunidad de F-box, integrada en el complejo proteico SCF de la ubiquitin ligasa encargado de la ubiquitinación de proteínas (Skowyra y col., 1997; Gray y col., 1999; Dharmasiri y col., 2005a; Dharmasiri y col., 2005b; Hayashi y col., 2008). TIR1 se ensambla con la subunidad de la ubiquitin ligasa CULLIN1 (CUL1) (Hellmann y col., 2003; Kepinski y Leyser, 2004), RING-BOX1 (RBX1) (Gray y col., 2002) y ARABIDOPSIS SKP1 (Zhao y col., 1999), para constituir el complejo funcional SCF^{TIR1} (Kepinski y Leyser, 2005; Quint y Gray, 2006; Guilfoyle, 2007); este proceso también parece ocurrir en el caso de NAA y el 2,4-D pero con diferentes grados de afinidad (Dharmasiri y col., 2005a; Kepinski y Leyser, 2005; Guilfoyle, 2007).

La función de TIR1 en la transducción de señales por auxinas, se basa en su capacidad para reconocer a las proteínas AUX/IAA (Gray y col., 2001; Kepinski y Leyser, 2005; Tan y col., 2007), las cuales bloquean la expresión de genes inducibles por auxinas, inhibiendo a las proteínas ARF (Auxin Response Factor) (Tiwari y col., 2001). Las proteínas AUX/IAA parecen no unirse al ADN directamente, pero actúan como represores transcripcionales a través del dominio I de los cuatro que poseen (I-IV), interaccionando así con las ARFs (Tiwari y col., 2001; Delker y col., 2008). Finalmente el dominio II funciona como una secuencia degradadora que tiene como diana el complejo AUX/IAA–SCF^{TIR1} para su ubiquitinización (Dharmasiri y col., 2003; Kepinski y Leyser, 2004) (Fig. 1.3). La

Introducción

regulación de la expresión por auxinas depende principalmente de la interacción de ARFs activas con otras proteínas, tales como AUX/IAA o potencialmente otras ARF (Guilfoyle y Hagen, 2007). No obstante, muchos aspectos sobre el mecanismo exacto de este proceso regulatorio, son todavía especulaciones que aguardan futuras investigaciones.

El hallazgo del efecto de las auxinas incrementando la baja afinidad de TIR1 hacia su sustrato AUX/IAA, estableció la función de TIR1 como receptor de auxinas (Dharmasiri y col., 2005a; Kepinski y Leyser, 2005; Guilfoyle, 2007). Además Dharmasiri y colaboradores (2005b) han demostrado que los genes del tipo *TIR1*, que codifican *AFB1-3* (*AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN1-3*), tienen las mismas funciones receptoras que TIR1. *TIR1*, *AFB1*, *AFB2* y *AFB3* se expresan de forma diferente en el tiempo, pero sus funciones individuales se solapan en gran medida, lo cual ha revelado una parcial redundancia entre estas proteínas F-box (Dharmasiri y col., 2005b).

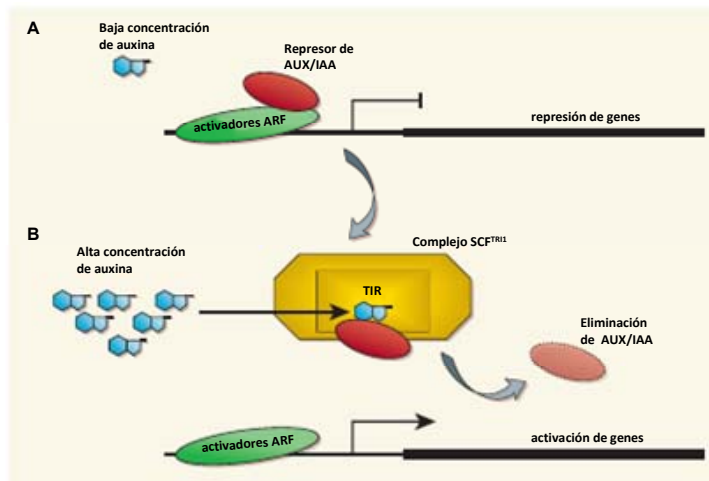


Figura 1.3: Ruta de señalización por auxinas. Tomado de Guilfoyle (2007). Los activadores ARF se unen a elementos de respuesta a auxinas para promover la respuesta génica. (A): A bajas concentraciones de auxina, los represores AUX/IAA se asocian con ARF mediante los dominios III y IV, y reprimen la expresión génica. (B): A altas concentraciones, la auxina se une al receptor TIR1 en el complejo SCF^{TR1}, permitiendo la unión de TIR1 con AUX/IAA, de esta forma los represores AUX/IAA entran en una ruta que permite su destrucción y la subsecuente activación de genes de respuesta auxinas.

1.6 Expresión Génica Dependiente de Auxinas

El modelo básico de la regulación génica inducida por auxinas, implica al receptor TIR1 mediando la degradación de proteínas AUX/IAA y ARFs, y consecuentemente

promoviendo cambios en la expresión génica. Estos patrones de expresión tan diversificados y solapantes ofrecen un vasto potencial regulador; además de la regulación postrascricional de la expresión génica mediada por microARNs que ha sido demostrada por la presencia de *ARFs* así como de *TIR1/ARFs* (Guilfoyle y Hagen, 2007; Delker y col., 2008). Los factores de transcripción ARF por si solos, no parecen regular los genes en respuesta a auxinas, ya que requieren la asociación con represores Aux/IAA (Hagen y Guilfoyle, 2002; Tiwari y col., 2003). Existe una gran variedad de genes identificados en la respuesta temprana a auxinas, entre ellos las familias *SAUR* y *GH3*, el *GH2/4* que codifican para la glutatión S-transferasa y el gen *ACS* que codifica para el ácido 1-carboxílico 1-aminociclopropano, enzima clave en la biosíntesis de etileno (Wright y col., 1987; Hagen y col., 1991; Abel y Theologis, 1996).

Una hora después del tratamiento con el 2,4-D ya se observan cambios importantes en los niveles de expresión del genoma completo de *Arabidopsis*, como el incremento de los niveles de transcritos de 148 genes e inhibición o reducción en los transcritos de 85 genes; muchos de los cuales pertenecen a categorías funcionales de alta importancia en la planta. Se ha confirmado además que el tratamiento con 2,4-D (1 mM), induce la expresión del gen *NCED1*, que codifica para la dioxigenasa 9-*cis*-epoxycarotenoide, enzima clave en la regulación de la biosíntesis de ácido abscísico ABA (Raghavan y col., 2005; Raghavan y col., 2006). En estudios de transcriptómica en *Arabidopsis* se ha observado que concentraciones de 1 μ M a 1 mM de 2,4-D producen la inducción de la expresión de los genes de respuesta a auxinas (*IAA1*, *IAA13*, *IAA19*) a niveles iguales de aplicación de IAA. Sin embargo los genes asociados con la señalización por auxinas mediada por ubiquitina, el *TIR1* y *ASK1*, mostraron reducción en la expresión en respuesta a bajas concentraciones de 2,4-D, así como una inducción en la biosíntesis de etileno, lo que sugiere la inducción de los genes que codifican para la ACC sintasa (ácido 1-carboxílico-1-amino ciclopropano) y para ACC oxidasa. Aunque los genes involucrados en la biosíntesis del etileno no se veían modificados en respuesta a las concentraciones de 2,4-D utilizadas, la señalización estaba reducida como lo demuestra el aumento en la expresión de los genes *CTR1* y *ERS*, ambos implicados en la ruta de señalización por etileno (Raghavan y col., 2006).

1.7 Componentes del Transporte de Auxinas

Un importante avance en la biología de las auxinas fue la formulación del modelo quimiosmótico, por el que se propuso la existencia de proteínas transportadoras de auxinas localizadas en la membrana plasmática facilitando la toma y flujo (salida) de auxinas. 20

Introducción

años después de su formulación se han identificado los entonces componentes hipotéticos de este modelo, gracias a los estudios y aproximaciones genéticas, y moléculares realizados en *Arabidopsis* (Geisler y Murphy, 2006; Feraru y Friml, 2008).

La familia de proteínas PIN FORMED (PIN) constituida por 8 miembros, ha sido caracterizada e identificada como la clave de una gran variedad de procesos del desarrollo mediados por las auxinas, como son embriogénesis, organogénesis, mantenimiento del meristemo radicular y diferenciación y regeneración del tejido vascular (Luschnig y Fink, 1999; Blilou y col., 2005; Paponov y col., 2005). Estas proteínas actúan como transportadores de salida de auxinas y tienen una localización principalmente polar que coincide con el flujo de la auxina, la cual se incorpora por la parte apical y sale por la parte basal de la célula (Wisniewska y col., 2006).

Junto a los transportadores de salida PIN se ha estudiado el proceso contrario, de entrada de auxinas en la célula, el cual ocurre principalmente mediante difusión y minoritariamente mediante el importe activo en el que participa el transportador AUXIN RESISTANT/LIKE AUX1 1 (AUX1/LAX), localizado en la membrana plasmática (Bennett y col., 1996). Sin embargo, debido a la falta de evidencias claras con respecto al transporte mediado por PIN y AUX1/LAX, recientemente se ha propuesto que las p-glicoproteínas (PGP), miembros de la superfamilia de transportadores ABC y representados como MULTIDRUG RESISTANCE (MDR o PGP) pueden actuar como transportadores tanto de salida como de entrada de auxinas (Luschnig, 2002; Geisler y col., 2003). Se han propuesto dos modelos de acción de las PGPs: la regulación de proteínas PIN o el transporte directo de auxinas. En este último se ha identificado a AtPGP1 como el mediador directo del flujo de salida (Geisler y Murphy, 2006). Por otra parte, en cuanto al flujo de entrada se ha identificado al transportador AtPGP4, el cual parece tener una importante función en el desarrollo de la raíz (Santelia y col., 2005).

Recientemente Blakeslee y col., (2007) observaron que el mecanismo de transporte de las proteínas PINs, PGPs y AUX/LAX es independiente pero funciona coordinadamente en la planta. Sin embargo todas las proteínas PIN y PGP (excepto PIN2) muestran localización subcelular polar y apolar; al parecer las PINs determinan el movimiento direccional de las auxinas requerido en el desarrollo embriogénico polar, formación de órganos y filotaxis. Las PGPs contribuyen en el flujo de salida de las auxinas desde los tejidos apicales, actuando en el transporte a largas distancias (Titapiwatanakun y Murphy, 2008).

1.8 Efecto de las auxinas sobre el citoesqueleto de actina

La red macromolecular más importante en las células eucariotas es el citoesqueleto, el cual permite llevar a cabo una gran variedad de movimientos coordinados y dirigidos; se dice que el crecimiento y desarrollo de todas las células en la planta depende de un citoesqueleto integralmente funcional. El citoesqueleto se compone de microtúbulos y microfilamentos de actina, que juegan un importante papel en diversos aspectos del crecimiento y desarrollo, incluyendo procesos fundamentales tales como la división celular, expansión, organización intracelular y movilidad (Staiger, 2000; Wasteneys y Galway, 2003). Las células vegetales responden a gran variedad de estímulos internos y externos, y en la mayoría de los casos el citoesqueleto es el mediador de esta respuesta. De esta manera, el citoesqueleto no está confinado al campo de la biología celular, por lo que actualmente la investigación de sus funciones se despliega a estudios que incluyen la estructura macromolecular, el desarrollo, la acción hormonal y el estrés medioambiental. Así, el citoesqueleto de actina transporta cloroplastos en condiciones de alta intensidad lumínica (Takagi, 2003), otros elementos del citoesqueleto facilitan el gravitropismo y establecimiento de simbiosis con micorrizas (Blancaflor y col., 2001) y dirigen respuestas celulares frente a heridas (Foissner y col., 1996; Hush y Overall, 1996).

Continuamente las plantas deben perfeccionar sus defensas y desarrollar nuevas estrategias que les permitan mantener bajo control sus interacciones con microorganismos; en estos procesos el citoesqueleto puede ser tanto regulador como diana y su remodelamiento una vía para conseguir persuadir o resistir al ataque de patógenos. Durante la mayoría de interacciones planta-patógeno, se desarrollan gran variedad de estructuras asociadas al sitio de interacción con resultados beneficiosos para la planta, un ejemplo podrían ser las estructuras radiales de actina que se desarrollan frente a procesos de invasión por patógenos, así como las redes de microfilamentos de actina o microfilamentos que se forman durante la colonización por las micorrizas, en las cuales se cree existe un incremento en la estabilidad de los filamentos de actina frente a su degradación proteolítica por monoubiquitinización (Dantán-González y col., 2001).

Por otra parte en cuanto a la transducción de señales existe una creciente evidencia de la participación de redes de actina y microtúbulos de células vegetales, en las cascadas de señalización iniciadas en la membrana plasmática, y que derivan hacia adaptaciones a factores ambientales (Abdrakhamanova y col., 2003; Nyporko y col., 2003).

Además está bien establecida la influencia de hormonas como el etileno, las giberelinas, brasinoesteróides, auxinas y auxinas sintéticas, sobre la organización del citoesqueleto. De hecho la aplicación exógena de hormonas inicia una serie de eventos que

culminan en procesos dirigidos por el citoesqueleto, tales como la rápida proliferación celular, expansión y diferenciación. Así, por ejemplo, las auxinas exógenas inducen a la reorganización de las redes de microtúbulos en epicotilos de judías (Takesue y Shibaoka, 1999). En células neuronales se ha visto que el 2,4-D produce *in vitro* una significativa reducción de la polimerización de la tubulina (Rosso y col., 2000) y en células vegetales el 2,4-D induce la reorientación de transversal a longitudinal de los microtúbulos, lo cual promueve la expansión celular permitiendo la hinchazón de tallos y raíces (Abeles y col., 1992). Recientemente se ha observado que el 2,4-D actúa mayoritariamente sobre la división celular afectando al citoesqueleto de actina provocando su desorganización y desintegración, mientras el IAA actúa sobre la elongación sin afectar al citoesqueleto de actina (Rahman y col., 2007).

1.9 Especies de oxígeno reactivo (ROS)

La atmósfera terrestre actual contiene un 21 % de oxígeno molecular (O_2). Las principales trazas de O_2 aparecieron 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 ultravioleta y que favoreció la colonización terrestre 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 ser capaces de protegerse de la propia toxicidad del oxígeno, mediante el desarrollo de diferentes sistemas antioxidantes (Noctor, 2000).

El oxígeno molecular en estado basal triplete es un radical con sus dos electrones de valencia externos ubicados en orbitales separados con spines paralelos, razón por la cual es incapaz de aceptar dos electrones directamente de cualquier molécula orgánica; es así que para oxidar a una molécula o átomo no radical, el oxígeno en este estado necesitaría reaccionar con una pareja que le provea un par de electrones con spines paralelos que se ajuste en sus orbitales con electrones libres (Cadenas, 1989; Halliwell y Gutteridge, 2000). Sin embargo, este estado basal del oxígeno puede convertirse en diferentes ROS, ya sea por transferencia de energía o de electrones. Por transferencia de energía se genera el oxígeno singlete, y por transferencia de electrones el resultado es la

reducción secuencial a radicales superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Fig. 1.4, Tabla 1.1).

| 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 ($ONOO^-$) |

Tabla 1.1: Especies de oxígeno reactivo (ROS).

Una de las causas de la toxicidad biológica del H_2O_2 proviene de su capacidad para oxidar a los grupos $-SH$, la cual puede incrementarse en presencia de catalizadores metálicos por las reacciones del tipo Fenton o Haber-Weiss (Dat y col., 2000). En presencia de radicales $O_2^{\cdot-}$ y de metales de transición como Fe^{+2} o Cu^{+2} , el H_2O_2 puede dar lugar a la formación de los radicales $\cdot OH$, mediante las reacciones de Haber-Weiss (Halliwell y Gutteridge, 2000).

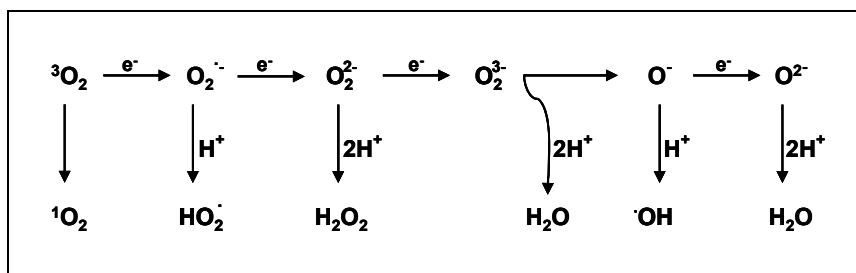


Figura 1.4: Generación de especies de oxígeno reactivo por transferencia de electrones o reducción secuencial univalente del oxígeno en estado basal triplete. (Apel y Hirt, 2004).

En condiciones fisiológicas normales las ROS producidas por las plantas son eliminadas eficientemente por los diferentes sistemas antioxidantes localizados en diferentes compartimentos celulares (Alscher y col., 1997). Sin embargo el equilibrio entre producción y eliminación de las ROS puede ser obstaculizado por diferentes situaciones ambientales, estreses abióticos tales como sequía, bajas temperaturas, salinidad, metales pesados, contaminantes o herbicidas entre otros; como resultado de éstas los niveles de ROS pueden elevarse rápidamente (Prasad y col., 1994; Dat y col., 2000; Sandalio y col., 2001; Romero-Puertas y col., 2004a). Las situaciones externas adversas pueden ser abióticas o bióticas. Existen algunas características en común en la respuesta de la planta frente a estos dos tipos de estrés, sin embargo el incremento en la concentración de las ROS parece ser dirigido por diferentes mecanismos.

Introducción

Una de las defensas de la planta frente al ataque por patógenos, es la rápida producción de ROS ($O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2), en el sitio primario de invasión (Apostol y col., 1989; Lamb y Dixon, 1997). Doke (1985) fue el primero en establecer esta rápida producción de ROS, demostrando la rápida transformación del $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 , en los tubérculos de patata inoculados con *Phytophthora infestans*.

Una gran variedad de enzimas están implicadas en la producción de las ROS en el estrés biótico. El sistema NADPH oxidasa, es uno de los que más ha captado atención. Se identificó en fagocitos y linfocitos B, catalizando la producción de $O_2^{\cdot -}$, a través de la reducción del oxígeno usando el NADPH como donador de electrones. El $O_2^{\cdot -}$ generado por esta enzima interviene en la producción de una gran variedad de oxidantes como alógenos oxidados, radicales libres de oxígeno y oxígeno singlete, los cuales son usados por los fagocitos para combatir a los microorganismos invasores. La NADPH oxidasa esta compuesta por cinco componentes de los cuales tres forman un complejo citosólico, y los dos restantes se localizan en las vesículas secretoras. Cuando las células que permanecen en reposo son estimuladas, el componente citosólico $p47^{PHOX}$ se fosforila y es movilizado a la membrana, donde se asocia con componentes de la membrana para dar la oxidasa activa (Babior, 2004). Estudios posteriores sugieren la posibilidad de un origen común para las NADPH oxidasas, de plantas y de fagocitos, existiendo reacción cruzada entre los anticuerpos contra $p22^{PHOX}$, $p47^{PHOX}$ y $p67^{PHOX}$ humanas, con diferentes proteínas de peso molecular similar (Tenhaken y col., 1995; Desikan y col., 2001) y varios genes de los llamados *rboh* (*Respiratory burst oxidase homologs*) en plantas, homólogos de $p91^{PHOX}$, la subunidad catalítica de la NADPH en fagocitos (Keller y col., 1998; Torres y col., 1998). Mutantes knock-out de *Arabidopsis* en dos de los genes *rboh*, *AtrbohD* y *AtrbohF* demuestran que ambos son requeridos para la normal producción de intermediarios de ROS durante la interacción planta-patógeno, siendo la mutación en *AtrbohD* la que elimina mayoritariamente la producción de ROS (Torres y col., 2002).

Se sabe que existe un mecanismo común para la producción de H_2O_2 durante la interacción planta-patógeno y las heridas producidas por el ataque de insectos herbívoros; dicho mecanismo se ha podido desvelar gracias a la inhibición de la NADPH oxidasa producida por la incubación con cloruro de difenil iodonio (DPI). El peróxido de hidrógeno actúa como mensajero secundario en la inducción de genes de defensa en respuesta a heridas (Orozco-Cardenas y col., 2001), sin embargo, estos genes son diferentes de los inducidos en respuesta a patógenos, por lo que se piensa que la especificidad observada en cada respuesta no tiene que ver con H_2O_2 (Apel y Hirt, 2004), ya que algunos autores

han cuestionado la selectividad del DPI como inhibidor de NADPH, observando su acción sobre otras oxidasas (Allan y Fluhr, 1997; Frahy y Schopfer, 1998).

La producción y eliminación de ROS ocurre de una forma controlada, sin embargo el equilibrio entre producción y supresión puede verse afectado por diferentes factores abióticos como la alta intensidad lumínica, xenobióticos, metales pesados, bajas y altas temperaturas y estrés mecánico entre otros (Bowler y col., 1992; Prasad y col., 1994; Tsugane y col., 1999; Romero-Puertas y col., 2004a; Rodríguez-Serrano y col., 2006). El estudio de ROS durante situaciones de estrés abiótico se ha centrado principalmente en su papel en procesos de aclimatación (Prasad y col., 1994; Foyer y col., 1997; Dat y col., 1998; de Azevedo Neto y col., 2005). Sin embargo, altas concentraciones de ROS inducen fitotoxicidad y por el contrario bajas concentraciones pueden ser usadas como señales que permiten la aclimatación de la planta, por lo cual las ROS no son simplemente productos tóxicos del metabolismo, sino que también funcionan como moléculas señal (Mittler y col., 2004; Van Breusegem y col., 2008).

El metabolismo celular de las plantas debe estar altamente regulado con el objeto de permitir una integración efectiva de las diferentes rutas biosintéticas de reductores para mantener el equilibrio redox (Dietz y Scheibe, 2004; Scheibe y col., 2005), no obstante esto no parece ser suficiente para evitar la activación del oxígeno molecular y la consecuente generación de ROS, particularmente de H₂O₂ (Geigenberger y col., 2005). Sin embargo, en muchos casos, la producción de ROS esta genéticamente programada, es inducida durante su desarrollo y por cambios medioambientales, además induce una completa cascada de señales durante el metabolismo primario y secundario (Millar y col., 2003; Buchanan y Luan, 2005). El O₂⁻ y el H₂O₂ actúan como mensajeros secundarios en una gran variedad de procesos asociados con el crecimiento y desarrollo de la planta (Foyer y Noctor, 2005a; Foyer y Noctor, 2005b). Además, una de las mayores vías usadas por las plantas para la transmisión de señales concernientes con los cambios medioambientales, es la producción de superóxido en la membrana plasmática (Barnes y Mayfield, 2003; Terman y Brunk, 2006).

La exposición a altas intensidades de luz es una de las causas más comunes de estrés oxidativo en las plantas. Altas intensidades lumínicas provocan una fuerte generación de ROS principalmente cuando este factor se combina con una limitada tasa de fijación de CO₂ (Willekens y col., 1997). Bajo condiciones normales, los cloroplastos generan aproximadamente 150-250 μmol de H₂O₂ por mg de clorofila por h (Asada, 1994a). En condiciones de excesiva luz, los procesos enzimáticos para la fijación de CO₂ se vuelven

limitantes, y como resultado durante la fotosíntesis se produce más NADPH y ATP del necesario. Esta acumulación de equivalentes redox y energía reduciría el contenido de plastoquinona, generando procesos de fotoinhibición (Dat y col., 2000).

La fotoinhibición también es inducida por la aplicación de xenobióticos, proceso que a la vez produce un incremento en la producción de ROS en cloroplastos (Smirnov, 1993, 1998). En estas situaciones se ha observado un incremento en la peroxidación lipídica, comúnmente usado como un indicador de estrés oxidativo (Gogorcena y col., 1995; Sandalio y col., 2001; Romero-Puertas y col., 2004a; Sunohara y Matsumoto, 2008).

La presencia de metales pesados como cobre y cadmio, causa un desequilibrio en las reacciones redox celulares, el cual permite la formación de ROS y subsecuente peroxidación lipídica (Halliwell y Gutteridge, 2000; Rodríguez-Serrano y col., 2006). La activación diferencial de las diferentes isoformas de SOD durante el tratamiento con Cu, sugiere la acumulación de ROS como consecuencia del tratamiento con Cu, que además promueve la expresión de proteínas de defensa (Utriainen y col., 1998). Por otra parte el exceso de hierro promueve el estrés oxidativo, en gran parte debido a su potencial para reaccionar con H_2O_2 y $O_2^{\cdot -}$ y dar lugar a una especie de oxígeno reactiva más tóxica el radical $\cdot OH$. Así mismo en presencia de este metal se incrementa la actividad APX (Kampfenkel y col., 1995; Halliwell y Gutteridge, 2000)

Recientemente se ha observado que el ozono (O_3) induce la respuesta hipersensible en plantas, encontrándose similitudes en las respuestas producidas por el ataque de patógenos, por lo que el O_3 podría actuar como un elicitador abiótico de la respuesta antioxidante (Ranieri y col., 2003). El O_3 que penetra en el espacio apoplástico de hojas es convertido rápidamente en ROS y permite la acumulación de H_2O_2 a través de la NAD(P)H de membrana plasmática, la acumulación de peróxido de hidrógeno continúa en otros compartimentos celulares como citoplasma, mitocondrias y peroxisomas cuando la exposición al O_3 ha terminado (Pellinen y col., 1999; Overmyer y col., 2003).

1.9.1 Producción de ROS en Sistemas Biológicos

Cloroplastos (Fig. 1.5): El oxígeno se produce continuamente durante el transporte electrónico fotosintético en las reacciones lumínicas y se elimina de manera simultánea de los cloroplastos en los procesos de reducción y asimilación. Existen tres tipos de procesos que consumen oxígeno relacionados con la fotosíntesis: (a) la reacción de la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa (Rubisco), (b) la reducción directa del oxígeno molecular por el transporte electrónico en el fotosistema I (FSI) y (c) la clororrespiración (Keller y col., 1998; Apel y Hirt, 2004).

El proceso de clororrespiración describe la reducción del oxígeno que resulta en la cadena respiratoria constituida por una NAD(P)H deshidrogenasa y una oxidasa terminal en cloroplastos, que compete por el transporte fotosintético de electrones. Este proceso ha sido ampliamente estudiado en micro algas (Bennoun, 1982) y sólo recientemente se han encontrado componentes en la cadena respiratoria de plantas superiores (Nixon, 2000). Se sabe que este proceso contribuye a la formación de ROS en cloroplastos, aunque la capacidad de transporte electrónico en la clororrespiración es menos del 1% que en la fotosíntesis. Por otra parte se ha observado que la clororrespiración esta involucrada en procesos de adaptación a estreses abióticos (Díaz y col., 2007).

Los dos procesos primarios encargados de la formación de ROS durante la fotosíntesis son la fotorreducción del O₂ a radical superóxido que ocurre por la reducción de los componentes asociados al FSI durante el transporte electrónico y las reacciones ligadas al ciclo fotorrespiratorio, incluyendo las reacciones de la Rubisco y el ciclo glicolato-oxidasa en los cloroplastos, y la catalasa y peroxidasas en peroxisomas. Cuando se expone a una planta a intensidades de luz que exceden su capacidad de asimilación de CO₂, ocurre una reducción en la cadena de transporte electrónico que ocasiona la inactivación del fotosistema II (FSII) y la inhibición de la fotosíntesis. Las plantas disponen de dos estrategias para proteger su aparato fotosintético de la fotoinhibición: el exceso de energía de excitación en el FSII puede disiparse térmicamente (proceso que se conoce como “quenching” no fotoquímico), y la habilidad del FSII para transferir electrones a diferentes aceptores en el cloroplasto (“quenching” fotoquímico) (Rutherford y col., 1984; Ort y Baker, 2002). Cuando las plantas están expuestas a factores de estrés medioambiental como la presencia de xenobióticos o temperaturas no adecuadas, y la disponibilidad de CO₂ en la hoja esta limitada, ocurre la reducción del oxígeno por el FSI (reacción de Mehler) (Mehler, 1951) y la fotorrespiración juega un papel fotoprotectivo crucial para la planta (Apel y Hirt, 2004).

De esta manera el FSI es el principal sitio de generación de radicales O₂^{•-}, a nivel de la ferredoxina-NADP⁺-reductasa y la forma reducida de la monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR) (Asada, 2006). Así mismo se ha descrito la generación de O₂^{•-} en el FSII, por el P₆₈₀, la feofitina y la proteína Q_A (Navari-Izzo y col., 1999). El H₂O₂ en los cloroplastos, se origina por dismutación espontánea del O₂^{•-} y por acción de las superóxido dismutasas (Asada, 1994b; Choi y col., 2002).

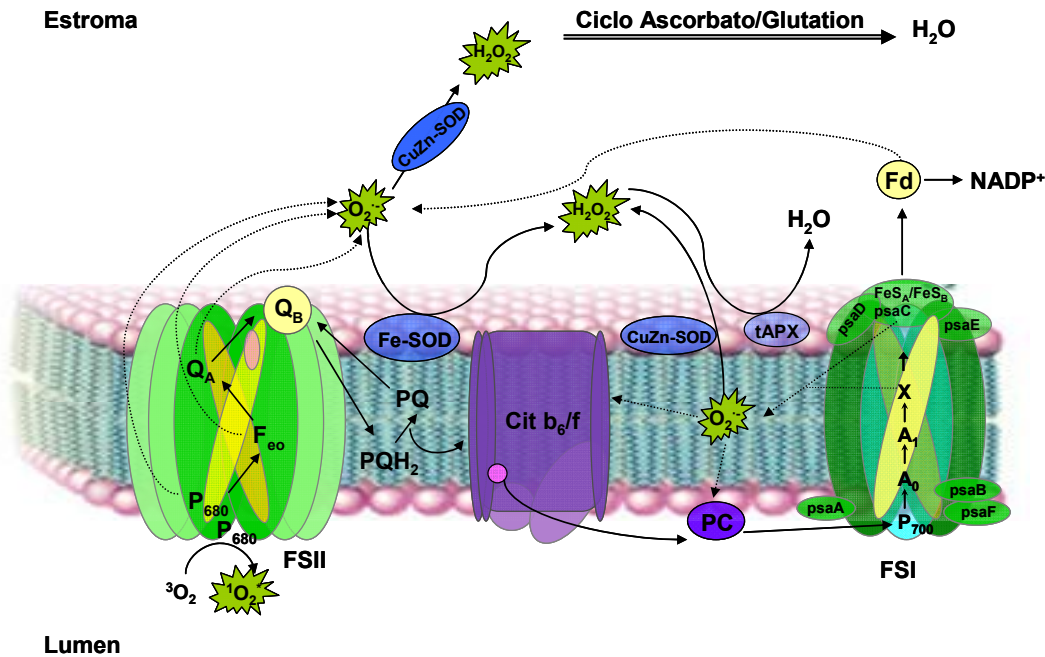


Figura 1.5: Producción y degradación de ROS en cloroplastos. (modificado de Navari-Izzo y col., 1999). CuZn-SOD, Fe-SOD, CuZn y Fe superóxido dismutasas; Fd, ferresoxina; Feo, feofitina; FSI y FSII, fotosistemas I y II; PC, plastocianina; PQ, plastoquinona; psa A-F, polipéptidos del FSI con función estructural; tAPX, ascorbato peroxidasa tilacoidal.

Durante la fotosíntesis es producido el oxígeno singlete por el FSII, especialmente en condiciones de exceso de luz. El centro de reacción del complejo del FSII consta del citocromo b_{559} y el heterodimero de las proteínas D1y D2, lo cuales se unen al centro de reacción funcional, el grupo prostético que incluye el P680, la feofitina y los receptores de electrones, la quinona A y B (QA y QB). La excitación del centro de reacción produce la separación en cargas entre el P680 y la feofitina, y la secuencial reducción de las QA y QB (Barber, 1998). Cuando el estado redox del contenido de plastoquinona y las QA y QB, se reducen a causa de un exceso de energía lumínica, no se completa la separación de las cargas y el P680 oxidado se recombina con la feofitina reducida. Bajo estas condiciones se favorece a la formación del triple estado del P680, permitiendo la generación del oxígeno singlete. La formación de 1O_2 ha sido observada durante el estrés por exceso lumínico que provoca la fotoinhibición del FSII (Fryer y col., 2002; Hideg y col., 2002).

Mitocondrias (Fig 1.6): En los mamíferos las mitocondrias constituyen la mayor fuente de ROS, sin embargo en plantas la contribución de las mitocondrias es más limitada (Purvis, 1997). En estos orgánulos la producción de $O_2^{\bullet-}$ 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-citocromo b del complejo II y de los centros o del complejo III (Dat y col., 2000). La presencia de la oxidasa alternativa (AOX) es una de las razones para la reducida producción de ROS en mitocondrias vegetales, ya que ésta cataliza la reducción trivalente del O₂ por la ubiquinona, compitiendo por los electrones con el complejo del citocromo c. Además, se ha visto que el H₂O₂ induce a la expresión de AOX (Wagner, 1995; Maxwell y col., 1999).

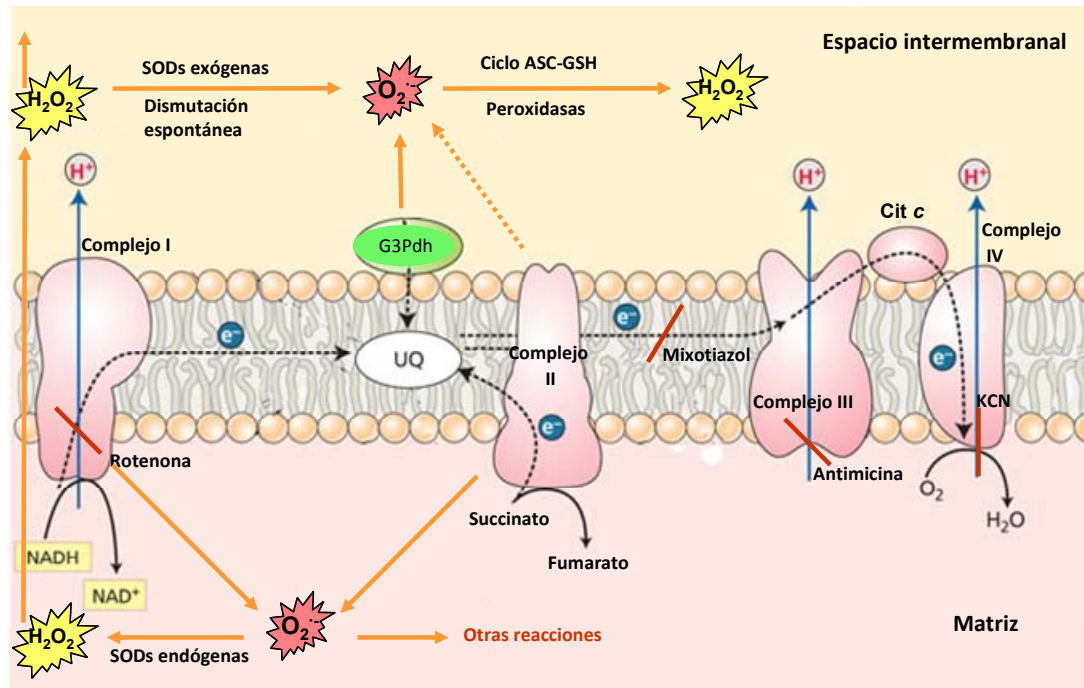


Figura 1.6: Producción de ROS en la cadena de transporte electrónico mitocondrial. H₂O₂, peróxido de hidrógeno; O₂⁻, superóxido; UQ, ubiquinona, G3P, gliceraldehído 3-Fosfato; G3PDH, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; SOD, superóxido dismutasa.

Peroxisomas (Fig 1.10): En la mayoría de los organismos eucariotas, los peroxisomas son probablemente el principal sitio de producción intracelular de H₂O₂. Más recientemente se ha demostrado la producción de O₂⁻ y NO en estos orgánulos. Los principales procesos metabólicos responsables de la producción de H₂O₂ en peroxisomas son: la reacción de la glicolato oxidasa en la fotorrespiración, la β-oxidación, la reacción de las flavin oxidasas y la dismutación del O₂⁻ (Baker y Graham, 2002; del Río y col., 2002b; Foyer y Noctor, 2003). La producción de O₂⁻ en estos orgánulos ocurre como una consecuencia de su metabolismo, así por ejemplo se ha identificado en la matriz de peroxisomas a la xantina oxidasa y en la membrana peroxisomal a la NADPH oxidasa, como responsables de la generación del radical O₂⁻ (del Río y col., 2002b). Además la

cadena de transporte electrónico de la membrana peroxisomal, parece estar relacionada con la producción de $O_2^{\cdot -}$ (del Río y col., 2006), en la que se han identificado a proteínas integrales de membrana peroxisomal (PMPs), como los principales responsables en la generación de $O_2^{\cdot -}$ (López-Huertas y col., 1999).

Membrana plasmática y pared celular: Las peroxidasas de pared celular producen $O_2^{\cdot -}$ a expensas de NADH, en una reacción dependiente de Mn (Bolwell y col., 1995), y las NAD(P)H oxidorreductasas de la membrana plasmática asociadas a cadenas de transporte electrónico, producen $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 . Además, en la pared celular se ha demostrado la producción de $\cdot OH$ catalizada por la acción de una peroxidasa apoplástica (Liszky y col., 2003) La producción de ROS asociada a la membrana plasmática, más conocida, es la que se induce en procesos de infección por patógenos, actuando directamente como defensa frente a la infección, e indirectamente reforzando la pared celular o bien como molécula señal en la inducción de la respuesta de defensa (Apel y Hirt, 2004; Van Breusegem y col., 2008).

1.10 Eliminación de Especies de Oxígeno Reactivo

Las ROS pueden ser tóxicas cuando se acumulan en exceso, es por eso que los organismos aerobios han desarrollado sistemas de protección, que permiten el equilibrio entre su formación y eliminación. Estos sistemas reciben el nombre de antioxidantes. Entre las distintas ROS, los radicales $\cdot OH$ son los más reactivos y se forman en el curso de las reacciones tipo Fenton o Haber Weiss, en las que interviene H_2O_2 y $O_2^{\cdot -}$, y son catalizadas por metales, fundamentalmente Fe y Cu. No se conocen sistemas enzimáticos de eliminación de los $\cdot OH$, por lo que su control se ejerce a través de la regulación de la acumulación de H_2O_2 y $O_2^{\cdot -}$, y la disponibilidad de metales (Halliwell y Gutteridge, 2000).

1.10.1 Antioxidantes no Enzimáticos

También se denominan antioxidantes estequiométricos por su capacidad de neutralizar un radical libre por molécula. Los más importantes son el ascorbato y el glutatión (GSH), así como el tocoferol, flavonoides, alcaloides y carotenoides. Normalmente actúan a concentraciones relativamente elevadas (Halliwell y Gutteridge, 2000). Se pueden distinguir tres grupos:

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

El ascorbato es de especial relevancia debido a su elevada capacidad reductora, siendo quizás el antioxidante más abundante (Smirnoff, 2000). Está implicado en la eliminación del H_2O_2 con la intervención de la ascorbato peroxidasa (APX) (Foyer, 1993). También puede actuar reduciendo directamente al radical superóxido, dando lugar al H_2O_2 y al ácido deshidroascorbato (DHA) (Takahama, 1988), y puede reaccionar con el oxígeno singlete y con los radicales $\cdot OH$.

El glutatión (γ -glutamyl-cisteinil-glicina) es un tripéptido tiólico que funciona como reductor intracelular, generando el ambiente necesario para que algunas enzimas actúen. Es el principal compuesto tiólico de bajo peso molecular en plantas que contribuye también 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).

El glutatión (GSH) es oxidado dando lugar a glutatión oxidado (GSSH), por otro lado el ascorbato es oxidado produciendo monodeshidroascorbato (MDHA) y deshidroascorbato (DHA), formando parte del ciclo ascorbato-glutatión (Fig.1.7), a través del cual GSSH, MDHA y DHA pueden ser reducidos formando nuevamente GSH y ascorbato. Como respuesta a varios tipos de estrés abiótico y biótico, se ha descrito en plantas un importante incremento del GSH y de sus enzimas biosintéticas (Vanacker y col., 2000; Noctor y col., 2002; Vernoux y col., 2002).

Una alta proporción de ascorbato y GSH en su estado reducido es esencial para mantener el balance de ROS en las células. Los estados reducidos de ASC y GSH son mantenidos por la glutatión reductasa (GR), la monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR) y la deshidroascorbato reductasa (DHAR), las cuales usan como poder reductor el NADPH (Asada y Takahashi, 1987; Tsugane y col., 1999). El balance general entre los distintos antioxidantes debe mantenerse, ya que por ejemplo un aumento descontrolado en la biosíntesis del glutatión provoca estrés oxidativo y daños en cloroplastos (Creissen y col., 1999).

2) Reductores liposolubles. En este grupo está incluida la vitamina E (α -tocoferol). Los tocoferoles tienen dos mecanismos principales de reacción (Neely y col., 1988), inicialmente pueden interrumpir la cadena de reacciones en cascada de la formación de radicales lipídicos y pueden reaccionar con el oxígeno singlete produciendo hidropéroxido. El radical resultante, el α -tocoferilo se regenera por reacción con el ascorbato. La vitamina E es el antioxidante más importante en las membranas lipídicas (Halliwell y Gutteridge, 2000), se encuentra principalmente en las hojas y en semillas (Falka y col., 2003; Sattler y col., 2004). Recientemente, se ha demostrado que los tocotrienoles son eficientes

Introducción

antioxidantes que protegen las membranas lipídicas de la peroxidación *in vivo* (Matringe y col., 2008), también muy probablemente tienen una función importante en la aclimatación de las plantas a condiciones de elevada intensidad lumínica, además de su implicación en el sistema de modulación de las ROS en procesos de señalización por estrés (Liszky y Trebst, 2006).

Los flavonoides también están incluidos en el grupo de reductores liposolubles y son una familia de polifenoles de origen vegetal (denominados vitamina P) que pueden ser regenerados por ascorbato y son, entre los metabolitos secundarios, de los más comunes en plantas vasculares (Stafford, 1994). Numerosos estudios demuestran la acción directa de los flavonoides sobre las ROS, así actúan inhibiendo las lipoxigenasas y las ciclooxigenasas, incluso la xantina oxidasa y también pueden atrapar al H₂O₂ (Bors y col., 1990; Yamasaki y col., 1997). Otro miembro de este grupo es el α -caroteno que actúa, de forma no estequiométrica, como atrapador físico del oxígeno singlete utilizando su energía para interconvertir la forma *cis* del β -caroteno en la forma *trans* y viceversa (Halliwell y Gutteridge, 2000).

3) Quelantes de metales. Otro mecanismo antioxidante es el constituido por determinados componentes celulares que actúan atrapando a los iones metálicos, impidiendo de esta forma su participación en reacciones de tipo Fenton que generan radicales OH \cdot . A este grupo pertenecen proteínas como la transferrina y la ceruloplasmina. Esta última, almacena cobre y cataliza la oxidación del Fe²⁺ a Fe³⁺ con formación de agua, evitando así la producción de radicales \cdot OH (Gutteridge y col., 1980). Otros quelantes de metales son las fitoquelatinas (Leshem y Kuiper, 1996).

1.10.2 Antioxidantes Enzimáticos

Su función es prevenir la iniciación de las oxidaciones en cadena, al eliminar las especies de oxígeno parcialmente reducidas (O₂ \cdot^- y H₂O₂) (Halliwell y Gutteridge, 2000).

1.10.2.1 Superóxido dismutasa (SOD; 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 o desproporcionamiento catalítico de los radicales libres O₂ \cdot^- con formación de agua y peróxido de hidrógeno:



Las SODs son una familia de enzimas que se agrupan según el grupo prostético metálico ligado a la enzima, en CuZn-SODs, Mn-SODs, Fe-SODs y una cuarta Ni-SOD. Las

CuZn-SODs se encuentran generalmente en el citosol y cloroplastos de las células eucariotas y en algunos procariotas; la Mn-SODs se encuentran en procariotas y en las mitocondrias y peroxisomas de eucariotas; las Fe-SODs se encuentran generalmente en procariotas, algas y en los cloroplastos y peroxisomas de algunas plantas superiores y la Ni-SODs se han encontrado en *Streptomyces* (Hassan, 1989; Scandalios, 2005).

1.10.2.2 Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6)

Es una enzima hemínica que cataliza la descomposición del H₂O₂ con un mecanismo similar al de la SOD, una molécula de H₂O₂ es reducida a agua, mientras que la otra es oxidada a O₂:



Esta reacción se encuentra favorecida por concentraciones elevadas de H₂O₂ (Chance y col., 1997). Sin embargo, la catalasa también es capaz de llevar a cabo ciertas reacciones peroxidásicas a pH básico, en presencia de H₂O₂, actuando sobre algunos alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos como sustratos (AH₂) (Halliwell y Gutteridge, 2000). La mayoría de los organismos anaerobios no contienen catalasa, salvo algunos como *Propionibacterium shermanii* (Halliwell y Gutteridge, 2000).

La catalasa está localizada en peroxisomas, y previene la difusión de H₂O₂ a otros compartimentos celulares. Son numerosos los estudios que han puesto de manifiesto que la catalasa es una enzima esencial en el mecanismo de defensa frente a distintos tipos de estrés (Willekens y col., 1997), y se han descrito diferentes isoformas de catalasa en plantas (Eising y col., 1990; Havir y col., 1996; Corpas y col., 1999). La actividad catalasa se encuentra localizada de forma exclusiva en peroxisomas/glioxisomas, por lo que se utiliza habitualmente como marcador de estos orgánulos celulares (del Río y col., 2006).

1.10.2.3 Enzimas del Ciclo Ascorbato-Glutation

También denominado ciclo de Foyer-Halliwell-Asada, es un mecanismo eficiente de las células vegetales que opera en cloroplastos con el objetivo de remover el H₂O₂ generado durante las reacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis a través de la cadena de transporte electrónico (Asada y Takahashi, 1987), también es funcional en mitocondrias y peroxisomas (Jiménez y col., 1997). En este ciclo participan cuatro enzimas: ascorbato peroxidasa (APX), la cual utiliza al ascorbato como donador de electrones para reducir el H₂O₂ a H₂O, con la generación de monodeshidroascorbato, posteriormente éste es directamente reducido a ascorbato por la ferredoxina reducida o monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR) con el poder reductor del NAD(P)H. Por otro lado el MDHA puede

Introducción

directamente transformarse en ascorbato y DHA por dismutación espontánea; el DHA es entonces reducido a ascorbato por acción de la deshidroascorbato reductasa (DHAR) que utiliza GSH. El GSSG resultante es regenerado finalmente por la glutatión reductasa (GR) con la ayuda de NAD(P)H (Asada, 2006) (Fig. 1.7).

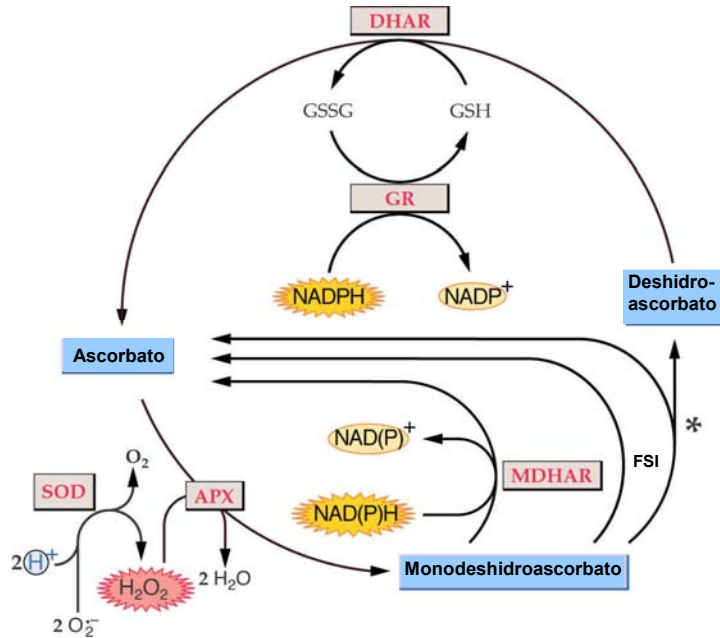


Figura 1.7: Ciclo ascorbato-glutation (Buchanan y col., 2000).

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-glutation 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 enzima con un mecanismo de funcionamiento típico de una peroxidasa hemínica, esta clasificada como peroxidasa del tipo I y lleva a cabo la primera reacción del ciclo, reduciendo el peróxido de hidrógeno a agua usando ascorbato como fuente de poder reductor. El papel de esta enzima en la eliminación del peróxido de hidrógeno es esencial, al menos en cloroplastos (Asada y Takahashi, 1987). Se ha localizado tanto en el estroma

de cloroplastos (sAPX) como en tilacoides (tAPX), en el citosol, mitocondrias y peroxisomas (Chen y Asada, 1989; Miyake y Asada, 1992; Foyer y col., 1997; Jiménez y col., 1997; López-Huertas y col., 1999); siendo la APX peroxisomal más lábil que la cloroplastídica y la mitocondrial (Kavitha y col., 2008).

La base de datos de *Arabidopsis* muestra la existencia de 4 genes 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 (Yoshimura y col., 2002). 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)

Además de reducir el MDHA (Asada y Takahashi, 1987) esta enzima es capaz de reducir fenoxi radicales, como los radicales de la quercetina a sus fenoles (Sakihama y col., 2000). Es una enzima ampliamente distribuida en plantas, algas y animales, y está presente en el citosol, cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas generalmente unida a la membrana (Hossain y Asada, 1984b; Jiménez y col., 1997; Asada, 2006).

Se han clonado los cDNAs de la MDHAR en tres especies vegetales diferentes (pepino, tomate y guisante) que codifican un péptido similar de unos 47 kDa (Murthy y Zilinskas, 1994; Sano y Asada, 1994; Grantz y col., 1995; Leterrier y col., 2005). La forma citosólica de la MDHAR parece tener una sola copia del gen. Sin embargo, la detección de otras isoformas en otras especies y en compartimentos celulares diferentes sugiere la existencia de otros genes (Creissen y Mullineaux, 2002).

Deshidroascorbato reductasa (DHAR; EC 1.8.5.1)

La actividad deshidroascorbato reductasa (DHAR) cataliza la reducción divalente del deshidroascorbato (DHA) a ascorbato (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* la DHAR no parece ser fundamental en el mantenimiento del ascorbato en su forma reducida e incluso se ha dudado de su existencia como enzima específica (Morell y col., 1997). Sin embargo, la DHAR se ha purificado casi a homogeneidad en hojas de espinaca y se sabe que es un monómero de unos 23 kDa (Foyer y Halliwell, 1977; Hossain y Asada, 1984b).

Introducción

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. Los dos grupos –SH formados interaccionan con el GSSG reduciéndolo hasta obtener 2 moléculas de GSH (Halliwell y Gutteridge, 2000). Esta actividad enzimática se encuentra ampliamente distribuida entre procariotas y eucariotas, estando 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). Es una enzima importante en la protección de la planta frente a diferentes tipos de estrés, como los producidos por herbicidas, contaminantes ambientales, bajas temperaturas, alta intensidad lumínica y estrés hídrico (Foyer y col., 1991; Osswald y col., 1992; Mullineaux y col., 1994; Navari-Izzo y Izzo, 1994; Romero-Puertas y col., 2006).

Se clonó por primera vez en plantas a partir de hojas de guisante por Creissen y col. (1992). El DNAC codificaba un polipéptido con una alta homología con las GRs secuenciadas hasta entonces (GOR1), y se observó que presentaba un péptido señal de dirección simultánea a cloroplastos y mitocondrias. También se han clonado GRs de hojas de *Arabidopsis*, nódulos de soja y hojas de tabaco, presuntamente plastídicas (Creissen y Mullineaux, 2002). Por otro lado, se ha clonado un gen que codifica la GR sin péptido señal y todo parece indicar que puede tratarse de la enzima citosólica (GOR2). Sin embargo, estos genes no explican la cantidad de isoformas encontradas en determinadas especies vegetales, y parece lógico pensar que probablemente exista una familia multigénica similar a la de la APX, y que quizás las distintas isoformas sólo se expresan en determinadas condiciones de estrés (Creissen y Mullineaux, 2002).

1.10.2.4 *NADP-Deshidrogenasas*

Al ciclo ascorbato-glutation habría que sumar las actividades de una serie de enzimas que suministran el poder reductor (NADPH), tanto en animales como en plantas, una de ellas pertenece a la llamada ruta oxidativa 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 ha localizado en el citosol, cloroplastos y peroxisomas (Corpas y col., 1998), y ha sido purificada, caracterizada y clonada en tubérculos de patata (Graeve y col., 1994). La velocidad a la que esta ruta trabaja depende del suministro de NADP⁺ a la primera enzima, proporcionado por la GR, que oxida el NADPH y disminuye la relación

NADPH/NADP⁺ (Halliwell y Gutteridge, 2000). Además, el enzima málico (EM) y la isocitrato deshidrogenasa (ICDH) también aportan poder reductor, y en cloroplastos existe una fuente adicional de NADPH que es la ferredoxin-NADP⁺ reductasa del fotosistema I.

1.10.2.5 Otras Peroxidasas

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7; donador:H₂O₂ oxidoreductasas) constituyen un grupo de enzimas cuya función primaria es oxidar sustratos a expensas del H₂O₂, encontrándose en plantas, mamíferos, hongos y organismos procariotas (Asada, 1992). Las peroxidasas utilizan una gran variedad de donadores de electrones y reciben distintos nombres en función de la naturaleza del sustrato. En general, se utiliza el término guayacol peroxidasas por ser el guayacol el donador más utilizado en los ensayos de laboratorio. Están implicadas en un gran número de procesos fisiológicos como la biosíntesis de ligninas (Hahlbrock y Grisebach, 1979), el desarrollo y organogénesis por degradación del ácido indolacético o la biosíntesis del etileno (Schneider y Wightman, 1974; O'Neill y Scott, 1987). Se han encontrado muchas isoenzimas de peroxidasas en plantas, y la expresión de algunas de ellas varía de forma específica en respuesta al desarrollo o al estrés, tanto biótico como abiótico (Butt, 1980). En bacterias y organismos animales se han identificado y caracterizado diferentes enzimas dependientes de selenio, entre las que se incluyen la actividad glutatión peroxidasa (GPX) (Stadman, 1990; Läuchli, 1993).

En animales se han llegado a determinar hasta cuatro grupos de GPXs caracterizadas por su estructura, especificidad de sustrato y distribución en el tejido (Eshdat y col., 1997). Esta actividad se ha detectado también en cultivos celulares de espinaca y maíz, así como en plantas de *Lemna* (Drotar y col., 1985) y en semillas de guisante etioladas (Edwards, 1996).

1.10.2.6 Glutatión-S-Transferasas

Catalizan la reacción de compuestos de bajo peso molecular con grupos tioles y glutatión con una gran variedad de sustratos tanto hidrofóbicos como electrofílicos y, normalmente citotóxicos, formando tioésteres denominados S-conjugados (Marrs, 1996). Las GSTs se identificaron por primera vez por su capacidad de desintoxicación de herbicidas y se han caracterizado en numerosos cultivos (Cummins y col., 1997; Fujita y col., 1998; Hatton y col., 1998; Hatton y col., 1999). Sin embargo, hay otra subclase de GST que se ha implicado en numerosos casos de respuesta al estrés, incluido el producido por el ataque de patógenos, el estrés oxidativo, y la toxicidad por metales pesados. Además, en plantas las GSTs 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).

Todos los eucariotas tienen múltiples isoenzimas de GST, citosólicas o unidas a membranas. Se sabe que, al menos, seis familias de genes codifican las GSTs, lo que da una idea de su alto grado de complejidad (Halliwell y Gutteridge, 2000).

1.11 Peroxisomas

Los peroxisomas son orgánulos, de aproximadamente 1 μm de diámetro rodeados por una membrana simple. Tienen principalmente un metabolismo oxidativo y se encuentran en todas las células eucariotas.

Los peroxisomas de plantas, tienen la característica de desempeñar diferentes funciones dependiendo del tipo celular en el que se encuentren, así como del estado metabólico y de desarrollo de la planta. Por lo tanto se pueden clasificar en 4 tipos según su función metabólica específica y el tejido en el que se encuentren (Huang y col., 1983):

1) Glioxisomas, presentes en semillas oleaginosas y en los que se encuentran las enzimas necesarias para llevar a cabo la β -oxidación de ácidos grasos y dos enzimas del ciclo del glioxilato, la malato sintasa y la isocitrato liasa, 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 (Graham, 2008). Por otra parte este tipo de peroxisomas se pueden formar a partir de peroxisomas de hojas durante procesos de senescencia, (Hayashi y Nishimura, 2003).

2) Peroxisomas de hojas, presentes en los tejidos fotosintéticos, y que llevan a cabo las reacciones más importantes de la fotorrespiración (Huang y col., 1983; Douce y Heldt, 2000). Estos peroxisomas se hallan en estrecho contacto con mitocondrias y cloroplastos con los que cooperan para realizar la fotorrespiración (Reumann, 2002; Reumann y Weber, 2006).

3) Peroxisomas de nódulos de raíz, presentes en los nódulos de ciertas leguminosas, contienen enzimas que incluyen uricasa y allantoinasa, las cuales participan en el metabolismo del nitrógeno (Vaughn y Stegink, 1987; Johnson y Olsen, 2001).

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 (Huang y col., 1983).

1.11.1 Principales Funciones Metabólicas

En plantas superiores, los peroxisomas juegan un papel importante en tres rutas metabólicas: fotorrespiración, β -oxidación y detoxificación de H_2O_2 . Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado la participación de los peroxisomas en nuevas funciones celulares. Muchos de los procesos metabólicos en los que intervienen los peroxisomas se

encuentran compartimentados, lo que implica un flujo de sustratos entre distintos orgánulos celulares y un posible papel regulador indirecto de los peroxisomas sobre otras rutas metabólicas, a través de la disponibilidad de sustratos o productos del metabolismo peroxisomal.

11.1.1.1 Degradación de ácidos grasos

La β -oxidación es el principal proceso de degradación de ácidos grasos, en semillas oleaginosas (glioxisomas), pero también tiene lugar en peroxisomas de hojas (Baker y Graham, 2002). Este proceso consiste en cuatro reacciones enzimáticas, que involucran la actividad de la acil-CoA sintetasa, acil-CoA oxidasa, la proteína multifuncional (con actividad enoil-CoA hidratasa y 3-hidroxiacil-CoA dehidrogenasa) y la ketoacil-CoA tiolasa (Fig.1.8). El producto final de la β -oxidación es un mol de acetil-CoA, cuyo destino varía según la fisiología del orgánulo, y un ácido graso con dos átomos de carbono menos, que comienza de nuevo el ciclo. A su vez, el acetil-CoA es procesado en el ciclo del glioxilato a succinato, a través de las actividades de las enzimas peroxisomales citrato sintetasa, isocitrato liasa, malato sintetasa y malato dehidrogenasa, suplementado con la acción de la aconitasa citosólica. En plantas, este ciclo es exclusivo de tejidos de reserva (Huang y col., 1983) y se encuentra en estrecha relación con la β -oxidación, actuando ambos para suministrar glúcidos a la plántula durante su desarrollo.

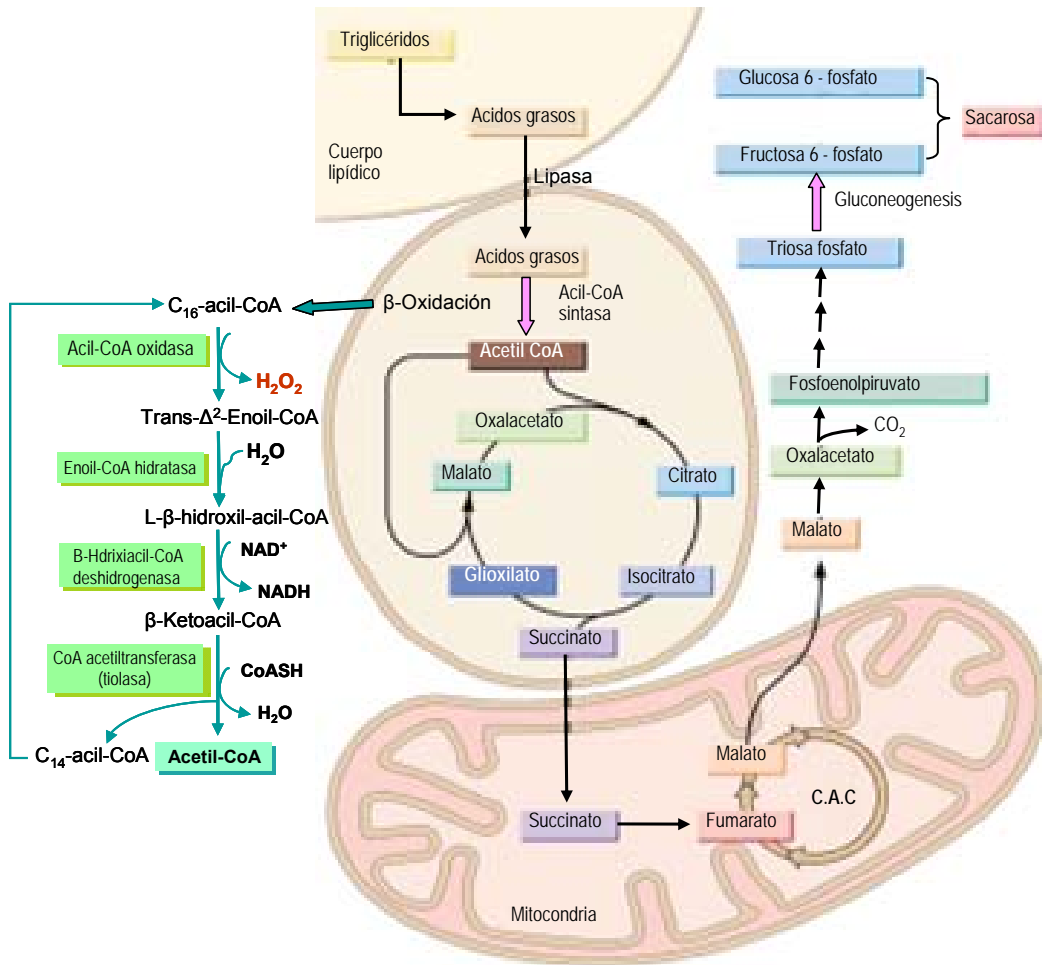


Figura 1.8: β-oxidación de ácidos grasos y ciclo del glioxilato en peroxisomas (Buchanan y col., 2000).

1.11.1.2 Fotorrespiración

En las hojas, los peroxisomas están principalmente involucrados en el reciclaje del 2-fosfoglicolato producido por la actividad de la RubisCO durante la fotorrespiración. En este proceso ocurre un constante flujo de metabolitos, el cual implica la función coordinada de dieciseis enzimas y al menos seis canales de membrana distribuidos entre cloroplastos, peroxisomas y mitocondria, que comunican directamente estos organulos (Douce y Heldt, 2000; Reumann y Weber, 2006). Las enzimas peroxisomales involucradas en la fotorrespiración, incluyen la glicolato oxidasa dependiente de flavina, la serin glicolato aminotransferasa, glutamato-glicolato aminotransferasa, hidroxipiruvato reductasa, la malato deshidrogenasa y la aspartato aminotransferasa (Fig. 1.9).

Introducción

La localización de actividad xantina oxidasa y xantina deshidrogenasa en peroxisomas de hojas de guisante (del Río y col., 1989) y la presencia de urato oxidasa en estos orgánulos, apunta a la implicación de los peroxisomas en la biogénesis de ureidos y el catabolismo de purinas en hojas (del Río y col., 1992; del Río y col., 2006; Corpas y col., 2008).

11.1.2 Metabolismo del Oxígeno y Nitrógeno Reactivo y Sistemas Antioxidantes

En plantas la producción de ROS ha sido demostrada en varios compartimentos celulares como cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas, membrana plasmática, apoplasto y núcleo (Foyer y Noctor, 2003; Apel y Hirt, 2004; Palma y col., 2006). El metabolismo oxidativo, es una característica importante de los peroxisomas, en estos orgánulos tiene lugar la producción de H_2O_2 en la reacción de la glicolato oxidasa, durante la fotorrespiración y la reacción de la acil-CoA oxidasa durante la β -oxidación (Fig. 1.8 y 1.9). La XOD es otra fuente adicional de H_2O_2 , en la matriz peroxisomal durante el catabolismo de ureidos (Huang y col., 1983; del Río y col., 1992; Jiménez y col., 1997). En la figura 1.10, se esquematiza la producción de ROS y RNS, y la defensa antioxidante en peroxisomas.

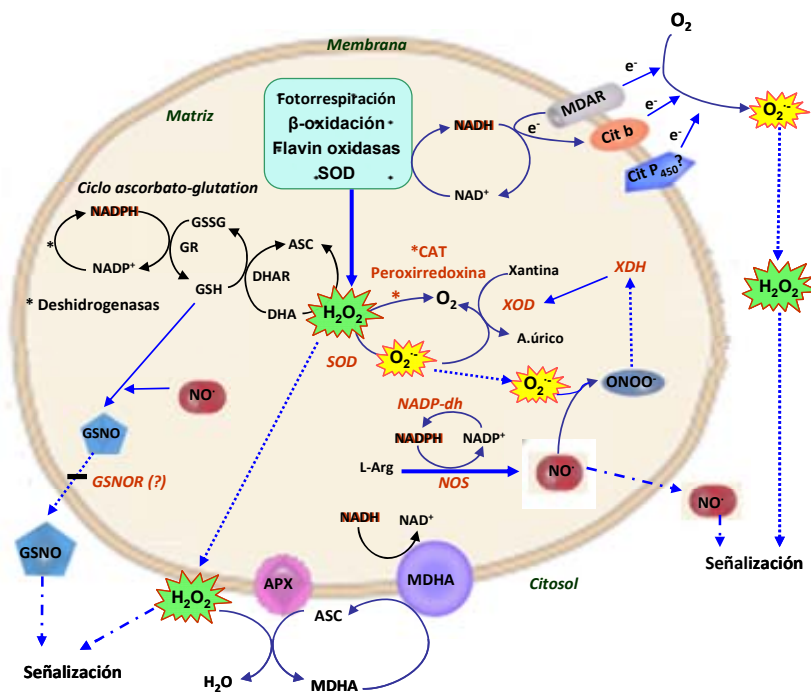


Figura 1.10: Esquema de la producción de ROS/RNS y sistemas antioxidantes en peroxisomas de hojas de guisante. Modificado de del Río y col., (2006). GR: glutatión reductasa; DHAR: deshidroascorbato reductasa; CAT:

catalasa; SOD: superóxido dismutasa; XOD y XDH: xantina oxidasa y deshidrogenasa; GSNOR: S-nitrosoglutathion reductasa; APX: ascorbato peroxidasa; MDAR: monodeshidroascorbato reductasa.

Recientemente se ha identificado y caracterizado en *A. thaliana* la enzima peroxisomal sulfito oxidasa (SO), la cual es dependiente de molibdeno. Los datos experimentales indican que esta enzima está localizada en peroxisomas y que cataliza la oxidación de sulfito con el oxígeno como último aceptor de electrones, con la concomitante producción de H₂O₂ (Hänsch y col., 2006). Dicho hallazgo provee una vía adicional para la producción de peróxido en peroxisomas de plantas. Además, los autores proponen que la reacción es seguida por un paso no enzimático, donde el H₂O₂ puede oxidar a una segunda molécula de sulfito. De esta manera, la enzima parece tener un papel dual, la detoxificación de sulfito y la regulación de los niveles de H₂O₂, especialmente en peroxisomas de *Arabidopsis* (Hänsch y col., 2006; Hänsch y col., 2007).

Además, se ha identificado en plantas la enzima sarcosina oxidasa (SOX) que cataliza la dimetilación de sarcosina, con la subsecuente producción de glicina y H₂O₂ (Hanson y Roje, 2001). Su principal función en plantas parece ser la oxidación de pipicolato proveniente del catabolismo de la lisina, ya que la sarcosina no es un metabolito común en plantas. De este modo la SOX utiliza oportunísticamente este sustrato exógeno, y parece tener una función detoxificadora en suelos (Goyer y col., 2004).

Por otro lado, la producción del radical superóxido (O₂⁻) en peroxisomas fue primero demostrada usando fracciones subglioxisomales de sandía (*Citrullus vulgaris* Schrad) donde se identificaron dos puntos de producción de O₂⁻ (Sandalio y col., 1988), la XOD, en la matriz, y una cadena de transporte electrónico presente en la membrana peroxisomal compuesta por el citocromo b5, una NAD(P)H oxidasa, citocromo c reductasa y el citocromo c (López-Huertas y col., 1996).

Asimismo, se ha demostrado la existencia de actividad óxido nítrico sintasa (NOS) en peroxisomas de hojas de guisante (Corpas y col., 2001), lo que parece implicar a las especies de nitrógeno reactivo en el metabolismo peroxisomal, sugiriendo que estos orgánulos pueden desempeñar un importante papel en el mecanismo de transducción de señales por NO (Corpas y col., 2004a).

Los peroxisomas disponen de una batería de antioxidantes que regulan los niveles de H₂O₂ y O₂⁻. Entre ellos, la catalasa y los componentes del ciclo ascorbato-glutation, son los principales sistemas implicados en la eliminación del H₂O₂ (del Río y col., 2006). La actividad SOD es la encargada de eliminar los radicales superóxido y también está presente en peroxisomas. La existencia de esta actividad en estos orgánulos celulares fue

demostrada por primera vez en tejidos vegetales (Sandalio y col., 1987), y desde entonces, la presencia de SODs en peroxisomas aislados se ha demostrado en, al menos, nueve especies diferentes de plantas, y también en células animales y humanas (del Río y col., 2002b).

11.1.3 Movimiento de Peroxisomas

Gracias a los recientes avances en el uso de proteínas fluorescentes como marcadores *in vivo*, en los últimos años se ha explorado una nueva área de investigación, el posicionamiento o distribución de orgánulos celulares y su papel en el metabolismo celular.

Una importante característica de los orgánulos de células vegetales como mitocondrias y peroxisomas, es su rápido e incesante movimiento que es atribuido a la movilidad del citoesqueleto de actina-miosina (Vale, 2003; Boldogh y Pon, 2006).

Además de los aspectos funcionales del metabolismo de los peroxisomas, estos orgánulos se ven afectados por cuestiones concernientes a su biogénesis, como son el mantenimiento de su forma y tamaño, la formación de nuevos peroxisomas y el mantenimiento de su distribución citoplasmática. En orgánulos análogos, algunos de estos aspectos parecen estar relacionados con las funciones del citoesqueleto. Así, por ejemplo se ha visto el papel de los microtúbulos en la organización del retículo endoplasmático (Allan y Vale, 1994) y en hojas de tabaco, se ha observado que el movimiento de mitocondrias, peroxisomas y de membranas a través del aparato de Golgi, es mediado en gran medida por las miosina K de la clase XI y otros genes parálogos como la XI-1, XI-2 y XI-B (Avisar y col., 2008; Prokhnevsky y col., 2008). Gracias a estos avances, se ha permitido un replanteamiento del concepto de corriente citoplasmática en plantas superiores, revelando que el tráfico en Golgi, el movimiento de peroxisomas y mitocondrias, exhibe movimientos aleatorios y mutidireccionales con un gran rango de velocidades. La expresión de proteínas de fusión GFP::cDNA en *Arabidopsis*, ha permitido la obtención de al menos 29 líneas marcadas, donde los peroxisomas han sido la diana de la GFP; la mayoría de estas líneas poseen una proteína carboxi terminal PTS-1 (del término en inglés: peroxisomal targeting signals) y el tripeptido SKL (Cutler y col., 2000).

El porcentaje de peroxisomas en movimiento y estacionados depende del estado y el tipo de célula. La velocidad de movimiento de los peroxisomas se ha estudiado en distintos tipos celulares así por ejemplo en células de epidermis de puerro la máxima 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 raíz y pelos radicales de

Arabidopsis, la máxima velocidad se encontraba entre 2-5 $\mu\text{m/s}$ (Jedd y Chua, 2002; Mano y col., 2002; Mathur y col., 2002). Algunos estudios llevados a cabo con mutantes deficientes en genes de miosina, sugieren que las altas velocidades en el transporte de orgánulos, son requeridas para un óptimo crecimiento de la planta. Esta hipótesis es apoyada por la correlación entre los efectos negativos sobre el crecimiento y la fertilidad, en mutantes deficientes en miosina XI-K/1 (Prokhnevsky y col., 2008)

El movimiento de los peroxisomas a través de los filamentos de 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, y además la velocidad difiere de acuerdo al tipo celular analizado. La despolimerización de los filamentos de actina, en presencia de fármacos como latrunculina-B, inhibe el movimiento de peroxisomas y sin embargo el uso de despolimerizantes de microtúbulos no afecta su movimiento, lo que demuestra la dependencia de los filamentos de actina para el desplazamiento de estos orgánulos (Collings y col., 2002; Mathur y col., 2002). Además, estudios de colocalización, han revelado la cercana asociación de los peroxisomas con los filamentos de actina (Jedd y Chua, 2002).

Hasta el momento se han descrito las proteínas miosina XI-2 o MYA2, XI-F (Hashimoto y col., 2005; Avisar y col., 2008; Prokhnevsky y col., 2008) como responsables del tráfico de peroxisomas. Además, se han identificado a las proteínas Rab (AtRabD1 y AtRabC2a) como factores que interactúan con la región C terminal de la miosina XI-2, de forma dependiente de GTPasas, y específicamente la AtRabC2a fue localizada en peroxisomas de protoplastos de hojas de *Arabidopsis* (Hashimoto y col., 2008).

Normalmente los peroxisomas de hojas se localizan en las proximidades de los cloroplastos, probablemente para maximizar el proceso de fotorrespiración (Mano y col., 2002). Asimismo, cabe resaltar que esta proximidad, demuestra una dependencia entre la distribución de los peroxisomas y el movimiento de cloroplastos, en las células de hojas (Oikawa y col., 2003; Wada y Suetsugu, 2004). Otra de las posibles funciones del movimiento de los peroxisomas, sería el acercamiento del orgánulo a las zonas del citoplasma donde se sintetizan las proteínas destinadas al peroxisoma (Muench y Mullen, 2003). El importe de proteínas a los peroxisomas parece estar mediado por microtúbulos, a los que se unen la proteína multifuncional de peroxisomas (MFP) PTS1 (*peroxisomal targeting signal*) que interviene en la β -oxidación (Mullen, 2002; Chuong y col., 2004).

Por otro lado los peroxisomas reaccionan en procesos de respuesta celular frente a situaciones de estrés, como se ha demostrado la infección por el patógeno *Erysiphe*

Introducción

cichoraccearum en *Arabidopsis* cuya respuesta involucra el movimiento de peroxisomas hacia el sitio de penetración del patógeno (Koh y col., 2005).

OBJETIVOS

El estudio de la función de las diferentes especies de oxígeno y nitrógeno reactivo (*ROS* y *RNS*) en la transducción de señales celulares y en la regulación de la expresión de sistemas antioxidantes en respuesta a diferentes tipos de estrés, constituye una de las líneas de investigación de nuestro grupo de trabajo dentro del Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC) de Granada.

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 son una fuente de *ROS* y *NO*, y además contienen una amplia batería de antioxidantes de defensa frente a estas *ROS*. Las especies de oxígeno reactivo cuando se producen en exceso son tóxicas, pero a bajas concentraciones desempeñan un papel muy importante como moléculas señal regulando multitud de procesos, entre ellos el desarrollo y la respuesta al estrés. Es por ello, que los peroxisomas son unos orgánulos muy atractivos desde un punto de vista científico dada su dualidad como fuente de estrés oxidativo, pero también como emisores de señales celulares.

Recientemente, se ha demostrado la implicación de especies de oxígeno reactivo (*ROS*) en el mecanismo de acción del herbicida 2,4-D (Grossmann y col., 2001; Romero-Puertas y col., 2004a). Sin embargo la fuente de *ROS* y los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la respuesta celular, no están bien establecidos.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se ha pretendido profundizar en este tema mediante la identificación de las fuentes de *ROS* implicadas en los mecanismos de toxicidad de este herbicida y la secuencia de eventos que intervienen en la transducción de señales en respuesta al estrés por 2,4-D y para ello, se han utilizado plantas de guisante y *Arabidopsis*. Especial interés se ha dedicado al estudio del papel de las *ROS* y el *NO*, tanto en la toxicidad del 2,4-D, como en la señalización celular, y el papel de los peroxisomas de hojas en la respuesta al 2,4-D. Para ello se han establecido los siguientes objetivos:

- 1.- Estudio del efecto del 2,4-D sobre el metabolismo de especies de oxígeno reactivo. Para ello, se analizará la actividad de distintas fuentes de *ROS* y los niveles de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, y se determinará la acumulación de *ROS* y *NO* mediante aproximaciones bioquímicas y celulares.

Objetivos

- 2.- Análisis de daños oxidativos a macromoléculas. Se estudiará la modificación de proteínas por oxidación y S-nitrosilación, y la relevancia de estos procesos en la toxicidad del herbicida 2,4-D.
- 3.- Determinar la secuencia de eventos implicados en la inducción de la respuesta de la planta frente al 2,4-D. Se analizará la producción de etileno, inducción de proteínas de defensa y la participación de canales de Ca^{2+} y procesos de fosforilación/desfosforilación de proteínas, en la respuesta frente al 2,4-D.
- 4.- Establecer el papel de los peroxisomas en la respuesta frente al 2,4-D. Para ello se analizará la dinámica de estos orgánulos y su regulación, así como el papel del citoesqueleto de actina.
- 5.- Determinar el perfil de proteínas fosforiladas de peroxisomas y analizar los cambios dependientes de 2,4-D en la fosforilación de las proteínas peroxisomales para profundizar en la respuesta de estos orgánulos al estrés por 2,4-D.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material Vegetal y Condiciones de Cultivo

3.1.1 Plantas de *Pisum sativum* L., cv Lincoln

En este estudio se emplearon plantas de guisante (*Pisum sativum* L., cv Lincoln) crecidas en medio de cultivo hidropónico en invernadero (del Río y col., 1985). Las semillas (Royal Sluis, Enkhuisen, Holanda) fueron tratadas con NaHCl₃ al 2% y a continuación, se germinaron en vermiculita previamente humedecida con agua, en cámara de cultivo a 25 °C en oscuridad durante 4 días. Posteriormente, se trasladaron al invernadero, donde se mantuvieron durante quince días. Una vez obtenido el estadio de crecimiento adecuado, las plántulas se trasplantaron a recipientes de PVC (2,5 litros de capacidad; 4 plántulas por bote) que se distribuyeron siguiendo 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 uno de los recipientes de cultivo, la cual fue renovada cada 7 días.

La solución nutritiva se basó en la composición descrita por Hewitt (1966) modificada para un pH inicial de $5,5 \pm 0,1$ y una concentración iónica de 30 mg ion l⁻¹, siguiendo la técnica propuesta por Steiner (1961) Las concentraciones de macro y micro nutrientes utilizadas fueron las siguientes según del Río (del Río y col., 1985):

- Macronutrientes (mM): NO₃⁻, 12; H₂PO₄⁻, 4,0; SO₄²⁻, 1,5; K⁺, 5,0; Ca²⁺, 4,5; Mg²⁺, 1,5.
- Micronutrientes (µM): Fe, 91,3; B, 46; Cu, 1,1; Zn, 2,3; Mn, 9,3.

Las condiciones para el cultivo en invernadero fueron las siguientes: 26 ± 2 °C durante el día y 18 ± 1 °C durante la noche, $70\% \pm 5$ de humedad relativa y fotoperíodo de 16 h.

3.1.2 Plantas de *Arabidopsis thaliana*

Paralelamente se emplearon plantas de *Arabidopsis thaliana*, silvestres (wt) del ecotipo Columbia 0 (Col-0) y los mutantes: GFP-Fimbrina y GFP-SKL A-5 (cedidas por el Prof. Hawes de la Universidad Oxford Brookes, Reino Unido) y *acx1* deficiente en la actividad de la acil-CoA Oxidasa (cedida por el Dr. León del CSIC-UVP Valencia, España), todas ellas Col-0.

Previamente a la siembra de las semillas en vermiculita/turba, éstas se sometieron a un proceso de estratificación con el objetivo de favorecer su germinación, el cual consistió en mantenerlas a 4°C y en oscuridad durante dos días, embebidas en agua destilada estéril, seguidamente fueron sembradas directamente sobre vermiculita/turba a una relación 1:4 y

crecidas en cámara de cultivo hasta el momento de la aplicación de los diferentes tratamientos, los cuales se aplicaron durante la fase vegetativa de las plantas. Las condiciones de cultivo de las plantas fueron las siguientes: temperatura 22°C/18°C, humedad relativa 60%/50%, y un fotoperiodo de 16 horas (día largo) y 8 horas (día corto) con un PAR (Photosynthetically Active Radiation) de 130 μ E.

3.1.3 Tratamientos con el Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

3.1.3.1 Vía Foliar

Pasados 21-36 días de crecimiento de las plantas de guisante en el cultivo hidropónico, se procedió a la aplicación foliar del 2,4-D mediante el uso de un micropulverizador de vidrio de control manual.

Debido a su baja solubilidad en agua, el 2,4-D (forma ácida) se disolvió en etanol (50%; v/v) y, a continuación se añadió un mojante-adherente (Bayer) al 1% (v/v). La concentración aplicada, de 2,4-D fue de 22,6 mM. La aplicación vía foliar del herbicida, en plantas de *Arabidopsis* se realizó durante la fase vegetativa de la planta, a las tres semanas de edad para las plantas cultivadas en día largo y a las cinco semanas para las plantas de día corto. El 2,4-D 22,6 mM en DMSO 1% fue aplicado por pulverización fina a una distancia de 20 cm de las plantas con ayuda de un micropulverizador.

Tanto en guisante como en *Arabidopsis* el período de tratamiento fue de 72 horas, finalizado el tratamiento se procedió a la recolección de muestras y procesamiento. No obstante en plantas de *Arabidopsis* también se tomaron muestras a 1, 5 y 24 h tras el tratamiento.

3.1.3.2 Tratamiento con Inhibidores y Moduladores en Brotes de Plantas de Guisante

Para el análisis del efecto de inhibidores y moduladores se utilizaron brotes de las plantas anteriormente descritas, para lo cual se cortaron de la parte superior de cada planta 3 internudos a los que denominamos brotes. Cada brote se incubó durante 3 horas con la solución del inhibidor o modulador, pasado este tiempo se cambió la solución por una con inhibidor y 2,4-D 20 μ M manteniendo las concentraciones de cada inhibidor. Los efectos de cada tratamiento se registraron pasadas 18 horas del tratamiento, cuando los efectos del 2,4-D eran visibles.

La concentración de inhibidores o moduladores utilizados se describe en la Tabla 3.1. difenil iodonium (DPI), inhibidor de NADPH oxidasa; Alopurinol, inhibidor de XOD; hidroxianisol butilado (BHA) análogo de la vitamina E que actúa antioxidante; EDTA, quelante de metales; Amino-etoxi-vinil glicina (AVG), inhibidor de la síntesis de etileno;

NO₃Ag, como bloqueante de receptores de etileno ;Wortmannin, inhibidor de MAP quinasas, y La₃Cl, inhibidor de canales de Ca²⁺.

| Tratamiento | Concentración |
|--------------------|---------------|
| 2,4-D | 20 µM |
| DPI | 10 µM |
| Alopurinol | 2 mM |
| BHA | 500 µM |
| EDTA | 200 µM |
| AVG | 50µM |
| NO ₃ Ag | 10 mM |
| Wortmannin | 8 nM |
| La ₃ Cl | 1 mM |

Tabla 3.1: Concentraciones de 2,4-D y de los diferentes inhibidores/moduladores, usadas para la incubación de brotes de guisante.

3.1.3.3 Tratamiento con Inhibidores y Moduladores en Tiras de Hojas de Plantas de Guisante

Para el análisis de inhibidores y/o moduladores en tiras de hojas de guisante, se utilizaron hojas de la parte apical de plantas de 21-28 días de edad. Las tiras de 10 mm de largo por 1,5 mm de ancho fueron cortadas de la región central de las hojas, como se describe en la figura 3.1. Se utilizaron 15-20 tiras de hojas por tratamiento, las cuales se incubaron durante 20h en placas petri de 5 cm de diámetro, con 5 ml de un medio de incubación compuesto por Tris-HCl 0,5 mM, pH 6,0, KCl 10 mM y sacarosa 10 mM, suplementado con 2,4-D 120 µM y/o inhibidores (Tabla 3.2). Las placas fueron incubadas en oscuridad.

Una vez terminado el tiempo de incubación, las tiras se dispusieron en una superficie plástica de modo que en la parte inferior quedara la zona abaxial o envés de la hoja y en la parte superior la zona adaxial o haz, de esta forma se fotografiaron para su posterior análisis. La curvatura epinastica (curvatura hacia el haz) fue determinada como el grado de curvatura (θ), el cual se calculó geométricamente como se ilustra en la figura 3.1 C y según Kawano y col. (2003).

| Tratamiento | Concentración |
|-------------|---------------|
| 2,4-D | 120 µM |
| EDTA | 200 µM |
| Cantaridina | 10 µM |
| DPI | 10 µM |
| BHA | 500 µM |
| Wortmannin | 8 nM |
| AVG | 100 µM |

Tabla 3.2: Concentraciones de 2,4-D y de los diferentes inhibidores / moduladores, usadas para la incubación de tiras de hojas de guisante. Cantaridina, inhibidor de fosfatasas; DPI, cloruro de difenilén iodonio, inhibidor de NADPH oxidasas; BHA, hidroxianisol butilado, antioxidante; Wortmannin, inhibidor de MAP quinasas y AVG, amino etoxi vinil glicina, inhibidor de síntesis de etileno.

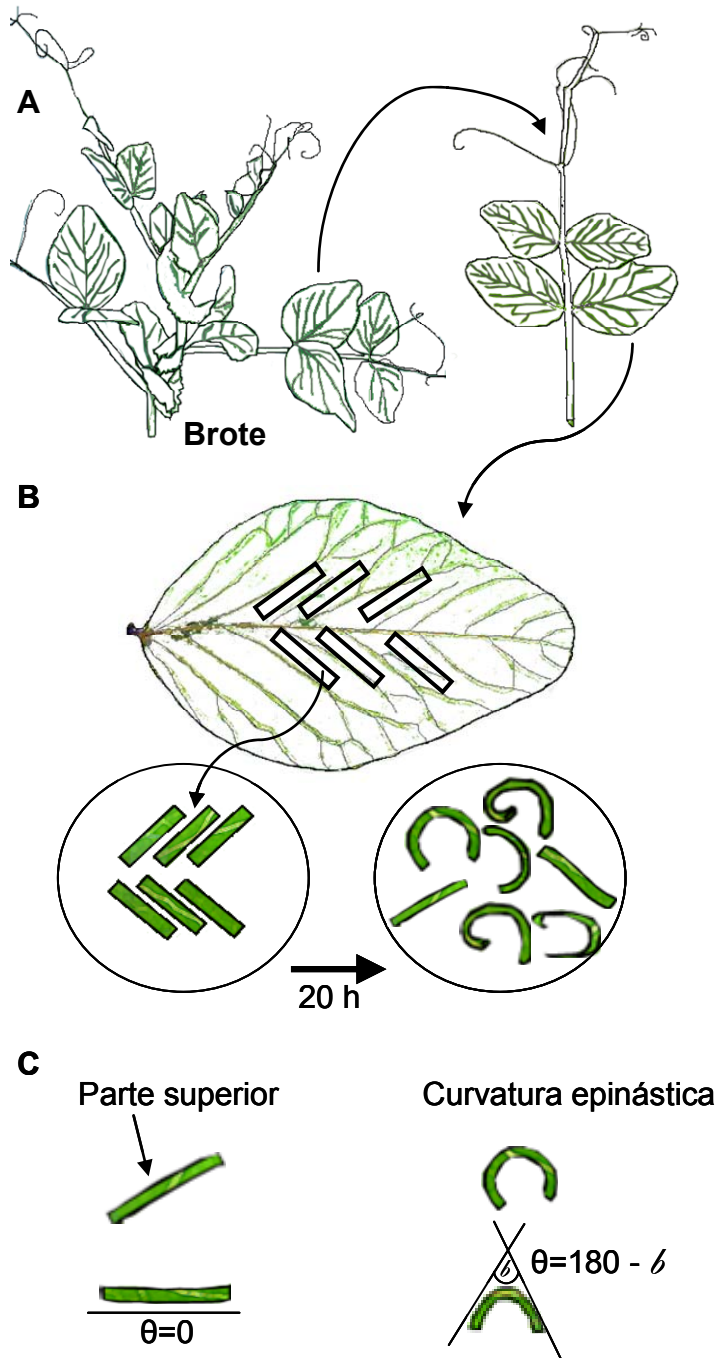


Figura 3.1 Preparación de brotes y tiras de hojas de guisante, para el análisis de la curvatura epinástica. (A): ejemplo de brotes cortado en el cuarto internudo. (B): Hoja de guisante, vista de la parte abaxial, las tiras fueron cortadas de la zona central de la hoja evitando las nerviaciones. (C): Ejemplo de la inducción de la epinastia en tiras de hojas, con una ilustración del método usado para medir el grado de curvatura.

3.1.4 Diseño Estadístico y Análisis de Resultados

El análisis de los resultados experimentales se llevó a cabo mediante la aplicación de la prueba *t* de *student* para muestras independientes, con el que se compara las medias de dos grupos de casos. Para cada variable se tuvo en cuenta: tamaño muestral, media, desviación típica y error de la media. Para la diferencia entre las medias: media del error típico e intervalo de confianza. Además se analizó la distribución normal de los datos y la homogeneidad de la varianza, mediante el test de Levene y estadísticos descriptivos como Shapiro-Wilk. El análisis matemático se realizó con el software estadístico SPSS 15.0.

3.2 Elaboración de Extractos Crudos

3.2.1 Homogenados de Hojas

El proceso de obtención de homogenados de hojas de guisante se realizó mediante la maceración del material vegetal, con tampón de homogeneización Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 conteniendo: DTT 1 mM, PMSF 1 mM, Tritón X-100 al 0,2% (v/v), EDTA 0,1 mM y Glicerol al 20 % (v/v); a 4 °C con una relación 1:4 (p/v). Los extractos se filtraron a través de dos capas de nylon y posteriormente se centrifugaron a 27.000 g durante 25 min., a 4 °C, en una centrifuga refrigerada Sorvall. Finalmente se recuperó el sobrenadante, que se repartió en diferentes alícuotas para la posterior determinación de actividades enzimáticas.

3.3 Aislamiento y purificación de peroxisomas

3.3.1 Gradientes de Sacarosa

El aislamiento de peroxisomas de hojas de guisante, se realizó según el método de López-Huertas y col. (1995). Todos los pasos del protocolo fueron efectuados a 4° C, de esta forma se ayuda a preservar la integridad de los orgánulos. El método consistía en realizar varias centrifugaciones diferenciales seguidas finalmente de una centrifugación en gradientes de densidad de sacarosa (Fig. 3.2). Se partió de 40 g de hojas de guisante, previamente lavadas con agua destilada las cuales se homogeneizaron en 160 ml de medio de extracción semi-congelado, utilizando un Sorvall Omnimixer a velocidad máxima en tres golpes de tres segundos cada uno. La composición del medio de extracción fue la siguiente: tampón Tricina-KOH 170 mM, pH 7,5, con sacarosa 1 M, EDTA-Na₂ 1 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM, ASB al 0,3% (p/v) y DTT 5mM. El homogenado obtenido, se filtró a través de dos capas de entretela y se centrifugó a 5.400 g durante 20 min para eliminar la mayor parte de los cloroplastos, núcleos y residuos celulares. El primer 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, con pH 7,0 y sin DTT, y la suspensión de

Material y Métodos

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- Na_2 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 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 y absorción con una jeringa.

Para diluir la concentración de sacarosa de los peroxisomas, las muestras se diluyeron 10 veces con medio EDTA- Na_2 , pH 7,5 y posteriormente se centrifugaron a 12.000 g durante 30 min, finalmente se recogieron los peroxisomas que se depositaron en fondo del tubo y el sobrenadante que aun contenía peroxisomas se concentró por ultrafiltración usando una membrana PM-10 de Amicon. Finalmente los peroxisomas fueron almacenados a -20°C , hasta su posterior uso.

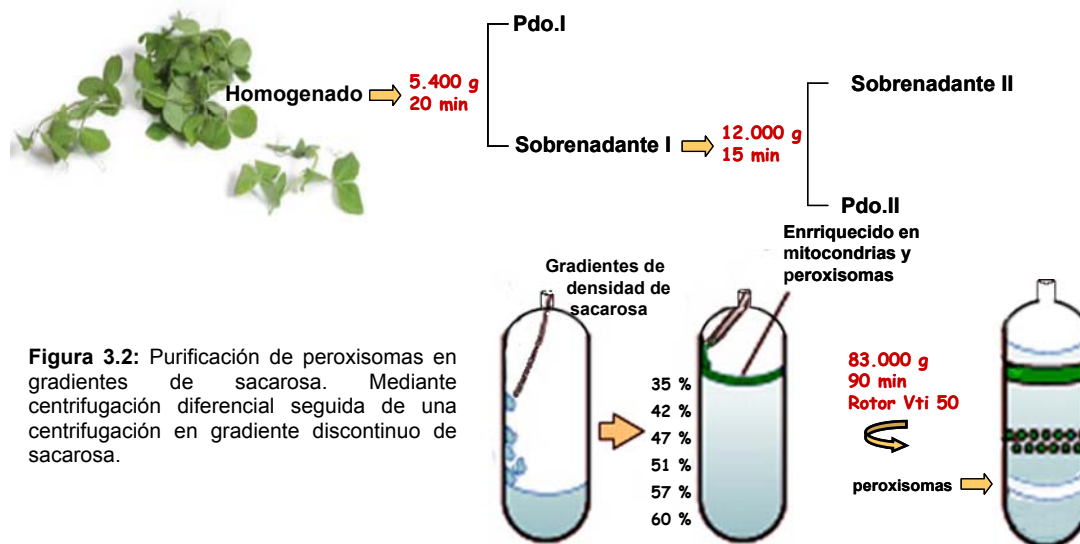


Figura 3.2: Purificación de peroxisomas en gradientes de sacarosa. Mediante centrifugación diferencial seguida de una centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa.

3.4 Desarrollos Electroforéticos

3.4.1 Geles de Poliácridamida en Condiciones Nativas (EGPA)

Se empleó un equipo "Mini-Protean II" de Bio-Rad con geles de 7,5 x 8 cm y 1,5 mm de grosor. Dependiendo de las proteínas a analizar los geles se prepararon usando acrilamida del 7 o del 12% (p/v) en tampón Tris-HCl 377 mM, pH 8,9, la gelificación se

realizó con TEMED al 0,48 % (v/v) y persulfato amónico al 0,45% (p/v). Las muestras se prepararon en tampón de carga que contenía: sacarosa al 10 % preparada en tampón de geles y azul de bromofenol al 0,006%, p/v. El desarrollo electroforetico se realizó con una intensidad de 10 mA por gel, durante 15-20 min y posteriormente, de 20 mA por gel, hasta que el frente de azul de bromofenol alcanzó prácticamente el final del mismo. Como tampón de electrodos se utilizó Tris 5 mM, pH 8,3, y glicina 38 mM.

3.4.2 Geles de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes (EGPA-SDS)

Se siguió básicamente la técnica descrita por Laemmli (1970), utilizando un equipo "Mini-ProteanII" de Bio-Rad. Se prepararon geles de poliacrilamida al 10 ó 12% (p/v) de 7,5 x 8 cm, con un gel concentrador de poliacrilamida al 4% (p/v). Las muestras para la electroforesis se prepararon en tampón Tris-HCl 63 mM, pH 6,8, conteniendo SDS al 2% (p/v), glicerol al 10% (v/v), azul de bromofenol al 0,006% (p/v), y DTT 10 mM, y se calentaron a 95°C durante 5 min. 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) que se prepararon igual que las muestras.

3.4.3 Tinción de Proteínas en EGPA-SDS

3.4.3.1 Tinción con Azul Coomassie

Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron con "Coomassie Brilliant Blue" R-250 al 0,1% (p/v) preparado en metanol al 50% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) durante 30 min, tras lo cual se destiñeron con metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10%(v/v) hasta obtener bandas azules sobre un fondo transparente.

3.4.3.2 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, se lavaron en repetidas ocasiones y se incubaron con una solución reductora de ferricianuro potásico ($K_3Fe(CN)_6$) al 1% (p/v) y tiosulfato de sodio al 1,6% (p/v) durante 15 min. Posteriormente, los geles se lavaron y se incubaron en una solución con nitrato de plata ($AgNO_3$) al 0,1% (p/v), en oscuridad, durante 30 min. El revelado se efectuó por inmersión en una solución conteniendo carbonato sódico (Na_2CO_3) 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 Transferencia de Proteínas e Inmunodetección (técnica de Western-blot)

3.5.1 Transferencia de Proteínas

Los geles obtenidos mediante EGPA-SDS se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF) de Millipore, utilizando un sistema de transferencia semi-seco de Bio-Rad. Para la transferencia se utilizó un tampón Caps 10 mM, pH 11,0, conteniendo metanol al 10 % (v/v) y se llevó a cabo con una intensidad de 1,5 mA por cm² durante 1 h.

3.5.2 Inmunodetección

Para la detección de la reacción antígeno-anticuerpo en las membranas se empleó el método de la quimiolumiscencia, que se basa 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 permeabilizaron con metanol 100% (v/v) durante unos segundos, y se lavaron con agua destilada. Con objeto de bloquear los lugares inespecíficos de unión de las inmunoglobulinas, 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 con el anticuerpo primario correspondiente, convenientemente diluido, de 1 a 3 h 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 peroxidasa de rábano. Para el revelado con la peroxidasa de rábano, 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. Alternativamente se utilizó el kit ECL Plus Western Blotting (GE, Healthcare Amersham). Posteriormente, las membranas se expusieron en una película para autoradiografía tipo "Hyperfilm" (Amersham), con ayuda de un "cassette" para autorradiografía (Kodak) o se obtuvieron las imágenes de fluorescencia con el Chemidoc

(Bio-Rad). El tiempo de exposición variaba desde segundos hasta 30 min, dependiendo de la intensidad de la señal obtenida.

Se han utilizado anticuerpos policlonales frente a las siguientes proteínas: actina (dilución 1/1000) Ambion, DNP (dilución 1/80000) Sigma, biotina (dilución 1/10000) e IgG anti-conejo unido a la HRP (dilución 1/10000) Bio-Rad.

3.6 Determinación de Actividades Enzimáticas

3.6.1 Xantina Oxidorreductasa

Xantina Oxidasa (XOD; EC 1.1.3.22)

La medida se realizó siguiendo el método de Rajagopalan (1985), basado en la medida del incremento de absorbancia a 293 nm debida a la formación de ácido úrico a partir de xantina. La reacción se siguió durante 10 min a 25 °C en un espectrofotómetro Beckman mod. DU-7, en un volumen final de reacción de 1,06 ml, con la siguiente composición: CNK 0,1 mM, 50µl de muestra; tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8 saturado con oxígeno mediante borboteo de aire, y xantina 50 µM. La muestra se incubó con CNK durante 3 min en oscuridad.

La actividad enzimática, expresada en nmoles de ácido úrico x min⁻¹ x mg prot⁻¹, se calculó a partir de la máxima pendiente obtenida en el intervalo de medida y aplicando un coeficiente de extinción (ϵ_{293}) para el ácido úrico de $1,22 \times 10^4 \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Hong y Schopfer, 1981).

Para visualizar la actividad isoenzimática XOD en geles, se utilizaron homogenados de hojas de guisante, los cuales se sometieron a electroforesis en condiciones no desnaturalizantes o nativas. Terminada la separación de las proteínas por electroforesis, se efectuó el revelado de la actividad XOD de acuerdo con el método de López-Huertas y col. (1999), basado en la reducción del NBT a azul de formazano por los radicales O_2^- generados en la oxidación enzimática de la xantina. Para el revelado se incubaron los geles en oscuridad, a 30 °C y durante 15 min, en una solución consistente en tampón fosfato-K 100 mM, pH 7,8, saturado con O_2 , conteniendo xantina 1 mM, EDTA 0,1 mM y NBT 1 mM. Finalizada la incubación, se realizó un lavado rápido con tampón fosfato-K 100 mM, pH 7,8 y se expuso el gel a la luz sobre un transiluminador de luz blanca, apareciendo la actividad XOD como una banda de color azul-morado sobre un fondo transparente.

Xantina Deshidrogenasa (XDH; EC 1.1.1.204)

Se siguió el método espectrofotométrico descrito por Rajagopalan (1985), el cual se basa en la medida de ácido úrico dependiente de NADH, a 293 nm. La reacción se siguió como se ha descrito anteriormente para la actividad XOD, con la incorporación de xantina 50 μM y NAD 0,5 mM como aceptor de electrones. Finalmente la actividad enzimática, expresada en nmoles de ácido úrico $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$, se calculó a partir de la máxima pendiente obtenida en el intervalo de medida y aplicando un coeficiente de extinción (ϵ_{293}) para el ácido úrico de $1,22 \times 10^4 \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Hong y Schopfer, 1981).

3.6.2 Superoxido Dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1)

Se empleó el método espectrofotométrico de McCord y Fridovich (1969), con una ligera modificación en la concentración de citocromo *c* y la xantina en mezcla de reacción (13,5 μM y 96,7 μM , respectivamente). El ensayo se basa en la medida de la tasa de inhibición, debida a la actividad SOD, de la reducción del citocromo *c* por los radicales O_2^- generados por el sistema xantina-xantina oxidasa. La reacción se llevó a cabo a 25 °C durante 2-3 min y la medida de la densidad óptica se efectuó a 550 nm en un espectrofotómetro Beckman mod. DU-7. Los pasos a seguir fueron los siguientes:

1. Comprobación del estado de oxidación del citocromo *c* en la mezcla de reacción. A un volumen de 1 ml de mezcla de reacción (tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8, citocromo *c* 13,5 μM , Na₂-EDTA 0,1 mM y xantina 96,7 μM saturado de O_2 y a 25 °C) se le añadió una pequeña cantidad de ditionito sódico y se midió la absorbancia de la solución a 550 nm. La lectura debía estar comprendida entre 0,20 y 0,24.

2. Reacción control, en la cual se estimó el volumen de xantina oxidasa (XOD) necesario para lograr un incremento de la densidad óptica de 0,025 unidades min^{-1} . Para ello se calibró el espectrofotómetro con la mezcla de reacción y se midió durante 3 min el cambio de absorbancia producido por la adición de 4-15 μl de XOD convenientemente diluída. Esta reacción se repitió 3- 4 veces para calcular un valor medio. Se utilizó XOD bovina de la casa comercial Roche.

3. Reacción problema. Se realizó un blanco de muestra, calibrando el espectrofotómetro con 1 ml de mezcla de reacción y 10-50 μl de muestra. Después de la calibración se añadió el volumen de XOD, previamente determinado en la reacción control, y se siguió el curso de la reducción del citocromo *c* durante 3 min. Adicionalmente, se realizó una medida de la reducción del citocromo *c* utilizando tan solo la muestra y la mezcla de reacción (blanco de muestra) sin XOD, para valorar la contribución de la muestra en la pendiente obtenida en el ensayo de actividad.

Finalmente para calcular la actividad SOD total de la muestra en unidades $\times \text{ml}^{-1}$, se aplicó la siguiente expresión, donde 1 unidad de actividad SOD es la cantidad de enzima necesaria para producir una inhibición el 50% en la tasa de reducción del citocromo c (McCord & Fridovich, 1969).

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

$$\text{Unidades SOD/ml} = \frac{\% \text{ Inhibición}}{50\%} \times \frac{1}{\text{vol de muestra (ml)}} \times \text{factor de dilución}$$

Para la separación e identificación de las isoformas de SOD se aplicó el método fotoquímico de Beauchamp & Fridovich (1971), basado en la inhibición que la SOD produce en la reducción del NBT a azul de formazano por los radicales $\text{O}_2^{\cdot -}$. Se prepararon geles al 12% (p/v) de acrilamida y se sometieron a electroforesis en condiciones no desnaturalizantes (Davies, 1964). La solución de gelificación, compuesta por acrilamida y bisacrilamida (19:1), se preparó en tampón Tris-HCl 377 mM, pH 8,9. Las muestras se prepararon con tampón de muestra para EGPA nativa y la electroforesis se efectuó como se describe el en apartado 3.4.1.

El revelado de la actividad SOD en geles de poliacrilamida, se efectuó mediante el siguiente procedimiento:

1. Los geles se incubaron en oscuridad, durante 20 min, con una solución de NBT 2,45 mM preparada en tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8.
2. Se eliminó la solución anterior y se incubaron los geles en oscuridad, durante 15 min, con una solución de riboflavina 28 μM y TEMED 28 mM en tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8.
3. Los geles se lavaron rápidamente con tampón fosfato.
4. Se renovó la solución de tampón y se reveló la actividad en los geles mediante exposición a luz blanca en un transiluminador, hasta la aparición de bandas acromáticas sobre un fondo azul.

3.6.3 Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6)

Se siguió el método espectrofotométrico descrito por Aebi (1984), basado en la medida de la disminución de la absorbancia del H_2O_2 a 240 nm debida a su

descomposición por efecto de la catalasa. En una cubeta de cuarzo se añadieron de 5 a 100 μ l de muestra a 2,9 ml de mezcla de reacción formada por tampón fosfato potásico 50mM, pH 7,0 y H_2O_2 10,6 mM, convenientemente protegida de la luz. La reacción se registró durante 2 min a 25 °C en un espectrofotómetro Beckman mod. DU-7. La actividad enzimática, expresada en μ moles de H_2O_2 x min^{-1} x mg prot^{-1} se calculó a partir de la velocidad inicial de la reacción y de un coeficiente de extinción molar para el H_2O_2 de 39,58 $\text{M}^{-1}\text{x cm}^{-1}$ (del Río y col., 1977).

3.6.4 Acil-CoA Oxidasa (ACX; EC 1.3.3.6)

Se midió mediante el método espectrofotométrico de Gerhardt (1983), basado en la medida indirecta del H_2O_2 producido en la oxidación del palmitoil-CoA, a través de la oxidación de la 4-aminoantipirina. Esta actividad se registró a 500 nm durante 10 min a 25° C. La mezcla de reacción (1 ml) contenía: tampón Tris-HCl 175 mM, pH 8,5, saturado con oxígeno; FAD 50 μ M; PHMB (*p*-hidroximercuribenzoato) 12 mM; 4-aminoantipirina 1 mM; NaH_3 1 mM; peroxidasa de rábano (5,3 unidades); 100 μ l de muestra y palmitoil-CoA 50 μ M. La reacción se inició al añadir el palmitoil-CoA. Adicionalmente para cada muestra se midió un blanco con todos los componentes mencionados anteriormente excepto el palmitoil-CoA y el FAD. La actividad fue expresada en μ moles de antipirina oxidada x min^{-1} x mg prot^{-1} , y se calculó aplicando un coeficiente de extinción molar (ϵ_{500}) de $64 \times 10^{-1} \times \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.6.5 Glutation S-transferasa (GST, EC 2.5.1.18)

Se empleó el método de Habig y co. (1974), que está basado en la medida a 340 nm, de la tasa de formación del complejo entre GSH y el compuesto 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno (DCNB). La reacción fue registrada en un espectrofotómetro Beckman mod. DU-7 durante 3 min, a 30 °C en un volumen de mezcla de reacción de 1 ml con la siguiente composición: tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 7,8; glutatión reducido (GSH) 1 mM; muestra (5-75 μ l); y DCNB 1 mM, preparado en etanol puro.

La actividad enzimática, expresada en nmoles de complejo GSH-DCNB x min^{-1} x mg prot^{-1} , se calculó a partir de la máxima pendiente obtenida en el intervalo de medida y aplicando un coeficiente de extinción molar (ϵ_{340}) para el complejo, de $9,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Habig y col., 1974).

3.6.6 Lipoxigenasa (LOXs; 1.13.11.12)

Fue medida de acuerdo con Suurmeijer y col. (1998). Previo al ensayo los extractos se pasaron por columnas PD 10 sephadex G-25 M de Amersham Biosciences. El método se basa en el incremento de absorbancia a 243 nm a 25 °C, debido a la formación de un dieno conjugado por la hidroperoxidación catalizada por la LOX. La reacción se inició por la adición de 10 – 50 µl de muestra, a una mezcla de reacción compuesta por 5 µl de ácido linoléico 30 mM, con 945-985 µl de tampón fosfato potásico 100 mM pH 6,8. La reacción fue registrada en un espectrofotómetro Beckman mod. DU-7 durante 2-3 min. La actividad enzimática, expresada en nmoles de dieno conjugado x min⁻¹ x mg prot¹, se calculó a partir de la parte lineal de la curva y aplicando un coeficiente de extinción molar (ϵ_{234}), de 25 mM⁻¹ x cm⁻¹.

3.6.7 Guayacol Peroxidasa (GPX)

Se aplicó el método de Quessada y Macheix (1984), consistente en registrar el incremento de la absorbancia a 470 nm debido a la oxidación del guayacol en presencia de H₂O₂ por la acción de peroxidasas celulares. La reacción se llevó a cabo a 25 °C y se midió por la adición de H₂O₂ a una mezcla de reacción constituida por tampón fosfato potásico 50 mM, pH 6,1; guayacol 6,25 mM; muestra (25-50µl convenientemente diluida); y H₂O₂ 25µM. La reacción se registró durante 3 min y la actividad enzimática, expresada en nmoles de guayacol oxidado x min⁻¹ x mg prot¹, se calculó aplicando un coeficiente de extinción (ϵ_{470}) para el guayacol oxidado de 26,6 mM⁻¹ x cm⁻¹.

3.6.8 Glutation Reductasa (GR; EC 1.6.4.2)

Para su determinación se empleó el método de Edwards y col. (2000), 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, Mg Cl₂ 3 mM, y glutation oxidado 0,5 mM, en un volumen final de 1 ml. La reacción se inició 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 glutation oxidado. La actividad enzimática expresada en nmoles de NADPH oxidado x min⁻¹ x mg prot¹, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el NADPH de 6,22 mM⁻¹ x cm⁻¹ (Jiménez y col., 1997).

3.6.9 Ascorbato Peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11)

Para llevar a cabo el análisis de esta actividad se utilizaron muestras preparadas en un medio de extracción conteniendo ascorbato 2 mM, para prevenir la inactivación de la APX. La actividad se determinó según describe Jiménez y col. (1997), midiendo a 290 nm la oxidación del ácido ascórbico, durante 1 min.

La mezcla de reacción (1 ml) contenía tampón Hepes-NaOH 50 mM, pH 7,6, ascorbato 0,2 mM, H₂O₂ 0,3 mM, y la muestra convenientemente diluida. El ensayo se realizó a 25°C y se inició con la adición del H₂O₂. La actividad enzimática, expresada en nmoles de ácido ascórbico oxidado x min⁻¹ x mg prot⁻¹, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el ácido ascórbico de 2,8 mM⁻¹ x cm⁻¹ (Hossain y Asada, 1984a). Se utilizaron tres controles, uno sin H₂O₂, otro sin ascorbato y otro sin muestra. Además como control negativo de la reacción se utilizó un inhibidor de la APX, el *p*-cloromercurifenilsulfónico (pCMS).

3.6.10 Gicolato Oxidasa (GOX; EC 1.1.3.1)

En su determinación se empleó el método descrito por Kerr y Groves (1975). En la mezcla de reacción (1 ml) compuesta por tampón fosfato-K 50 mM pH 8,3, fenilhidracina 10 mM y gicolato 5 mM, la medida se inició con la adición de la muestra, midiéndose a 324 nm durante 3 min la formación del complejo glioxilato-fenilhidrazona. La actividad enzimática expresada en nmol de glioxilato-fenilhidracina x min⁻¹ x mg prot⁻¹, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un ϵ_{324} para el complejo de 17,0 mM⁻¹ x cm⁻¹ (Kerr y Groves, 1975).

3.6.11 S-Nitrosoglutation Reductasa

La actividad enzimática de la S-Nitrosoglutation 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 (1 ml) contenía tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NADH 0,2 mM y EDTA 0,5 mM, y la reacción se inició por adición del GSNO (Calbiochem) a una concentración final de 400 μ M. La actividad enzimática, expresada en nmol de NADH consumido x min⁻¹ x mg prot⁻¹, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un ϵ_{340} de 6,22 mM⁻¹ x cm⁻¹

3.7 Peroxidación Lipídica

La tasa de peroxidación lipídica se determinó según el método de Buege y Aust (1978) midiendo la concentración de malondialdehído (MDA) en la muestra con ácido tiobarbitúrico. Todos los reactivos se prepararon en agua Milli-Q. Para el ensayo se

añadieron 200 µl de muestra a 1 ml de mezcla de reacción conteniendo: 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. Seguidamente, la mezcla se incubó a 95°C durante 15 min con agitación constante, se dejó enfriar y se centrifugó a 2.000 g durante 5 min. Finalmente se efectuó la lectura de la densidad óptica a 535 nm. La concentración de MDA en las muestras problema se calculó a partir de una curva de calibración con distintas concentraciones de MDA conocidas (0,1-10 µM).

3.8 Determinación de Glutation Reducido y Oxidado

La determinación de GSH y GSSG se realizó en extractos ácidos de hojas de guisante. El material (0,2 g) fue homogenizado con nitrógeno líquido, seguidamente se añadió ácido metafosfórico al 5 % (p/v). El extracto se centrifugó a 19.000 g durante 30 min y a 4 °C. El contenido de glutacion total se determinó según el método de Griffith (1980) basado en la oxidación del GSH en presencia de DTNB con la formación de TNB y GSSG. El GSSG es reducido de nuevo por la glutacion reductasa con consumo de NADPH. En el caso de la medida de GSSG las muestras se derivatizaron con la 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. Paralelamente se preparó un blanco sin muestra conteniendo ácido metafosfórico al 5%. Las muestras derivatizadas (GSSG) y sin derivatizar (GSH) se utilizaron para las determinaciones. La mezcla de reacción contenía tampón fosfato sódico 143 mM, Na₂-EDTA 6,3 mM (pH 7,5), NADPH (0,248 mg /ml), DTNB 6 mM y 25 µl de muestra, la reacción se inició con la 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 glutacion total y el GSSG (muestras derivatizadas).

3.9 Determinación de Ascorbato (ASC)

El contenido de ácido ascórbico se determinó según el método de Okamura (1980), empleando extractos ácidos obtenidos en ácido metafosfórico al 6% (p/v). El método se basa en la reducción del Fe³⁺ por el ASC ascorbato a Fe²⁺, que en presencia de biperidil, forma un complejo de color rojo. Así el deshidroascorbato (DHA, forma oxidada) fue medido en el paso de reducción de DHA a ascorbato por la adición de DTT. El exceso de DTT fue eliminado por la reacción con N- etilmaleimida (NEM). De esta forma, el ensayo permitió la determinación del ascorbato total (ascorbato+ DHA), ASC y el contenido de DHA fue estimado a partir de la diferencia entre ascorbato total y reducido (con y sin NEM).

3.10 Determinación de Proteínas

La determinación del contenido de proteínas en extractos crudos de hojas, se realizó espectrofotométricamente mediante el método de Bradford (1976). Se empleó el reactivo comercial de la casa Bio-Rad ("Protein Assay Dye Reagent") y albúmina de suero bovino (ASB) como estándar para preparar la curva patrón. La medida se realizó en un volumen final de 1 ml, contenido en 200 μ l de reactivo de Bradford y 800 μ l de la muestra o ASB, convenientemente diluida en agua destilada. La absorbancia se midió a 595 nm pasados 10 min de incubación con el reactivo de Bradford.

3.11 Determinación de Peróxido de Hidrógeno

3.11.1 Análisis en Solución

La determinación de H_2O_2 en hojas de guisante y de *Arabidopsis* se realizó mediante el método fluorimétrico descrito por Creissen y col. (1999) con algunas modificaciones. Todos los pasos del proceso se llevaron a cabo a 4°C. Los extractos ácidos de hojas se prepararon usando un mortero, en $HClO_4$ 1 mM (1/3, p/v) en presencia de PVPP (5%) con el objetivo de eliminar fenoles, posteriormente se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min. El sobrenadante resultante se filtró a través de un filtro Millipore de 0.45 μ m y se ajustó a pH 7,0 con K_2CO_3 y seguidamente se centrifugó a 12.000 g por 2 min, para remover el $KClO_4$ en el precipitado. El sobrenadante se utilizó para medir la concentración de H_2O_2 . 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 μ l de muestra. La reacción comenzaba con la adición de peroxidasa de rábano 40 μ M. La concentración de H_2O_2 se determinó midiendo la fluorescencia, en un espectrofluorímetro Shimadzu RF-540 (Shimadzu, Columbia, MD), con una longitud de onda de excitación de 315 nm y de emisión 425 nm, frente a una curva patrón de peróxido de hidrógeno (1-20 μ M).

3.11.2 Localización *in situ* de H_2O_2

Para detectar *in situ* la producción de H_2O_2 se utilizó el método descrito por Romero-Puertas y col. (2004b) que utilizaba DAB. Las hojas control y tratadas con 2,4-D 22,6 mM se incubaron en una solución del 1% (p/v) de 3,3'-diaminobenzidina-HCL (DAB) en tampón MES 10 mM, pH 6,5; infiltradas a vacío durante 2 h y posteriormente incubadas a temperatura ambiente durante 8 h en total oscuridad. Finalizado el tiempo de incubación las hojas se iluminaron, hasta la aparición de precipitados marrones, característicos de la reacción del DAB con el H_2O_2 . Finalmente las hojas se blanquearon por inmersión en etanol hirviendo, para facilitar la visualización de los precipitados.

3.12 Detección Espectrofluorimétrica de NO en Solución

La producción de NO en extractos crudos de plantas silvestres de *Arabidopsis*, se determinó siguiendo el método descrito por Nakatsubo y col. (1998). Se utilizaron extractos frescos de hojas de plantas control y tratadas con 2,4-D 22,6 mM, a diferentes tiempos después de la pulverización (1, 5, 24 y 72 h). Los extractos se incubaron a 37°C durante 2 h en oscuridad, con tampón Hepes 50 mM, pH 7,5 y 10 µM de DAF-2 DA. Finalmente el NO se midió en un espectrofluorímetro Shimadzu RF-540, con una longitud de onda de excitación de 495 nm y de emisión de 515 nm, frente a un blanco sin muestra. Los valores fueron referidos a la concentración de proteínas presentes en la muestra.

3.13 Análisis de Proteínas S-Nitrosiladas

La determinación de proteínas S-nitrosiladas se realizó en hojas de *Arabidopsis* procedentes de plantas control y tratadas con 2,4-D 22,6 mM. Se siguió el método del “Biotin Switch” (Jaffrey y col., 2001), basado en la conversión de las cisteínas nitrosiladas en cisteínas biotinizadas, con el previo bloqueo de los grupos tioles libres con un agente metilacionante específico de estos. El patrón de proteínas S-nitrosiladas se identificó mediante Western-blot usando un anticuerpo anti-biotina.

3.13.1 S-Nitrosilación de la Actina

Las proteínas S-nitrosiladas obtenidas mediante la aplicación del método del “Biotin-Switch” según se describe en Perazzolli y col., (2004) fueron inmunoprecipitadas con el anticuerpo frente a la biotina unido a la proteína A (UltraLink Immobilized Protein A/G, Pierce. IPA). Para lo cual las muestras se incubaron toda la noche con agitación a 4°C con PBS y el anti-Biotina unido a la IPA. Posteriormente las muestras se lavaron 3 veces con PBS para eliminar la muestra que no se haya unido al complejo IPA-Anti-Biotina en el último lavado se eliminó completamente el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 20 µl de tampón de muestra SDS 4X y DTT 10 mM. Las proteínas se separaron mediante EGPA-SDS y se transfirieron a una membrana de PVDF según se ha descrito con anterioridad. Este procedimiento se utilizó para determinar la S-nitrosilación de la actina, mediante el uso del anticuerpo específico para esta proteína.

3.14 Determinación de Grupos Carbonilo

Como marcador de estrés oxidativo se utilizó el contenido de grupos carbonilo en proteínas. Para ello se utilizaron dos ensayos, en solución y la detección de las proteínas oxidadas mediante EGPA-SDS e inmunodetección.

3.14.1 Medida en Solución

La cuantificación de grupos carbonilo se efectuó según el método de Levine y col. (1994) 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 homogenados de hojas de guisante en tampón fosfato-Na 10 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 0.2% (v/v) y PMSF 1mM, usando una relación p/v de 1/4. Los homogenados se filtraron y centrifugaron a 27.000 g durante 20 min y los sobrenadantes se utilizaron para las determinaciones.

Para cada tratamiento se usaron tres muestras (con dos réplicas a su vez, cada una) y su correspondiente blanco. Los extractos, conteniendo 0,5 mg de proteína se incubaron con sulfato de estreptomicina al 1% (p/v) durante 20 min para eliminar ácidos nucleicos y se centrifugaron a 2.000 g durante 10 min. Posteriormente, los homogenados se incubaron durante 1 h con DNPH 10 mM preparada en HCl 2 M. Los blancos se incubaron con HCl sin DNPH. Las proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v) y el exceso de DNPH se eliminó lavando con etanol/acetato de etilo (1:1). Finalmente, el precipitado se resuspendió en guanidina 6 M preparada en KH_2PO_4 20 mM a pH 2,3 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 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., 1990).

3.14.2 Detección Inmunoquímica

Se llevó a cabo según se describe en Romero-Puertas y col (2002). Los homogenados se incubaron con DNPH 10 mM preparada en HCl 2 M durante 1 h. Como control negativo se utilizaron blancos incubados en HCl sin DNPH. Posteriormente, se precipitaron las proteínas con TCA al 10% (p/v) y se lavaron con etanol/acetato de etilo (1:1). Finalmente, las proteínas se resuspendieron en tampón fosfato-Na 10 mM, pH 7,4, y se cargaron en dos geles de poliacrilamida-SDS, al 12% el gel separador y al 4% el gel concentrador. Uno de los geles se empleó para la inmunodetección, mediante la transferencia a una membrana de PVDF, y el segundo para tinción de proteínas como control de carga. Las membranas de PVDF se incubaron con anticuerpos comerciales frente al DNPH (Sigma) y las proteínas oxidadas se detectaron mediante quimioluminiscencia.

3.14.3 Inmunoprecipitación de Proteínas Oxidadas

Los homogenados derivatizados con DNPH se inmunoprecipitaron con el anticuerpo frente al DNPH unido a la proteína A (UltraLink Immobilized Protein A/G, Pierce. IPA). Las muestras derivatizadas se incubaron toda la noche con agitación a 4°C en en PBS y el anti-DNPH (1:1.000 v/v) unido a la IPA, en un volumen final de 800 µl. Posteriormente las muestras se lavaron 3 veces con PBS para eliminar la muestra que no se haya unido al complejo IPA-Anti-DNPH y en el último lavado se eliminó completamente el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 20 µl de tampón de muestra SDS 4X y DTT 10 mM. Las proteínas se separaron mediante EGPA-SDS y se transfirieron a una membrana de PVDF según se ha descrito con anterioridad. Como controles se ensayaron homogenados normales, homogenados inmunoprecipitados sin derivatizar y homogenados derivatizados sin inmunoprecipitar. Este procedimiento se utilizó para determinar la oxidación de la actina, mediante el uso de anticuerpos específicos frente a esta proteína.

3.15 Análisis de Emisión de Etileno

La emisión de etileno se determinó en hojas frescas mediante cromatografía de gases según Rodríguez-Serrano y col. (2006). Para ello las hojas se mantuvieron durante 2 h en frascos de 50 ml sellados con tapones de goma. Pasado este tiempo, se tomaron muestras de los distintos tratamientos y se inyectaron en un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer 8600, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA) con un detector de ionización de llama y una columna Poropack-R. Como patrón se utilizó una concentración conocida de etileno.

3.16 Aislamiento y Manipulación de Ácidos Nucleicos

3.16.1 Extracción de ARN

El ARN total se extrajo de las hojas de plantas de guisante, utilizando una solución de fenol y de isotiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987) disponible comercialmente como TRIzol (GIBCOBRL, Life Technologies). Las hojas de guisante (previamente congeladas con nitrógeno líquido y conservadas en -80 °C) se homogeneizaron en mortero en presencia de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Inmediatamente se pesó el polvo y se añadió la solución de TRIzol (1 ml por cada 0,1 g de tejido) evitando la descongelación de la muestra, que se agitó vigorosamente y se incubó a 15-30 °C durante 5 min. A continuación se añadió cloroformo (0,2 ml / ml de TRIzol) agitando por inversión durante 15 s e incubando 2-3 min a 15-30 °C, y se centrifugó durante 15 min a 4 °C a 14.000 rpm. Se obtuvieron dos fases, una orgánica de fenol-cloroformo, y otra acuosa donde se quedó el ARN. Esta fase se recuperó y se le añadió isopropanol

puro, se incubó durante 10 min a 15-30 °C y posteriormente se centrifugó 10 min, a 4 °C y 14.000 rpm. Así, se obtuvo un precipitado de ARN que se lavó con etanol al 75% (v/v) (al menos 1 ml / ml de TRIzol) y posteriormente se volvió a precipitar centrifugando 5 min a 4 °C y 11.500 rpm. Finalmente, se dejó secar el precipitado al aire durante unos min y se resuspendió el ARN en agua tratada previamente con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0,1% (v/v) para inactivar posibles ARNasas ($20-40\mu\text{l} \times 0,1\text{g}^{-1}$ de tejido).

3.16.2 Cuantificación y Análisis Electroforético del ARN

La cuantificación del ARN en solución se estimó a partir de la absorbancia a 260 nm, asumiendo que una unidad de densidad óptica a esta longitud de onda equivale, aproximadamente a 40 $\mu\text{g/ml}$ de ARN. Para ello, se realizó una dilución del ARN en agua tratada con DEPC y se midió la absorbancia entre 200-300 nm para comprobar posibles contaminaciones de proteínas. Además se determinó la relación A_{260}/A_{280} , indicativo de la pureza del ARN que debe estar entre 1,8 y 2,0.

El ARN procedente de hojas de guisante se analizó en geles de agarosa del 0,8 %, con el fin de comprobar su integridad.

3.16.3 Análisis de expresión por RT-PCR semicuantitativa

Para analizar los niveles de transcrito mediante RT-PCR semicuantitativa se realizaron PCRs con oligonucleótidos específicos para cada gen de interés incluyendo en todos los casos la amplificación del gen constitutivo de la actina-II como control de la reacción. Se analizó la expresión diferencial de enzimas antioxidantes y proteínas de defensa (Tabla 3.3), utilizando como DNA molde el cDNA obtenido a partir de la RT del ARN total de muestras de hojas de guisante pertenecientes a las zonas apical y basal de plantas control y tratadas con 2,4-D 22,6 mM.

| Gen | Secuencia de Oligonucleótidos (5'-3') | Tamaño amplificado (pb) | Nº Acceso |
|--|---|-------------------------|-----------|
| Catalasa (CAT) F-CAT R-CAT | ATCCCTATCTTCTGCTCC GACATACACCGATTTTCC | 711 | X60169 |
| MnSOD F- MnSOD R- MnSOD | GGAGCAAGTTTGGTTCCATT AAGGTTATTCGGCCAGATTG | 315 | X60170 |
| CuZnSOD F- CuZnSOD R- CuZnSOD | GAACAATGGTGAAGGCTGTG GTGACCACCTTTCCAAGAT | 395 | X56435 |
| FeSOD F- FeSOD R- FeSOD | GCACCACAGAGCTTATGTAG GGAGTGGATGATGATGGTTC | 436 | AY426764 |
| GST F-GST R-GST | GGAGCACAATGGCAAGGTAT CTCGATCCATGCTGCAAGTT | 376 | AB087837 |
| GR I F GR I R GR I | TCGCAGCACTCTCTTCTCA CTCCATCCAAAACCATGCT | 396 | X60373 |
| GR II F GR II R GR II | ACAGTATTTGGTGGGCAAGC AAACTGCGCTTTCGTAGCTC | 322 | X98274 |
| PsPrP4A F PsPrP4A R PsPrP4A | ATGGAGAGCGTACAGAGAAG AGTCCAGTCCAGGATTAGAG | 438 | AF137351 |
| Chitinasa F Chi R Chi | GCCAAGCTGGTGGAGCTGTA TCAGGAGCCACATGGCCAATC | 472 | X63899 |
| Heat Shock Protein F HSP 71,2 R HSP 71,2 | ACCTCGGCACAACCTACAGC GAGATAGCACCGGCGTCTT | 496 | U08848 |
| Actina II F-Act R-Act | AATGGTGAAGGCTGGATTTG AGCAAGATCCAACGAAGGA | 496 | X68649 |

Tabla 3.3: Oligonucleótidos usados para el análisis de expresión por PCR semi-cuantitativa. Se muestra el nombre del gen, el código de acceso y las parejas de oligonucleótidos utilizados como cebadores en cada caso (F, directo; R, reverso).

El análisis de los productos de PCR, se llevó a cabo en geles de agarosa al 0,8%, teñidos con bromuro de etidio. Estos se visualizaron y cuantificaron usando el programa informático Gel Doc system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) acoplado a un analizador de imágenes. La expresión de los diferentes genes se normalizó utilizando la actina-II como gen de expresión constitutiva. Los valores representados son de al menos tres experimentos independientes. El nivel relativo de amplificación, se calculó según Letierrier y col. (2005).

3.17 Obtención y Análisis de Proteínas Fosforiladas en Peroxisomas de Hojas de Guisante

Se estudió el patrón de proteínas fosforiladas en peroxisomas de hojas de guisante control y tratadas con 2,4-D 22,6 mM. Para lo cual los peroxisomas se purificaron en

Material y Métodos

gradientes de densidad de sacarosa según se ha indicado en el apartado 3.3. La concentración de sacarosa se redujo por dilución y concentración simultánea en un sistema de ultrafiltración de Amicon. La extracción y purificación de las proteínas fosforiladas se efectuó por medio del Kit de enriquecimiento de fosfoproteínas (Phosphoprotein enrichment by phosphate metal affinity chromatography, PMAC de Laboratorios Clontech). Este tipo de cromatografía por afinidad metálica utiliza resinas cargadas con diferentes iones como Al (III), Fe(III), Ga(III) y Zn (II). La adsorción se basa en la formación irreversible en condiciones ácidas, de un complejo entre el grupo fosfato y el ion metálico, el cual se disocia a pH alcalino. Las proteínas no fosforiladas fluyen a través de la resina en pH ácido, mientras que las fosforiladas son retenidas en la misma. A continuación se describen los pasos seguidos:

- Las columnas fueron equilibradas según las instrucciones del fabricante. La solución de almacenamiento (etanol) se dejó fluir a través de la resina y posteriormente se lavaron 2 veces con el tampón **A** (extracción / carga) o hasta que el pH fuese menor o igual a 6.
- Seguidamente se añadieron las muestras resuspendidas en tampón **A** y se incubaron con agitación suave a 4°C durante 30 min.
- Después de la incubación, se situó verticalmente la columna para permitir nuevamente la precipitación de la resina, en este punto se permitió la salida de las proteínas no fosforiladas y se lavó la columna 4 veces con 5 ml del tampón **A**.
- Finalmente se obtuvieron las proteínas fosforiladas, por la adición de 1 ml x 5 tampón de elución **B** (fosfato-K 20 mM y NaCl 0,5 mM). Se recogieron 5 eluidos, que se almacenaron a -20°C hasta su posterior utilización. La mayor proporción de proteínas fosforiladas se encontraba en las fracciones 2 y 3.

Las proteínas fosforiladas contenidas en las fracciones 2 y 3, se precipitaron siguiendo el método del metanol / cloroformo. Se añadió a cada una de las muestras 0,1% de ácido deoxicólico y se incubaron durante 10 min en hielo. A continuación se añadió un volumen de metanol 100 % y 1,7 volúmenes de cloroformo 100%, seguidamente se agitó vigorosamente, y se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 min, de esta forma se obtuvieron tres fases. La fase superior correspondía al cloroformo, la intermedia a proteínas y la final al metanol. Cuidadosamente se eliminó con pipeta la fase superior y se añadió 175 µl de metanol (por cada 100 µl de muestra), se agitó vigorosamente a intervalos de 1 min durante 5 min y se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 min, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó nuevamente en metanol repitiendo el paso anterior. Finalmente el

precipitado se dejó secar a temperatura ambiente en campana para permitir la evaporación del metanol, se solubilizó en tampón de lisis para electroforesis en condiciones desnaturizantes, y se procedió a la individualización de las proteínas mediante EGPA-SDS, al 12 %.

3.17.1 Tinción de Fosfoproteínas Pro-Q[®] Diamond

Una vez terminada la separación de las proteínas mediante EGPA-SDS, se identificaron las proteínas fosforiladas mediante la tinción específica con Pro-Q[®] Diamond Phosphoprotein Gel Satín (Molecular Probes), para lo cual se siguieron las recomendaciones del fabricante. Las proteínas se fijaron en el gel mediante la incubación durante 30 min en una solución compuesta de metanol al 50 % y ácido acético al 10 %, preparada en agua ultra pura, este paso se efectuó dos veces para asegurarse el completo lavado del SDS en el gel. Se continuó con tres lavados en agua ultra pura, de 10 min cada uno. Seguidamente el gel se incubó durante 90 min en un volumen de 60 ml de Pro-Q[®] Diamond, posteriormente se destiñó mediante la incubación durante 30 min en una solución de acetato sódico 50 mM, pH 4,0 y acetonitrilo al 20 % preparada en agua ultra pura, este paso se repitió dos veces para asegurarse un óptimo lavado. Finalmente se realizaron dos lavados de 5 min con agua ultra pura y se visualizó en el transiluminador con luz ultravioleta.

Paralelamente, se efectuó una tinción de proteínas con Azul Coomassie o nitrato de plata.

3.17.2 Análisis Diferencial de Proteínas Fosforiladas mediante 2D-DIGE e Identificación y Caracterización por MALDI-TOF

El análisis de las proteínas fosforiladas obtenidas en los eluidos 2 y 3, tras la cromatografía de enriquecimiento en fosfoproteínas, se realizó mediante 2D-DIGE y MALDI-TOF en el servicio de proteómica del CNB.

- 2D-DIGE

El análisis diferencial de las muestras control y 2,4-D, se realizó mediante la técnica de DIGE (Differential gel electrophoresis), que permite el análisis cuantitativo de proteínas basado en el marcaje por fluorescencia. Las muestras se resuspendieron en tampón de lisis para DIGE (Tris-HCl 30 mM, pH 8,5, urea 7 M y CHAPS 4%) y se determinó su concentración de proteínas mediante el Kit RC DC (BioRad, Hercules CA, USA) y que es compatible con la metodología.

Se marcaron volúmenes iguales de muestras (proteínas fosforiladas) con 400pmol de los fluoróforos Cy2, Cy3 y Cy5 (GE) que se combinaron de acuerdo al diseño

Material y Métodos

experimental (Tabla 3.4), se les añadió volúmenes iguales de tampón de carga 2X (6 M urea, 2 M tiourea, 2% CHAPS, 1 %) y anfolitos pH 3-10 L (GE), 10 mM DTT y se incubaron durante 10 min en frío. Seguidamente se procedió a la separación de las proteínas en geles de poliacrilamida en una primera dimensión, en función de su punto isoeléctico (IEF, isoelectroenfoque), mediante la utilización de tiras IPG (18 cm; pH 3-10 L. GE) en las que se cargaron las dos muestras diferentes, marcadas con Cy3 y Cy5, y el control interno compuesto por proteínas de las dos muestras marcadas con Cy2, Tabla 3.4.

| GEL | Cy2 Control interno | Cy3 | Cy5 |
|-----|------------------------------------|-----------------------|------------------------|
| 1 | 14 µg (7 µg Control/14,5 µg 2,4-D) | 11,4 µg CONTROL =18µl | 23,7 µg 2,4-D =18 µl |
| 2 | 14 µg (7 µg Control/14,5 µg 2,4-D) | 23,7 µg 2,4-D =18 µl | 11,4 ug CONTROL =18 µl |

Tabla 3.4: Diseño Experimental para 2-D-DIGE comparando muestras controles y tratadas con 2,4-D. X µg de cada muestra y µg del control interno se marcó con X pmoles del CyDye indicado, se incubaron en hielo y oscuridad por 30 min: las reacciones se detuvieron añadiendo 1 µl de Lisina 10 mM e incubando 10 min en hielo y oscuridad. Antes de la separación electroforética se combinaron las muestras marcadas, (Cy3 y Cy5) y el control interno (Cy2).

El IEF, se llevó a cabo en un IPGphor (GE) aplicando los siguientes incrementos de voltaje: de 300V/h por 3h, de 300 a 1000V por 6h, de 1000 a 8000V por 3h, 8000V/h por 3h o hasta que se alcanzó 43000 V totales. Seguidamente se procedió a la separación en una segunda dimensión SDS-PAGE, en geles del 12.5% acrilamida (1-mm de grosor, 26 x 21 cm), por 30 min a 2 watt/gel y 4 h a 20 watt/gel, a 20°C. Las imágenes Cy2-, Cy3- y Cy5- se obtuvieron en un scanner Typhoon 9400 (GE).

-Análisis de Imagen

La detección de manchas y su cuantificación, y comparación en cada gel se realizó utilizando Differential In-gel Analysis (DIA) and Biological Variation Analysis (BVA) módulos de DeCyder software versión 6.5 (GE). Mediante el uso de DIA, las manchas se detectaron automáticamente en las imágenes Cy2, Cy3, y Cy5, y se calcularon los volúmenes normalizados (abundancia de proteínas). Los mapas de manchas fueron exportados al BVA, para la comparación de las proteínas entre los geles. Los criterios de selección para detectar proteínas que cambian significativamente fueron: una variación de la proporción del punto \geq a 1,5 y un $p < 0,05$ en la prueba *t*. Además las diferencias indicadas por el software del DeCyder se confirmaron visualmente.

- Digestión de proteínas y Espectrometría de Masas

Las diferencias encontradas con el DeCyder se localizaron en un gel teñido con Sypro Ruby (Sigma) el cual también fue escaneado en el Typhoon. En esta imagen se seleccionó la lista de proteínas con sus coordenadas X e Y, la cual se exportó al programa *Spot Picker* (GE) mediante el cual se cortaron las manchas y se transfirieron a un placa de 96 pocillos. Posteriormente esta placa se dispuso en el Digestor Proteineer DP (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), para la digestión automática de todas las manchas cortadas (Schevchenko y col., 1996) y su posterior identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.

- Obtención de la Huella Peptídica mediante MALDI y Búsqueda en Bases de Datos

Se depositó manualmente una alícuota de 0,8 µl de la mezcla de péptidos eluidos y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 0,8 µl de solución matriz (ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico 3 g/L en acetonitrilo acuoso al 30%/15% isopropanol con ácido trifluoroacético al 0,1%) en un portamuestras 386-well OptiTOF (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) que se dejó secar de nuevo a temperatura ambiente.

Las muestras fueron analizadas de manera automática en un espectrómetro de masas 4800 MALDI-TOF/TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight*, Desorción e ionización mediante láser asistida por matriz con tiempo de vuelo) (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) en modo reflector positivo de iones (con un voltaje de aceleración de iones de 25 kV para la adquisición de los espectros de MS y de 1 kV para los de MSMS).

Cada espectro de huella peptídica fue calibrado internamente empleando determinadas señales provenientes de la autoproteólisis de la tripsina, también se suavizó y se corrigió la línea base. De esta forma la precisión en la medida de las masas se situó típicamente en ± 30 ppm.

Las masas correspondientes a péptidos trípticos registradas fueron enviadas automáticamente a través del programa Global Protein Server (GPS, Applied Biosystems) al programa Mascot (Matrix Science, Londres, Reino Unido) para efectuar la búsqueda en la base de datos pública NCBIInr. Respecto a la búsqueda en las bases de datos del NCBIInr, no se establecieron restricciones de taxonomía debidas a la especie de origen, se permitió la pérdida de un corte tríptico y la tolerancia se fijó en 100 ppm. En todos los casos que se validó la identificación de una proteína, la puntuación de probabilidad superó el

umbral establecido por el motor de búsqueda Mascot, siendo el p-valor en todo caso inferior al fijado como significativo.

3.18 Microscopía Óptica y Confocal

3.18.1 Estudios Estructurales

Con el propósito de analizar los cambios estructurales a nivel subcelular se utilizaron hojas y tallos de plantas de guisante control y tratadas con 2,4-D. Los tejidos se cortaron en segmentos de 2 mm² y se fijaron en una solución de gutaraldehído al 2,5% (v/v) preparado en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 6,8, durante 2,5 h a temperatura ambiente (Romero-Puertas y col., 2004b). Las muestras fueron post fijadas durante 30 min en 1% OsO₄ en tampón cacodilato 50 mM, pH 7,2, deshidratadas en series de etanol (30 – 100%; v/v) y embebidas en resina Spurr. Finalmente se obtuvieron secciones semifinas que fueron contrastadas con citrato de plomo y acetato de uranilo para ser observadas en un microscopio óptico.

3.18.2 Detección de Óxido Nítrico (NO), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y Superóxido (O₂⁻), por Microscopía Confocal

Cortes transversales de aproximadamente 25 mm², procedentes de hojas de guisante y *Arabidopsis*, y tallos de guisante, control y tratados con 2,4-D, fueron incubados a temperatura ambiente y total oscuridad, durante 1 h con fluorocromos específicos; paralelamente se llevó a cabo una reacción control incubando los cortes con una solución de secuestradores de ROS y NO (Sandalo y col., 2008).

Para la localización de O₂⁻ se utilizó el fluorocromo dihidroetidio (DHE), el cual atraviesa pasivamente las membranas celulares y reacciona con el O₂⁻ generado en las células, y da lugar a oxietidio (Oxy-E), un compuesto fluorescente que se caracteriza por su estabilidad debido a la oxidación irreversible que sufre el DHE generando el radical etidio (E·). La especificidad de este fluorocromo por el radical superóxido se ha comprobado por la inhibición que ejercen las SODs, y que no se observa con la adición de la catalasa. Además, se ha demostrado que no se forma oxietidio en presencia de H₂O₂ ni peroxinitrito (Fink y col., 2004). Los cortes de tejido se incubaron con DHE 10 μM preparado en Tris-HCL 10 mM pH 7,4, durante 1h a 37 °C (Sandalo y col., 2008).

Con el objeto de comprobar la eficacia del fluorocromo y como control negativo, algunos cortes se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, con el secuestrador de O₂⁻ tetrametilpiperidina (TMP) 1 mM. Posteriormente se incubaron en la solución de DHE y TMP 1 mM, según se ha indicado anteriormente. Para eliminar el exceso de fluorocromo los cortes se lavaron varias veces en el tampón anteriormente descrito.

Para detectar peróxido de hidrógeno, se utilizó la carboxidiclorofluoresceína diacetato (DCF-DA), (Brul y col., 1997). Este compuesto no fluorescente 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 y sin ASC 1 mM durante 1 h a temperatura ambiente, y posteriormente se incubaron en una solución con DCF-DA 25 μ M preparada en tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), durante 30 min a 37 °C y en oscuridad. Finalmente las muestras se lavaron durante 30 min con el mismo tampón.

En cuanto a la detección del NO, se siguió el método descrito por Kojima y col. (1998a; 1998b), en que se describe la conveniencia del uso de diaminofluoresceínas como marcadores de óxido nítrico. Así, el 4,5-diacetato de diaminofluoresceína (DAF-2 DA) es permeable, no reacciona con ROS y al reaccionar con el NO intracelular produce su forma tetrazólica (DAF-2T), altamente fluorescente, con un límite de detección para el NO de 5 nM (Kojima y col., 1998a). De igual forma que para la determinación de $O_2^{\cdot -}$, se incubaron los cortes en una solución 10 μ M del fluorocromo y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente y en total oscuridad.

Como control negativo se utilizó el 2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidacolina-1-oxil-3-óxido (PTIO) 300 μ M, secuestrador de NO.

Una vez finalizada la incubación con los fluorocromos y lavados los cortes, se continuó con la inclusión de estos en acrilamida para poder realizar cortes del tejido. Para ello, se incubaron los cortes durante 4 h en una solución de acrilamida/bisacrilamida al 15% (p/v), preparada en PBS (fosfato-K10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM) y TEMED 1 % (v/v). Los cortes en la solución de acrilamida se dispusieron en posición vertical en moldes de 0,7 mm³ (Sorvall), donde se llevó a cabo la polimerización de la acrilamida con persulfato amónico ($S_2O_8(NH_4)_2$) al 2% (p/v), para la obtención de bloques (Sandalo y col., 2008). A partir de estos bloques se cortaron secciones de aproximadamente 100 μ m de grosor, con un vibratomo Leica VT 1000 ST. Los cortes fueron montados en portaobjetos con una solución de glicerol al 50 % en PBS y se observaron en un microscopio confocal, Leica TSC SL, con las longitudes de excitación y emisión correspondientes para cada fluorocromo (Tabla 3.5).

| Fluorocromo | λ Excitación | λ Emisión |
|-------------|----------------------|-------------------|
| DHE | 488 | 520 |
| DAF-2 DA | 495 | 520 |
| DCF-DA | 485 | 530 |

Tabla 3.5: Longitudes de onda de excitación y emisión de los fluorocromos utilizados.

3.19 Visualización del Citoesqueleto

El efecto del 2,4-D sobre el citoesqueleto se observó mediante microscopia láser confocal, utilizando plantas transformadas de *Arabidopsis thaliana*, que expresan fimbrina unida a una proteína GFP. Para ello, secciones de hoja de 3 mm² se dispusieron en un portaobjetos y se visualizó la fluorescencia verde de la fimbrina-GFP (excitación 488nm y emisión 508nm) en las células epidérmicas. Con el fin de obtener una imagen tridimensional, se obtuvieron fotos en diferentes planos X,Y y Z. De esta forma, se analizó el efecto del 2,4-D, EDTA, AVG, alopurinol, cantaridina y piruvato, sobre el citoesqueleto de actina (Tabla 3.6). Las plantas fueron pulverizadas con 2,4-D 22,6 mM, según se indicó en el apartado 3.1.3.1.

| Tratamiento | Concentración |
|-------------|---------------|
| 2,4-D | 22.6 mM |
| EDTA | 10 mM |
| AVG | 100 μ M |
| Alopurinol | 10 mM |
| Cantaridina | 10 mM |
| Piruvato | 5 mM |

Tabla 3.6: Concentraciones de 2,4-D, e inhibidores/secuestradores, usadas en plantas de los estudios realizados con plantas de *Arabidopsis* fimbrina-GFP.

Las plantas se pulverizaron con los inhibidores 3 h antes de la pulverización con el 2,4-D y se mantuvieron en cámara botánica, según se ha descrito en el apartado 3.2, durante 72 h, durante este periodo se repitió la dosis de los inhibidores cada 12 h, con el fin de prolongar el periodo de acción de estos compuestos durante el tratamiento.

Finalizado el tratamiento, se analizó el entramado de fibras del citoesqueleto bajo un microscopio confocal Leica TCS SL. La GFP fue visualizada a 488 nm longitud de onda de excitación y 510 nm de emisión. Para estimar la fluorescencia de los tratamientos, se utilizaron los parámetros establecidos para el control sin tratamiento, y estos mismos parámetros se utilizaron para capturar las secciones en Z a intervalos de 1 μ m.

3.20 Análisis del Movimiento de Peroxisomas

Con el objetivo de analizar las modificaciones en el movimiento de peroxisomas bajo el tratamiento con 2,4-D, se utilizaron mutantes de *Arabidopsis* que contenían una proteína de fusión GFP-SKL (obtenidas en nuestro laboratorio) y A-5 cedidas por el Prof. Chips Hawes (Universidad de Oxford Brookes, Oxford Reino Unido). Se pulverizaron con 2,4-D 22,6 mM plantas de un mes de edad, y pasadas 72 h se obtuvieron las imágenes de movimiento mediante la visualización de secciones de hoja en un microscopio confocal Leica TCS SL. Todas las imágenes fueron tomadas en los planos X, Y, Z y en el tiempo, de esta forma se siguió el desplazamiento de estos orgánulos en el espacio-tiempo. Una vez obtenidas las imágenes, éstas se analizaron con el software de análisis de imágenes Volocity (Improvision, Image Processing and Vision Company; <http://www.improvision.com/products/volocity/>). Se calculó el valor medio de la velocidad (micrómetros por segundo) de al menos 10 fragmentos de película en cada caso.

Adicionalmente, se analizó el efecto del EDTA 10 mM sobre el movimiento de peroxisomas de plantas control y tratadas con 2,4-D 22,6 mM. La aplicación de dicho tratamiento se realizó como se indica en el apartado anterior.

RESULTADOS

4.1 Efecto del 2,4-D sobre el Fenotipo de Plantas de Guisante y *Arabidopsis*

Atendiendo a estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio, en los que se evaluó el efecto de la concentración y diferentes tiempos de tratamiento (McCarthy, 2004; Romero-Puertas y col., 2004a), en el presente estudio se analizó el efecto de la aplicación vía foliar de 2,4-D 22,6 mM durante un periodo de 72 h, en plantas de guisante de 21-28 días de edad. Pocas horas a partir de la aplicación del herbicida 2,4-D algunos síntomas morfológicos como la curvatura de tallos y epinastia de las hojas de los brotes más jóvenes se hicieron evidentes. Después de 72 horas de la aplicación vía foliar del herbicida, las plantas presentaron una reducción del crecimiento con respecto al de las plantas control, además de la aparición de síntomas avanzados de epinastia en las hojas apicales, mientras que las hojas basales no mostraban epinastia pero sí una aceleración de la senescencia (Fig. 4.1 A). Estos síntomas se manifiestan ya en las primeras 24 h de tratamiento y pertenecen a la segunda fase de eventos descrita por Grossmann 2003, provocados por estos herbicidas sobre dicotiledóneas sensibles.

La zona apical de la planta se caracteriza por ser la zona de crecimiento y elongación, y en esta zona las plantas tratadas presentaron curvatura y engrosamiento de tallos, además de epinastia de hojas (Fig. 4.1 B). El tejido de esta zona se mostró quebradizo y sensible a rotura, mientras que en la zona basal se evidenció una avanzada senescencia foliar, pardeamiento irregular de hojas, pérdida de turgencia y algunas zonas necróticas (Fig. 4.1 C).

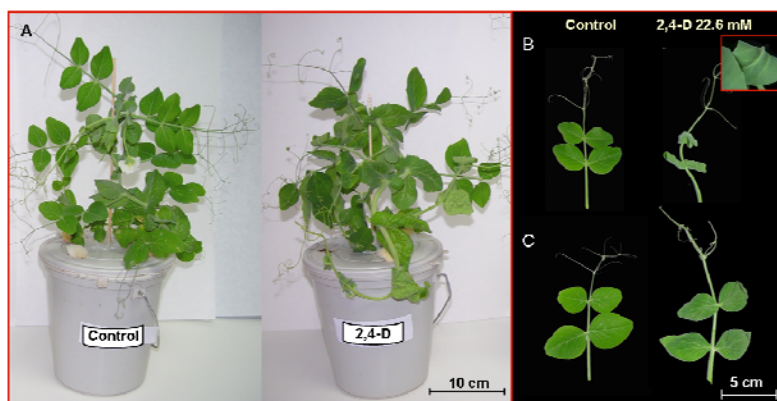


Figura 4.1: Efecto del 2,4-D sobre el fenotipo de la parte aérea de plantas de guisante. Las plantas (21-28 días) fueron tratadas durante 72 h con 2,4-D 22,6 mM aplicado por vía foliar. (A): efecto sobre la planta completa; (B): hojas apicales y (C): hojas basales.

Resultados

Los cambios provocados por el 2,4-D sobre la estructura de las hojas estaban directamente relacionados con la epinastia. El tratamiento afectó directamente al parénquima en empalizada, en el cual se observó desorganización, aumento del tamaño de las células del mesófilo, plegamiento de la pared celular, entre otros, y a los haces vasculares que mostraron proliferación y condensación del citosol de las células del parénquima asociado a estos. Adicionalmente, los haces vasculares secundarios experimentaron un desarrollo considerable (Fig. 4.2).

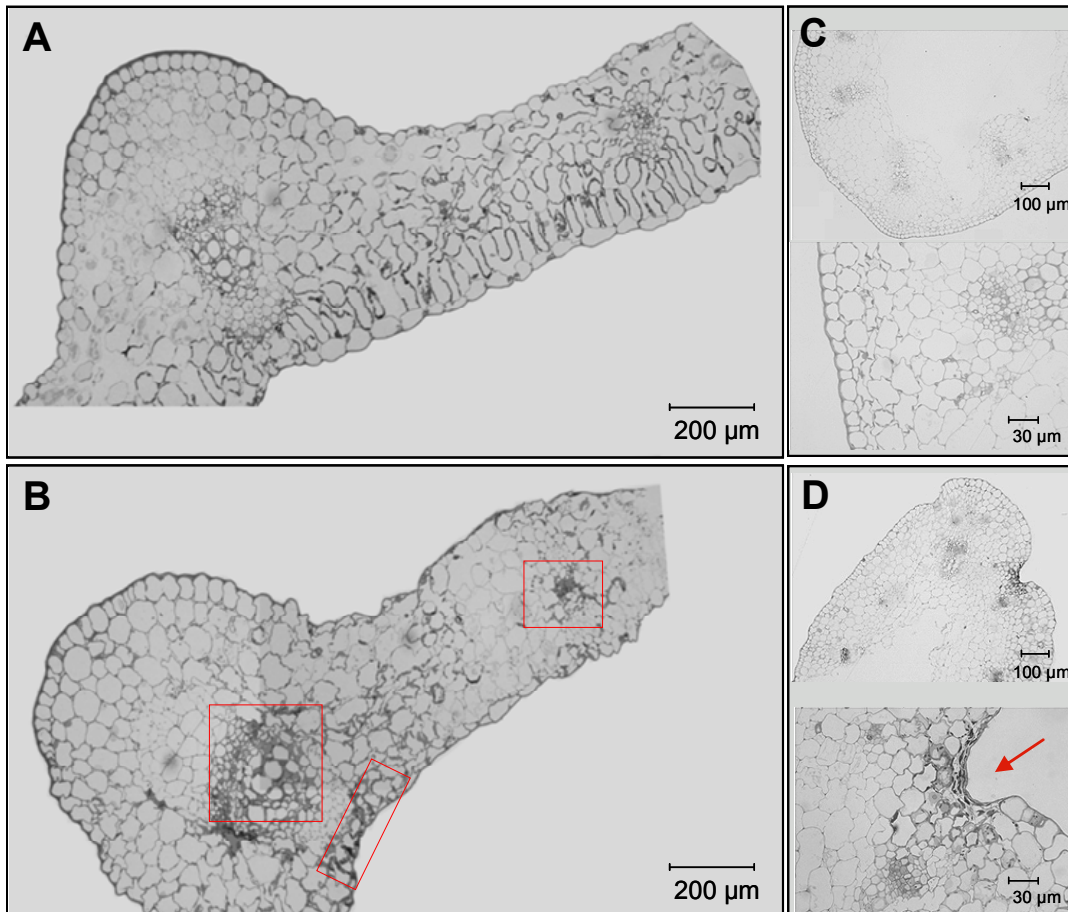


Figura 4.2: Efecto del 2,4-D (22,6 mM) sobre la estructura de hojas y tallos apicales de plantas de guisante. (A): hojas control, (B): hojas tratadas con 2,4-D, (C): tallos de plantas control y (D): tallos de plantas tratadas con 2,4-D. En los recuadros se resalta las zonas de condensación y deformación celular, y el desarrollo de haces vasculares secundarios, las flechas señalan las zonas de deformación de tallos de plantas tratadas con 2,4-D.

Como complementación de los estudios realizados en guisante también se utilizaron plantas de *Arabidopsis*, ya que ésta presenta ciertas ventajas como son un ciclo

de vida más corto y la disponibilidad de mutantes que nos han permitido profundizar en la regulación de la respuesta de la planta frente al herbicida 2,4-D.

Las plantas de *Arabidopsis* se trataron como las de guisante, utilizando una concentración de 2,4-D de 22,6 mM, aplicado mediante pulverización y el tiempo del tratamiento también fue de 72 h. El 2,4-D producía un efecto similar al descrito en guisante, con desarrollo de epinastia y pérdida de turgencia (Fig. 4.3).



Figura 4.3: Efecto de la aplicación de 2,4-D 22,6 mM, en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Los efectos fueron registrados 72 h después de la pulverización.

4.2 Efecto del 2,4-D Sobre el Metabolismo de ROS en Plantas de Guisante

4.2.1 Análisis de Enzimas Generadoras de ROS

Dado que uno de los mecanismos de toxicidad que se ha propuesto para el herbicida 2,4-D, consiste en la inducción de un estrés oxidativo (Romero-Puertas y col., 2004a), en este estudio se abordó tanto el análisis de enzimas clave en la producción de ROS, como los antioxidantes implicados en su eliminación.

Las determinaciones se realizaron en extractos crudos de hojas de guisante apicales y basales, provenientes de plantas control y tratadas con 2,4-D 22,6 mM.

El análisis de la actividad xantina oxidoreductasa mostró un patrón opuesto en las dos zonas analizadas de la planta, observándose un aumento significativo de la actividad xantina oxidasa en las hojas apicales, mientras que en las hojas basales se observó un descenso de la misma (Fig. 4.4 A). Con respecto a la actividad xantina deshidrogenasa, que no está implicada en la producción de ROS, se observó un leve descenso en las hojas apicales y por el contrario en las hojas basales se observó un ligero incremento (Fig. 4.4 B).

Resultados

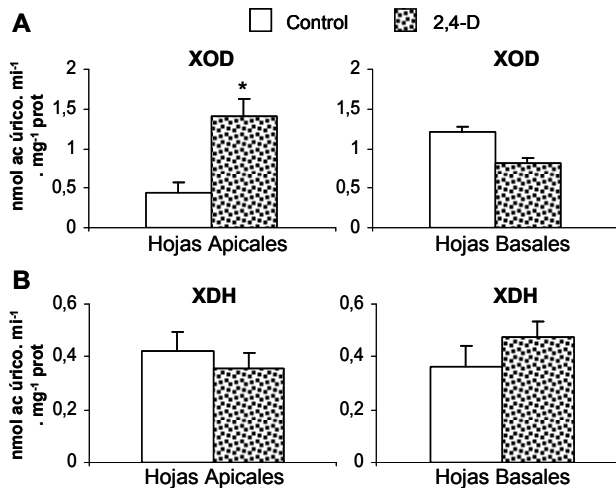


Figura 4.4: Efecto del 2,4-D sobre la actividad xantina oxidoreductasa de plantas de guisante. Las plantas de 21-28 días de edad se trataron con 2,4-D 22,6 mM por vía foliar durante 72 h. (A): actividad xantina oxidasa (XOD), en hojas apicales y basales; (B): actividad xantina deshidrogenasa (XDH), en hojas apicales y basales. Cada valor representa la media de tres determinaciones diferentes \pm SEM. Las diferencias eran significativas con $p < 0,05$ (*) de acuerdo con el test *t* de Student.

Otras fuentes de ROS analizadas son, la acil-CoA oxidasa de la β -oxidación de ácidos grasos y la enzima glicolato oxidasa de la fotorrespiración. La actividad acil-CoA oxidasa mostró un aumento significativo tras el tratamiento con 2,4-D en las dos zonas de la planta analizadas, siendo este aumento del doble en hojas apicales y tres veces mayor en hojas basales con respecto al control (Fig 4.5).

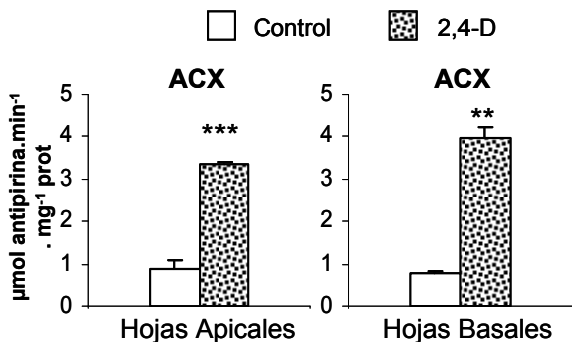


Figura 4.5: Efecto del 2,4-D sobre la actividad Acil-CoA oxidasa (ACX) en plantas de guisante. La actividad se determinó en extractos crudos de hojas de guisante de las zonas apical y basal de plantas control y tratadas con 2,4-D. Cada valor representa la media de tres diferentes determinaciones \pm SEM. Las diferencias eran significativas con $p < 0,01$ (**) y $p < 0,005$ (***) de acuerdo con el test *t* de Student.

Estos resultados señalan a la enzima ACX como una importante fuente de H_2O_2 en la respuesta de la planta al tratamiento con el herbicida 2,4-D. Por lo cual se decidió evaluar el efecto del herbicida sobre el fenotipo de plantas mutantes de *Arabidopsis acx1*.

El gen *ACX1*, codifica una de las isoformas de la Acil-CoA oxidasa enzima clave de la β -oxidación, que lleva a cabo la conversión del acil-CoA en 2-*trans*-enoil-CoA. El enzima requiere como cofactor FAD y como aceptor de electrones usa el oxígeno molecular que se reduce a H_2O_2 . Así, se caracterizó el efecto producido por el 2,4-D sobre el fenotipo de plantas de *Arabidopsis* wt y *acx1*, tratadas con el herbicida a una concentración de 22,6

mM durante 72 h. En la figura 4.6 A-B, se observa como los síntomas de epinastia foliar en el mutante son menos drásticos que en el wt, por lo cual resulta evidente la importancia del H_2O_2 en el desarrollo de la epinastia. En la figura 4.6 C, se observa con más detalle el efecto sobre la epinastia de las hojas.

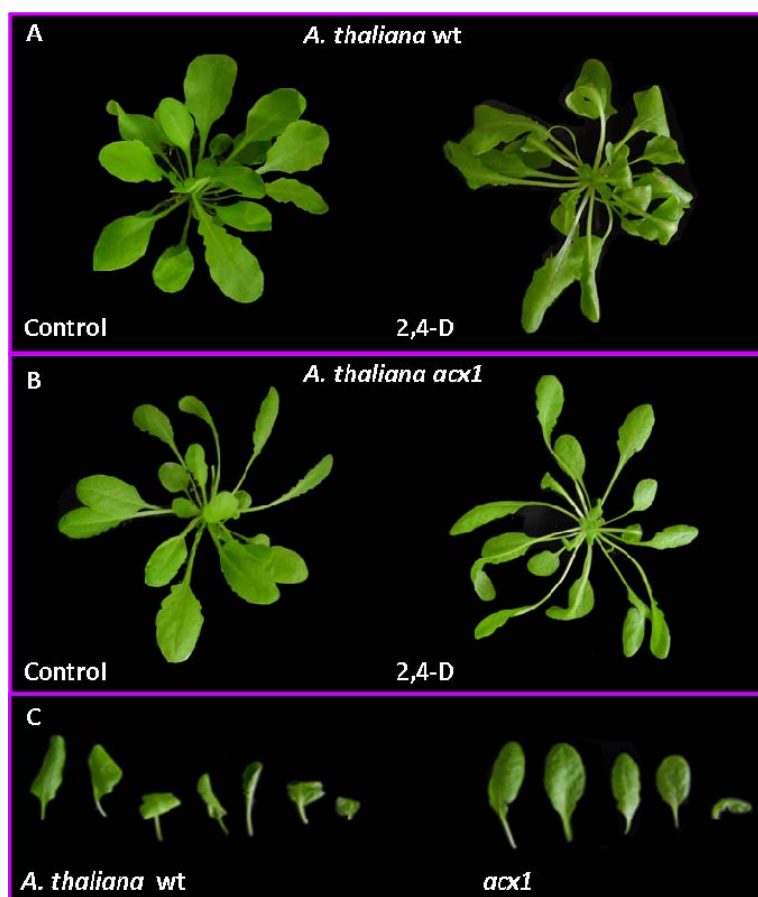


Figura 4.6: Efecto de la aplicación de 2,4-D 22,6 mM sobre plantas de *A.thaliana* wt y mutante *acx1* de 27 días de edad. (A): efecto sobre *A.thaliana*. wt 72 h después de la aplicación de 2,4-D por pulverización. (B): efecto sobre el mutante *acx1*. (C): Detalle de las hojas roseta de plantas wt y *acx1* pulverizadas con 2,4-D.

Con respecto a la actividad GOX, el 2,4-D provocaba una reducción significativa, tanto en las hojas apicales como basales (Fig. 4.7), lo que sugiere que en las condiciones estudiadas la fotorrespiración puede estar reducida, y por tanto la GOX no parece ser relevante como fuente de ROS, en estas condiciones.

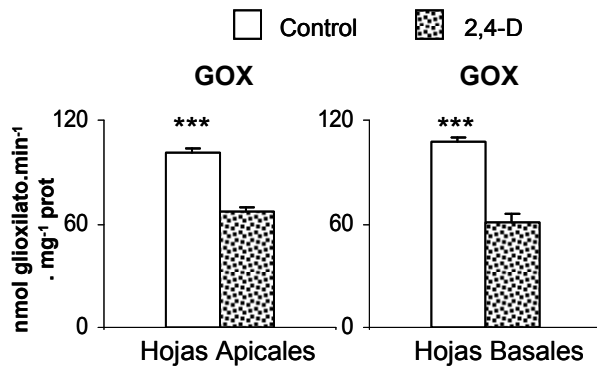


Figura 4.7: Efecto de la aplicación de 2,4-D (22,6 mM) sobre la actividad glicolato oxidasa (GOX), de plantas de guisante. Los ensayos se realizaron en extractos crudos de hojas apicales y basales de plantas de guisante control y tratadas con 2,4-D. Cada valor representa la media de tres determinaciones diferentes \pm SEM. Las diferencias eran significativas con $p < 0,005$ (***) de acuerdo con el test *t* de Student.

La enzima lipoxigenasa cataliza la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados y puede ser una fuente de peróxidos lipídicos en determinadas situaciones de estrés. El tratamiento con 2,4-D producía un aumento de la actividad en ambas zonas de la planta, siendo más evidente en la zona apical (Fig. 4.8). La alta actividad lipoxigenasa está asociada con tejidos y órganos en rápido crecimiento, y se ha descrito que puede ser necesaria para la estabilidad de la membrana (Fauconnier y col., 2001). No obstante, la LOX también está involucrada en procesos de senescencia y en la producción de jásmonico (Casey, 1999).

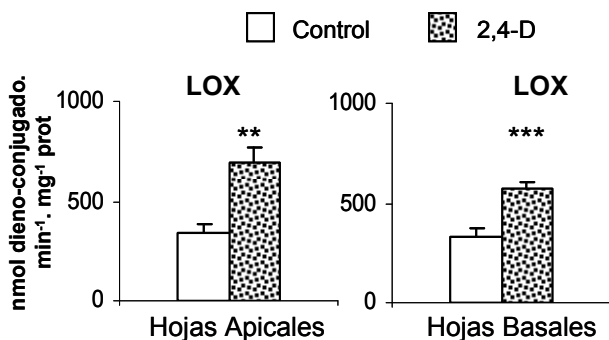


Figura 4.8: Efecto del 2,4-D (22,6 mM) sobre la actividad lipoxigenasa (LOX), de plantas de guisante. La determinación se llevó a cabo en extractos crudos obtenidos a partir de hojas apicales y basales de plantas de guisante control y tratadas con 2,4-D. Cada valor representa la media de cuatro diferentes determinaciones \pm SEM. Las diferencias eran significativas con $p < 0,01$ (**) y $p < 0,005$ (***) de acuerdo con el test *t* de Student.

4.2.2 Efecto del 2,4-D Sobre Sistemas Antioxidantes

En condiciones en las que se encuentra incrementada la producción de ROS, puede tener lugar una inducción de los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos con objeto de eliminar el exceso de ROS y de esta forma prevenir daños oxidativos a macromoléculas. No obstante, cuando la producción de ROS supera la capacidad antioxidante, se detectan daños oxidativos. En este trabajo se ha analizado la

actividad y expresión de algunos de los antioxidante enzimáticos más importantes en respuesta al herbicida 2,4-D, tanto en hojas basales como apicales. Para completar este estudio también se ha examinado su efecto sobre antioxidantes no enzimáticos, ASC y GSH.

4.2.2.1 Antioxidantes Enzimáticos

La actividad total superóxido dismutasa se estudió en extractos crudos de hojas de guisante procedentes de las zonas apical y basal de plantas control y tratadas con el herbicida durante 72 h. La actividad SOD aumentaba ligeramente en hojas apicales, sin embargo en las hojas basales no se observó ningún cambio debido al tratamiento con el herbicida (Fig. 4.9 A y B). El análisis de las diferentes isoformas mediante EGPA, permitió observar que el incremento de la actividad SOD total en hojas apicales se debía fundamentalmente a la Mn-SOD, mientras que en las basales la única isoforma que se incrementaba por el tratamiento con 2,4-D era la CuZn-SOD I de localización citosólica, mientras que el resto de isoformas se reducía.

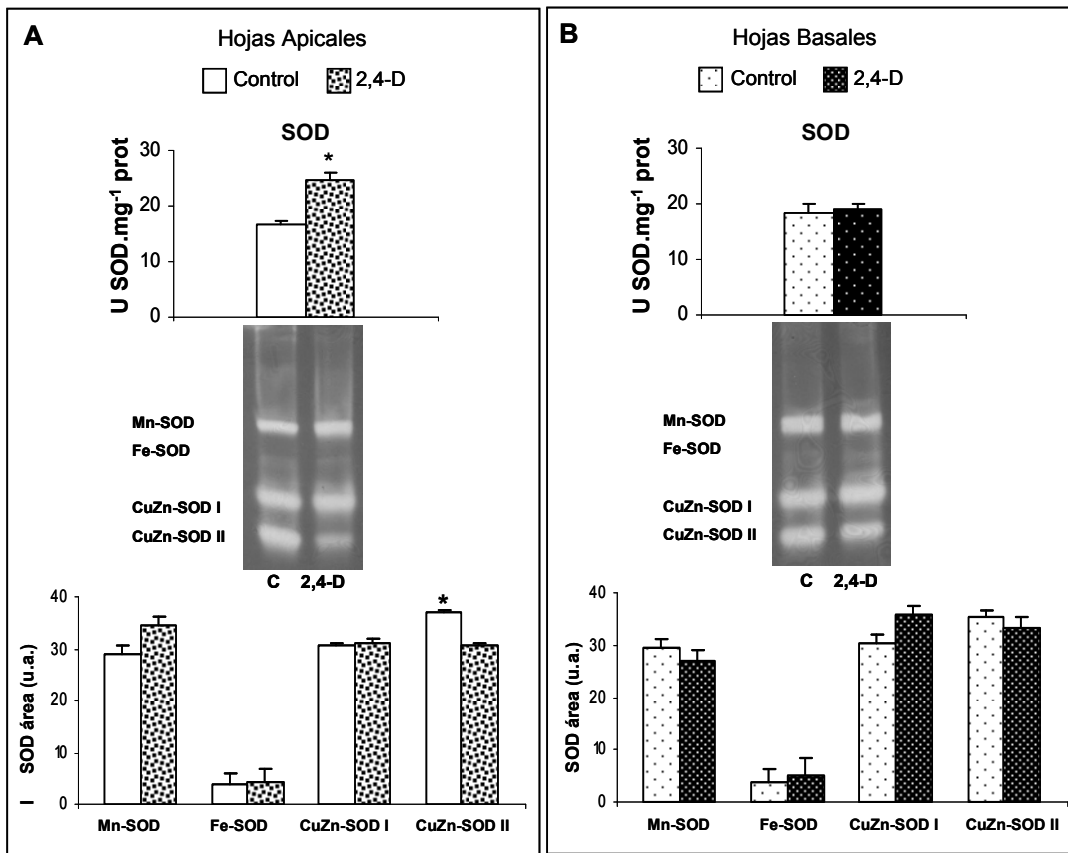


Figura 4.9: Efecto del 2,4-D sobre la actividad superóxido dismutasa (SOD). La determinación de la actividad SOD se realizó en extractos crudos de hojas de guisante apicales y basales, tratadas con 2,4-D 22,6 mM. (A): actividad SOD total y actividad isoenzimática de las hojas apicales; (B): actividad SOD total y actividad isoenzimática de las hojas basales. En cada recuadro se muestra un gel representativo de la actividad isoenzimática y el área expresada en unidades arbitrarias (u.a.) correspondiente a cada isoforma de SOD. Las proteínas (40µg) se separaron mediante electroforesis nativa en geles de poliacrilamida (10%, p/v) y las isoenzimas se visualizaron mediante tinción fotoquímica con NBT. Los datos expresan la media ± SEM de 5 repeticiones. Las diferencias eran significativas con $p < 0,05$ (*) de acuerdo con el test *t* de Student.

El análisis de la actividad catalasa demostró que el herbicida 2,4-D no producía cambios apreciables de esta actividad en ninguna de las zonas estudiadas (Fig. 4.10).

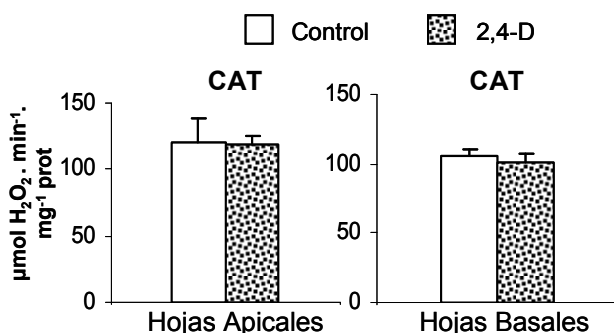


Figura 4.10: Efecto del 2,4-D sobre la actividad catalasa (CAT) de extractos crudos de hojas apicales y basales de plantas de guisante control y tratadas con 2,4-D. Cada valor representa la media de cinco determinaciones diferentes \pm SEM.

La enzima glutation-S- transferasa (GST) se induce en respuesta a compuestos xenobióticos y su principal función es llevar a cabo la conjugación de estos compuestos con grupos SH para prevenir su toxicidad (Reade y col., 2004). No obstante la GST también puede utilizar el H₂O₂ como sustrato, llegando a tener un papel importante en la protección frente a las especies de oxígeno reactivo y los hidroperóxidos orgánicos (Cummins y col., 1999). El tratamiento con el herbicida producía un aumento significativo de la actividad en las hojas apicales, mientras que en las hojas basales no se percibió ninguna modificación significativa (Fig 4.11).

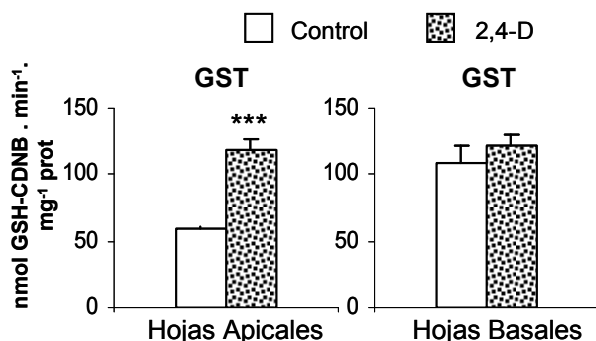


Figura 4.11: Efecto del 2,4-D sobre la actividad glutation-S-transferasa (GST). La actividad se analizó en extractos crudos de hojas apicales y basales de plantas de guisante control y tratadas con 2,4-D. Cada valor representa la media de cuatro determinaciones diferentes \pm SEM, las diferencias eran significativas con $p < 0,005$ (***) de acuerdo con el test *t* de Student.

La actividad de la enzima ascorbato peroxidasa, presentó un aumento significativo en las hojas de la zona basal de plantas tratadas con 2,4-D, sin embargo en la zona apical no se observaron cambios con respecto al control (Fig. 4.12).

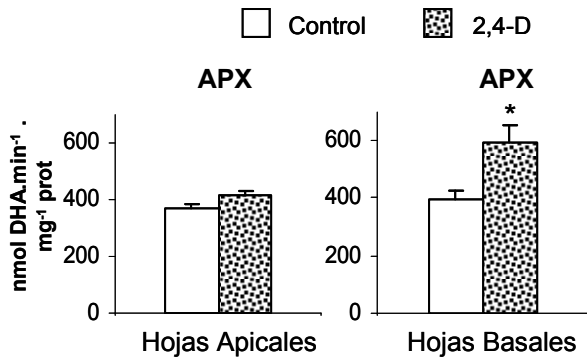


Figura 4.12: Efecto del 2,4-D sobre la actividad ascorbato peroxidasa (APX). Las determinaciones se realizaron en extractos crudos de hojas apicales y basales de plantas de guisante control y tratadas con 2,4-D. Cada valor representa la media de cuatro determinaciones diferentes \pm SEM, las diferencias eran significativas con $p < 0,05$ (*) de acuerdo con el test *t* de Student.

La actividad glutatión reductasa, responsable de la reducción cíclica del GSSG, era levemente estimulada en las dos zonas analizadas de la planta por el tratamiento con 2,4-D, sin embargo este aumento no fue significativo (Fig. 4.13).

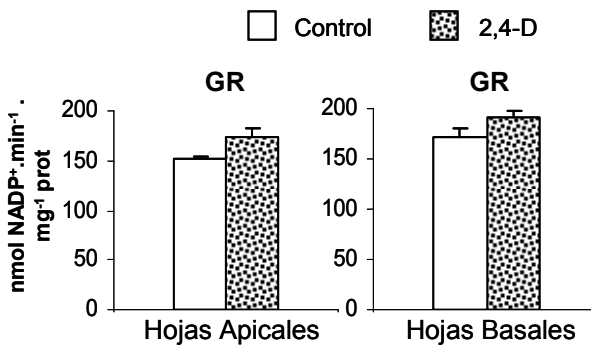


Figura 4.13: Efecto del 2,4-D sobre la actividad glutatión reductasa (GR) de extractos crudos de hojas apicales y basales de plantas de guisante control y tratadas con 2,4-D. Cada valor representa la media de tres determinaciones diferentes \pm SEM.

La medida de la actividad peroxidasa total se analizó mediante la determinación de la actividad guayacol peroxidasa. Esta actividad en contraste con la APX, aumentó como consecuencia del tratamiento con el herbicida en las dos zonas analizadas de la planta, siendo este aumento significativo en hojas apicales (Fig. 4.14).

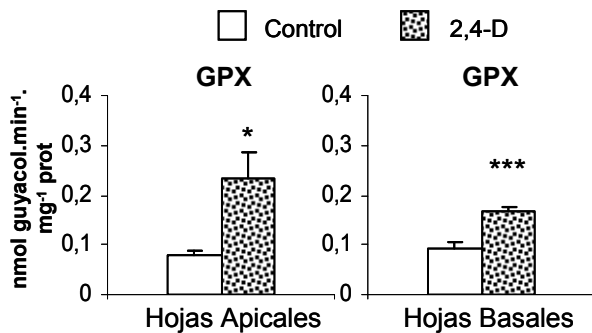


Figura 4.14: Efecto del 2,4-D sobre la actividad guayacol peroxidasa (GPX) de extractos crudos de hojas apicales y basales de plantas de guisante control y tratadas con 2,4-D. Cada valor representa la media de cuatro determinaciones diferentes \pm SEM, las diferencias eran significativas con $p < 0,05$ (*) y $p < 0,005$ (***) de acuerdo con el test *t* de Student.

4.2.2.2 Expresión de Enzimas Antioxidantes

El nivel de expresión de enzimas antioxidantes fue analizado mediante RT-PCR semicuantitativa. De los enzimas analizados, tan sólo la GST mostró un aumento significativo del nivel de transcritos por efecto del tratamiento con 2,4-D (Fig. 4.15), lo que coincide con el aumento en la actividad observado anteriormente. Mientras que el resto de los genes estudiados no mostraban modificaciones significativas, salvo la GR I cloroplastídica que aumentaba en hojas basales y la GR II citosólica que aumentaba en la misma proporción que la anterior en la zona apical de la planta. Estos resultados coinciden con los datos de actividad GR mencionados anteriormente y demuestran que los niveles de antioxidantes están básicamente regulados a nivel transcripcional.

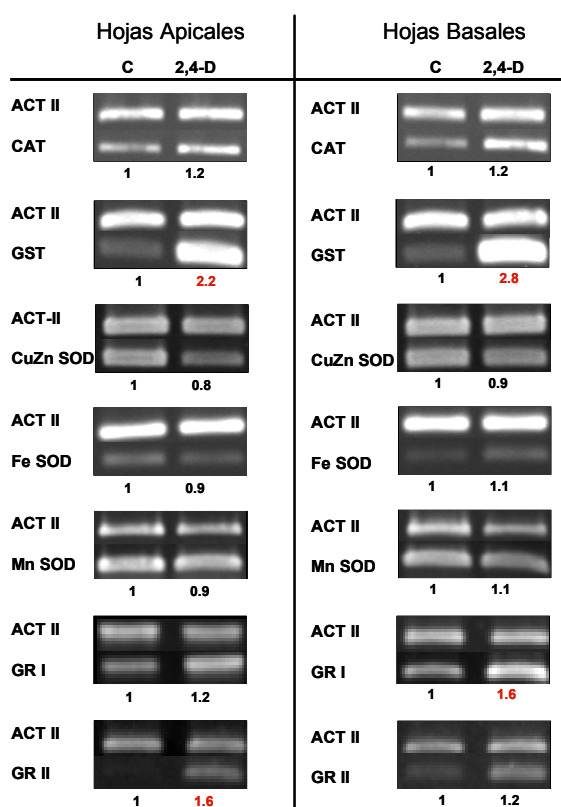


Figura 4.15: Efecto del tratamiento con 2,4-D 22,6 mM, sobre la expresión de enzimas antioxidantes. Catalasa (CAT), glutation-S-transferasa (GST), superoxido dismutasa (CuZn, Mn y Fe-SOD) y glutation reductasa cloroplastidica y citosólica (GR I y GR II, respectivamente). El análisis se realizó mediante RT-PCR semicuantitativa, según se ha descrito en material y métodos. 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 usada como control interno después de su normalización, y expresan el número de veces respecto al control sin tratamiento, al que se asigna el valor 1.

Resultados

4.2.2.3 Antioxidantes no Enzimáticos

Otro importante mecanismo de defensa frente al estrés oxidativo, lo constituyen los antioxidantes no enzimáticos, entre ellos el GSH y el ASC, los cuales ceden sus electrones a los radicales libres neutralizándolos y evitando así las posibles reacciones en cadena de formación de otros radicales, además de actuar como sustrato de algunos sistemas antioxidantes.

El análisis del glutatión (oxidado y reducido), mostró una clara tendencia a incrementar por efecto del tratamiento con 2,4-D. Este aumento era significativo para el glutatión total y el reducido (GSH) en las dos zonas analizadas, apical y basal (Fig. 4.16). Comparativamente, la forma predominante de glutatión tanto en hojas basales como apicales, era el glutatión reducido (GSH), si bien la proporción GSH/GSSG era muy superior en las hojas basales tratadas con el herbicida 2,4-D, respecto a su control.

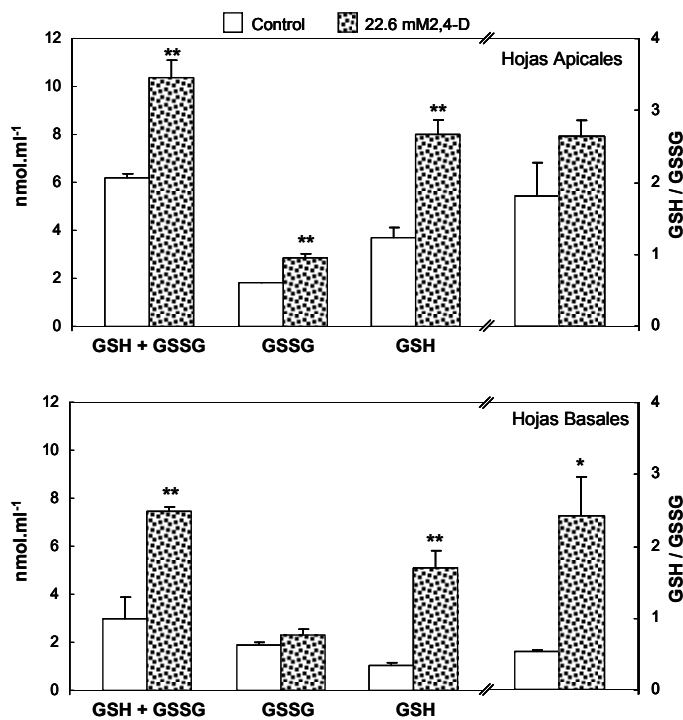


Figura 4.16: Efecto del 2,4-D sobre el contenido de glutatión total (GSH+GSSG), glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y su relación (GSH/GSSG). El contenido de glutatión fue determinado espectrofotométricamente en extractos ácidos de hojas de la zona apical y basal de plantas de guisante control y tratadas con 2,4-D. Las diferencias eran significativas con $p < 0.05$ (*) y $p < 0,01$ (**) según el test *t* de Student.

En cuanto al ascorbato, el tratamiento con 2,4-D producía una reducción significativa del contenido total del mismo en las hojas apicales, mientras que en las basales se detectó un incremento significativo en el ascorbato total con respecto a su control (Fig. 4.17). La relación ASC/DHA era superior en las hojas de plantas tratadas,

siendo las diferencias más acusadas en las hojas basales. Estos resultados indican un incremento de la forma reducida de asorbato por efecto del tratamiento.

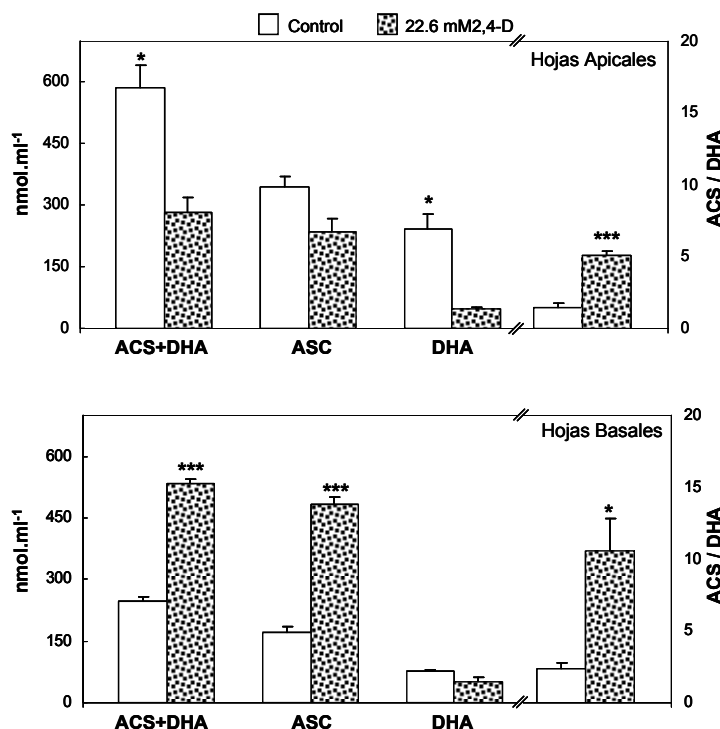


Figura 4.17: Efecto del 2,4-D sobre el contenido de asorbato total (ASC+DHA), asorbato reducido (ASC), asorbato oxidado (DHA) y relación la ACS/DHA en plantas de guisante. El contenido de asorbato fue determinado espectrofotométricamente en extractos ácidos de hojas de la zona apical y basal de plantas de guisante control y tratadas con 2,4-D. las diferencias eran significativas con $p < 0.05$ (*) y $p < 0,005$ (***) según el test *t* de student.

Estos resultados sugieren que el ASC puede ser un factor limitante en la defensa antioxidante en respuesta al 2,4-D, reduciendo la eficiencia del ciclo ASC/GSH.

4.2.3 Efecto del 2,4-D sobre la Producción de ROS

Los resultados obtenidos respecto al efecto del 2,4-D sobre actividades enzimáticas generadoras de ROS, sugieren que el herbicida puede inducir la acumulación de ROS, y más concretamente de H₂O₂. La zona apical de la planta parece experimentar con más intensidad el desequilibrio que causa el herbicida, debido al aumento de las actividades XOD, ACX y LOX, y la ausencia de cambios en las actividades antioxidantes. Es por ello que se abordó el estudio de la producción de ROS dependiente del tratamiento con 2,4-D en hojas de plantas de guisante. Así, se ha analizado el contenido total de H₂O₂ en extractos mediante fluorimetría, y se ha visualizado el contenido de H₂O₂ mediante histoquímica y técnicas de microscopía láser confocal que permiten examinar *in vivo* la producción de ROS.

Resultados

4.2.3.1 Producción de H_2O_2

4.2.3.1.1 Contenido Total de H_2O_2

El análisis del contenido total de H_2O_2 se determinó mediante fluorimetría, en extractos ácidos de hojas de guisante. Tras el tratamiento con 2,4-D durante 72 h el H_2O_2 se elevó en las dos zonas analizadas de la planta, siendo de hasta 13 veces superior en las hojas apicales y el doble en las hojas basales (Fig. 4. 18). Estos resultados resaltan la importancia de esta especie de oxígeno reactivo en el mecanismo de acción del fenoxiherbicida 2,4-D.

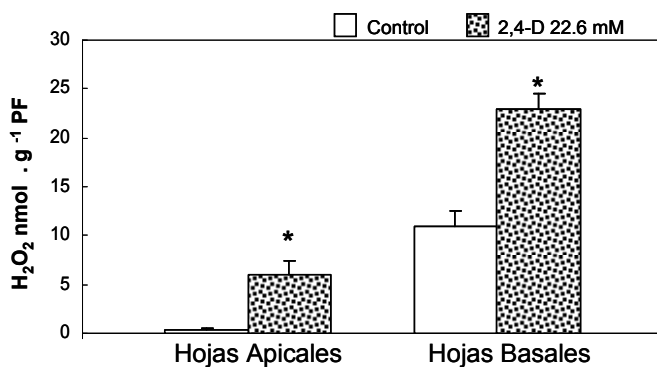


Figura 4.18: Efecto del 2,4-D sobre la producción de H_2O_2 en hojas apicales y basales de plantas control y tratadas con 2,4-D. La medida se realizó en extractos ácidos mediante fluorimetría utilizando el ácido homovanilínico. Los valores representan la media \pm SEM de cinco determinaciones diferentes. Las diferencias eran significativas con $p < 0.05$ (*) según el test t de Student.

El contenido de peróxido de hidrógeno también se midió en extractos ácidos de hojas de *Arabidopsis*. Observándose una tendencia similar a la detectada en guisante, siendo en este caso el aumento de tres veces en las plantas sometidas al tratamiento con 2,4-D con respecto al control (Fig. 4.19).

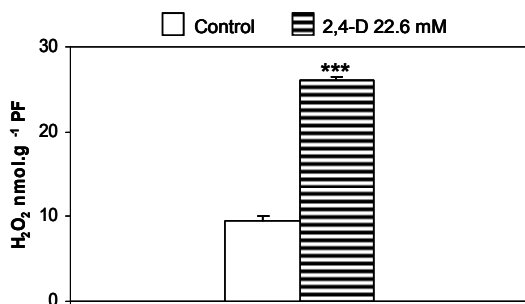


Figura 4.19: Producción de H_2O_2 en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Las plantas de 1 mes de edad se pulverizaron con 2,4-D 22,6 mM, durante 72 h. Los valores representan la media \pm SEM de seis determinaciones diferentes. Las diferencias eran significativas con $p < 0,005$ (***), según el test t de Student.

Dado que la acil-CoA oxidasa se induce por el tratamiento con 2,4-D, para determinar el papel de esta enzima en la producción de H_2O_2 dependiente de 2,4-D, se utilizó el mutante de *Arabidopsis acx1*, deficiente en la actividad ACX1.

La producción de peróxido de hidrógeno tanto en el mutante *acx1* como en el wt, se analizó a distintos intervalos de tiempo entre 0 y 72 h, en presencia y ausencia de 2,4-D mediante fluorimetría. De esta manera, se observó que en las plantas de *Arabidopsis* wt, el 2,4-D produce un aumento de la producción de H₂O₂ en el tiempo, duplicándose 1h después del tratamiento y llegando a ser 4 veces superior a las 72 h, por el contrario en el mutante *acx1* los niveles de H₂O₂ en plantas tratadas con 2,4-D eran similares a los de las plantas wt y *acx1* en ausencia del tratamiento (Fig. 4.20).

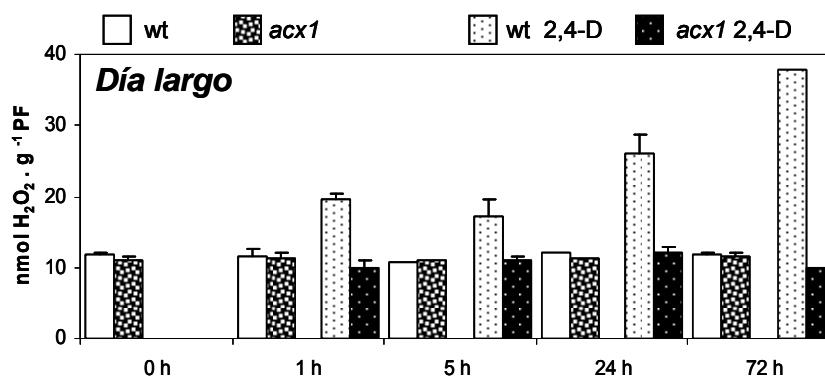


Figura 4.20: Producción de H₂O₂, por efecto del 2,4-D 22,6 mM en *A. thaliana* wt y *acx1*, cultivadas con un fotoperíodo de 16 h. La figura es representativa de cuatro experimentos independientes y las columnas representan la media \pm SEM de tres determinaciones.

Estos resultados sugieren que una parte importante del H₂O₂ que se produce en respuesta al 2,4-D procede de la acil-CoAoxidasa de la β -oxidación de ácidos grasos en peroxisomas.

4.2.3.1.2 Acumulación Tisular de H₂O₂

El análisis de la acumulación de H₂O₂ *in situ*, en la hoja se estudió mediante la tinción con DAB de hojas completas, provenientes de plantas de guisante y *Arabidopsis* control y tratadas con 2,4-D. Para facilitar la observación de los precipitados de DAB, se eliminaron los pigmentos foliares mediante extracción con etanol al 95 % a 90 °C. El tratamiento con 2,4-D en hojas de guisante producía precipitados de DAB en las zonas de curvatura de la hoja, así como en los haces vasculares, mientras que en las hojas control tan solo se detectaron algunos precipitados en los haces vasculares (Fig. 4.21). Estos resultados sugieren que el acumulo de H₂O₂ puede estar directamente relacionado con el desarrollo de la epinastia foliar.

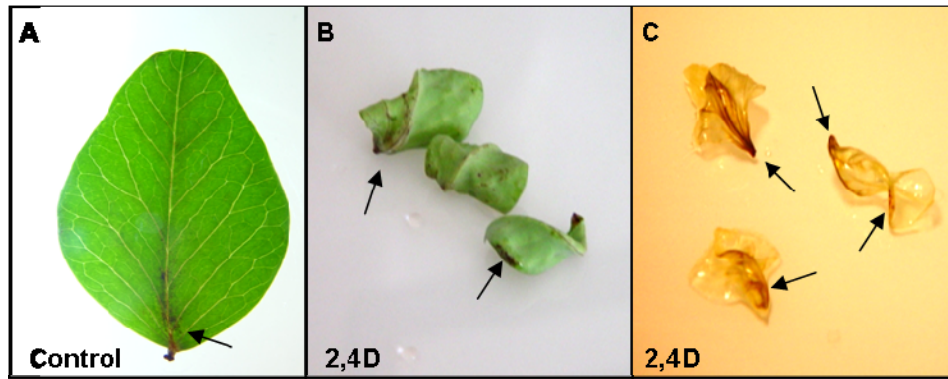


Figura 4.21: Efecto del 2,4-D sobre la acumulación de H_2O_2 *in situ*, mediante tinción histoquímica con DAB en hojas de plantas de guisante control y tratadas con 2,4-D. A y B: hoja control y hojas de plantas tratadas con 2,4-D, respectivamente, después de la incubación con DAB; y C: hojas tratadas con 2,4-D, en las que se ha eliminado la clorofila. Las flechas señalan los sitios de acumulación del H_2O_2 .

En ausencia de 2,4-D las hojas de plantas de *Arabidopsis* no presentaron depósitos con DAB mientras que en las hojas de plantas tratadas con el herbicida se observaron zonas marrones que se hacían más evidentes en las hojas más afectadas por el 2,4-D y que coincidía mayoritariamente con las nerviaciones de las hojas y especialmente en las hojas más jóvenes (Fig. 4.22).

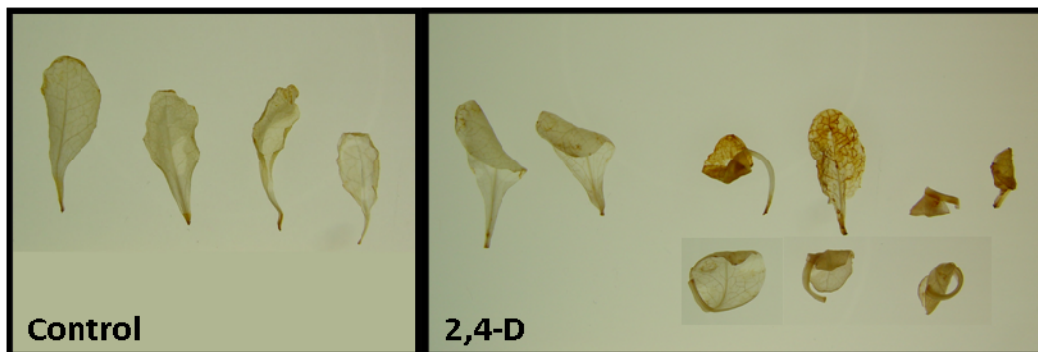


Figura 4.22: Localización *in situ* de H_2O_2 en hojas de *Arabidopsis thaliana*. Mediante histoquímica con DAB, y destinción con etanol a 90 °C.

La tinción con DAB permitió observar que aparentemente el tratamiento con 2,4-D induce la formación de haces vasculares secundarios. Este proceso podría ser el responsable de la curvatura de la hoja y sería dependiente de la producción de ROS.

4.2.3.2 Visualización de la Producción de ROS y NO Mediante Microscopía Láser Confocal

La visualización de la acumulación de ROS *in vivo* se realizó en cortes transversales de tejido, mediante el uso de sondas fluorescentes específicas y observación por microscopía láser confocal. El uso de esta metodología ha permitido la observación de H₂O₂, O₂⁻ y NO en respuesta a la aplicación del herbicida 2,4-D en la planta, y la determinación de la contribución de los distintos tipos de células a la respuesta frente al herbicida. Secciones de hojas y tallos apicales de plantas de guisante control y tratadas con 2,4-D 22,6 mM durante 72 h, se incubaron con los respectivos fluorocromos como se describe en Material y Métodos.

4.2.3.2.1 Detección de H₂O₂

La detección de la producción *in vivo* de H₂O₂ se llevó a cabo mediante el uso del fluorocromo DCF-DA, el cual es capaz de atravesar membranas biológicas, y una vez dentro de la célula es hidrolizado a 2'7'-diclorofluoresceína (DCF) que reacciona con el H₂O₂ para producir la forma fluorescente del DCF (Brul y col., 1997). El análisis de la acumulación de H₂O₂ en hojas de guisante mostró depósitos de peróxido fundamentalmente en las células del xilema y floema, y en epidermis y estomas de las hojas control (Fig. 4.23 A). En plantas tratadas con 2,4-D además de los depósitos en haces vasculares se observó un fuerte incremento de la fluorescencia en células del mesófilo (Fig. 4.23 B). Para demostrar la especificidad del fluorocromo por el H₂O₂ y como control negativo, se visualizaron secciones de hojas incubadas con ASC 1 mM, que actúa como secuestrador de peróxido de hidrógeno, reduciendo considerablemente la fluorescencia debida al DCF-DA (Fig. 4.23 C).

Resultados

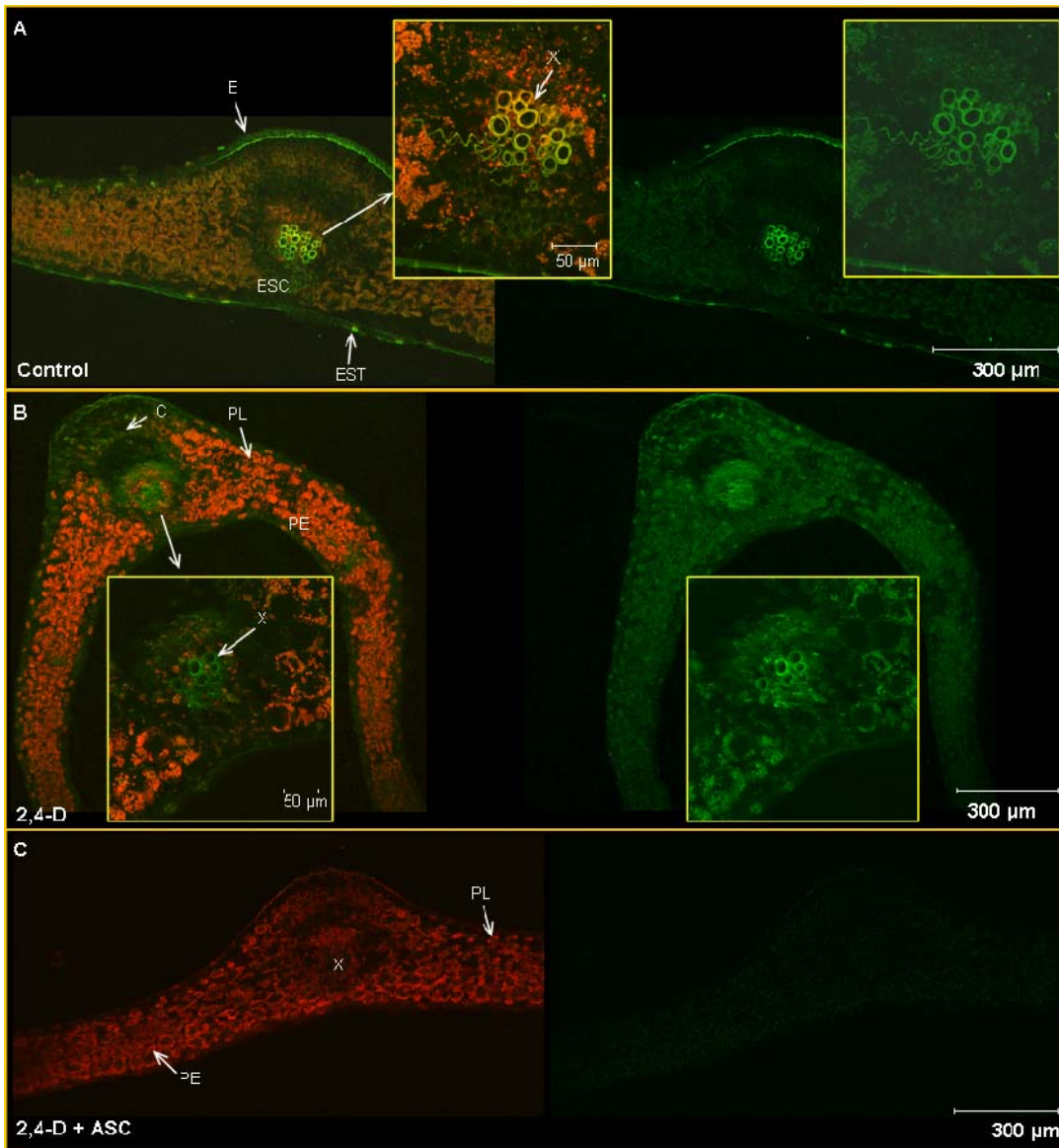


Figura 4.23: Visualización *in vivo* de la acumulación de H_2O_2 en hojas apicales de plantas de guisante tratadas con 2,4-D 22,6 mM. (A): hojas control; (B): hojas tratadas con 2,4-D, el recuadro interior en A y B corresponde a una magnificación de los haces vasculares; y (C): control negativo 2,4-D incubado con ASC. Las fotografías son reconstrucciones tridimensionales de las imágenes obtenidas en el microscopio confocal, la fluorescencia verde corresponde al DCF-DA y en rojo se aprecia la autofluorescencia. ASC, ascorbato 1 mM; X, xilema; PL, parenquima lagunar; PE, parénquima en empalizada; ESC, esclerénquima; C, colénquima; E, epidermis y EST, estoma.

4.2.3.2.2 Detección de $O_2^{\cdot-}$

La visualización de la acumulación de $O_2^{\cdot-}$ dependiente de 2,4-D se llevó a cabo mediante el uso de DHE y posterior visualización en el microscopio confocal. Como control negativo se incubaron cortes con TMP 1 mM que actúa secuestrando los radicales $O_2^{\cdot-}$. Como se observa en la figura 4.25 la presencia de este radical es casi inapreciable en las hojas control observándose una débil señal en la zona de los haces vasculares. Sin embargo la localización de $O_2^{\cdot-}$ en las hojas de plantas tratadas con 2,4-D era mucho más evidente, apreciándose una mayor fluorescencia en los haces vasculares centrales y en los secundarios que proliferan por efecto del 2,4-D. El $O_2^{\cdot-}$ se localizaba en xilema, floema y parénquima asociado a haces vasculares (Fig. 4.24 C y D).

Adicionalmente se observó también acumulación de $O_2^{\cdot-}$ en estomas y epidermis (Fig. 4.24 C) y en el mesófilo donde se detecta en orgánulos de menor tamaño que los cloroplastos posiblemente mitocondrias y/o peroxisomas (Fig. 4.24 E). Por el contrario, no se observó solapamiento de autofluorescencia y DHE, lo que sugiere que los cloroplastos no son una fuente importante de $O_2^{\cdot-}$ en las condiciones estudiadas. El incremento en la fluorescencia debido al tratamiento, era revertido por la incubación con TMP 1 mM (Fig. 4.24 B), lo que demuestra la especificidad del DHE.

Resultados

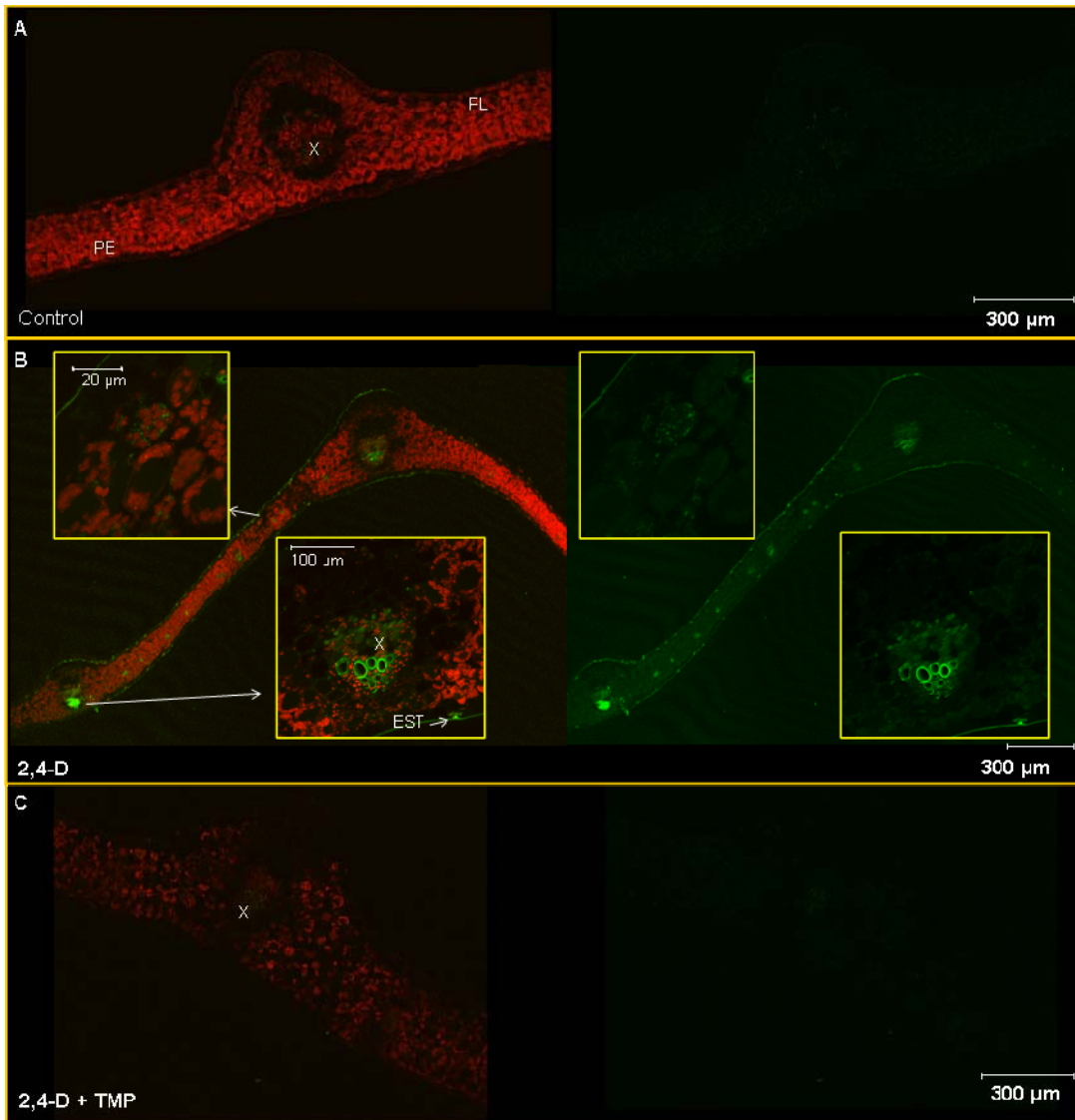


Figura 4.24: Visualización *in vivo* de la acumulación de $O_2^{\cdot -}$ en hojas apicales de plantas de guisante tratadas con 2,4-D 22,6 mM. A: hojas control; B-C: hojas tratadas con 2,4-D. Las fotografías son reconstrucciones tridimensionales de las imágenes obtenidas en el microscopio confocal, la fluorescencia verde corresponde al DHE y en rojo se aprecia la autofluorescencia. TMP, tetrametilpiperidina 1 mM; PL, parénquima lagunar; PE, parénquima en empalizada; X, xilema; ES, estoma. El recuadro interior muestra con mayor ampliación zonas de producción del radical $O_2^{\cdot -}$, en hojas de plantas tratadas con 2,4-D.

En relación a los tallos, la acumulación de $O_2^{\cdot -}$, se observaba en las zonas de haces vasculares en los cortes de plantas control. En las plantas tratadas con 2,4-D se incrementaba la fluorescencia tanto en los haces vasculares como en células del córtex. Hay que destacar la proliferación de células del xilema por efecto del tratamiento con 2,4-D

y la pérdida de la simetría bilateral de los haces vasculares que se observa en los controles (Fig. 4.25).

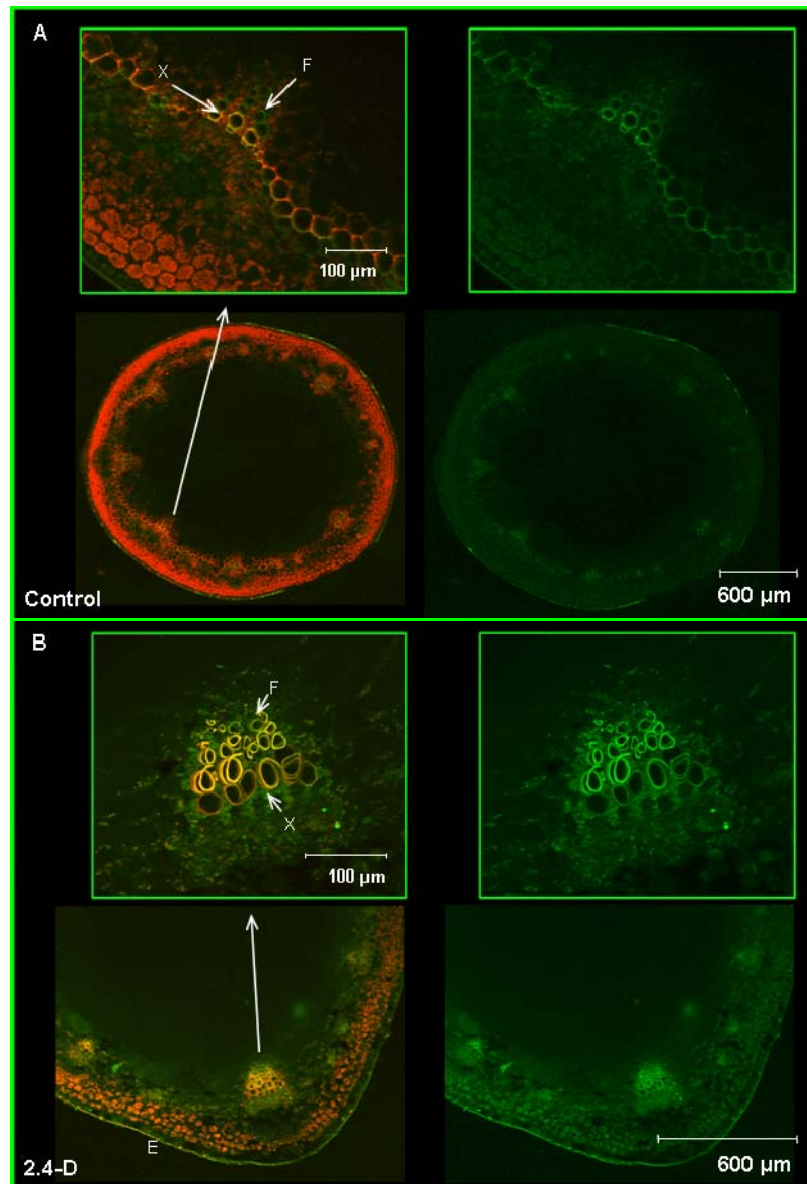


Figura 4.25: Visualización *in vivo* de la acumulación de O_2^- en cortes de tallos de plantas tratadas con 2,4-D 22,6 mM durante 72 h. A: tallos de plantas control; B: tallo de plantas tratadas con 2,4-D. Las fotografías son reconstrucciones tridimensionales de las imágenes obtenidas en el microscopio confocal. La fluorescencia verde corresponde al DHE y en rojo se aprecia la autofluorescencia. E, epidermis; F, floema; X, xilema.

Resultados

Paralelamente se realizaron estudios en plantas de *Arabidopsis* después de 72 h de tratamiento con 2,4-D 22,6 mM. En las hojas de *Arabidopsis* se observaron zonas de acumulación de O_2^- en el xilema de la nerviación central, pero también en haces vasculares secundarios que se inducen por el tratamiento (Fig. 4.26 B). La observación a mayor aumento permitió identificar en células del mesófilo próximas a haces vasculares unos orgánulos esféricos que podrían ser peroxisomas y/o mitocondrias que mostraban una intensa fluorescencia debida al O_2^- . Además, estas células también mostraban producción de O_2^- en la pared celular y/o membrana citoplasmática. También se detectó acumulación de O_2^- en la epidermis y en estomas (Fig. 4.26 B). Como control negativo se utilizó SOD con el fin de eliminar el O_2^- (Fig. 4.26 C).

Estos resultados sugieren que en parte, el incremento de la producción de ROS en haces vasculares podría proceder de la células adyacentes del mesófilo y más concretamente de la NADPH oxidasa de membrana y también de peroxisomas y/o mitocondrias.

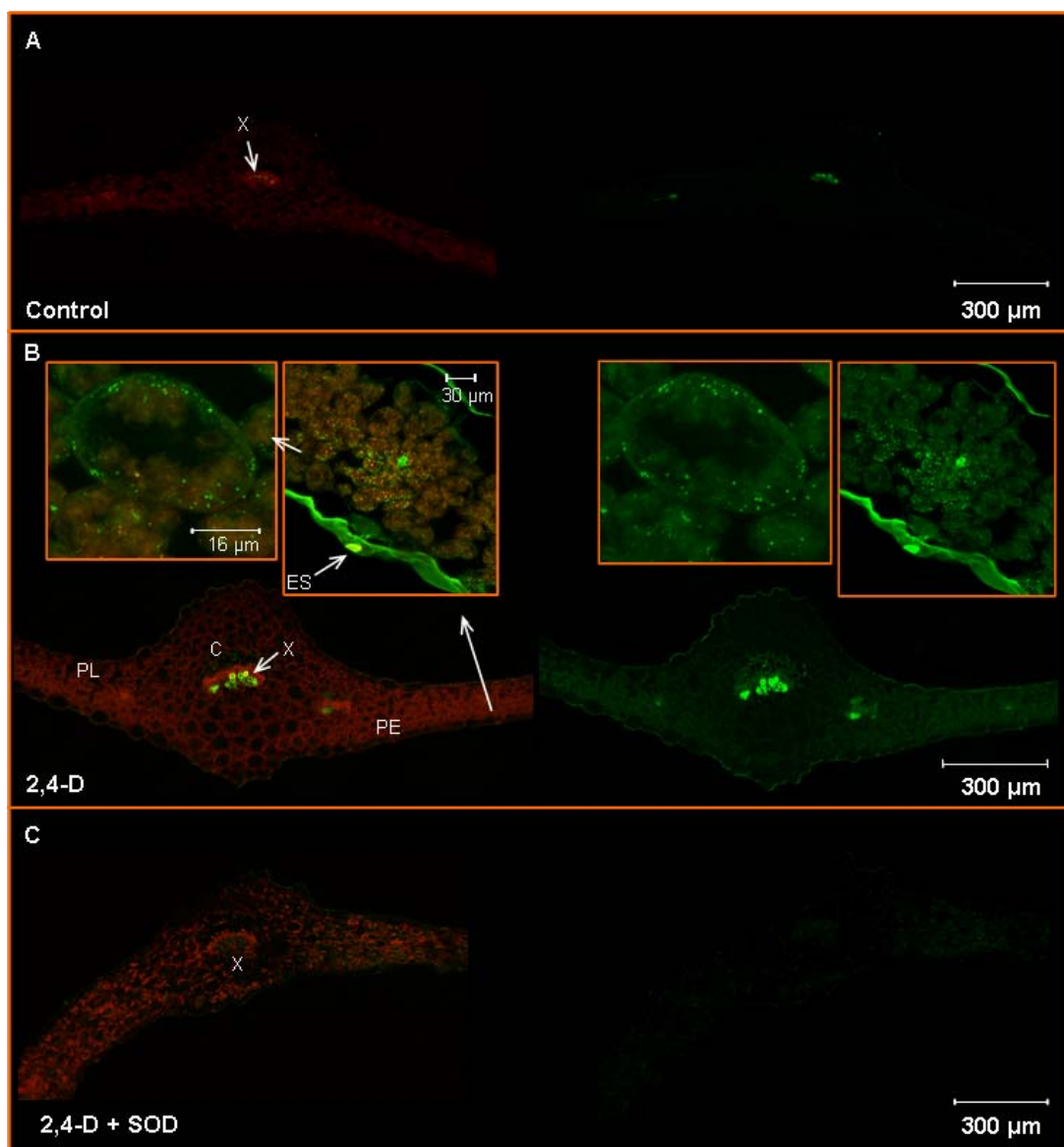


Figura 4.26: Visualización *in vivo* de O_2^- dependiente de 2,4-D en hojas de *Arabidopsis thaliana*. Las fotografías son reconstrucciones tridimensionales de las imágenes obtenidas en el microscopio confocal, la fluorescencia verde corresponde al DHE y en rojo se aprecia la autofluorescencia. A: hojas control; B-C: hojas tratadas con 2,4-D. SOD, superóxido dismutasa 100 μ M; X, xilema; ES, estoma; C, colénquima; PL, parénquima lagunar; PE, parénquima en empalizada.

Resultados

4.2.3.2.3 Producción de NO

La función del óxido nítrico en plantas esta relacionada con la respuesta a diversas situaciones de estrés biótico y abiótico, adicionalmente esta molécula está involucrada en procesos del desarrollo como la germinación, el gravitropismo y desarrollo radicular, lo que indica un papel clave en la regulación de respuestas a señales y estímulos endógenos, provocados por auxinas y ABA (Durner y Klessig, 1999; Desikan y col., 2001; Mittler y col., 2004). La visualización de NO en respuesta al 2,4-D se realizó mediante el uso del fluorocromo DAF-2DA. En condiciones fisiológicas normales hay una producción basal de NO, tal como se observa en hojas control, concretamente en haces vasculares, epidermis y mesófilo (Fig. 4. 27 A). No obstante, en hojas sometidas al tratamiento con el herbicida se reducía el acúmulo de NO (Fig. 4.27 B). Como control negativo se incubaron algunos cortes con un secuestrador de NO, el PTIO 300 μ M, lo que reducía considerablemente la fluorescencia dependiente de NO en plantas control (Fig. 4.27 C).

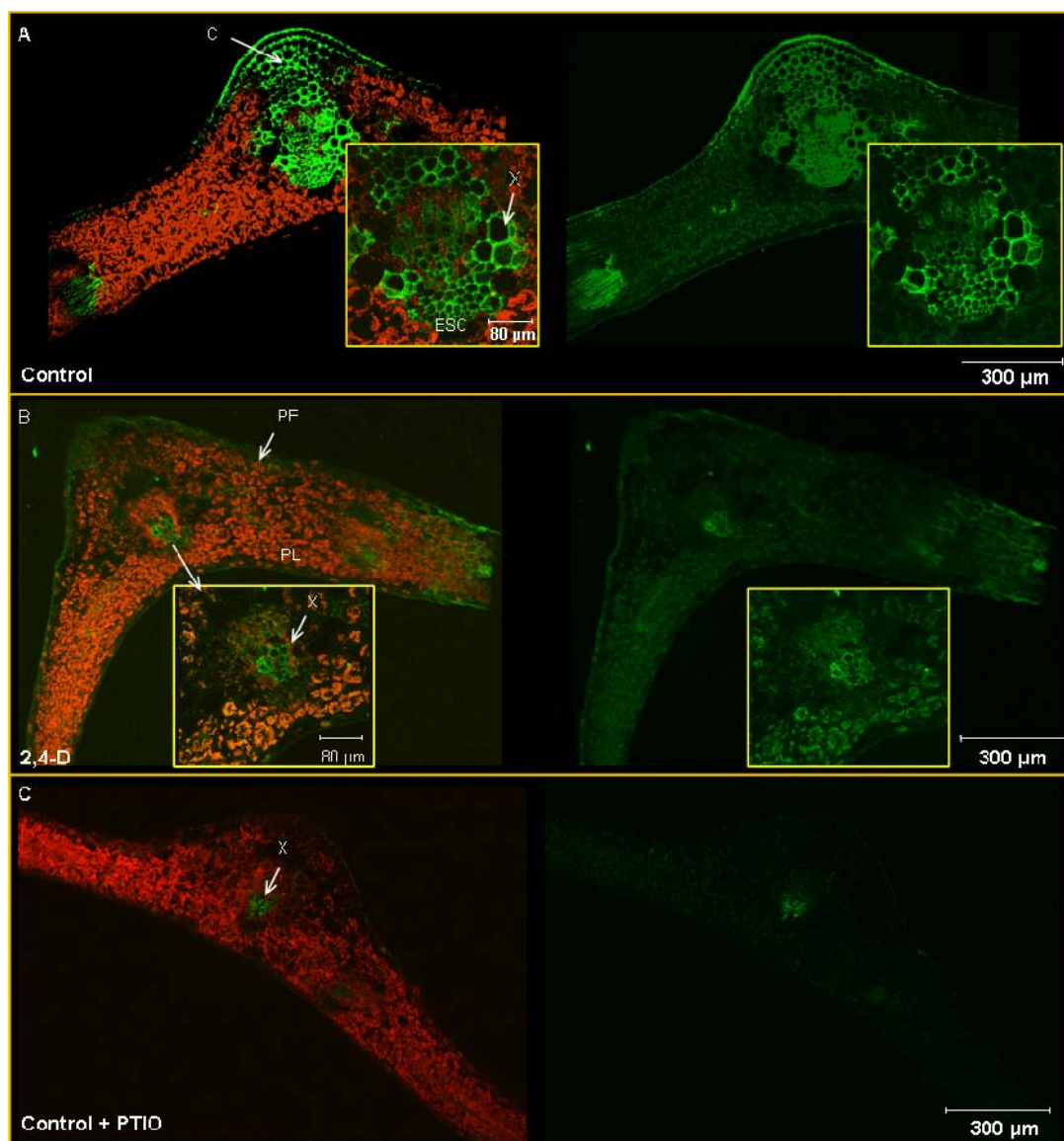


Figura 4. 27: Visualización de la acumulación de NO en hojas apicales de plantas de guisante tratadas con 2,4-D 22,6 mM durante 72 h. A: hojas control; B: hojas tratadas con 2,4-D, el recuadro interior en A y B corresponde a una magnificación de los haces vasculares; y C: hojas controles tratadas con PTIO. Las fotografías son reconstrucciones tridimensionales de las imágenes obtenidas en el microscopio confocal, la fluorescencia verde corresponde al DAF-2DA y en rojo se aprecia la autofluorescencia. PTIO, 2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidacolina-1-oxil-3-óxido 300 μ M; X, xilema; ESC, esclerénquima; PE, parénquima en empalizada; PL, parénquima lagunar; C, colénquima.

Resultados

La enzima nitrosoglutation reductasa (GSNOR) regula los niveles de GSNO fuente endógena de NO (Lee y col., 2008a). GSNOR y GSNO operan conjuntamente en la regulación y homeostasis del NO. El tratamiento con 2,4-D producía un incremento en la actividad de GSNOR, tanto en hojas apicales como basales, siendo este aumento significativo y mucho mayor en la zona apical, con respecto a la zona basal (Fig. 4.28).

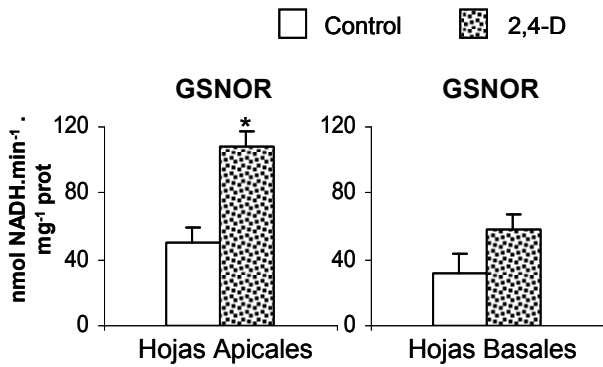


Figura 4.28: Actividad nitrosoglutation reductasa (GSNOR). En extractos crudos de hojas apicales y basales de plantas de guisante control y tratadas con 2,4-D. Cada valor representa la media de tres determinaciones diferentes \pm SEM, las diferencias eran significativas con $p < 0,05$ (*) de acuerdo con el test *t* de Student.

La visualización de NO en hojas de *Arabidopsis* tratadas con 2,4-D no mostró cambios en la producción de NO con respecto a la producción de plantas control (Fig. 4.29).

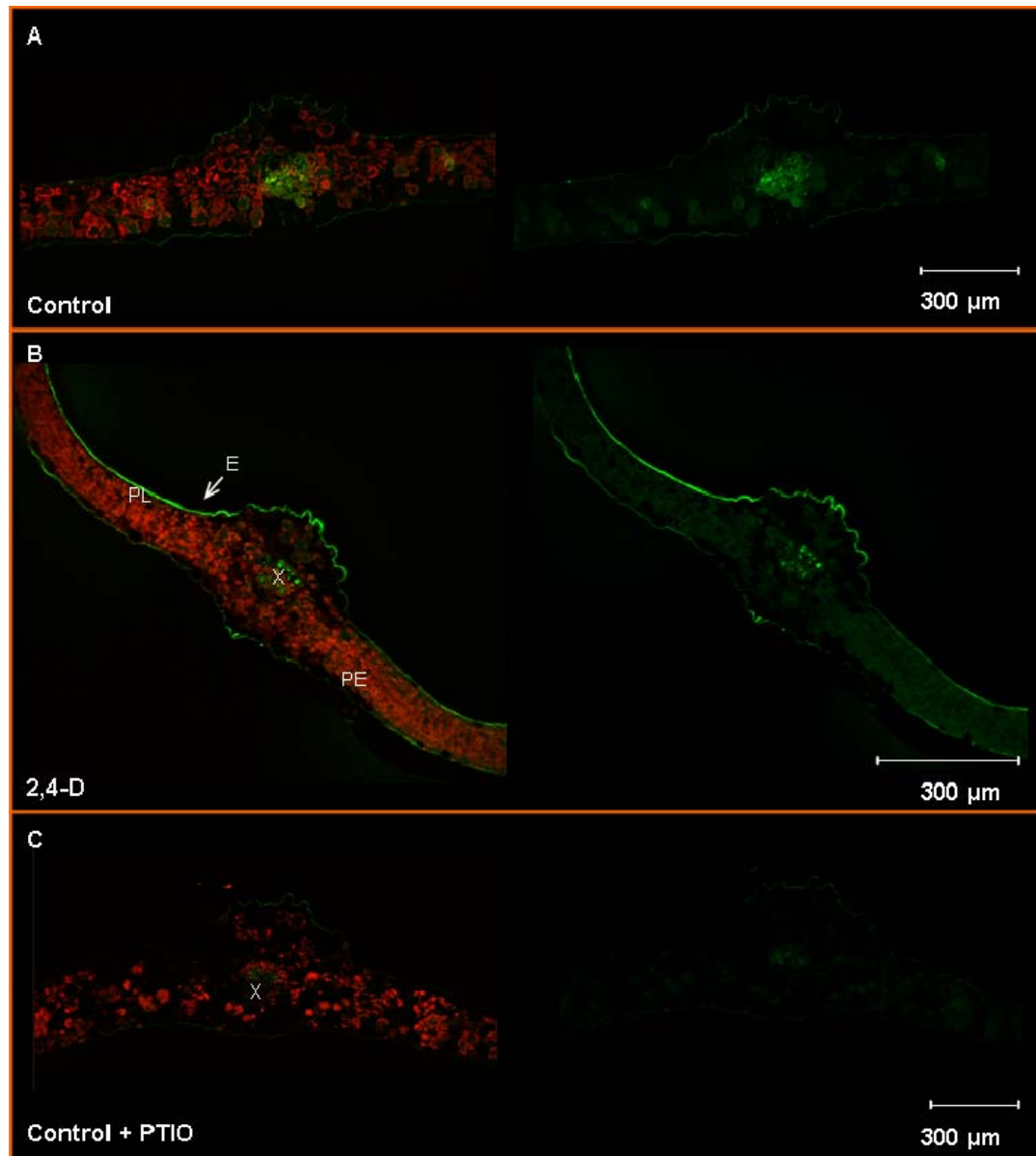


Figura 4.29: Visualización *in vivo* de la acumulación de NO en cortes de hojas de *Arabidopsis thaliana*. Las fotografías son reconstrucciones tridimensionales de las imágenes obtenidas en el microscopio confocal, la fluorescencia verde corresponde al DAF-2DA y en rojo se muestra la autofluorescencia. A: Control; B: 2,4-D y C: control+PTIO 300 μM; X, xilema; E, pidermis.

Resultados

4.2.3.2.3.1 Detección de NO Mediante Fluorimetría

Para cuantificar los cambios observados en la producción de NO, se procedió al análisis de este compuesto mediante fluorimetría usando el DAF-2DA en extractos de plantas de *Arabidopsis* tratadas con 2,4-D a diferentes intervalos de tiempo (1, 5, 24 y 72 h). El contenido de NO incrementaba significativamente después de 1 h de tratamiento y posteriormente se reducía a las 5, 24 y 72 h alcanzando valores similares a los del control (Fig. 4.30). Estos resultados concuerdan con la observación realizada mediante microscopía láser confocal a las 72 h de tratamiento con 2,4-D.

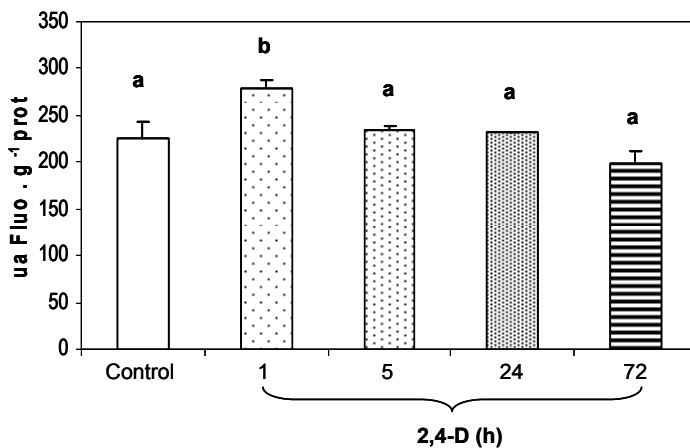


Figura 4.30: Efecto del tratamiento con 2,4-D sobre la producción de NO. El NO se analizó mediante fluorescencia usando DAF-2DA, los resultados se expresan en unidades arbitrarias de fluorescencia. Cada valor representa la media de dos determinaciones diferentes \pm SEM las diferencias fueron significativas con $p < 0,05$ de acuerdo con la prueba de rangos múltiples de Duncan.

4.2.3.3 Marcadores de Estrés Oxidativo

Un exceso de ROS puede conducir a situaciones de estrés oxidativo, que se caracteriza por daños a macromoléculas, entre ellas proteínas, lípidos y DNA. Como marcadores de estrés oxidativo se determinaron el contenido total de grupos carbonilo en solución y la tasa de peroxidación lipídica, cuantificada mediante el análisis del contenido de malondialdehído (MDA).

El tratamiento con 2,4-D producía un incremento significativo del contenido de grupos carbonilo en las hojas apicales, mientras que en las hojas basales este incremento fue muy inferior en comparación con su control (Fig. 4.31).

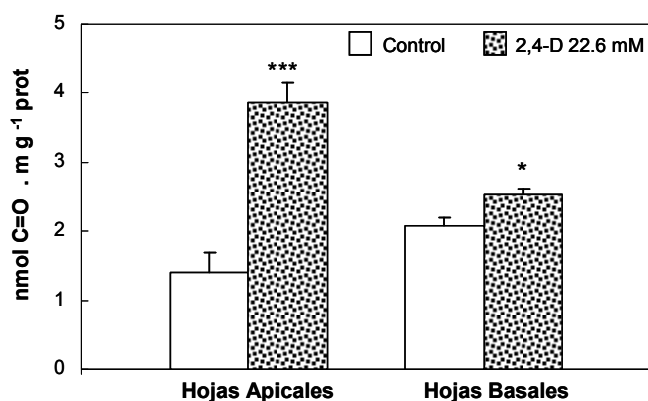


Figura 4.31: Contenido de grupos carbonilo en hojas apicales y basales, de plantas tratadas con 2,4-D. Cada valor representa la media \pm SEM de tres determinaciones diferentes. Las diferencias eran significativas con $p < 0,05$ (*) y $p < 0,005$ (***) de acuerdo con el test *t* de Student.

Por lo que respecta a la tasa de peroxidación lipídica, el tratamiento con 2,4-D ocasionaba un incremento en la zona apical de la planta, sin embargo en la zona basal no se observaron modificaciones por efecto del tratamiento, si bien era mayor por igual en plantas control y tratadas con el herbicida con respecto al control de hojas apicales (Fig.4.32).

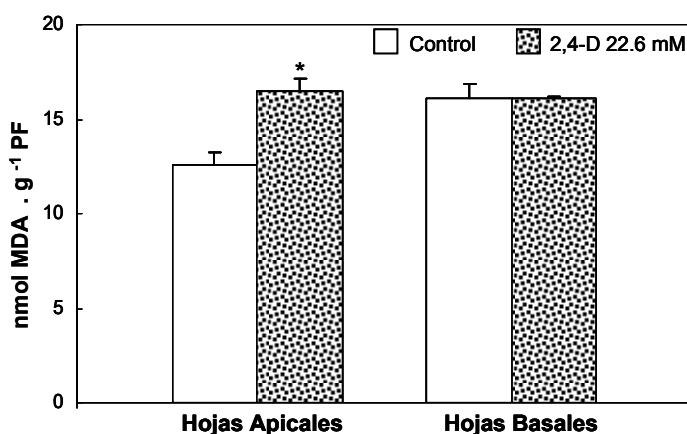


Figura 4.32: Efecto del 2,4-D sobre la tasa de peroxidación lipídica en hojas apicales y basales de plantas de guisante. Cada valor representa la media \pm SEM de tres determinaciones diferentes. Las diferencias eran significativas con $p < 0,05$ (*) de acuerdo con el test *t* de Student.

Estos resultados sugieren que la zona apical es más susceptible a daños oxidativos dependientes del 2,4-D, que la zona basal, y que los incrementos de procesos oxidativos observados en las hojas basales son más propios de procesos de senescencia que del efecto del herbicida.

4.2.4 Modificación Oxidativa y Nitrosativa de Proteínas

A la vista de los resultados anteriores, se analizó las posibles modificaciones de proteínas, por oxidación o S-nitrosilación. Para ello, se analizó el patrón de proteínas oxidadas en extractos de hojas de *Arabidopsis* mediante el análisis de grupos carbonilo por Western blot, y utilizando el anticuerpo comercial frente al DNPH. En la figura 4.33, se

Resultados

muestra que el 2,4-D induce un incremento en el número e intensidad de las bandas de proteínas oxidadas. Como control de carga, se visualizaron las proteínas mediante azul Coomassie (Fig. 4.33 A y B). Estos resultados demuestran que el 2,4-D provoca estrés oxidativo que afecta predominantemente a las proteínas de 24, 30, 37 y 45-50 kDa.

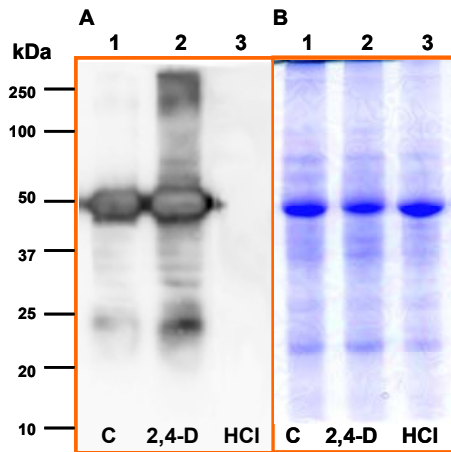


Figura 4.33: Efecto del 2,4-D sobre la oxidación de proteínas, en extractos crudos de plantas de *Arabidopsis* control y tratadas con 2,4-D 22,6 mM derivatizados con DNPH. (A): inmunodetección de grupos carbonilo en hojas control (1), hojas tratadas con 2,4-D (2) y control negativo sin derivatizar (3). (B): proteínas totales teñidas con azul Coomassie, líneas 1 – 3 igual que en panel A. A la izquierda de la figura se sitúan los marcadores de masa molecular.

La S-nitrosilación de proteínas es otra modificación postraducciona que puede afectar la actividad de determinadas proteínas (Mannick y Schonhoff, 2002; Romero-Puertas y col., 2007). Para determinar en que medida el 2,4-D puede modificar el perfil de proteínas S-nitrosiladas, se determinó el patrón de estas proteínas mediante biotinización y posterior detección por Western blot usando anticuerpos específicos y extractos de hojas de *Arabidopsis*. En la figura 4.34 A, se observa los cambios experimentados por las proteínas a los diferentes intervalos de tiempo estudiados (1, 5, 24, 72 h). Básicamente, el perfil de proteínas S-nitrosiladas no variaba por el tratamiento. Así, en plantas control se detectaron unas 14 proteínas S-nitrosiladas, siendo mayoritarias las de 35 kDa y 23 kDa. No obstante, el tratamiento con 2,4-D incrementaba la intensidad de las bandas de 35, 23 y 37 kDa. Este incremento era más patente 1 h después del tratamiento, coincidiendo con la mayor producción de NO y se mantenía especialmente en la banda 35 kDa después de 72 h. La proteína de 37 kDa, no obstante experimentaba una reducción a las 5 y 24 h, volviendo a incrementarse a las 72 h. Como control de carga las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau (Fig 4.34 B).

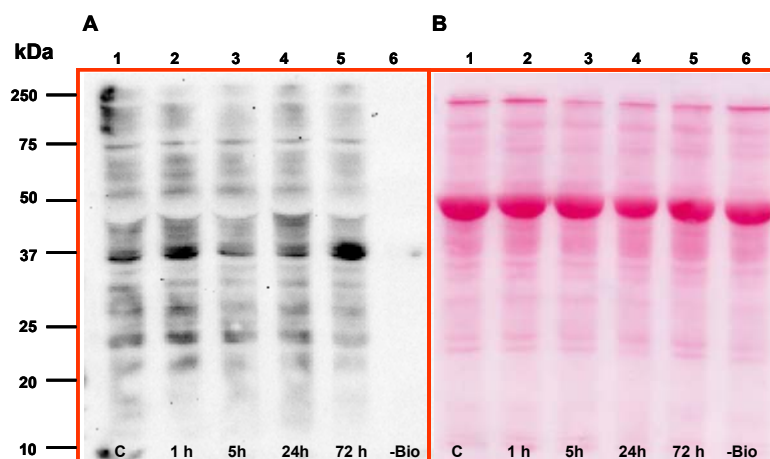


Figura 4.34: Patrón de proteínas S-nitrosiladas. (A): detección inmunológica por Western-Blot de proteínas S-nitrosiladas, líneas 1-5 corresponden a los tiempos de tratamiento con 2,4-D: 0 (Control), 1, 5, 24 y 72 h, respectivamente, la línea 6 corresponde al control negativo sin biotina. (B): tinción de proteínas con Rojo Ponceau. A la izquierda se sitúan los marcadores de masa molecular.

4.2.5 Efecto del 2,4-D Sobre la Producción de Etileno

Uno de los primeros eventos que tiene lugar tras la aplicación de auxinas o herbicidas auxínicos, es la inducción de la biosíntesis de etileno (Grossmann, 2003). Esta hormona está involucrada en la aparición de la epinastia foliar, pero también en la regulación de la senescencia.

En las dos zonas analizadas de la planta (hojas apicales y basales), el herbicida producía un aumento significativo en la producción de etileno siendo de cuarenta veces superior con relación a su respectivo control (Fig. 4.35). El mayor incremento se registró en la zona apical. En ausencia del herbicida no se detectaron cambios significativos entre las hojas jóvenes y las maduras.

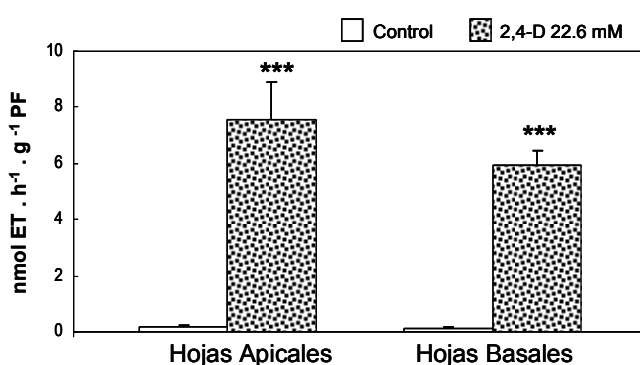


Figura 4.35: Efecto del tratamiento con 2,4-D 22,6 mM sobre la producción de etileno, en hojas apicales y basales de plantas de guisante. Cada valor representa la media \pm SEM de tres determinaciones diferentes. Las diferencias eran significativas con $p < 0,005$ (***) de acuerdo con el test t de Student.

4.2.6 Efecto del 2,4-D Sobre la Expresión de Proteínas de Defensa

Existen datos en la literatura que demuestran una interacción de las auxinas con la actividad de elicitores exógenos (Jouanneau y col., 1991), y por tanto, un posible papel de esta hormona en la regulación de la expresión de proteínas de defensa o relacionadas con la patogénesis (PRs). Para profundizar en este punto, se abordó el análisis de los transcritos de algunas PR, entre ellas: PrP4A, y quitinasas, también se ensayaron los niveles de la proteína de choque térmico (“heat shock protein”), HSP 71.2.

El nivel de transcritos correspondiente a la PrP4A experimentaba un incremento considerable de 5 y 4 veces en la parte apical y basal, respectivamente, por efecto del tratamiento con 2,4-D. Sin embargo, el herbicida solo inducía ligeramente (1.2 veces) la expresión de la quitinasa, no observándose diferencias entre las hojas jóvenes y las maduras (Fig. 4.36). La HSP 71.2, es una proteína citosólica de estrés térmico que también se induce en diferentes situaciones de estrés, como metales pesados o salinidad (Sung y col., 2001; Rodriguez-Serrano y col., 2009). El 2,4-D también inducía la expresión de este gen, especialmente en las hojas apicales, y en menor medida en las hojas basales, si bien en las plantas control no se detectó la presencia de transcritos, lo que se corresponde con la naturaleza inducible de este gen.

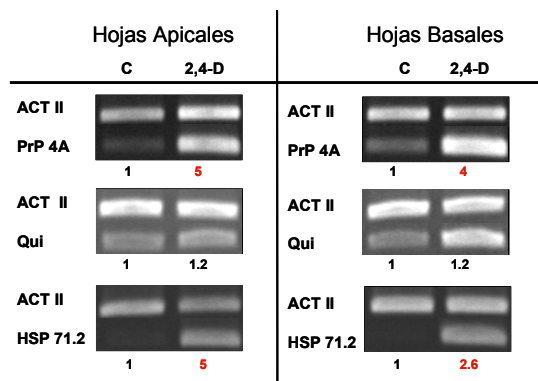


Figura 4.36: Efecto del tratamiento con 2,4-D 22,6 mM, sobre la expresión de proteínas de defensa. PrP 4A, quitinasa (Qui) y la proteína de choque térmico (HSP 71.2). El análisis se realizó mediante RT-PCR semicuantitativa, según se ha descrito en material y métodos. La intensidad de las bandas se cuantificó 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 usada como control interno después de su normalización, y expresan el número de veces respecto al control sin tratamiento, al que se asigna el valor 1.

4.3 Regulación de la Respuesta Celular Frente al 2,4-D

4.3.1 Regulación de la Epinastia Foliar

Con objeto de determinar la secuencia de eventos que conducen a la aparición de la epinastia dependiente del 2,4-D y el papel concreto que las ROS pueden tener en este proceso, en este trabajo se ha abordado el estudio del efecto de diferentes antioxidantes y

moduladores de la transducción de señales en la aparición de síntomas de epinastia foliar y curvatura de tallos. Se ha descrito que uno de los efectos indirectos del 2,4-D, mediado por el H_2O_2 es la masiva acumulación de ABA (Hansen y Grossmann, 2000) y el cierre estomático vía canales de calcio de la membrana plasmática (Pei y col., 2000), con la intervención de proteínas MAPK (Burnett y col., 2000). Es por ello que se ensayó el efecto del wortmannin como inhibidor de MAPK, la cantaridina como inhibidor de fosfatasa y el lantano como inhibidor de canales de calcio, en la respuesta de la planta al 2,4-D. Para determinar el papel de las ROS en la curvatura dependiente de 2,4-D, se evaluó el efecto de inhibidores de diferentes fuentes de ROS. Así, el DPI que inhibe la NADPH oxidasa de membrana plasmática, y el alopurinol, inhibidor de la XOD. Como secuestradores de radicales libres de oxígeno se utilizó el BHA y además se empleó el EDTA, que actúa como quelante de metales y por tanto puede prevenir la formación de $\cdot OH$ a través de reacciones tipo Fenton. Para determinar la contribución del etileno en la epinastia, se utilizó un inhibidor de la síntesis de etileno, el AVG, el cual actúa inhibiendo la enzima ACC sintasa.

Para llevar a cabo este estudio, los compuestos anteriormente mencionados se suministraron a brotes de la parte apical de plantas de guisante durante 18 h y se analizó su efecto sobre la formación de curvatura del tallo y la aparición de la epinastia foliar dependiente de 2,4-D. En este estudio se utilizó una concentración de 2,4-D más adecuada para la aplicación por solución del herbicida, de esta manera se fijó la concentración de 20 μM de 2,4-D por ser la que producía la mayor formación de curvatura de tallo y epinastia foliar en brotes de guisante. En la figura 4.37 se muestra el efecto de cada uno de estos compuestos y en la tabla 4.1 se cuantifica el grado de curvatura de tallo y epinastia foliar, tomando como referencia el máximo de curvatura (+++) en los brotes tratados con 2,4-D. El tratamiento de los brotes con EDTA y con BHA+EDTA producía la máxima protección, ya que prevenía totalmente la aparición de curvatura de tallo y epinastia foliar. El BHA por sí solo prevenía parcialmente la curvatura del tallo y protegía ligeramente frente a la epinastia foliar. El alopurinol reducía la curvatura de tallo y la epinastia foliar levemente; y el AVG reducía en mayor medida (Fig. 4.37). Por el contrario, el DPI y el wortmannin no parecían tener efecto alguno y el cloruro de lantano sólo prevenía sutilmente la epinastia foliar y en mayor medida la curvatura de tallos.

Resultados

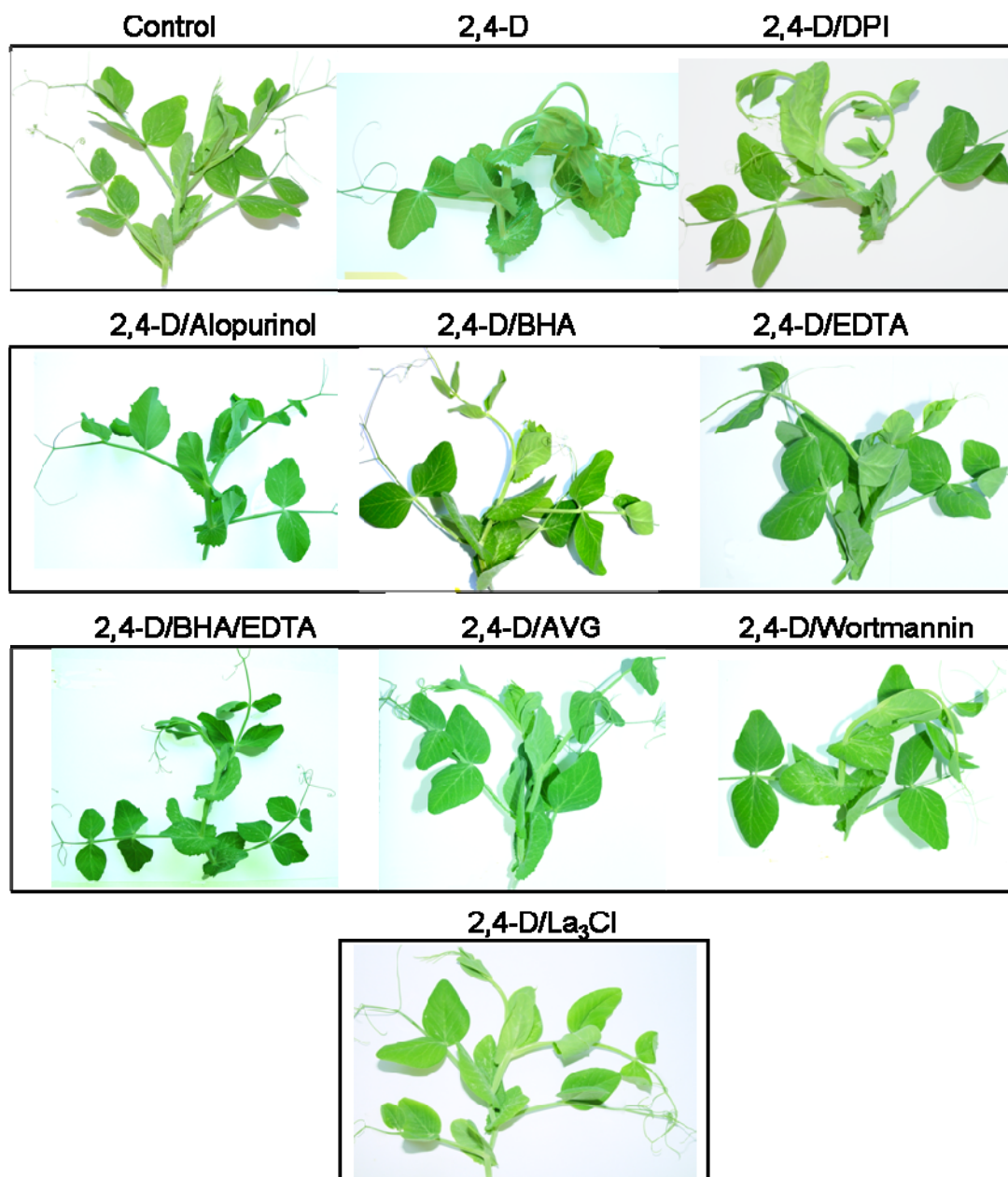


Figura 4.37: Efecto del 2,4-D (20 μM) sobre brotes de plantas de guisante, y regulación de la epinastia por inhibidores y/o moduladores de la respuesta al 2,4-D. Cada una de las imágenes representan el efecto ejercido por el herbicida y su combinación con los inhibidores, sobre la curvatura del tallo y la epinastia foliar, pasadas 18 h de incubación. DPI (10 μM): difenil iodonium; Alopurinol (2 mM); BHA (200 μM): hidroxianisol butilado; EDTA (200 μM): ácido etilendiaminotetraacético; AVG (50 μM): amino-etoxi-vinilglicina; Wortmannin (8 nM) y La₃Cl (1 mM).

| Tratamiento | Epinastia foliar | Curvatura de tallo |
|------------------------------------|------------------|--------------------|
| CONTROL | --- | --- |
| 2,4-D 20 μ M | +++ | +++ |
| DPI 10 μ M | +++ | +++ |
| Alopurinol 2 mM | -++ | --+ |
| BHA 500 μ M | -++ | --+ |
| EDTA 200 μ M | --- | --- |
| BHA 500 μ M / EDTA 200 μ M | --+ | --+ |
| AVG 50 μ M | --+ | --+ |
| Wortmannin 8 nM | +++ | +++ |
| La ₃ Cl 1 mM | -++ | --+ |

Tabla 4.1: Efecto de inhibidores y/o moduladores sobre la aparición de síntomas de epinastia y curvatura de tallo en brotes de guisante. Brote control sin síntomas (- - -) y brote tratado 2,4-D 20 μ M (+++).

Con el fin de cuantificar con más exactitud el efecto de estos compuestos se utilizaron tiras de 1.5 mm x 10 mm de hojas de pecíolos apicales de plantas de guisante, que se incubaron con los compuestos anteriormente mencionados. El efecto de cada uno de ellos se cuantificó mediante la medida del grado de curvatura de las tiras de hojas.

Previamente al análisis de los diferentes inhibidores, se realizó una optimización del ensayo utilizando diferentes concentraciones de 2,4-D (20, 40, 60, 80, 100, 120, 200 y 250 μ M) ya que la concentración usada en brotes no producía efectos sobre la curvatura de tiras de hojas. Como resultado de ello, se estableció que 120 μ M, era la concentración que producía el máximo efecto de curvatura sobre las tiras de hojas en oscuridad y tras 20 h de tratamiento.

En estas condiciones se observó un grado de curvatura (θ) medio de 130° en las tiras incubadas con 2,4-D (Fig 4.38). Esta curvatura máxima se reducía un 95 % en presencia de EDTA, un 93% con cantaridina, un 86 % con DPI, 97% con BHA, y un 54% con wortmannin, mientras que el AVG producía un efecto opuesto con un incremento de un 48% de la curvatura (Fig. 4.38).

Este método parece más efectivo para el esclarecimiento de los procesos implicados en la regulación de la epinastia dependiente de 2,4-D. A la vista de los resultados obtenidos, el desarrollo de la epinastia es dependiente de ROS y está regulado por fosfatasa y en menor medida por quinasas.

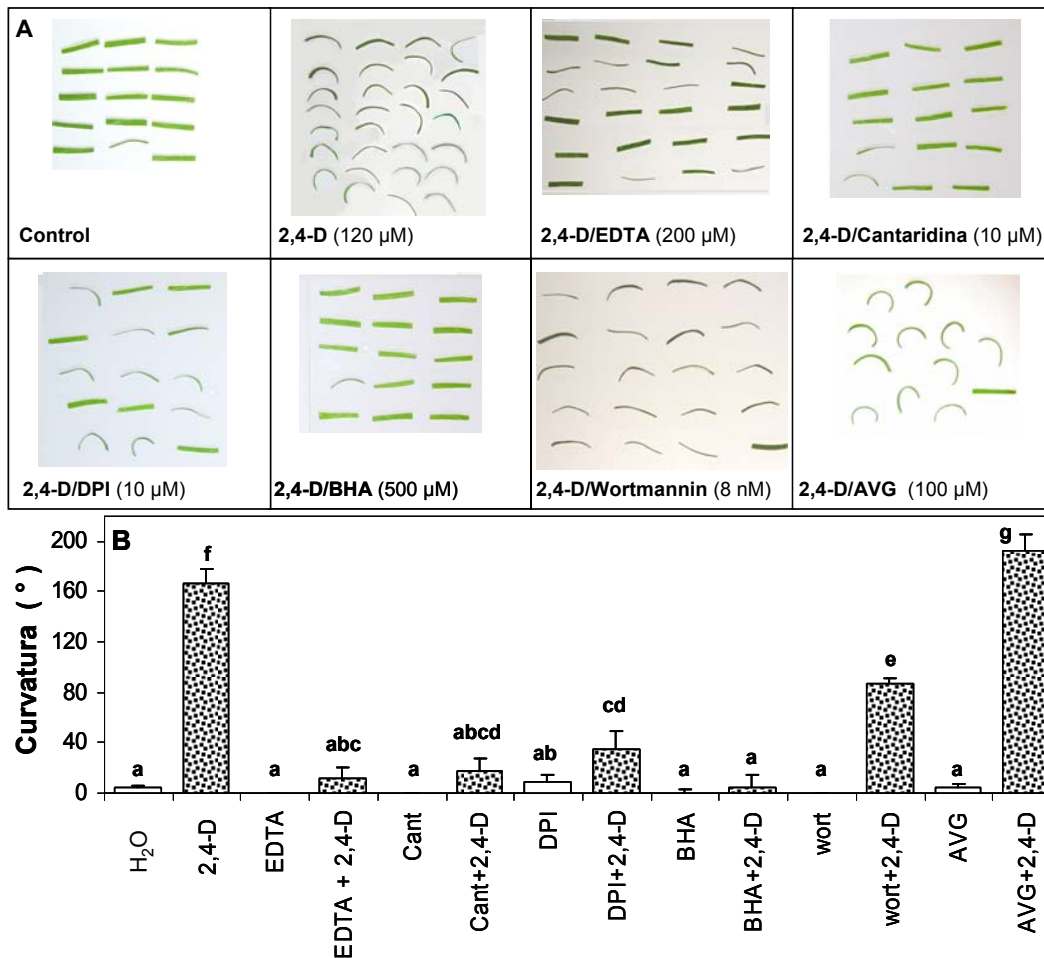


Figura 4.38: Efecto de inhibidores y/o moduladores sobre la curvatura de tiras de hojas de guisante y grado de curvatura. El 2,4-D fue utilizado a una concentración de 120 μ M, las tiras fueron incubadas en una solución de 2,4-D y su mezcla con el correspondiente inhibidor en un volumen final de 5 ml, durante 20 h en total oscuridad. DPI, cloruro de difenilén iodonio; BHA, hidroxianisol butilado; AVG, amino etoxi vinil glicina; Cant, cantaridina; wort, wortmannin. (A): Curvatura de las tiras de hojas. (B): Gráfico de barras del grado de curvatura, los valores representan la media \pm SEM de tres determinaciones y las diferencias fueron significativas con un $p < 0,05$ de acuerdo con la prueba de rango múltiples de Duncan.

El resultado obtenido con AVG, resulta cuando menos sorprendente, habida cuenta de la bien establecida implicación del etileno en el desarrollo de la epinastia. Estos resultados sugieren que, al menos en tiras de hojas, la producción endógena de etileno no interviene en el desarrollo de la epinastia, y por tanto la producción de ROS parece tener el mayor peso en la formación de la curvatura de la hoja.

Una vez establecido el papel de cada uno de los inhibidores en el desarrollo de la curvatura, se llevó a cabo el estudio en profundidad del efecto de estos compuestos sobre la producción de ROS y sistemas antioxidantes.

4.3.1.1.1 Producción de H₂O₂

De acuerdo con los efectos de protección frente al 2,4-D de los diferentes inhibidores y secuestradores de ROS analizados, se determinó el contenido de H₂O₂ en los tratamientos de brotes con los compuestos que mostraron efectos más acusados sobre la epinastia (Fig. 4.37).

Los brotes incubados con EDTA presentaron una reducción en la producción de H₂O₂, hasta niveles de producción similares a los del control sin tratamiento. Los brotes incubados con alopurinol presentaron una reducción inferior a la observada en el tratamiento con EDTA, y el tratamiento con AVG redujo el contenido de peróxido de hidrógeno, tanto en los brotes control como en los tratados con 2,4-D, mientras que el tratamiento con NO₃Ag, el cual actúa como bloqueante de receptores de etileno, reducía la producción de H₂O₂ a los niveles detectados en el control (Fig. 4.39). De estos resultados podemos destacar la reducción observada tanto en plantas control, como tratadas con 2,4-D, por el AVG, lo que indica una relación directa de la síntesis de ET con la producción de H₂O₂. La percepción de ET parece ser importante en la producción de H₂O₂ dependiente del 2,4-D, a juzgar por los resultados con NO₃Ag. La reducción del H₂O₂ producida por el EDTA sugiere que además de prevenir la producción de \cdot OH también podría reducir la producción de H₂O₂ por inhibición de metaloenzimas implicadas en la generación de esta ROS.

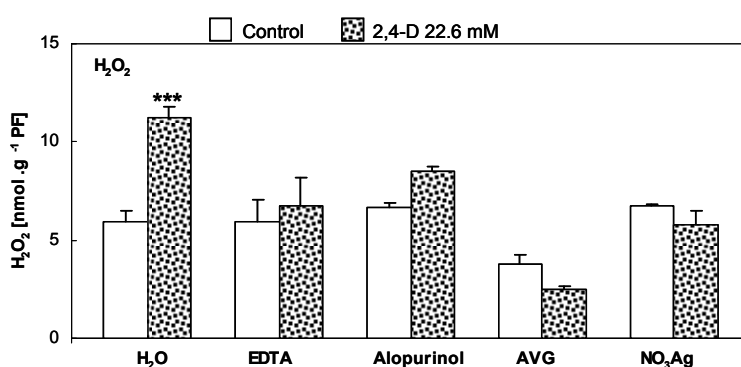


Figura 4.39: Producción de H₂O₂ en hojas de brotes de plantas de guisante en presencia de 2,4-D 20 μ M e inhibidores de ROS. EDTA (200 μ M): ácido etilendiaminotetraacético, Alopurinol (2 mM), AVG (50 μ M), aminoetoxivinil glicina, NO₃Ag (10 mM). Los valores representan la media \pm SEM de tres determinaciones diferentes. Las diferencias eran significativas con $p < 0,005$ (***) según el test *t* de Student.

Resultados

Para determinar el efecto del alopurinol sobre la actividad XOD, se ensayó esta actividad en geles de poliacrilamida en muestras procedentes de brotes incubados en presencia y ausencia de alopurinol. Como se observa en la figura 4.40 el alopurinol, reducía ligeramente la actividad XOD, lo que podría explicar la reducción de la tasa de producción de H_2O_2 observada previamente.

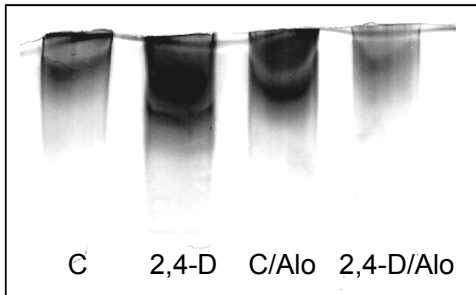


Figura 4.40: Efecto del 2,4-D sobre la actividad XOD en geles. Las proteínas (200 μ g) se separaron mediante electroforesis nativa en geles de poliacrilamida (6 %, p/v) y tinción específica de XOD. Alo: alopurinol (2 mM).

4.3.1.2 Regulación de la Capacidad Antioxidante

4.3.1.2.1 Antioxidantes Enzimáticos

Con objeto de profundizar en el papel de las ROS en el desarrollo de la epinastia foliar, se estudió la actividad de antioxidantes enzimáticos en los distintos tratamientos utilizados en brotes.

La actividad catalasa presentaba un ligero aumento en el tratamiento con 2,4-D 20 μ M, mientras la incubación con EDTA y alopurinol parecía influir negativamente sobre la actividad de esta enzima, provocando una disminución con respecto a los controles de brotes control y 2,4-D (Fig 4.41).

La actividad SOD, en los brotes incubados con EDTA no presentaba ningún cambio con respecto a los controles con y sin 2,4-D. Sin embargo, en presencia de alopurinol esta actividad se reducía notablemente mostrando un leve aumento en presencia de 2,4-D.

La actividad total de la peroxidasa medida como la guayacol peroxidasa, aumentaba en presencia de 2,4-D 20 μ M y se reducía al nivel del control sin 2,4-D en presencia de EDTA, sin embargo, la incubación con alopurinol provocaba un notorio incremento en esta actividad tanto en control como en 2,4-D (Fig. 4.41).

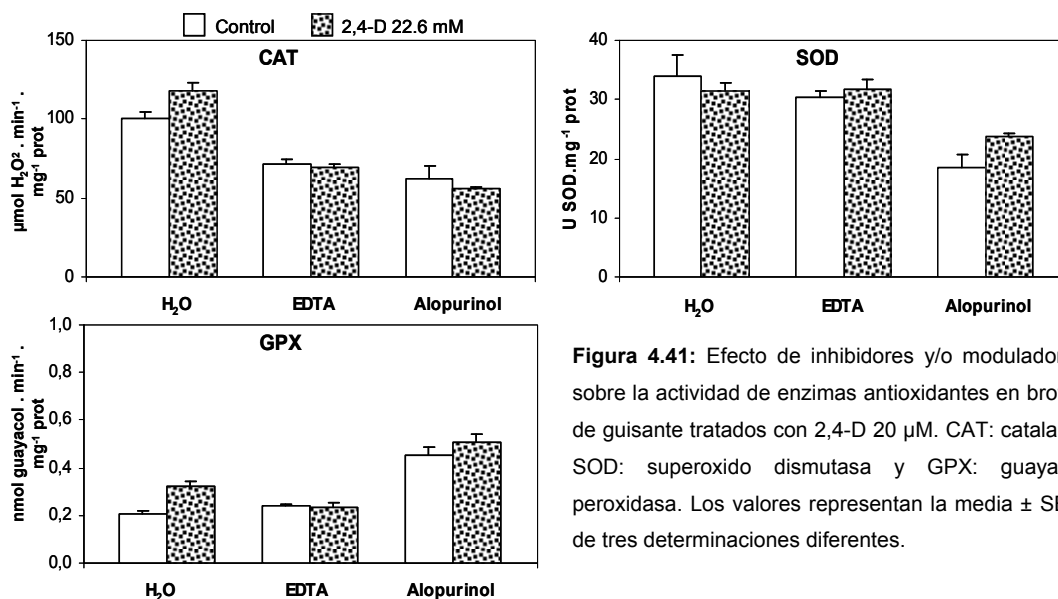


Figura 4.41: Efecto de inhibidores y/o moduladores sobre la actividad de enzimas antioxidantes en brotes de guisante tratados con 2,4-D 20 µM. CAT: catalasa; SOD: superóxido dismutasa y GPX: guayacol peroxidasa. Los valores representan la media ± SEM de tres determinaciones diferentes.

En los brotes incubados con EDTA se determinó la actividad de la glutación-S-transferasa, la cual se reducía levemente en presencia de este quelante de metales, con respecto al tratamiento con 2,4-D (Fig. 4.42). Sin embargo el EDTA producía un aumento significativo en la actividad GST con respecto al control y 2,4-D sin EDTA.

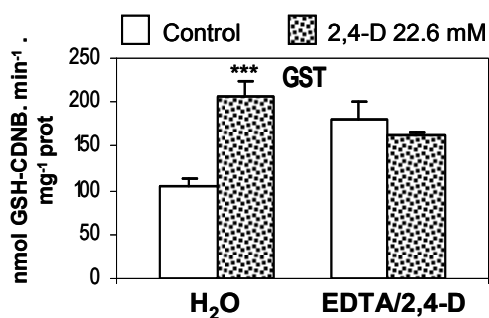


Figura 4.42: Efecto del EDTA (200 µM), sobre la actividad glutación-S-transferasa (GST) en brotes incubados con 2,4-D 20 µM. Las diferencias eran significativas con $p < 0,005$ (***) . El efecto del EDTA sobre la actividad presentó diferencias significativas con respecto al tratamiento control, con un $p = 0,019$ para EDTA y $p = 0,000$ para EDTA-2,4-D, de acuerdo con el test *t* de Student.

A la vista de estos resultados, el efecto protector del EDTA y el alopurinol frente al 2,4-D no parece ser debido a modificaciones de la actividad de los sistemas antioxidantes, si no más bien de la producción de ROS.

4.3.1.2.2 Antioxidantes no Enzimáticos

El análisis del contenido de ascorbato total de los brotes de plantas control y tratadas con 2,4-D, mostró resultados similares a lo obtenidos en la zona apical de plantas de guisante sometidas al tratamiento por pulverización de 2,4-D 22,6 mM (ver apartado

Resultados

4.2.2.3, Fig. 4.17). El tratamiento con EDTA provocó un ligero aumento en el contenido de ascorbato total en los brotes control y tratados con 2,4-D, si bien no era estadísticamente significativo. Sin embargo, el alopurinol incrementaba significativamente el contenido total de ASC, tanto en los brotes control como los tratados con 2,4-D. Este mayor contenido de ascorbato total se debía a la forma oxidada. Contrariamente, el 2,4-D favorecía una reducción de la tasa de ASC/DHA, que era revertida por el EDTA y reducida por el Alopurinol (Fig. 4.43).

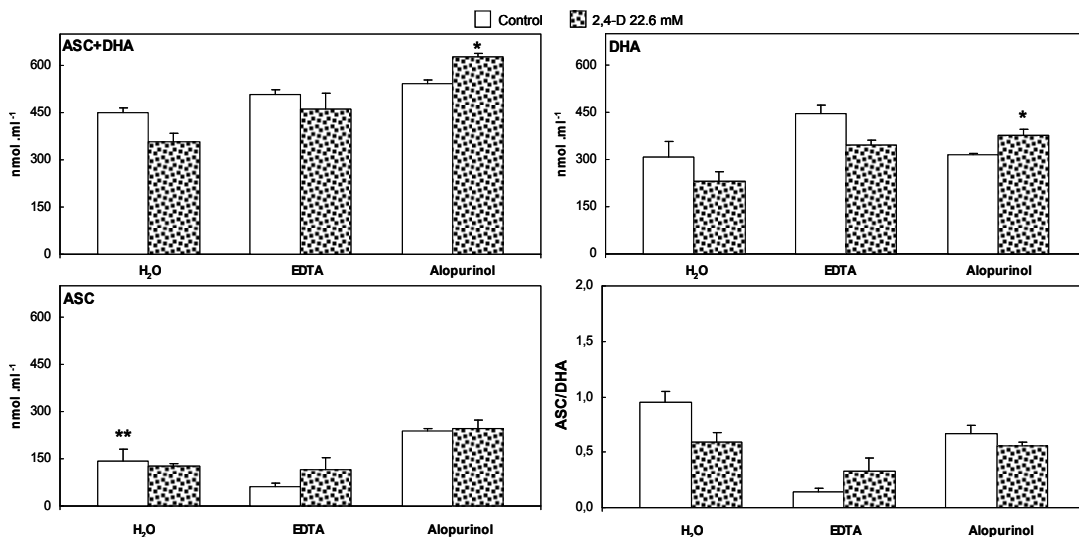


Figura 4.43: Efecto del 2,4-D e inhibidores, sobre el contenido de ascorbato en brotes. ASC+DHA, ascorbato total; ASC, ascorbato reducido; DHA, ascorbato oxidado. Los brotes fueron incubados en soluciones conteniendo 2,4-D 20 μ M y/o su combinación con EDTA 200 μ M y Alopurinol 2 mM, durante 18 h. Las diferencias eran significativas con $p < 0,05$ (*) y $p < 0,01$ (**), de acuerdo con el test *t*.

El análisis del contenido de glutatión total en los brotes control y tratados con 2,4-D 20 μ M mostró resultados similares a los observados en la zona apical de la planta pulverizada con 2,4-D 22,6 mM (ver Fig. 4.16), detectándose un aumento muy significativo en los brotes tratados con 2,4-D 20 μ M. Este incremento era revertido por el tratamiento con EDTA 200 μ M, alcanzando niveles similares a los observados en el control sin tratamiento. Resultados similares se obtuvieron con el alopurinol 2 mM. En el tratamiento con 2,4-D la forma predominante de glutatión era la reducida, sin embargo, lo contrario ocurría en los brotes incubados con EDTA, donde la forma predominante era la oxidada. Algo similar ocurrió en el tratamiento con alopurinol, exceptuando su efecto sobre los brotes control, donde el mayor aporte al contenido total de glutatión provenía de la forma reducida (Fig. 4.44).

La relación GSH/GSSG, se reducía significativamente como consecuencia del tratamiento con EDTA y era significativamente incrementada en los brotes control incubados con alopurinol.

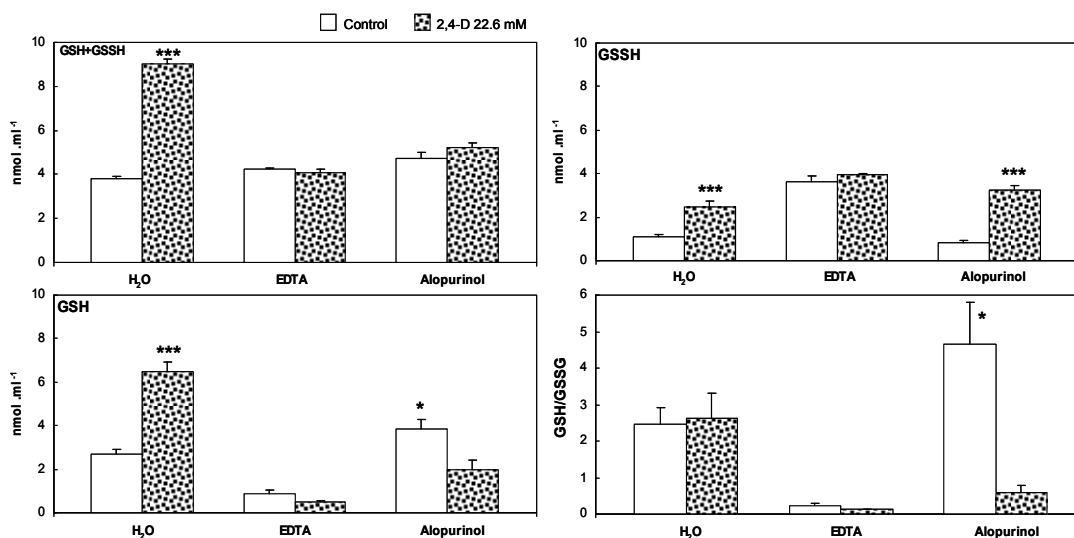


Figura 4.44: Efecto del 2,4-D e inhibidores, sobre el contenido de glutatión en brotes. GSH+GSSG, glutatión total; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado. Los brotes fueron incubados en soluciones conteniendo 2,4-D 20 μ M y/o su combinación con EDTA 200 μ M y Alopurinol 2 mM, durante 18 h. Las diferencias eran significativas con $p < 0,05$ (*) y $p < 0,005$ (***), según el test *t* de Student.

4.3.2 Regulación de la Producción de Etileno

Con el fin de determinar la relación existente entre el efecto de los inhibidores que reducían la epinastia y la producción de etileno, se determinó la producción de esta hormona en los brotes incubados con distintos inhibidores.

Los brotes incubados con EDTA presentaban una reducción significativa en la emisión de etileno con respecto al tratamiento con 2,4-D, sin embargo los niveles de etileno continuaban por encima del control. Por su parte el alopurinol no provocaba cambios en el patrón de emisión de etileno observado en control y 2,4-D. El tratamiento con AVG producía una reducción en la producción de esta hormona en presencia del 2,4-D de casi 10 veces, por lo que se comprobó el efecto de este inhibidor sobre la síntesis de etileno. Sin embargo en los brotes incubados con un bloqueante de los receptores de etileno el NO_3Ag , como era de esperar no se reducía completamente la producción de este (Fig. 4.45).

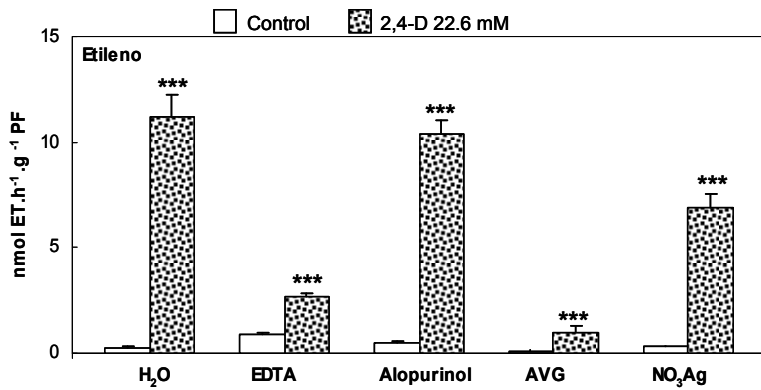


Figura 4.45: Efecto de inhibidores sobre la producción de etileno en brotes. Los brotes fueron incubados con una solución de 2,4-D 20 μ M y en combinación con: EDTA 200 μ M, Alopurinol 2 mM, AVG (amino etoxi vinil glicina) 50 μ M y NO₃Ag 10 mM. Los valores representan la media \pm SEM de dos determinaciones diferentes. Las diferencias eran significativas con $p < 0,005$ (***), según el test *t* de Student.

4.4 Papel de los Peroxisomas en la Respuesta al 2,4-D

4.4.1 Efecto del 2,4-D sobre Peroxisomas

4.4.1.1 Movimiento de Peroxisomas en Respuesta al Estrés por 2,4-D

La distribución intracelular de los orgánulos juega un papel muy importante en la capacidad de la planta para sobrellevar situaciones de estrés, así cada tipo de orgánulo responde a los cambios medioambientales de manera independiente, pero armónica y coordinada con los demás orgánulos celulares. En trabajos previos se observó que los peroxisomas modifican su dinámica en respuesta al estrés oxidativo impuesto por el Cd (Rodríguez-Serrano, 2007). Para determinar si el 2,4-D también afecta la dinámica de estos orgánulos, y su funcionalidad, en este trabajo se decidió analizar el movimiento de los mismos, en plantas mutantes de *A. thaliana* que expresaban la GFP-SKL (péptido señal de peroxisoma), sometidas al tratamiento con 2,4-D 22,6 mM durante 72 h. Concretamente se analizó el movimiento de los peroxisomas en células epidérmicas.

El análisis del movimiento de los peroxisomas mediante microscopía láser confocal, permitió observar que los peroxisomas presentaban una forma esférica u ovalada, y varios tipos de movimiento como, aleatorio y oscilatorio, lento y rápido, direccional y bidireccional, estacionario y activo (Fig. suplementaria 1A, Anexo I en CD), adicionalmente se observó que el movimiento de estos orgánulos es predominante en los contornos celulares (Fig. suplementaria 1C, Anexo 1 en CD). La velocidad de los peroxisomas de plantas tratadas con 2,4-D disminuyó significativamente por la acción del tratamiento con el herbicida 2,4-D con respecto al movimiento de los peroxisomas de las plantas control (Fig 4.46, Fig. suplementaria 1A y 1B Anexo I, en CD). Por otro lado el trayecto recorrido también era

considerablemente inferior por efecto del 2,4-D. A la vista del efecto protector del EDTA sobre la epinastia, se analizó el efecto de ese compuesto sobre el movimiento de los orgánulos. El tratamiento con el quelante de metales EDTA revertía el efecto del herbicida 2,4-D sobre el movimiento, incrementándolo incluso a niveles superiores a los observados en las plantas control, pero también incrementaba esta velocidad en las plantas control (Fig 4.46, Fig. suplementaria 2A y 2B Anexo II, en CD).

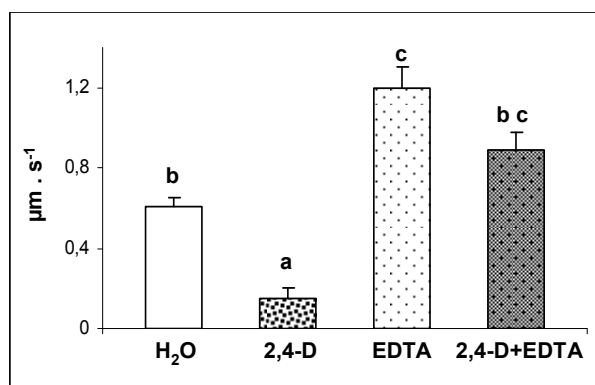


Figura 4.46: Efecto del tratamiento con 2,4-D y EDTA, sobre la velocidad de desplazamiento de peroxisomas. Las determinaciones se efectuaron en la epidermis de hojas de plantas de *Arabidopsis* GFP-SKL control y tratadas con 2,4-D 22,6 mM durante 72 h. Los datos representan la media \pm SEM, de 10 determinaciones. Las diferencias fueron significativas con $p < 0,05$, según la comparación múltiple de variancias Duncan.

Los peroxisomas se mueven a través de filamentos de actina según lo demostraron Mano y col (2002), utilizando latrunculina, inhibidor de la polimerización de la actina, que causa una interrupción del movimiento de peroxisomas (Mano y col., 2002). Con estos indicios, se planteó el estudio del efecto del 2,4-D sobre el citoesqueleto de actina.

4.4.1.2 Análisis Estructural del Citoesqueleto

Para determinar si el 2,4-D (22,6 mM durante 72 h) produce alteraciones del citoesqueleto de actina, se ha estudiado la estructura del citoesqueleto mediante microscopía láser confocal en fragmentos de hojas de plantas mutantes de *Arabidopsis* que expresan la GFP unida a la fimbrina, proteína de unión entre los filamentos de actina.

En la figura 4.47 A y B se observa como el entramado de actina se reduce notablemente como consecuencia del tratamiento con 2,4-D. Adicionalmente, se estudió el efecto de algunos inhibidores, específicamente de aquellos que tuvieron una acción positiva previniendo los síntomas de epinastia en brotes de guisante. Para llevar a cabo este estudio se incrementaron las concentraciones de los inhibidores para su aplicación fue por pulverización.

Como se ha mencionado anteriormente el EDTA previene la curvatura de hojas en brotes de guisante, y el análisis del citoesqueleto de actina en presencia de EDTA mostró

Resultados

una recuperación completa del entramado de actina en las plantas tratadas con 2,4-D, siendo muy parecido al de las plantas control (Fig. 4.47 C y D).

El AVG, inhibidor de la síntesis de etileno, recuperaba parcialmente los daños ocasionados por el 2,4-D (Fig. 4.47 E y F), al igual que sucedía con el piruvato sódico, utilizado como antioxidante (Fig. 4.47 I y J). En presencia de alopurinol no se logró observar una mejoría apreciable (Fig. 4.47 H y I). La aplicación de piruvato sódico como antioxidante resultó en una leve mejoría del entramado del citoesqueleto (Fig. 4.47 I y J). Finalmente el uso de cantaridina, un inhibidor de fosfatasa previno en parte la pérdida del entramado de actina (Fig. 4.47 K-L).

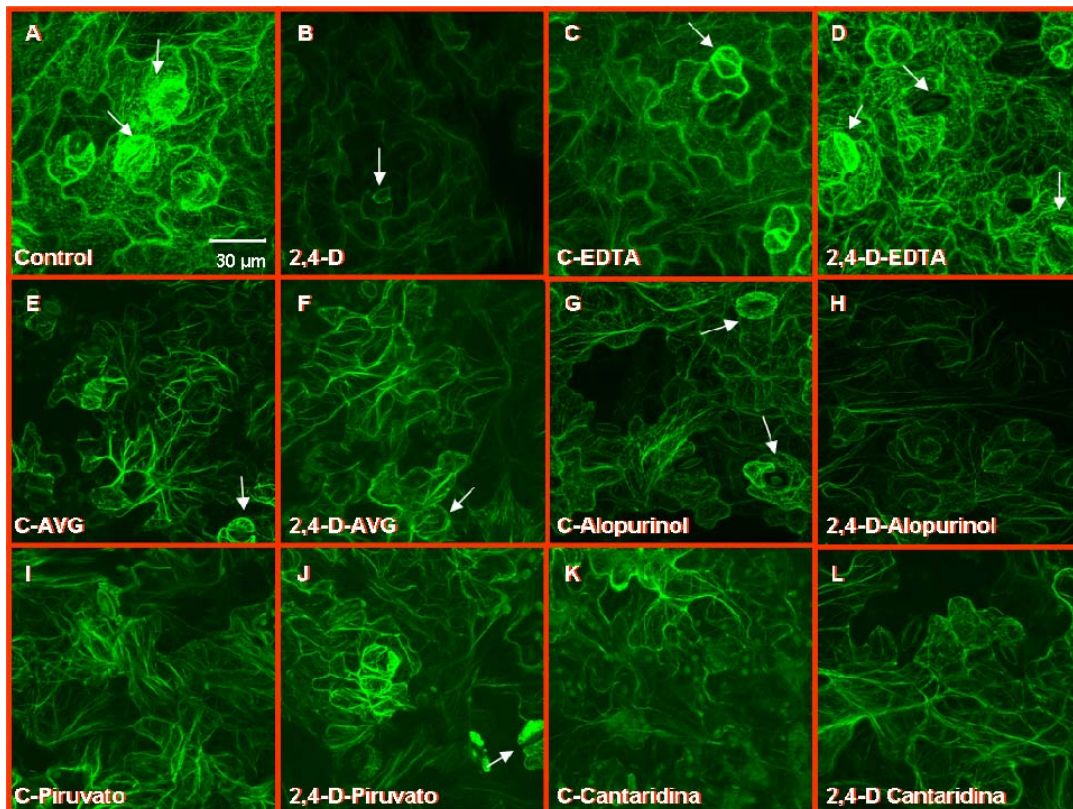


Figura 4.47: Efecto del 2,4-D sobre la estructura del citoesqueleto. El citoesqueleto se observó mediante microscopía láser confocal utilizando plantas de *Arabidopsis* que expresan la proteína de fusión fimbrina-GFP. Las imágenes son el resultado de la composición de 20 secciones en el eje Z. Tanto los inhibidores como el 2,4-D se aplicaron por vía foliar, el análisis se realizó 72 h después del tratamiento. Control y 2,4-D (22,6 mM) (A-B); EDTA (10 mM) y 2,4-D+EDTA (C-D); AVG (100 µM) y 2,4-D+AVG (E-F); alopurinol (10 mM) y 2,4-D+alopurinol (G-H); piruvato (5 mM) y 2,4-D+piruvato (I-J), cantaridina (10 mM) y 2,4-D+cantaridina (K-L).

De estos resultados se podría sugerir que los daños sobre el citoesqueleto, producidos por el 2,4-D son dependientes de ROS y ET, y están regulados por procesos de fosforilación de proteínas.

Para determinar las causas de los cambios observados en la estructura del citoesqueleto, se analizó los posibles cambios o modificaciones postraduccionales de la actina que puedan afectar a la estructura del citoesqueleto.

En células animales se ha descrito que la actina puede oxidarse y también experimentar modificaciones por S-nitrosilación, en situaciones de estrés oxidativo (Sun y col., 2006), ambos tipos de modificaciones pueden afectar el grado de polimerización de la actina, y por tanto la estructura del citoesqueleto. En células animales se ha descrito que la actina puede oxidarse y también experimentar modificaciones por S-nitrosilación en situaciones de estrés oxidativo (Sun y col., 2006), ambos tipos de modificaciones pueden afectar el grado de polimerización de la actina, y por tanto a la estructura del citoesqueleto.

El análisis del grado de oxidación de la actina se realizó mediante derivatización de las proteínas de extractos crudos de hojas de *Arabidopsis* tratadas o no con 2,4-D, con DNPH y la purificación de las proteínas oxidadas mediante inmunoprecipitación con la proteína A unida al anti-DNPH. Para identificar la actina entre las proteínas oxidadas se utilizaron anticuerpos específicos frente a esta proteína. En la figura 4.48 A se observa que en extractos crudos de plantas control y tratadas con 2,4-D no hay cambios aparentes en el contenido de actina; no obstante en extractos derivatizados con DNPH e inmunoprecipitados con la proteína A unida al anticuerpo frente al DNP se observaba un claro incremento en los niveles de oxidación de la actina en las plantas tratadas con 2,4-D (Fig. 4.48 B). Lo que permite concluir que en las condiciones estudiadas, la actina experimenta procesos de oxidación.

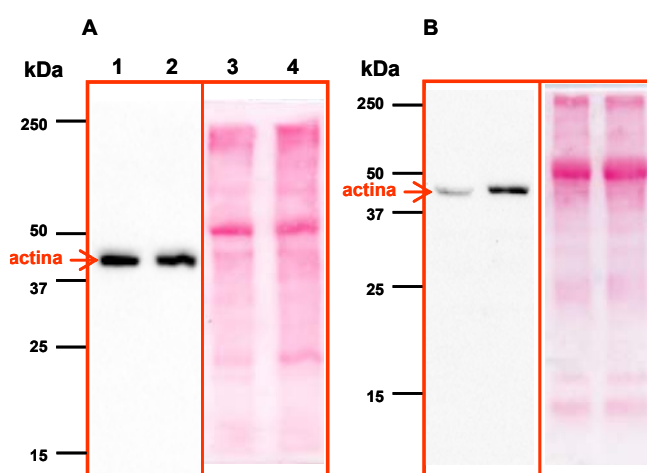


Figura 4.48: Identificación del grado de oxidación de la actina en hojas de *Arabidopsis*. (A): líneas 1 y 2 detección inmunológica en extractos crudos de hojas de plantas de *Arabidopsis* control y tratadas con 2,4-D (22,6 mM 72 h), respectivamente; líneas 3 y 4 tinción con Rojo Ponceau (40 μ g); (B): líneas 1 y 2 extractos derivatizados inmunoprecipitados frente a anti-DNP con proteína A, control y 2,4-D, respectivamente; líneas 3 y 4 tinción con Rojo Ponceau (20 μ l). En los dos paneles, los marcadores de masa molecular se sitúan a la izquierda.

Resultados

Paralelamente se detectó el contenido en grupos carbonilo y el grado de oxidación de la actina en muestras tratadas con el inhibidor de la XOD, alopurinol 10 mM y el quelante de metales EDTA 10 mM. En presencia de alopurinol parece haber una leve reducción de la oxidación de proteínas tanto en controles como en plantas tratadas con 2,4-D (Fig. 4.49 A), al igual que una reducción en la oxidación de la actina (Fig. 4.49 B).

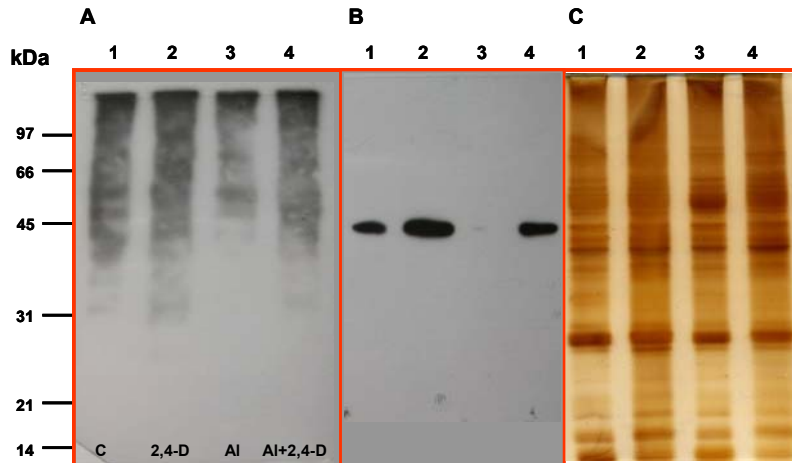


Figura 4.49: Efecto del 2,4-D (22,6 mM 72 h) y del alopurinol sobre el contenido de grupos carbonilo y el grado de oxidación de la actina en hojas de *Arabidopsis*. (A): detección inmunoquímica de carbonilos en extractos derivatizados con DNPH, líneas 1-4 corresponden a control, 2,4-D, alopurinol y 2,4-D+alopurinol, respectivamente. (B): detección inmunoquímica de la actina en los extractos derivatizados del panel A. (C): tinción de proteínas con plata (10 μ l) de los extractos derivatizados del panel A. Los marcadores de masa molecular se sitúan a la izquierda.

El efecto del EDTA parece ser mayor previniendo claramente la oxidación de las proteínas, ya que se reduce considerablemente tanto el número como la intensidad de las proteínas oxidadas en presencia de 2,4-D (Fig. 4.50 A, líneas 3 y 4). En estas condiciones la oxidación de la actina era reducida por efecto del EDTA (Fig. 4.50. B: líneas 3 y 4) llegando a los niveles de oxidación basal del control. Estos resultados demuestran que la alteración del citoesqueleto por efecto del 2,4-D se debe fundamentalmente a procesos de oxidación de la actina, dependientes de ROS y más concretamente de \cdot OH, ya que la aplicación de EDTA preserva tanto la oxidación de la actina, como la estructura del citoesqueleto. La reducción parcial de ambos procesos por el alopurinol, sugiere que en parte, la XOD es una de las fuentes de ROS, aunque no es la única.

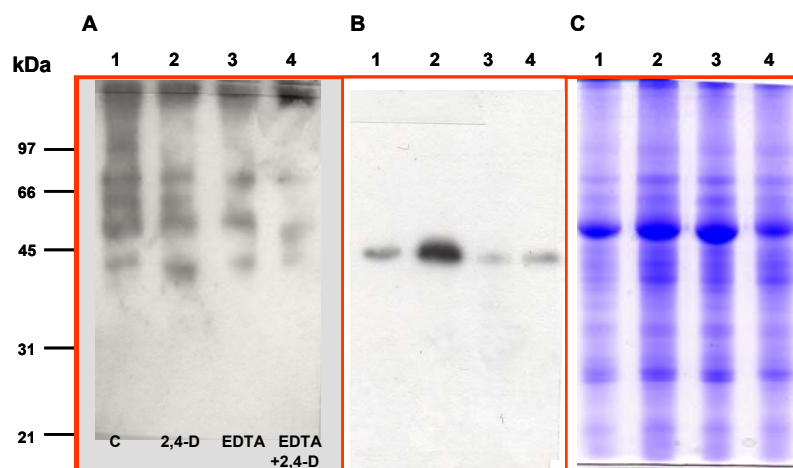


Figura 4.50: Efecto del 2,4-D (22,6 mM 72 h) y del alopurinol sobre el contenido de grupos carbonilo y grado de oxidación de la actina en hojas de *Arabidopsis*. (A): detección inmunoquímica de carbonilos en extractos derivatizados con DNPH, líneas 1 - 4 corresponden a control, 2,4-D, EDTA y 2,4-D+EDTA, respectivamente. (B): detección inmunoquímica de la actina en los extractos derivatizados del panel A. (C): tinción de proteínas con plata (10 µl) de los extractos derivatizados del panel A. Los marcadores de masa molecular se sitúan a la izquierda.

Estos resultados sugieren que la epinastia inducida por el 2,4-D se debe en gran parte a la desorganización del citoesqueleto de actina y posiblemente es dependiente de procesos de oxidación de esta proteína.

4.4.1.2.1 S-Nitrosilación de la Actina

La actina también es susceptible de procesos de S-nitrosilación que pueden afectar su grado de polimerización y por tanto la organización del citoesqueleto. Para determinar si este proceso está implicado en el efecto del 2,4-D (22,6 mM 72 h) sobre el citoesqueleto, se analizó el grado de S-nitrosilación de la actina. En primer lugar se analizó el patrón de proteínas S-nitrosiladas en los extractos de plantas control y tratadas con 2,4-D (Fig. 4. 51 A). El perfil de proteínas S-nitrosiladas fue similar en plantas control y tratadas con 2,4-D, observándose al menos 8 proteínas, con los siguientes pesos moleculares: 100, 75, 50, 45, 37, 22, 18 y 16 kDa. De estas proteínas, la de 45 kDa que podría corresponder a la actina, si bien solo era visible en las plantas tratadas con 2,4-D y tras la aplicación de GSNO. Para comprobar este resultado, se procedió a la purificación de las proteínas S-nitrosiladas mediante inmunoprecipitación con el anticuerpo frente a la biotina, y la detección de la actina

Resultados

mediante el uso de anticuerpos específicos (Fig. 4.51 C). De esta forma, se comprobó que la actina se encuentra S-nitrosilada por efecto del tratamiento con 2,4-D.

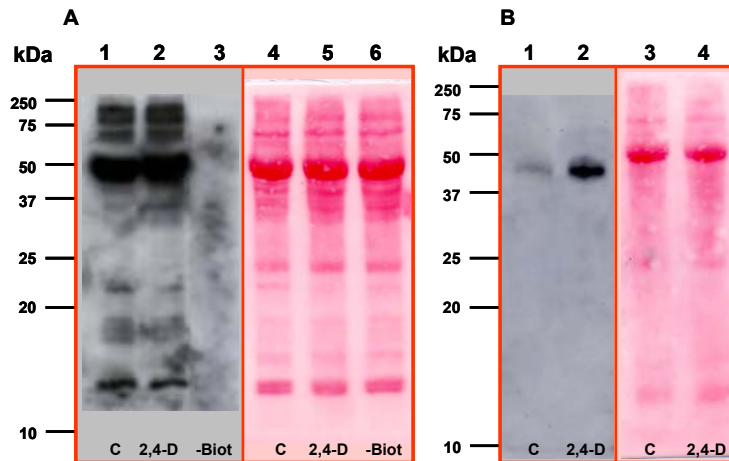


Figura 4.51: Identificación del grado de S-nitrosilación de la actina. (A): proteínas S-nitrosiladas de hojas de *Arabidopsis*, 1 control, 2 tratadas con 2,4-D y 3 control sin biotina, líneas 4, 5 y 6 control, 2,4-D y control sin biotina respectivamente teñidas con Rojo Ponceau (20 μ l); (B): detección de la actina en proteínas S-nitrosiladas inmunoprecipitadas con anti-biotina e inmunodetectadas con anticuerpo frente a la actina, 1. control y 2. tratadas con 2,4-D, 3 y 4 proteínas control y 2,4-D teñidas con Rojo Ponceau. Los marcadores de masa molecular se sitúan a la izquierda.

A la vista de estos resultados, podemos concluir que la oxidación y S-nitrosilación de la actina podrían ser responsables de la modificación de la estructura del citoesqueleto y por tanto de la movilidad de los peroxisomas y otros orgánulos, lo que puede afectar de una forma severa al metabolismo celular. Esta constituye la primera referencia sobre los mecanismos que pueden afectar al citoesqueleto en presencia del herbicida 2,4-D y su importancia en la toxicidad de este compuesto.

4.4.1.3 Efecto del 2,4-D sobre la Fosforilación de Proteínas Peroxisomales

Algunos de los efectos causados por el herbicida 2,4-D son dependientes de procesos de fosforilación y desfosforilación de proteínas. Con el propósito de obtener más información sobre la regulación de la respuesta al herbicida 2,4-D, se estudió el patrón de proteínas fosforiladas en peroxisomas de guisante procedentes de plantas control y tratadas con 2,4-D.

Como paso previo, se estudió el efecto del 2,4-D sobre el patrón de proteínas fosforiladas de extractos crudos de hojas, mediante la tinción específica de las mismas con Pro-Q Diamond. Como se observa en la figura 4.52, el tratamiento con 2,4-D producía algunos cambios en el patrón de proteínas fosforiladas en extractos crudos de hojas de

guisante. El tratamiento parecía causar una disminución en la fosforilación de algunas proteínas correspondientes a las bandas de 50 y 30 kDa, y el aumento de la intensidad de las bandas de aproximadamente 75 y 40 kDa.

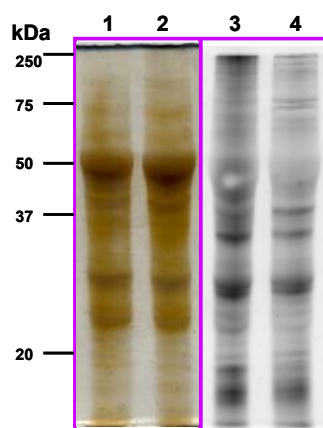


Figura 4.52: Patrón de proteínas fosforiladas en extractos crudos de plantas control y tratadas con 2,4-D 22,6 mM. Las proteínas (80 µg) se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 % (p/v) en condiciones desnaturalizantes. Líneas 1 y 2 tinción con plata para proteínas totales, control y 2,4-D respectivamente. Líneas 3 y 4 tinción con Pro-Q Diamond específica para proteínas fosforiladas, control y 2,4-D, respectivamente. Los marcadores de masa molecular se sitúan a la izquierda.

El patrón de proteínas fosforiladas de peroxisomas de hojas de guisante control y tratados con 2,4-D, se evaluó mediante purificación de las proteínas fosforiladas por cromatografía de afinidad (8 mg de proteína). Tras la elución de la columna se obtuvieron 5 fracciones, de las cuales las número 2 y 3 contenían la mayor concentración de proteínas fosforiladas. El análisis del contenido de proteínas mediante el método del RC DC en la mezcla de ambas fracciones demostró un incremento del contenido total de proteínas fosforiladas de 2,07 veces por efecto del tratamiento con 2,4-D. En base a estos resultados podemos decir que el porcentaje de proteínas fosforiladas peroxisomales en condiciones fisiológicas es de 0,5% y este se incrementaba hasta un 1.2% en el tratamiento con 2,4-D

En la figura 4.53 se muestra el patrón de proteínas no fosforiladas (Fig. 4.53 A) provenientes de los lavados de la columna; y el patrón de proteínas fosforiladas correspondientes a las fracciones 1,4 y 5, donde se aprecia un aumento de la intensidad de algunas bandas dependiente del tratamiento con 2,4-D.

Resultados

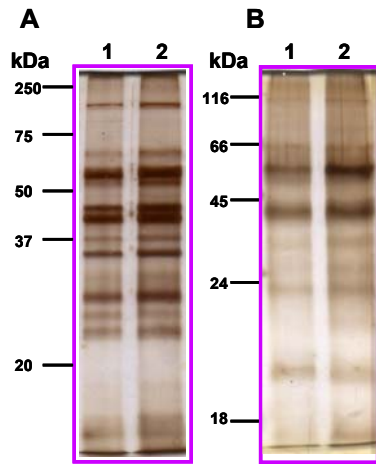


Figura 4.53: Patrón de proteínas de peroxisomas de hojas de plantas de guisante control y tratadas con 2,4-D 22,6 mM. (A): tinción con plata de proteínas no fosforiladas (80 μ g de proteína). 1, control y 2, tratadas con 2,4-D; (B): tinción con plata de proteínas fosforiladas 40 μ g de proteína correspondientes a las fracciones 1, 4 y 5. 1, control y 2, 2,4-D.

El tratamiento con 2,4-D producía un aumento en la fosforilación de algunas proteínas, sin embargo, en este análisis preliminar resultó difícil establecer que proteínas se veían modificadas y en qué proporción se encontraban fosforiladas con respecto al control, para lo cual se recurrió al análisis mediante 2D-DIGE, que permite separar simultáneamente las proteínas de dos muestras diferentes e identificarlas mediante el marcaje con distintos fluoróforos. El análisis de estas proteínas mediante electroforesis bidimensional se muestra en la figura 4.54, para ello las proteínas peroxisomales de plantas control se marcaron con Cy5 y las de peroxisomas procedentes de plantas tratadas con 2,4-D se marcaron con Cy3. Con el fin de comparar ambas muestras, las proteínas de plantas control y tratadas con 2,4-D se separaron conjuntamente en un mismo gel y se analizó la fluorescencia de cada uno de los fluoróforos por separado (Fig. 4.54, A y B), así como la fluorescencia debida a las proteínas totales, marcadas con Cy2 (Fig. 4.54 C), la fluorescencia solapada de Cy5 y Cy3 (Fig. 4.54 D), y la fluorescencia solapada de Cy2, Cy3 y Cy5 (Fig. 4.54 E). De esta forma, se pudo observar que por efecto del tratamiento con 2,4-D tiene lugar un incremento de las proteínas comprendidas en los PI 6-10 (Fig 4.54 y Tabla 4.2). Las proteínas fosforiladas se tiñeron con Pro-Q Diamond (Fig. 4.54 F).

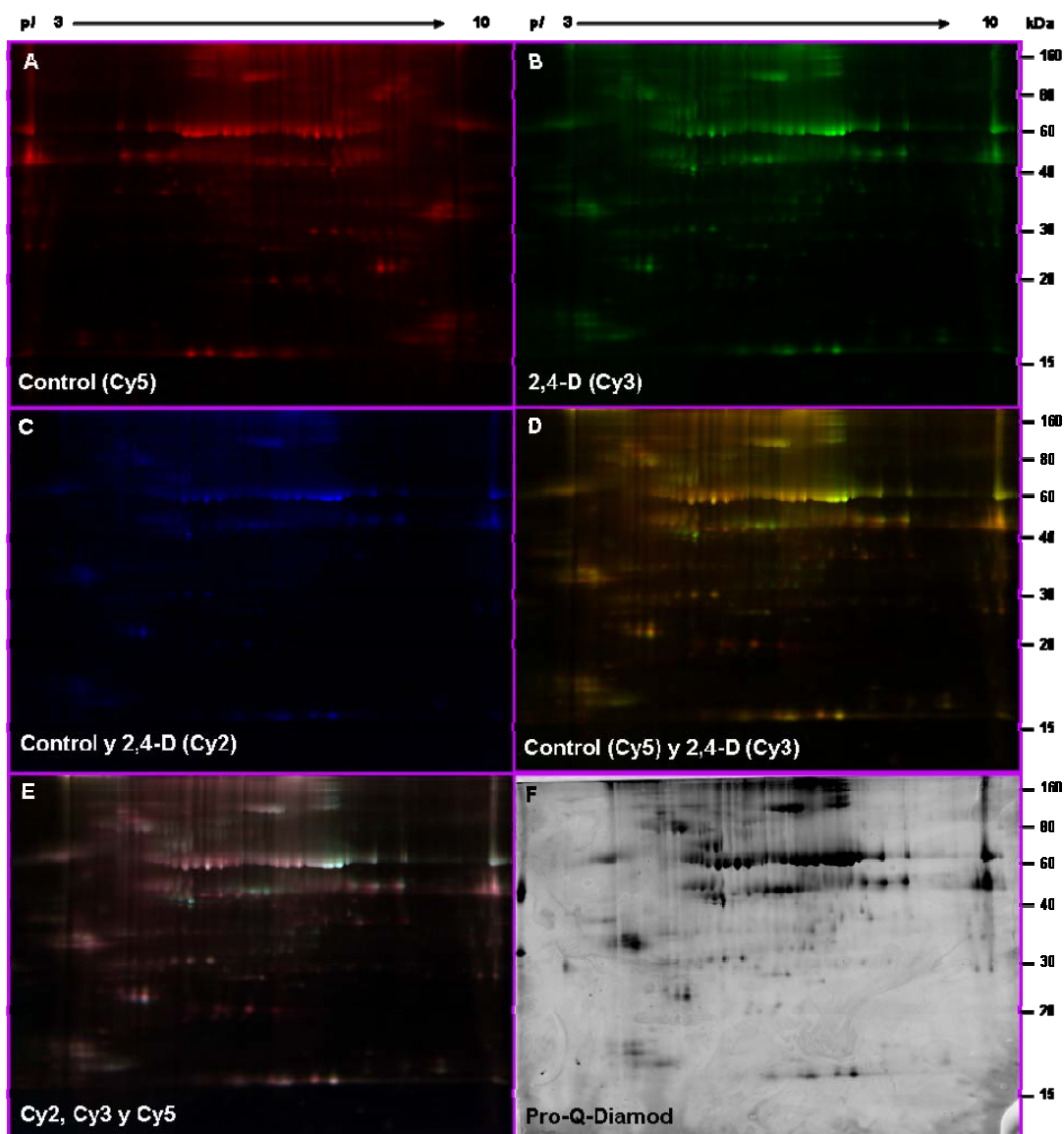


Figura 4.54: Análisis 2D-DIGE de peroxisomas de hojas de plantas de guisante control y tratadas con 2,4-D 22,6 mM, durante 72 h. (A): proteínas de peroxisomas de plantas control marcadas con Cy5; (B): proteínas de peroxisomas de plantas tratadas con 2,4-D marcadas con Cy3; (C): proteínas totales marcadas con Cy2; (D): solapamiento de proteínas control-Cy5 y tratadas con 2,4-D-Cy3 (E): solapamiento de proteínas totales-Cy2, control-Cy5 y tratadas con 2,4-D-Cy3 y (F): tinción específica de proteínas fosforiladas con Pro-Q Diamond.

Resultados

Simultáneamente se efectuó una tinción de las proteínas totales con Sypro. En la figura.4.55, se muestra el gel teñido con Sypro y las proteínas seleccionadas para su identificación. El análisis comparativo de los gels teñidos con Pro-Q Diamond y Sypro muestra el mismo patrón de proteínas, lo que demuestra que las proteínas analizadas corresponden realmente a proteínas fosforiladas.

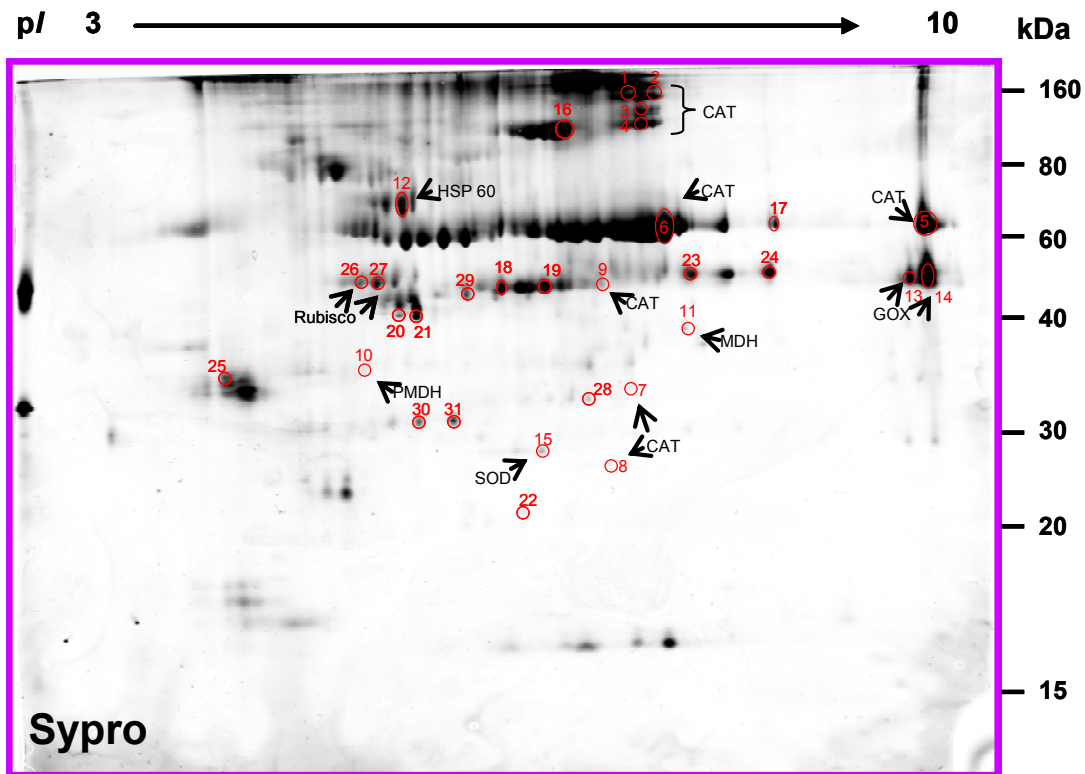


Figura 4.55: Tinción de proteínas totales Sypro. Los círculos resaltan las “spots” o manchas analizadas y su posición se identifica con un número, el cual corresponde a las proteínas analizadas por MALDI-TOF-TOF que se señalan en la tabla 4.2 de este apartado.

El análisis de cada gel se realizó utilizando los módulos Differential In-gel Analysis (DIA) y Biological Variation Analysis (BVA) de DeCyder, lo que nos permitió obtener las diferencias cuantitativas de las proteínas de los peroxisomas control y tratados con 2,4-D. En la figura 4.56 se muestra un ejemplo del análisis cuantitativo utilizando la mancha 6 (1085) que corresponde a la catalasa.

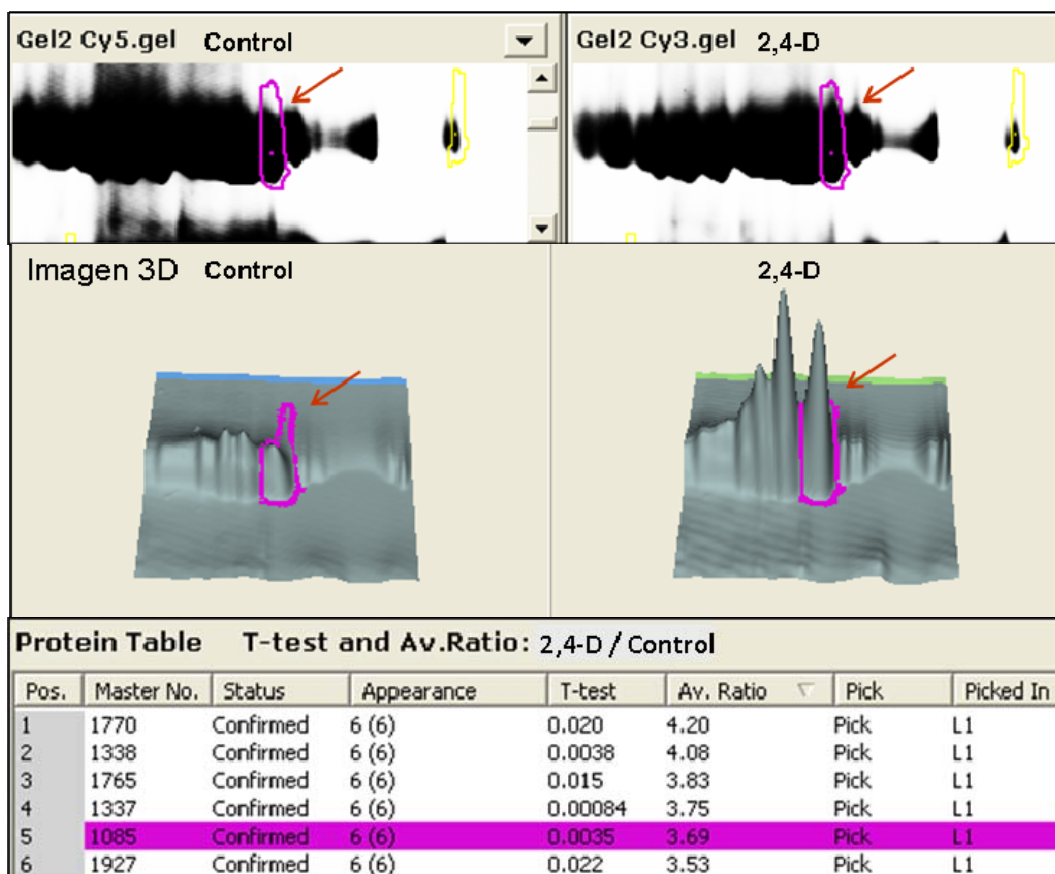


Figura 4.56: Análisis cuantitativo de manchas según BVA (Biological variation Analysis). La mancha número 6 (1085) resaltada con color magenta, que se identificó posteriormente como la catalasa, mostraba un aumento significativo con respecto al control. En la figura las flechas rojas señalan dicho aumento en la abundancia y la imagen 3D muestra el análisis tridimensional de esta proteína. Las diferencias son significativas con un valor $p=0,0064$ y la abundancia de la proteína en el tratamiento es de una proporción de 3,69 a 1.

De acuerdo con las diferencias obtenidas mediante el marcaje por fluorescencia DIGE de las dos muestras, control y tratado (2,4-D 22,6 mM), se seleccionaron las manchas que mostraron diferencias cuantitativamente significativas. En la tabla 4.2 se muestran las proteínas identificadas mediante MS-MALDI TOF, con una valoración mayor a 68 y un nivel de significancia del 0,05 ($p=0,05$). En esta se puede apreciar además el grado de diferencia con respecto a las proteínas de peroxisomas procedentes de plantas control.

Resultados

| Número de mancha | Abundancia | Score $p < 0,05$ * | Proteína (MS MALDI TOF) |
|------------------|----------------|--------------------|---|
| 1 (296) | 1,5 * | 437 * | Catalasa |
| 2 (310) | 2,19 ** | 417 * | Catalasa |
| 3 (427) | 1,57 | 227 * | Catalasa |
| 4 (516) | 1,94 | 298 * | Catalasa |
| 5 (1023) | | 323 * | Catalasa 3 |
| 6 (1085) | 3,69 *** | 425 * | Catalasa |
| 7 (1871) | 3,14 *** | 95 * | Catalasa |
| 8 (2185) | 2,47 * | 274 * | Catalasa |
| 9 (1323) | 2,53 * | Score <68 | Catalasa |
| 10 (1748) | -1,64 * | 69 * | PMDH1 NAD malato deshidrogenasa |
| 11 (1563) | 1,40 | 69 * | MDH Malato deshidrogenasa |
| 12 (924) | 1,66 ** | 127 * | HSP60 |
| 13(1327) | 1,01 | 118 * | GOX |
| 14 (1286) | -1,08 | 418 * | GOX |
| 15(2137) | 1,66 | Score <68 | SOD (59) 26.6 kD |
| 16 (538) | 1,9 *** | 563 >81 | Glicina deshidrogenasa |
| 17 (1016) | 2,18 *** | 553 >81 | Serina hidroximetil transferasa SHMT |
| 18 (1336) | 2,30 ** | 84 >68 | Piruvato deshidrogenasa α E1 |
| 19 (1338) | 4,08 *** | 88 >68 | Piruvato deshidrogenasa E1 |
| 20 (1471) | 3,18 | 143 >68 | Piruvato deshidrogenasa |
| 21 (1481) | 4,27 * | 252 >68 | Piruvato deshidrogenasa α E1 |
| 22 (2326) | -2,85 *** | 92 >68 | ATP sintasa |
| 23 (1236) | 1,80 | 308 >81 | Amino metil transferasa |
| 24 (1250) | 1,66 | 245 >81 | Amino metil transferasa |
| 25(1784) | -1,22 | 305 >81 | Ribonucleoproteína Acetil CoA transferasa (59) |
| 26 (1277) | -1,05 | 129 >81 | Rubisco |
| 27 (1284) | 1,16 | 134 >68 | Rubisco |
| 28 (1927) | 3,43 * | 42 <68 | CTR1 |
| 29(1379) | -1,18 | 123 >68 | Glutamina sintasa |
| 30(2007) | Score <68 (60) | Score <68 | ATPasa(60) |
| 31(2005) | Score <68 (44) | Score <68 | Glutarredoxina (51) Actina (44) |

Tabla 4.2: Proteínas fosforiladas identificadas por MALDI-TOF. En esta tabla se presenta el porcentaje de abundancia y el grado de significación de la proteína con respecto a las proteínas de los peroxisomas control, siendo (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ y (***) $p < 0,005$. La identificación de las proteínas se efectuó mediante el uso del programa Mascot y la base de datos NCBI nr, la puntuación de probabilidad superó el umbral establecido por el motor de búsqueda Mascot, siendo p -valor inferior al establecido como significativo. Los colores representan la ubicación de las proteínas, verde: peroxisomas; naranja: mitocondria; lila: cloroplasto y azul: otros. El número de spot se corresponde con el señalado en la figura 4.55.

Entre las proteínas identificadas cabe destacar varias CATs, la malato deshidrogenasa (MDH), la GOX, la HSP 60 y una SOD, que en base a su peso molecular podría tratarse de la Mn-SOD descrita en estos orgánulos. Estos resultados constituyen la primera aproximación al estudio del fosfoproteoma de peroxisomas, y sugieren una posible regulación de estas proteínas por fosforilación/desfosforilación, en respuesta al estrés por 2,4-D.

Además, de las proteínas peroxisomales, hay algunas proteínas fosforiladas procedentes de otros orgánulos como cloroplastos y mitocondrias. Estos resultados son compatibles con los resultados previos de caracterización de los gradientes de densidad de sacarosa utilizados para la purificación de estos orgánulos (López- Huertas y col., 1995).

Según este estudio, la contaminación cruzada de la fracción peroxisomal con cloroplastos y mitocondrias, está próxima al 1 – 2 %, respectivamente. La mayoría de estas proteínas son mitocondriales, como la piruvato deshidrogenasa, glicina deshidrogenasa y serina hidroximetiltransferasa, que experimentan los mayores incrementos con respecto al control. Entre las proteínas fosforiladas cloroplastídicas cabe destacar la Rubisco, y en retículo endoplasmático la CTR1, proteína receptora y reguladora de la respuesta a etileno.

DISCUSIÓN

Las auxinas regulan una gran variedad de aspectos del desarrollo y crecimiento de las plantas, entre los cuales se pueden nombrar la elongación celular, diferenciación de tejidos, el mantenimiento de la polaridad de los tejidos y la expansión de las hojas, entre otros (Benjamins y Scheres, 2008; Delker y col., 2008). El IAA es la principal auxina natural presente en la mayoría de las plantas y el fenoxiherbicida 2,4-D es una auxina sintética que se caracteriza por su especificidad por las plantas dicotiledóneas. Durante años se ha estudiado cuales son las características responsables de la susceptibilidad de las dicotiledóneas a este herbicida. Así, se han propuesto diversos factores que influyen en diferente grado a esta susceptibilidad, como son la arquitectura de la planta, el estado de desarrollo, aspectos moleculares como la presencia de ciertas proteínas transportadoras y receptoras para las auxinas, y la confluencia de estreses medioambientales.

El 2,4-D ha sido uno de los más exitosos herbicidas selectivos utilizados en la agricultura, sin embargo su excesivo uso ha generado graves efectos toxicológicos y problemas medioambientales, llegando a ser puesto bajo estricto control en 1987 por la agencia de protección medioambiental de América (EPA) (Bradberry y col., 2000; Chu y col., 2004). No obstante, el mecanismo celular y molecular que rige esta toxicidad no se conoce en profundidad. Numerosos estudios *in vitro* e *in vivo*, sugieren que el mecanismo de toxicidad del 2,4-D puede incluir alteraciones fisiológicas como el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Wedding y Black, 1961), cambios en el potencial de membrana (Lohse y Hedrich, 1992), formación de metabolitos reactivos y estrés oxidativo mediado por ROS (Romero-Puertas y col., 2004a; Teixeira y col., 2004).

En este estudio, nos hemos propuesto el análisis de los efectos provocados por la aplicación del 2,4-D a una concentración de 22,6 mM, sobre plantas de guisante de 21-28 días de edad y plantas de *Arabidopsis thaliana* de tres semanas de edad. El periodo de desarrollo de las plantas se correspondió con el periodo vegetativo de las dos especies utilizadas y los tratamientos fueron aplicados justo antes del período reproductivo, para evitar efectos hormonales adicionales al tratamiento. El periodo de tiempo del tratamiento de 72 h utilizado en este estudio, se escogió en función de la aparición de los síntomas más característicos provocados por el herbicida, como la epinastia foliar y la curvatura de tallos; condiciones que fueron establecidas en trabajos previos al desarrollo de esta tesis Doctoral (McCarthy, 2004; Romero-Puertas y col., 2004a).

5.1 El 2,4-D promueve desarrollo anormal de hojas y senescencia

El fenoxiherbicida aplicado por pulverización en tratamientos foliares, tiene una vida media de 11-12 días (Ahrens, 1994), y su absorción dependerá en gran medida de la estructura de la cutícula de la planta, así en especies sensibles como *Silene vulgaris* y *Phaseolus vulgaris* se ha observado que el 65% y el 83%, respectivamente, del 2,4-D aplicado por pulverización era absorbido en 72 h de tratamiento, y aproximadamente un 53% del herbicida era translocado fuera de las hojas, después de 72h (Wall y col., 1991). Con estos antecedentes y teniendo en cuenta que las dos especies utilizadas presentan cierta sensibilidad a los fenoxiherbicidas, y junto con estudios previos realizados en nuestro laboratorio, en este trabajo se seleccionó el periodo de 72 h después de la aplicación del herbicida para llevar a cabo las determinaciones pertinentes.

Tanto en guisante como en *Arabidopsis* se observaron alteraciones sobre el crecimiento, las cuales estuvieron en gran medida relacionadas con la aparición de síntomas de epinastia foliar, curvatura y engrosamiento de tallos, y signos de avanzada senescencia. Dichos efectos son característicos de una sobredosis en la aplicación de herbicidas auxínicos, ya que como se ha descrito en el capítulo de Introducción, el modo de acción de los herbicidas auxínicos es dual dependiendo de la concentración utilizada

Los síntomas de epinastia foliar comenzaban unas horas después de la aplicación del herbicida, sin embargo algunos autores han puesto de manifiesto que las respuestas de crecimiento pueden ser detectadas dentro de los 10 minutos posteriores a la aplicación de la auxina (Ray y Ruesink, 1962; Yamagata y Masuda, 1975). El desarrollo de epinastia sólo se observaba en hojas jóvenes apicales, mientras que en las basales no se apreciaba este proceso, pero sí procesos de senescencia. Este hecho se debe a que las hojas jóvenes en crecimiento son más sensibles a la acción de la auxina, mientras que en las hojas maduras la sensibilidad es menor coincidiendo con un cese o enlentecimiento del crecimiento (Keller y Van Volkenburgh, 1997).

El análisis de la estructura de la hoja epinástica mediante microscopía óptica demuestra un aumento del volumen de las células del mesófilo y epidermis y deformación por plegamiento de la pared celular. Otra característica observada es la proliferación de células en los haces vasculares, e incremento del número de haces vasculares secundarios, según se observa en hojas de *Arabidopsis*. Este hecho se debe al efecto regulador que las auxinas ejercen sobre el control del crecimiento de los haces vasculares (Hall y Langdale, 1996). Así, tanto el aumento del volumen de las células como el desarrollo

de haces vasculares serían responsables de la curvatura epinástica de las hojas. Se ha descrito que el aumento de volumen de las células que ocurre durante el desarrollo de la epinastia se debe a la promoción de la expansión longitudinal de las mismas, mediante la reorientación transversal de los microtúbulos (Abeles y col., 1992; Takesue y Shibaoka, 1999; Grossmann, 2003). Se sabe que las auxinas incrementan la plasticidad de la pared celular mediante el incremento de la actividad celulasa, en este estado la pared celular se dilataría con ayuda de la presión de turgencia por la entrada de agua (Cosgrove, 1999). Adicionalmente, se ha descrito un mecanismo de acción casi inmediato, pero menos aceptado entre la comunidad científica, que consiste en la hipótesis del crecimiento ácido, ya que las auxinas promueven la generación de protones y la activación de H⁺ATPasas lo que provoca la acidificación de la membrana plasmática y la consecuente elongación celular por la presión de turgencia (Lohse y Hedrich, 1992; Rayle y Cleland, 1992; Fuchs y col., 2006). Finalmente, también se ha relacionado la producción de ROS mediando el crecimiento inducido por auxinas (Schopfer y col., 2002; Liskay y col., 2003). Schopfer y col (2001) han demostrado que los cambios experimentados por la pared celular en respuesta a auxinas y 2,4-D son dependientes de radicales $\cdot\text{OH}$ que se producen en la pared celular en la reacción de peroxidasas y una NADPH superóxido sintetasa de la membrana plasmática. La NADPH superóxido sintetasa produciría $\text{O}_2^{\cdot-}$, que a su vez dismutaría a H_2O_2 y este podría ser utilizado por peroxidasas de la pared celular para dar lugar a $\cdot\text{OH}$ mediante reacciones tipo Haber-Weiss, con la intervención de metales y/o ascorbato (Schopfer, 2001). El aumento de la actividad peroxidasa total descrito en este trabajo podría estar asociado a esta producción de ROS que participaría en la formación de pared celular, tanto en mesófilo, como en epidermis y en haces vasculares. La prevención de la epinastia por EDTA, quelante de metales, apoya la hipótesis de la participación de metales en la producción de $\cdot\text{OH}$.

Debido a la sintomatología presentada por las plantas de guisante tratadas con 2,4-D, en las que claramente se observó la inducción de dos procesos diferentes, uno en la zona apical caracterizado por la epinastia foliar, y otro en la zona basal de las plantas marcado por la aparición de clorosis y procesos de senescencia, estas dos zonas fueron analizadas por separado, centrando el estudio en el papel de las ROS en la respuesta de la planta al 2,4-D.

El crecimiento anormal y la formación de nuevos tejidos en la zona apical, se han descrito como un sumidero metabólico, que viviría a expensas de la movilización de carbohidratos y proteínas de la zona basal fotosintéticamente activa, la cual iría en declive mostrando síntomas de senescencia (Cobb, 1992). Por otro lado se sabe que el 2,4-D

podría estar inhibiendo la biosíntesis de clorofila o acelerando la degradación de la misma (Grossmann y Kwiatkowski, 1995). Así mismo, algunos autores han descrito que el 2,4-D reduce la apertura estomática mediada por ABA, lo que se traduce en una reducción de la asimilación de carbono, daños a cloroplastos y clorosis progresiva, síntomas típicos de las plantas tratadas con 2,4-D y otros herbicidas auxínicos (Cobb, 1992; Sterling y Hall, 1997; Grossmann, 2000a).

Uno de los efectos más estudiados en plantas tratadas con auxinas y herbicidas auxínicos es la estimulación de la biosíntesis de etileno (Tittle y col., 1990; Hansen y Grossmann, 2000; Arteca y Arteca, 2008), la cual conlleva a la coproducción de cianuro proveniente de la oxidación de ACC. Este cianuro ha sido descrito como el responsable de la inhibición de enzimas importantes como la citocromo *c* oxidasa, nitrato/nitrito reductasa, la ribulosa bifosfato carboxilasa y la CuZn-SOD entre otras. El cianuro podría en parte ser una de las causas de los síntomas de clorosis foliar observados en las plantas de guisante tratadas durante 72 h con 2,4-D. Algunos autores han observado aumentos en la producción de cianuro de hasta un 50% (Sunohara y Matsumoto, 2008), suficiente para provocar una elevada fitotoxicidad en distintos compartimentos celulares como el citoplasma, cloroplastos y peroxisomas (Grossmann y col., 1996).

5.2 El 2,4-D Promueve la Generación de ROS

La generación de especies de oxígeno reactivo en la aplicación de auxinas ha sido ampliamente investigada en embriogénesis, cultivo de tejidos y/o inducción de formación de callos (Hatton y col., 1999; Pfeiffer y Höftberger, 2001; Peixoto y col., 2008; Blazquez y col., 2009). La producción de $O_2^{\cdot -}$ se ha observado en la inducción de tumores por fitohormonas, sugiriendo un papel directo de las auxinas en la formación de este radical (Jia y col., 1996). El papel de las ROS en la acción tóxica de herbicidas auxínicos no ha sido bien establecido, y son escasos los datos sobre las fuentes de ROS y su localización a nivel subcelular. Es por ello, que en este trabajo se ha evaluado la contribución de distintas fuentes de ROS en las dos zonas estudiadas de la planta.

El análisis de actividades enzimáticas generadoras de ROS en plantas de guisante mostró una acción pro-oxidante del 2,4-D. Así, la enzima xantina oxidoreductasa (XOD/XDH) se encuentra principalmente en la forma de XDH, y puede ser convertida en la forma XOD generadora del radical superóxido, mediante proteólisis. El significativo incremento de la XOD en hojas apicales sugiere un importante aumento en los niveles de $O_2^{\cdot -}$ y este radical podría ser dismutado a H_2O_2 por la acción de la SOD. Este resultado

coincide con lo descrito por Romero-Puertas y col (2004a) en la misma especie vegetal. Estos resultados sugieren un papel importante del catabolismo de los urédidos en respuesta al 2,4-D en hojas jóvenes. A diferencia de las hojas apicales, las hojas maduras no experimentaban este incremento en respuesta al 2,4-D, siendo la forma XDH la mayoritaria. Además estos resultados indican que la relación XDH/XOD puede estar regulada por la edad de la planta y también se ha descrito su regulación por las condiciones de estrés a las que pueda estar sometida la planta. Así, en respuesta a estrés por Cd la forma XOD se reduce frente a la XDH (Romero-Puertas y col., 1999), mientras que en situaciones de senescencia natural o inducida sucede lo contrario (Pastori y del Rio, 1997).

Además de la XOD, también se analizaron otras dos fuentes de ROS de origen peroxisomal, la GOX y la ACX. La ACX es una enzima clave de la ruta de β -oxidación de ácidos grasos en peroxisomas. El 2,4-D inducía un incremento considerable de esta actividad, tanto en hojas jóvenes como maduras, lo que conllevaría un incremento importante de la producción de H_2O_2 . Mediante el uso de mutantes de *Arabidopsis* deficientes en el gen *acx1* hemos podido confirmar la importante contribución de esta vía a la producción de H_2O_2 en respuesta a la aplicación de 2,4-D. La β -oxidación de ácidos grasos desempeña un papel importante en el desarrollo vegetativo y reproductivo y también ha sido asociada con procesos de defensa frente a xenobióticos tanto en plantas (Palma y col., 1991; Romero-Puertas y col., 2004a; Nila y col., 2006) como en animales (Cajaraville y col., 2003). En células animales se ha relacionado la activación de la β -oxidación con la formación de complejos xenobiótico-CoA que podrían facilitar la degradación de estos compuestos (Knights, 2003). A diferencia de la ACX, la GOX experimentaba una reducción por efecto del tratamiento lo que descarta esta enzima como fuente de H_2O_2 y por otro lado sugiere una reducción de la fotorrespiración, que en condiciones de estrés puede constituir un mecanismo de protección frente a la fotoinhibición en cloroplastos. Estos resultados difieren ligeramente con los obtenidos por Romero-Puertas y col (2004a) en la misma especie vegetal, esta discrepancia puede estar relacionada con diferencias en la toma de muestras ya que en los estudios de Romero-Puertas y col (2004a) no se hizo distinción entre parte apical y basal.

La LOX no es una enzima abundante en órganos vegetativos, y en condiciones fisiológicas normales interviene en procesos de germinación degradando lípidos de reserva (Casey, 1999). En estas condiciones se ha descrito que el 2,4-D y el NAA (ácido naftalen acético) promueven un incremento de esta actividad (Fauconnier y col., 2001). También está involucrada en la síntesis de oxilipinas como JA que interviene en la regulación de la expresión de genes de defensa (Feussner y col., 2001; Porta y Rocha-Sosa, 2002) y está

Discusión

asociada con procesos de senescencia (Leverentz y col., 2002). Esta enzima cataliza la producción de peróxidos lipídicos y por tanto su inducción en determinadas condiciones, puede promover estrés oxidativo (Blokhina y col., 2003). El aumento de LOX en las hojas apicales podría estar relacionado con el rápido crecimiento inducido por el 2,4-D y podría constituir un mecanismo de control de crecimiento indefinido frente a auxinas, mientras que en la zona basal podría inducir senescencia foliar a través de la generación de radicales superóxido y radicales lipídicos (Roy y col., 1994; Roy y col., 1995; Leverentz y col., 2002).

El análisis del contenido total de H_2O_2 en las hojas mediante fluorimetría confirmó la abundante generación de esta ROS por efecto del 2,4-D, tanto en las hojas basales como apicales. Los resultados obtenidos en plantas de *Arabidopsis* a lo largo del tiempo, demuestran que este incremento era ya visible 1 h después del tratamiento y aumentaba con el tiempo siendo el máximo a las 72 h. Mediante el uso del mutante *acx1* de *Arabidopsis* hemos podido observar que una de las principales fuentes de esta ROS es la actividad acil CoA asociada a la β -oxidación de ácidos grasos peroxisomal.

A la vista de estos resultados, no parece existir una respuesta diferencial específica de las hojas basales y las apicales, por lo que respecta a la fuente de ROS, salvo en el caso de la XOD, que es predominante en la zona apical, por lo que no parece existir mecanismos específicos de respuesta al 2,4-D en hojas jóvenes y maduras. No obstante, es posible que el papel de las ROS en ambas zonas sea diferente. Así, en hojas jóvenes un incremento de ROS podría estar implicado en el desarrollo de epinastia, mientras que en las hojas maduras promoverían senescencia foliar y muerte celular. El uso de mutantes deficientes en ACX1 nos ha permitido demostrar el importante papel que desempeña el H_2O_2 en el desarrollo de epinastia dependiente del 2,4-D.

El análisis de marcadores de estrés oxidativo en ambas zonas de la planta tras el tratamiento con 2,4-D demostró un incremento tanto en el contenido de grupos carbonilo de proteínas, como en la peroxidación lipídica, especialmente en hojas apicales, lo que coincide con el mayor aumento de la producción de ROS en esta zona. Este hecho podría deberse a una mayor concentración del herbicida en esta zona. El IAA se oxida en la pared celular en combinación con peroxidasas pudiendo causar peroxidación lipídica (Keten, 1955; Gazaryan y col., 1996; Folkes y col., 1999). La progresión del daño oxidativo durante el ciclo de vida de la planta en condiciones normales parece estar relacionada con la edad, aumentando exponencialmente y disminuyendo justo al entrar en el estado reproductivo (Johansson y col., 2004), es por ello que en ausencia del herbicida se incrementan los daños oxidativos en hojas adultas. El aumento de estos parámetros de estrés oxidativo por

el herbicida también han sido descritos por Romero-Puertas y col (2004a) en hojas de guisante.

El incremento de la producción de ROS está favorecido por la ausencia de cambios importantes de las actividades antioxidantes analizadas, especialmente en hojas apicales. Así, ni la CAT, ni la APX, ni la GR se inducen significativamente en hojas jóvenes, si bien, la APX se incrementaba en las hojas basales. El incremento de la actividad SOD en hojas apicales podría contribuir a la reducción de la acumulación de $O_2^{\cdot-}$, pero también podría participar en el aumento del H_2O_2 . En las hojas apicales el incremento de esta actividad se debía fundamentalmente a la actividad Mn-SOD presente en peroxisomas y mitocondrias, mientras que en las basales la forma que se incrementaba era la CuZn-SOD citosólica. El análisis de los niveles de transcritos de estas proteínas demuestra que en estas condiciones la regulación de estas proteínas es básicamente a nivel transcripcional. Estos resultados son similares a los obtenidos por Romero-Puertas y col (2004a) en la misma especie. En embriones de maíz, por el contrario, el tratamiento con IAA y 2,4-D inducía la expresión de los genes *Cat1*, *Cat2* y *Cat3* (Guan y Scandalios, 2002).

La medida de actividad GPX se considera como una medida de actividad peroxidasa total y el incremento observado en este trabajo, inducido por 2,4-D, podría estar más asociado a las peroxidasas de pared celular, que participan en la síntesis de pared celular y crecimiento inducido por auxinas, (Liszky y col., 2004; Schopfer y Liszky, 2006), y no tanto con la defensa antioxidante.

Las glutatión S-transferasas están implicadas en la defensa celular frente a xenobióticos, llevando a cabo la conjugación de los mismos con el GSH, y el complejo formado sería transportado a la vacuola para prevenir su toxicidad. Esta enzima es altamente estimulada por el tratamiento con 2,4-D en las hojas apicales, tanto a nivel de actividad como de transcritos. Mediante estudios de transcriptómica en plantas de *Arabidopsis*, se ha determinado que la GST es uno de los genes que más se inducen frente al 2,4-D (Raghavan y col., 2005). Esta enzima parece determinante en el proceso de desintoxicación de herbicidas (Hatton y col., 1998; Romero-Puertas y col., 2004a; Moons, 2005) y también desempeña un papel importante en la respuesta celular a auxinas, habiendo sido considerada como una proteína de unión a auxinas (Marrs, 1996; Gonneau y col., 1998). Es muy posible que el aumento observado, tanto en la actividad como en su expresión, constituya una estrategia de la planta para prevenir la toxicidad de estos herbicidas favoreciendo su acumulación en la vacuola. Sin embargo, también podría contribuir a la defensa antioxidante actuando como una glutatión peroxidasa.

Discusión

Recientemente se ha sugerido que el efecto del herbicida sobre la inducción o reducción de algunas enzimas antioxidantes es dependiente de la concentración aplicada del mismo. Así, en cultivos celulares de patata se ha observado que a mayor concentración del fenoxiherbicida mayor actividad en enzimas como la catalasa y la superóxido dismutasa (Peixoto y col., 2008). Otros autores han descrito la existencia de expresión diferencial dependiendo del tejido analizado, así en hojas jóvenes de trigo tiene lugar un aumento de los transcritos de la Cat1 (Guan y Scandalios, 2002).

El mantenimiento del ascorbato y el glutatión en sus formas reducidas, es de gran importancia para una eficiente defensa frente a un exceso de ROS. El ciclo ASC-GSH es el principal sistema implicado en este proceso (Jiménez y col., 1997). El tratamiento con 2,4-D promueve un aumento de los niveles totales de glutatión, tanto en la zona basal como apical, siendo predominante la forma reducida (GSH), especialmente en las hojas basales. Este hecho sugiere que la planta dispone de un sistema eficiente de reducción del GSSG, si bien la GR tan solo experimentaba una ligera inducción. El incremento del GSH podría ser resultado de la inducción de las GSTs y también podría contribuir a la regeneración del ASC. Además, se sabe que la síntesis y/o acumulación de GSH es un síntoma de una mayor oxidación del citosol ya que interviene manteniendo el estado redox del mismo, creando una barrera entre los residuos de cisteína de las proteínas y las ROS (Foyer y Noctor, 2005b).

Por el contrario, el contenido de ascorbato total en la zona apical descendió drásticamente por el tratamiento. La reducción del contenido de ASC ha sido relacionada con la sensibilidad al 2,4-D en dicotiledóneas, mientras que en las monocotiledóneas insensibles al herbicida el contenido de ASC se encuentra incrementado (Miteva y Ivanov, 2007). Esta reducción podría deberse a un defecto en una de las enzimas responsables del mantenimiento del pool de ASC, como la L-galactono-1,4-lactono deshidrogenasa (GLDH) (Tokunaga y col., 2005). Otra posibilidad es que el 2,4-D promueva una desregulación de la síntesis de novo de ascorbato, debido entre otras causas, a la disminución de la tasa fotosintética. La reducción del ASC en hojas apicales podría ser debido a la activación de la ascorbato oxidasa que participa en la elongación celular y se induce por auxinas (Esaka y col., 1992; Kisu y col., 1997; Pignocchi y Foyer, 2003).

El aumento de ascorbato detectado en las hojas basales de plantas tratadas podría ser debido a un aumento del H₂O₂ dependiente de 2,4-D en esta zona. Sin embargo, un exceso de ASC podría tener efecto prooxidante favoreciendo la producción de \cdot OH a través de reacciones tipo Fenton (Halliwell y Gutteridge, 1990; Fry, 1998; Green y Fry, 2005) que

podrían contribuir a la senescencia. Así, Bartoli y col (2005) han observado que altas cantidades de ASC pueden promover daños por xenobióticos.

5.3 Acumulación Tisular de ROS Dependiente del Herbicida 2,4-D

Para profundizar en el papel de las ROS en el mecanismo de acción del 2,4-D, se llevó a cabo la visualización de la acumulación de $O_2^{\cdot -}$ *in vivo* en hojas y tallos jóvenes de plantas tratadas con el herbicida. En condiciones fisiológicas es casi inapreciable, en contraste con las plantas tratadas con 2,4-D en las que se localizó principalmente en haces vasculares, pared celular, estomas y también en orgánulos de alrededor de 1 μm de diámetro. Dado el incremento de XOD y ACX observado, estos orgánulos podrían ser peroxisomas, si bien, no podemos descartar que también puedan ser mitocondrias.

En tallos de plantas control, al contrario de lo ocurrido en hojas, si era evidente la acumulación de $O_2^{\cdot -}$ en los haces vasculares y en la corteza. En los tallos de plantas tratadas se localizó intensamente en las zonas del xilema y floema, que presentan modificaciones tanto en su estructura como distribución en la sección del tallo. Dado que los tallos analizados procedían de la zona apical, la presencia de $O_2^{\cdot -}$ detectada en esta zona podría estar relacionada con procesos de elongación, mientras que en las plantas tratadas estaría involucrado en la elongación y deformación del tejido. En otras especies como *Solanum tuberosum* el $O_2^{\cdot -}$ y otras ROS parecen ser necesarias para la elongación de tallos y división celular (Kim y col., 2007).

La detección de H_2O_2 mediante citoquímica con DAB, tanto en hojas de guisante como de *Arabidopsis*, mostró un acúmulo importante en haces vasculares y zonas de curvatura de la hoja. En el caso de las hojas de *Arabidopsis* el 2,4-D además parece inducir el número y tamaño de los haces vasculares secundarios. Mediante microscopía láser confocal se observó que el H_2O_2 se localizaba especialmente en haces vasculares y en menor proporción en el mesófilo. El análisis de la epinastia dependiente de auxinas en hojas de tabaco ha demostrado que las nervaciones son muy importantes en el desarrollo de la curvatura de tiras de hojas, siendo mayor esta cuanto mayor es el tamaño de los haces vasculares (Keller y Van Volkenburgh, 1997). Este hecho sugiere que la producción de ROS en hojas apicales estaría fundamentalmente relacionada con la proliferación de haces vasculares que finalmente determinarían la epinastia. Sin embargo, podrían también promover daños oxidativos y/o actuar como mensajeros secundarios de la respuesta frente al herbicida, tal como sucede en otras situaciones de estrés (Apel y Hirt, 2004; Mittler y col., 2004; Ross y col., 2006).

5.4 Papel del NO en la Respuesta Inducida por 2,4-D

En plantas el NO puede ser generado enzimática y no enzimáticamente (Corpas y col., 2004b; del Río y col., 2004). Este radical es reconocido como mensajero intracelular e intercelular por su facilidad para difundir a través de las membranas celulares (Moncada y col., 1991; Lamattina y col., 2003; del Río y col., 2004). Recientemente se ha demostrado su participación en las respuestas de crecimiento mediado por auxinas (Pagnussat y col., 2002), puede estimular la división celular y la formación de células embriogénicas a partir de protoplastos (Ötvös y col., 2005). La detección *in vivo* del NO mediante microscopía láser confocal, tanto en hojas de guisante como de *Arabidopsis*, permitió observar una reducción de los niveles basales de NO detectados en las hojas control, por efecto del tratamiento con el 2,4-D a las 72 h. Sin embargo, el análisis de la producción de NO mediante fluorimetría demostró un incremento de la producción del mismo después de 1 h de tratamiento y una posterior reducción, lo que concuerda con los resultados obtenidos a las 72 h. El incremento de NO en los primeros estadios del tratamiento podría estar asociado a la inducción de división celular promovida por el herbicida ya que según Ötvös y col (2005), el NO es necesario para el inicio de la división celular, sin embargo no sería necesario para la progresión de la misma celular. De ahí que a tiempos largos se observe una reducción de los niveles hasta los detectados en ausencia del tratamiento. El NO suministrado como SNP induce la organogénesis de novo en raíces imitando el efecto del IAA (Pagnussat y col., 2002).

El NO puede actuar como un modulador redox funcionando como antioxidante, por reacción con el $O_2^{\cdot-}$, o como prooxidante, a través de la producción de RNS como el ONOO⁻ (Lee y col., 2008a). La reducción del NO observada después de las primeras horas de tratamiento podría deberse a su reacción con el $O_2^{\cdot-}$ para formar ONOO⁻, o bien por reacción con el GSH, que como hemos visto anteriormente se induce por 2,4-D, dando lugar a GSNO. A su vez, las RNS pueden modificar postraduccionalmente las proteínas mediante procesos de nitrosilación o nitración regulando de esta forma la actividad de las mismas (Zaninotto y col., 2006; Romero-Puertas y col., 2007; Romero-Puertas y col., 2008). Las reacciones de S-nitrosilación de proteínas se deben fundamentalmente al GSNO que constituye una fuente endógena de NO y puede intervenir en la regulación los mecanismos dependientes de NO (Hong y col., 2008; Lee y col., 2008a). El aumento de los niveles de NO a la hora de tratamiento coincide con un incremento de la S-nitrosilación de proteínas observada en esta Memoria. El análisis de proteínas S-nitrosiladas en hojas de *Arabidopsis* mostró la ausencia de cambios en el patrón de las proteínas susceptibles de

S-nitrosilación, sin embargo, tras 1 h de tratamiento se observó un aumento en la intensidad de estas bandas por efecto del tratamiento, especialmente en la de aproximadamente 37 kDa. Este hecho se correlaciona con el aumento de los niveles detectados de NO al mismo tiempo de tratamiento. Posteriormente, la intensidad de las bandas disminuye de nuevo a las 5 h y se incrementa ligeramente pasadas 72 h de tratamiento. Estos resultados sugieren que en parte el efecto del 2,4-D podría deberse a modificaciones postraduccionales de proteínas mediante S-nitrosilación, siendo más relevante las modificaciones específicas en ciertas proteínas que el aumento o disminución en la cantidad de proteínas S-nitrosiladas. Estos resultados se corresponden con resultados recientes obtenidos por Lindermayr y col (2005), en los que el mayor porcentaje de proteínas S-nitrosiladas se encontraban en los rangos de 33 kDa – 85 kDa y su incremento era simultáneo con el incremento de la concentración de GSNO. Entre las proteínas S-nitrosiladas se encontraba la actina (45 kDa), la malato deshidrogenasa (~34kDa) y la fosfoglicerato quinasa (~37kDa), entre otras.

Los niveles de GSNO son controlados por la actividad GSNO reductasa (GSNOR) que reduce el GSNO a GSSG, hidroxilamina y NH₃ (Liu y col., 2001; Lui y col., 2004). Esta actividad se identificó en un principio como una GSH formaldehído deshidrogenasa, sin embargo parece ser que su función principal es controlar los niveles de GSNO y no la desintoxicación del formaldehído (Martínez y col., 1996; Liu y col., 2001). Esta proteína también se ha identificado como una proteína de unión a auxinas, la ABP40, sin embargo se desconoce su función en relación con las auxinas (Sugaya y Sakai, 1996). El análisis de esta actividad en plantas de guisante mostró un aumento de la misma en respuesta al tratamiento con 2,4-D, tanto en hojas basales como apicales, sin embargo la interpretación de este incremento es complejo. Por un lado, podría regular procesos de S-nitrosilación de proteínas, lo que explicaría la reducción de proteínas S-nitrosiladas a tiempos largos de tratamiento, pero también podría intervenir en la percepción del 2,4-D.

5.5 El 2,4-D Induce la Producción de Etileno

El ET desempeña un papel pleiotrópico en el desarrollo y crecimiento de la planta, así como en una variedad de respuestas de defensa frente a estrés biótico y abiótico (Arteca y Arteca, 2008). La producción de etileno en las dos zonas de la planta fue ampliamente inducida por el herbicida en igual proporción en las hojas apicales y basales. Como se ha descrito en anteriores apartados una de las características más comunes de los herbicidas auxínicos es la inducción de la biosíntesis de etileno, hormona que está

Discusión

involucrada en respuestas a estrés y la regulación del crecimiento, y los procesos de senescencia (Abeles y col., 1992; Kende y Zeevaart, 1997). Adicionalmente está involucrada en procesos de abscisión y epinastia foliar, mediante la inducción de ABA. Estas dos hormonas ABA y etileno, pueden tener una función como mensajeros secundarios en la vía de señalización de auxinas, promoviendo la inhibición del crecimiento (Hansen y Grossmann, 2000). El 2,4-D induce la síntesis de ET a través de la inducción de la actividad ACC sintasa, no obstante, estudios transcriptómicos de plantas de *Arabidopsis*, no muestran cambios en el nivel de transcritos de genes implicados en la biosíntesis de ET en respuesta a concentraciones de 0,1 y 1 mM de 2,4-D, pero si de los genes implicados en la vía de señalización del ET entre ellos los receptores de ET (*ERS*) (Raghavan y col., 2006). La epinastia foliar según muchos autores parece estar directamente relacionada con el etileno (Stewart y Freebairn, 1969; Hansen y Grossmann, 2000; Grossmann y Hansen, 2001), y éste a su vez podría influir en la distribución y transporte de auxinas (Lee y col., 2008b). No obstante, los resultados obtenidos en esta Memoria sugieren que el ET no es imprescindible en el desarrollo de la epinastia, ya que inhibidores de la síntesis de ET no previenen completamente la epinastia y en tiras de hojas tratadas con 2,4-D, los inhibidores de ET no producían ningún tipo de efecto sobre la curvatura. No obstante, el ET podría potenciar la epinastia a través de la generación de ROS.

5.6 El 2,4-D activa Proteínas de Defensa

La respuesta celular en situaciones de estrés se caracteriza por la inducción de la síntesis de proteínas de defensa y de respuesta a patógenos (PRs). Recientemente, se ha demostrado la conexión entre la señalización por auxinas y la resistencia a patógenos en plantas (Navarro y col., 2006), lo que sugiere que bajos niveles de auxina pueden incrementar la resistencia a patógenos. Las proteínas de defensa se inducen en distintas especies vegetales en respuesta a distintos tipos de estrés. La mayoría de estas proteínas se inducen a través de la acción de moléculas señal como el salicílico, JA, ET o H₂O₂ (Ohashi y Ohshima, 1992; van Loon, 1997; Kitajima y Sato, 1999; van Loon y col., 2006). Entre estas proteínas, las quitinasas catalizan la ruptura de los enlaces de dos residuos de N-acetil-β-D-glucosamina consecutivos, presentes en los polímeros de N-acetilglucosamina en la quitina (Kasprzewska, 2003). Estas enzimas están implicadas en la defensa de la planta frente a patógenos y en procesos de crecimiento y desarrollo (Kasprzewska, 2003). Existen siete clases de quitinasas que difieren en el sustrato, estructura y mecanismo de acción (Kasprzewska, 2003). Las plantas de guisante tratadas con 2,4-D mostraron un

aumento de la expresión de la quitinasa I tanto en hojas jóvenes como adultas. Esta proteína también se induce frente a Cd (Rodríguez-Serrano y col., 2009), estrés osmótico (Tateishi y col., 2001) y daños mecánicos (Wu y Bradford, 2003). La regulación de este gen se ha descrito que es dependiente de ET, JA (Kasprzewska, 2003) y H₂O₂ (Dat y col., 2000), por lo que la inducción por 2,4-D podría ser una consecuencia de la inducción del ET y ROS dependiente del herbicida. Es probable que las quitinasas formen parte de la respuesta general de estrés en plantas, aunque también pueden desempeñar algún papel específico frente al 2,4-D y otros xenobióticos aún por determinar.

Las PR-4 son quitinasas de la clase I y II (Broekaert y col., 1990; van Loon y col., 1994). La PRP4A es una proteína de unión a quitina y en guisante se induce por el tratamiento con 2,4-D hasta 5 y 4 veces en hojas apicales y basales, respectivamente. Esta proteína se induce también por ozono y Cd en guisante (Sävenstrand y col., 2000; Rodríguez-Serrano y col., 2009) y se ha observado que se regula por JA y/o ET y también por ROS (Rodríguez-Serrano y col., 2009), lo que explicaría la inducción por 2,4-D, dado los niveles detectados de ET y ROS en respuesta al herbicida. Al igual que la quitinasa, se desconoce su función en respuesta a este herbicida, pero los altos niveles observados sugieren algún efecto protector, posiblemente frente a estrés oxidativo.

Las HSPs ("heat shock proteins") son chaperonas moleculares implicadas en el desarrollo de la planta y en la respuesta celular a distintas formas de estrés, fundamentalmente frente a altas temperaturas (Nover y col., 2001; Sung y col., 2003; Miller y Mittler, 2006; Swindell y col., 2007). El tratamiento con 2,4-D inducía la expresión de la HSP 71.2 citosólica de guisante tanto en hojas apicales como en basales. En estudios transcriptómicos, se ha demostrado la inducción de proteínas de defensa frente al 2,4-D en *Arabidopsis*, entre ellas, la HSP70 (Raghavan y col., 2005). Este hecho podría deberse al aumento de H₂O₂, ya que parece que los factores de transcripción que regulan estos genes actúan como sensores de H₂O₂ (Miller y Mittler, 2006; Rodríguez-Serrano y col., 2009). Se ha descrito que la inducción de HSPs en respuesta al 2,4-D en levaduras es crucial en el plegamiento de proteínas y la defensa frente a la agregación de proteínas (Simoes y col., 2003). El aumento de proteínas oxidadas dependiente de 2,4-D sugiere que las HSPs podrían constituir un mecanismo de protección frente a los efectos nocivos de oxidación y agregación de proteínas, pero también podrían intervenir en la facilitación del transporte de proteínas hacia los orgánulos (Rodríguez-Serrano y col., 2009). En cuanto a su regulación, las HSPs se regulan por JA y estrés oxidativo (Cheong y col., 2002; Ma y col., 2006; Rodríguez-Serrano y col., 2009).

El análisis comparativo de la expresión de proteínas de defensa en las hojas apicales y basales no mostró diferencias importantes, si bien la mayor inducción tenía lugar en la zona apical, donde además tiene lugar la mayor acumulación de H_2O_2 dependiente del 2,4-D.

5.7 Regulación de la respuesta celular al 2,4-D

Los procesos implicados en la señalización en respuesta al 2,4-D que desencadenan la respuesta celular no han sido bien establecidos. Por este motivo, en esta Memoria se ha abordado el estudio del efecto de distintos moduladores de la transducción de señales celulares así como inhibidores o secuestradores de ROS sobre la epinastia, ya que este efecto más característico y de fácil visualización en el tratamiento con este herbicida. Para ello se han utilizado dos abordajes, la incubación de brotes apicales con los fármacos correspondientes y la incubación de tiras foliares. Los resultados obtenidos con los brotes de hojas permiten concluir que la curvatura inducida por 2,4-D es dependiente de metales ya que la inclusión de EDTA, que actúa como quelante de metales, protege completamente, siendo esta protección mayor en presencia de un secuestrador de ROS. Resultados similares se obtuvieron utilizando tiras de hojas lo que permitió comprobar la protección por EDTA y antioxidantes. Estos datos demuestran que la epinastia foliar se debe fundamentalmente a la generación de radicales $\cdot OH$, probablemente mediante el mismo mecanismo descrito anteriormente para explicar los procesos de elongación celular y el gravitropismo dependientes de auxinas (Schopfer, 2001). Para determinar el papel del EDTA en la prevención de la curvatura, se ensayó el efecto de este compuesto sobre la producción de H_2O_2 , sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, y sobre la síntesis de ET. De los resultados obtenidos podemos concluir que básicamente el EDTA actúa reduciendo directa e indirectamente la producción de ROS, sin embargo, su acción sobre la actividad de antioxidantes no es relevante. Una prueba adicional de su papel en la prevención de la formación de ROS, y más concretamente de $\cdot OH$, es la reducción observada en el contenido de grupos carbonilo de proteínas en presencia de EDTA. Por otro lado, el EDTA también reduce la emisión de ET, posiblemente por acción sobre la ACC oxidasa ya que esta enzima requiere Fe^{+2} en su mecanismo de acción. Por otro lado, se ha descrito que el $\cdot OH$ y el oxígeno singlete podrían intervenir en la producción fotoquímica de ET en presencia de metionina y en medio ácido (Tzeng y Chen, 1992), y la producción de ROS también se ha descrito que induce la expresión del gen ACO implicado en la

síntesis de etileno (Wingler y col., 2005), lo que justificaría la reducción de ET dependiente de EDTA.

En cuanto a la fuente de ROS implicada en la producción de H₂O₂, los resultados obtenidos en brotes no son muy concluyentes ya que según el modelo experimental utilizado, la NADPH oxidasa podría ser una buena candidata como fuente de ROS, a juzgar por la inhibición observada por el DPI en tiras foliares. Sin embargo, su contribución en los estudios realizados en brotes no parece ser muy relevante, posiblemente por problemas de transporte a la parte apical o estabilidad del compuesto. La contribución de la XOD, no parece ser muy determinante, ya que la inhibición de la enzima con alopurinol solo produce ligeros cambios en la epinastia, paralelos a un ligero descenso en el contenido total de H₂O₂ en plantas tratadas con el 2,4-D. Para determinar otras posibles acciones del alopurinol en el metabolismo celular se analizó el efecto de este compuesto sobre sistemas antioxidantes, no detectándose un efecto diferencial en plantas tratadas con 2,4-D, en términos de actividad enzimática. Sin embargo, el alopurinol revertía los cambios dependientes de 2,4-D observados en el contenido de ASC y GSH. Por lo que su efecto sobre la producción de H₂O₂ también podría verse afectado por alteraciones de los niveles de ASC y GSH. Por el contrario, el alopurinol no afectaba la producción de ET.

La epinastia también es dependiente de ET, si bien los resultados obtenidos en brotes y tiras de hojas son contradictorios ya que el inhibidor de la síntesis de ET, el AVG, no produce ningún efecto protector frente a la curvatura de tiras foliares. Recientemente varios autores han observado que las auxinas (IAA, NAA y 2,4-D) inducen epinastia en secciones de hojas de tabaco independiente de la producción endógena de etileno, (Keller y Van Volkenburgh, 1997; Kawano y col., 2003). No obstante, en brotes apicales, el AVG reducía la emisión de ET y ello llevaba consigo una reducción del contenido de H₂O₂. Estos resultados demuestran que la inducción de ET promueve un incremento del H₂O₂ posiblemente como consecuencia de la generación de CN⁻ que podría afectar la cadena de transporte electrónico mitocondrial favoreciendo el desvío de los electrones hacia el oxígeno. La percepción del ET, parece ser también importante en la producción de H₂O₂ dependiente de 2,4-D. Estos resultados sugieren que el ET contribuye a la curvatura pero no es determinante, siendo las ROS responsables últimas de este proceso.

La epinastia también es dependiente de canales de Ca⁺², a juzgar por la reducción de la curvatura en presencia de lantano, inhibidor de canales de Ca⁺². El Ca⁺² es un elemento clave en la transducción de señales celulares (White y Broadley, 2003) y modula la actividad de un gran número de procesos a través de su unión a la calmodulina y ésta, a

Discusión

su vez, regularía la actividad de un gran número de proteínas (Roberts y Harmon, 1992), entre ellas MAP Kinasas. Los efectos del calcio sobre el transporte de auxinas están bien documentados en estudios de gravitropismo y estimulación en raíces (Blancaflor y Masson, 2003; Perrin y col., 2005). El Ca^{+2} parece estar implicado en el incremento del transporte descendente (adaxial) de auxinas a través de la zona de elongación (Lee y col., 2008b), lo que explicaría la protección observada en la curvatura de tiras de hoja por el lantano. La aplicación asimétrica de Ca^{+2} exógeno a raíces de maíz produce curvatura de la misma (Joo y col., 2001) lo que demuestra su implicación en este proceso.

Procesos de fosforilación/desfosforilación de proteínas también intervienen en la regulación de la epinastia a juzgar por los efectos de la cantaridina y wortmanin sobre tiras foliares. Un aumento de ROS está bien establecido que aumenta la fosforilación y activación de un gran número de proteínas, entre ellas MAPK (Kovtun y col., 2000). En procesos de graviestimulación se ha observado que tiene lugar un aumento de ROS y una rápida fosforilación de la MAPK5 de raíces de maíz (Joo y col., 2001).

Los resultados obtenidos en cuanto a la regulación de la epinastia, no nos permiten establecer los mecanismos moleculares que integran a ROS, Ca^{+2} y fosforilación de proteínas y la secuencia de eventos que finalmente conducen a la formación de la curvatura. No obstante, es posible que la producción de ROS ocurra en primer lugar, seguido de cambios en los niveles citosólicos de Ca^{+2} , activación de MAPK, fosforilación de proteínas, activación de factores de transcripción y expresión génica siguiendo una de las vías de señalización dependientes de ROS (Mittler y col., 2004).

5.8 Modificaciones en el Citoesqueleto de Actina

La principal función de las auxinas es el crecimiento, pero en el proceso que deben seguir para conseguirlo es evidente que alteran diferentes procesos celulares y ejercen un efecto directo sobre el soporte celular, el citoesqueleto de actina, el cual a la vez juega un importante papel en los procesos de desarrollo y crecimiento de la planta. Durante la morfogénesis, el citoesqueleto de actina media los cambios en la morfología celular que ocurren en respuesta a señales de crecimiento, y en muchos tipos de estrés biótico y abiótico, el citoesqueleto también está implicado en la respuesta celular (Binet y col., 2001; Takemoto y Hardham, 2004). En la epidermis de las hojas, las células regulan su localización y expansión, primariamente a través del control espacial del citoesqueleto (Basu y col., 2008), dicho control requiere una apropiada distribución de la auxina, lo que sugiere una interacción entre las auxinas y el citoesqueleto (Sun y col., 2004). Por otro lado, estudios en células animales revelan el efecto directo del 2,4-D sobre el citoesqueleto,

especialmente sobre la conformación de los microtúbulos y microfilamentos (Zhao y col., 1987; Rosso y col., 2000).

La actina es el componente principal del citoesqueleto y existe en forma monomérica como actina-G (actina globular), que a su vez polimeriza por determinados estímulos extracelulares a su forma actina-F (actina filamentosa). El análisis del citoesqueleto de actina, mediante microscopía confocal usando el mutante de *Arabidopsis* fimbrina-GFP, nos permitió observar la reducción considerable del entramado de actina en plantas tratadas con 2,4-D. Estudios realizados por Rahman y col. (2007), muestran resultados similares, si bien estos autores observaron estructuras punteadas conteniendo actina, que no son apreciables en nuestros experimentos. A diferencia del 2,4-D, el IAA y el NAA producían inducción del citoesqueleto de actina en las raíces de *Arabidopsis* (Rahman y col., 2007). Estos autores no han establecido, no obstante, el mecanismo por el cual el 2,4-D reduce el citoesqueleto de actina, si bien si han demostrado que no se debe a la inhibición del transporte polar de la auxina (Rahman y col., 2007). En esta Memoria Doctoral hemos demostrado que la reducción del entramado de actina inducido por el 2,4-D se debe a la modificación de la actina por oxidación y S-nitrosilación de la misma, lo que afectaría a la polimerización de la proteína para formar los haces de actina. En células animales se ha observado que la polimerización de la actina es sensible a la oxidación y S-nitrosilación de esta proteína lo que provocaba alteraciones del citoesqueleto (Banan y col., 2000; Banan y col., 2001). Recientemente se han identificado proteínas componentes del citoesqueleto, como posibles dianas de S-nitrosilación en *Arabidopsis*, entre las que se encuentra la actina, el factor de despolimerización de la actina, y las tubulinas α y β (Lindermayr y col., 2005). Si bien, hasta el momento no se había identificado la S-nitrosilación de esta proteína en un proceso fisiológico o en respuesta a estrés. En esta Memoria Doctoral, se observó que la oxidación de la actina era prevenida por el EDTA, que además prevenía la pérdida del entramado de actina y, como se ha demostrado anteriormente, también prevenía la curvatura epinástica. Estos resultados demuestran que la toxicidad del 2,4-D se debe a la inducción de procesos oxidativos de la actina que afectan en gran medida al citoesqueleto y a todos aquellos procesos dependientes del mismo. La naturaleza dinámica de los filamentos del citoesqueleto les permite a las células una rápida respuesta a señales intracelulares, mediante modificaciones en su morfología y el transporte intracelular de orgánulos y vesículas.

Para profundizar en los mecanismos implicados en la desestructuración del citoesqueleto de actina, en esta Memoria se ha estudiado el efecto de ROS, ET y procesos de fosforilación de proteínas sobre la estructura del citoesqueleto. Los efectos negativos del

Discusión

2,4-D sobre el citoesqueleto eran mitigados por el piruvato sódico que actúa como antioxidante, lo que sugiere que las ROS son importantes en el proceso de despolimerización de la actina. En células de hepatocitos expuestos a una fuente de ROS se ha observado desestructuración de los microfilamentos de actina asociado a la oxidación de grupos SH de la proteína (Dalle-Donne y col., 2001). Este proceso está asociado a malformación de la membrana plasmática y pérdida de gradiente de iones, especialmente de Ca^{+2} (Dalle-Donne y col., 2001). Un incremento de los niveles de Ca^{+2} podría promover disociación de los microfilamentos de actina y activación de proteasas responsables de la rotura del enlace con las proteínas de unión a la actina (Dalle-Donne y col., 2001).

En condiciones de estrés oxidativo también se ha observado en células animales una inducción de la MAPK y la correspondiente fosforilación de determinadas proteínas, entre ellas la HSP27 (Dalle-Donne y col., 2001). En células vegetales se ha observado que la polimerización de la actina es dependiente de procesos de fosforilación de proteínas, entre ellas, el factor de despolimerización de la actina (ADF) que a su vez, es dependiente de Ca^{+2} y calmodulina (Allwood y col., 2001). Como hemos observado en este trabajo, la inhibición de fosfatasa por cantaridina prevenía la desestructuración del citoesqueleto ocasionada por el 2,4-D, lo que demuestra la importancia de la fosforilación/desfosforilación de proteínas en el mantenimiento de las fibras de actina. Las tirosin quinasas y las fosfatasa pueden tener una función a través de la reorganización del citoesqueleto de actina mediante la modulación de las proteínas de unión a actina (ABP) (Guillén y col., 1999; Kameyama y col., 2000; Zi y col., 2007), por lo cual la fosforilación reversible de proteínas tiene también un papel muy importante en la dinámica del citoesqueleto y del movimiento de orgánulos como es el caso de los peroxisomas.

El papel del ET en la desestructuración del citoesqueleto no está claro, ya que el inhibidor AVG no mostró cambios importantes en el entramado de la actina, en plantas tratadas con 2,4-D. Por tanto, no se puede afirmar o descartar una acción sinérgica del ET con la producción de ROS en la despolimerización de las fibras de actina.

5.9 El 2,4-D afecta la dinámica de Peroxisomas

El movimiento de los peroxisomas en plantas es dependiente del citoesqueleto de actina y no de los microtúbulos como ocurre en animales (Mathur y col., 2002), sin embargo parece existir cierta flexibilidad y redundancia en el papel del citoesqueleto de actina, microfilamentos y microtúbulos en el movimiento de otros orgánulos como cloroplastos y

mitocondrias (Morris y Hollenbeck, 1995; Sato y col., 2001). El rápido e incesante movimiento de peroxisomas, mitocondrias y complejos celulares en plantas es impulsado por el sistema de motilidad de acto-miosina. Este motor molecular de miosina (mayoritariamente la miosina XI-K) está regulado por Ca^{2+} y es capaz de realizar transportes a lo largo de los filamentos de actina (Avisar y col., 2008).

La velocidad de los peroxisomas se ha analizado a partir de videos obtenidos por microscopia láser confocal mediante el uso del software Volocity, obteniéndose así la velocidad de los peroxisomas de plantas control y tratadas con 2,4-D 22,6 mM. De esta forma se observó una reducción importante de la velocidad y de la longitud de los trayectos recorridos por los peroxisomas como consecuencia del tratamiento. Estos efectos podrían deberse a los cambios observados en el citoesqueleto, ya que como se indicó con anterioridad estos orgánulos se mueven a través de los filamentos de actina. Así, la reducción del entramado de las fibras de actina podría explicar la reducción del trayecto recorrido por los orgánulos; sin embargo, no está tan claro si también va a condicionar la velocidad del movimiento de estos orgánulos. En células de raíces de plantas de *Arabidopsis* también se ha observado una reducción de las corrientes citoplasmáticas por efecto del 2,4-D, similar al que se observa utilizando latrunculina B, un inhibidor de la actina que afecta a la movilidad de orgánulos a través del citoesqueleto (Rahman y col., 2007).

En células vegetales se ha observado que las corrientes citoplasmáticas están reguladas por Ca^{+2} , de manera que un aumento de este catión puede producir inhibición reversible de estas corrientes (Yokota y col., 1999). Este hecho podría deberse a la inhibición de una protein kinasa implicada en la fosforilación de la miosina, por altas concentraciones de Ca^{+2} (Yokota y col., 1999). El ATP también es necesario para el movimiento de los orgánulos a través de la actina y una reducción del mismo por alteración de la fosforilación oxidativa en mitocondrias podría también ser responsable de la reducción del movimiento, tal y como se ha observado en células animales (Brough y col., 2005).

La incubación con EDTA revertía la reducción de la velocidad del movimiento de los peroxisomas dependiente del 2,4-D, pero también inducía un aumento de la velocidad del movimiento en las plantas control. Estos resultados sugieren que además del estado de oxidación de la actina, determinados metales pueden tener un papel importante en la dinámica de los orgánulos a través del citoesqueleto que aún está por estudiar.

Recientemente, en nuestro laboratorio se ha demostrado que el estrés oxidativo inducido por Cd puede provocar un aumento de la velocidad de los peroxisomas (Rodríguez-Serrano y col., 2007) lo que contrasta con los resultados obtenidos en esta

Memoria. Sin embargo, en los estudios con Cd el citoesqueleto de actina no estaba afectado por el tratamiento, lo que sugiere que un estrés oxidativo moderado puede favorecer un incremento del movimiento de los peroxisomas, mientras que en condiciones de estrés oxidativo extremo el efecto puede ser inverso por alteraciones de las proteínas motoras y de la estructura del citoesqueleto.

Los peroxisomas intervienen en muchos procesos metabólicos y por otro lado son una fuente importante de ROS y RNS y contiene una batería amplia de antioxidantes, lo que les confiere un papel importante en procesos de señalización y de desintoxicación celular en situaciones de estrés. Por tanto, la alteración de la dinámica de estos orgánulos puede afectar su funcionalidad y modificar severamente el metabolismo celular.

5.10 Patrón de proteínas fosforiladas de Peroxisomas y modificaciones por el 2,4-D

La fosforilación de proteínas es uno de las modificaciones postraduccionales de proteínas más importante. Así, puede determinar múltiples características de las proteínas, entre ellas la actividad enzimática, localización subcelular, interacción proteína-proteína y la vida media de las mismas (van Bentem y col., 2006). Este proceso es uno de los mecanismos más comunes en la regulación de numerosos procesos biológicos entre ellos, la división celular, el metabolismo y desarrollo, y también tiene lugar en las respuestas a señales hormonales y medioambientales. La fosforilación/desfosforilación de proteínas es probablemente el paso regulatorio más extendido en señalización, que afecta básicamente a todos los procesos celulares en diversos organismos (Budde y Chollet, 1988; Hunter, 2000; Manning y col., 2002). En particular las plantas han hecho de la fosforilación/desfosforilación un mecanismo específico y sofisticado para resistir a condiciones desfavorables, de esta forma la transducción de señales mediante la fosforilación de proteínas, es una forma de autoprotección en respuesta a situaciones de estrés (Fukao y col., 2003).

La fosforilación de proteínas tiene un papel importante en el mecanismo de acción de fitohormonas como las auxinas. Procesos de fosforilación afectan el transporte de auxinas mediante la activación, modificación, redistribución, o degradación de las proteínas y/o complejos transportadores de auxinas, así mediante este mecanismo las plantas regulan la actividad y localización de este tipo de proteínas (Titapiwatanakun y Murphy, 2008). El Ca^{+2} parece tener un papel importante en este proceso, promoviendo la fosforilación de proteínas en diferentes especies de plantas (Salimath y Marmé, 1983;

Veluthambi y Poovaiah, 1984; Raghothama y col., 1987), por lo cual algunos procesos de fosforilación inducidos por auxinas son mediados directamente por la acción del calcio, y debidos al efecto de las auxinas sobre los niveles intracelulares de calcio (Lee y col., 1983; Gehring y col., 1990a; Allan y Rubery, 1991; Lee y col., 2008b), además dicha fosforilación estaría modulada por calmodulina (Veluthambi y Poovaiah, 1984).

La inducción de la fosforilación de proteínas por el tratamiento con el herbicida auxínico 2,4-D se ha demostrado en el núcleo de hipocótilos de soja (Murray y Key, 1978), y en mitocondrias aisladas de hipocótilos de *Vicia faba* (Matlib y col., 1972). No obstante en peroxisomas no existe información de la inducción de procesos de fosforilación como consecuencia de la aplicación de este herbicida. Tampoco se ha descrito con anterioridad el patrón de proteínas fosforiladas en estos orgánulos; si bien, si se ha demostrado la presencia de fosfatasas y kinasas en estos orgánulos, lo que sugiere que la fosforilación/desfosforilación de proteínas puede ser un importante mecanismo de regulación del metabolismo de estos orgánulos (Fukao y col., 2002; Fukao y col., 2003).

En este trabajo se ha observado que el 2,4-D produce un aumento de la fosforilación de proteínas, tanto en extractos, como en peroxisomas purificados. El análisis de proteínas fosforiladas mediante purificación por afinidad, separación de las proteínas por electroforesis 2D y análisis mediante MS MALDI-TOF mostró un gran número de proteínas. Sin embargo, no todas ellas pudieron ser identificadas debido a la baja concentración en que se encuentran en el gel. En la tabla 4.2 se muestran solo aquellas manchas que fueron identificadas con una probabilidad igual o superior al 68%. Entre las proteínas fosforiladas encontradas mayoritariamente en peroxisomas de plantas tratadas con 2,4-D 22,6 mM, se halla la catalasa, de la cual se han identificado las isoformas 2 y 3. El proceso de fosforilación de la catalasa está descrito en células animales; así, en situaciones de estrés la producción de H₂O₂ induce la unión de c-Abl y Arg a la proteína catalasa, estas proteínas pertenecientes a la familia tirosin quinasa, fosforilan la catalasa en los residuos Tyr²³¹ y Tyr³⁸⁶ (Cao y col., 2003). Este parece ser un mecanismo en respuesta a situaciones de estrés oxidativo, para controlar los niveles de H₂O₂ mediante la activación de la enzima catalasa. En plantas se ha descrito la activación de la catalasa dependiente de Ca²⁺/CaM (Yang y Poovaiah, 2002). En hepatocitos la concentración basal de Ca²⁺ se incrementa en función de la concentración del herbicida 2,4-D (Palmeira y col., 1995), y en plantas se ha demostrado el incremento en la concentración de calcio después del tratamiento con 2,4-D (Gehring y col., 1990a; Gehring y col., 1990b). Este incremento de Ca²⁺ citosólico podría activar la catalasa en peroxisomas de hojas de plantas de guisante; sin embargo, la fosforilación de esta proteína no parece modificar la actividad de la misma según se ha

Discusión

observado en extractos de plantas tratadas con 2,4-D. No obstante, podría contribuir a la estabilidad de la proteína en situaciones de fuerte estrés oxidativo, ya que esta proteína es muy sensible a la oxidación. Posteriores estudios del papel de la fosforilación sobre la estabilidad y actividad de esta proteína son necesarios.

La enzima peroxisomal NAD^+ malato deshidrogenasa (PMDH) también se ha modificado entre las proteínas fosforiladas. No obstante, se encontró significativamente reducida en los peroxisomas de plantas tratadas con 2,4-D con respecto a los de plantas control. Su principal función parece ser la reducción de oxalacetato (OAA) a malato, y la concomitante oxidación del NADH necesario para la β -oxidación de ácidos grasos (Pracharoenwattana y col., 2007). Sin embargo, su papel en la oxidación del malato produciendo oxalacetato, como paso clave en el ciclo del glioxilato está todavía en discusión (Reumann, 2002; Cousins y col., 2008). La reducción en el estado de fosforilación de esta proteína podría estar relacionada con el descenso en la actividad GOX observado en las plantas tratadas con 2,4-D. Es muy probable que la PMDH esté involucrada en el ciclo del glioxilato y que su actividad se vea modificada por fosforilación/desfosforilación, siendo este el paso limitante para la entrada de OAA al ciclo. En las plantas tratadas con 2,4-D la fuente de OAA podría estar reducida a causa de la inactivación de la PMDH y como consecuencia de ello tendría lugar una reducción en la actividad de la GOX y el correspondiente descenso en la fotorrespiración.

Otra de las proteínas identificadas es la HSP60; sin embargo, la localización peroxisomal de esta proteína no ha sido demostrada. No obstante, en estudios proteómicos de peroxisomas de *Arabidopsis* se ha descrito la presencia de una HSP 70 (Reumann y col., 2009) y una HSP 15,7 (Ma y col., 2006); y por tanto, no podemos descartar la presencia de la HSP 60 en peroxisomas de guisante. En células animales se ha descrito que la HSP27 puede fosforilarse y este proceso promueve la fragmentación de agregados de esta proteína en respuesta a estrés (Dalle-Donne y col., 2001). Las HSP fosforiladas pueden actuar como proteínas de unión a la actina (ABP) previniendo su despolimerización y estabilizando los microfilamentos de actina (Dalle-Donne y col., 2001). Este hecho podría explicar la inducción de HSPs en respuesta a 2,4-D observado en esta Memoria como un mecanismo de protección.

La GOX es una proteína muy abundante en peroxisomas y es una enzima clave en la fotorrespiración. En el presente estudio se ha descrito la posible fosforilación de esta proteína, aunque no experimenta cambios en la intensidad de la banda por efecto del tratamiento con 2,4-D. Hasta la fecha no se ha descrito el papel que esta modificación postraduccional pueda tener en la actividad o estabilidad de la proteína; sin embargo, dada

la importancia de esta proteína en el metabolismo celular y su dependencia de la luz y del metabolismo del cloroplasto, debe ejercer algún papel regulador aún por determinar.

La SOD también parece ser susceptible de modificación por fosforilación. La proteína identificada como SOD podría ser la Mn-SOD peroxisomal en base a su peso molecular (Sandalo y col., 1987), aunque también podría tratarse de la proteína mitocondrial, ya que es difícil diferenciar ambas (del Río y col., 2003). El papel de la fosforilación de la Mn-SOD no ha sido estudiado, si bien, en células animales se ha descrito que la fosforilación de la CuZn-SOD induce a una reducción de la actividad de la proteína (Csar y col., 2001). La presencia de la misma actividad en dos orgánulos diferentes sugiere que el importe de la proteína a uno u otro podría estar mediado por este tipo de modificaciones de la proteína. Posteriores estudios nos permitirán evaluar el papel de la fosforilación de las SODs en este aspecto así como en la actividad y estabilidad de estas proteínas.

Adicionalmente se encontraron otras proteínas fosforiladas no peroxisomales que se deben a contaminaciones con restos de otros orgánulos celulares. Este es un problema inherente a los métodos utilizados para el aislamiento de los peroxisomas y es un problema recurrente en distintos trabajos realizados en estudios de proteómica de peroxisomas (Eubel y col., 2008). La mayor parte de la contaminación procede de proteínas mitocondriales, debido a la abundancia de estos orgánulos y a la similitud en tamaño. En la optimización del método de purificación utilizado se evaluó lo valores de contaminación cruzada para ambos orgánulos siendo este de 1 y 2 % para cloroplastos y mitocondrias respectivamente (López- Huertas y col., 1995). Algunas proteínas cloroplastídicas también suelen acompañar a las peroxisomales como contaminantes, entre estas proteínas cabe destacar la presencia de la Rubisco. Una de las isoformas de la Rubisco se encontraba significativamente disminuida en el tratamiento con 2,4-D, lo cual podría estar afectando su actividad en la fotorrespiración como fuente de 2 fosfoglicolato lo que concuerda con la reducción de la actividad GOX observada por efecto del 2,4-D.

Entre las proteínas mitocondriales, cabe destacar la piruvato deshidrogenasa y la serina hidroximetil transferasa. La piruvato deshidrogenasa esta implicada en el ciclo del ácido cítrico en mitocondrias, y es bien conocida su regulación por fosforilación/desfosforilación (Buchanan y col., 2000), su forma fosforilada es inactiva, lo que sugiere que en estas condiciones, el ciclo del ácido cítrico se encuentra negativamente afectado por el 2,4-D.

Finalmente, la Fig 5.1 muestra un resumen de los efectos del 2,4-D y la respuesta celular analizados en esta Memoria Doctoral. A lo largo de este trabajo se ha demostrado

Discusión

que el herbicida 2,4-D induce la producción de ROS, tanto en las hojas de plantas de guisante como en *Arabidopsis*, y se han identificado los sistemas generadores de ROS, tanto en hojas jóvenes como adultas. Entre estos sistemas cabe destacar la contribución de la acil CoA oxidasa peroxisomal ya que los mutantes de *Arabidopsis* deficientes en el gen *acx1* son más resistentes al herbicida y presentan muy reducida la producción de ROS en respuesta al 2,4-D. Otros sistemas que contribuyen a la producción de ROS son la XOD peroxisomal, la lipoxigenasa, la NADPH oxidasa y posiblemente las peroxidases de pared celular. Estos sistemas podrían inducirse de una forma secuencial en el tiempo ya que en los estudios realizados con el mutante *acx1* a distintos tiempos de tratamiento, demuestran un incremento de la producción de H₂O₂ a medida que se incrementa el tiempo de exposición al herbicida. En células de tabaco expuestas a altas concentraciones de Cd se ha observado una activación secuencial de la NADPH oxidasa, posteriormente la producción de ROS tenía lugar también en la mitocondria y finalmente a través de la formación de peróxidos lipídicos (Garnier y col., 2006). En relación con el 2,4-D los resultados obtenidos sugieren que la ACX podría ser una de las principales fuentes de ROS al comienzo del tratamiento y el resto podría inducirse a medida que progresa el estrés oxidativo. En plantas de guisante la producción de ROS se ve favorecida por la ausencia de una inducción significativa de enzimas antioxidantes, tanto en la parte apical como basal.

Las ROS producidas por el 2,4-D desempeñan distintas funciones dependiendo de la edad de las hojas analizadas. Así, en las hojas apicales participarían en el desarrollo de la epinastia foliar y la proliferación de haces vasculares. Mientras que en las hojas adultas inducirían procesos de senescencia y posiblemente muerte celular.

El herbicida también induce puntualmente la síntesis de NO después de 1 h de tratamiento, lo que conduce a S-nitrosilación de proteínas, entre ellas la actina, lo que se traduce en modificaciones del citoesqueleto. La inducción de ET dependiente del 2,4-D también contribuye a la sintomatología de este herbicida y junto con las ROS va a regular la defensa celular mediante la inducción de proteínas de defensa, entre ellas quitinasas y una HSP.

En esta Memoria de Tesis se ha demostrado además que la toxicidad de este herbicida podría deberse en gran medida a las alteraciones que provoca sobre el citoesqueleto que afectan a la dinámica de los peroxisomas y posiblemente otros orgánulos lo que podría traducirse en alteraciones importantes del metabolismo celular.

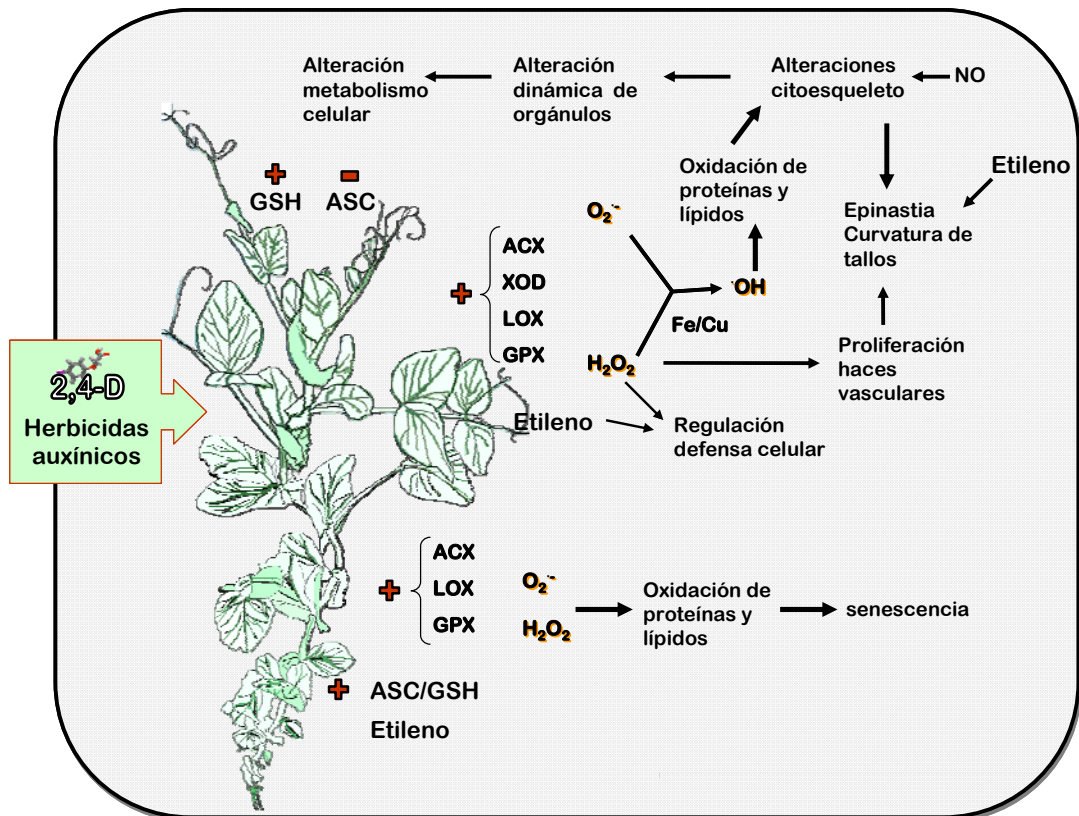


Figura 5.1: Esquema de efecto del 2,4-D sobre el metabolismo de ROS y NO en plantas y su función en el mecanismo de toxicidad de este fenoxiherbicida. +, inducción; -, reducción.

CONCLUSIONES

1.- El herbicida 2,4-D produce un estrés oxidativo en hojas caracterizado por un incremento de la producción de especies de oxígeno reactivo (H_2O_2 , $O_2^{\cdot -}$ y $\cdot OH$), como consecuencia de la activación de la acil CoA oxidasa y la xantina oxidasa peroxisomales, la lipoxigenasa y la NADPH oxidasa, sin que se produzca un incremento paralelo de sistemas antioxidantes. En hojas apicales las especies de oxígeno reactivo participarían en el desarrollo de epinastia foliar y curvatura de tallos, mientras que en las hojas basales estarían más asociadas con la inducción del programa de senescencia celular.

2.- La epinastia foliar inducida por el 2,4-D está asociada a la proliferación de haces vasculares y modificaciones del citoesqueleto por oxidación y S-nitrosilación de la actina. Este proceso es dependiente de $\cdot OH$, etileno y fosforilación/desfosforilación de proteínas y lleva consigo una reducción importante de la dinámica de los peroxisomas, lo que podría afectar considerablemente al metabolismo celular.

3.- El 2,4-D provoca en hojas jóvenes y adultas la inducción de la síntesis de proteínas de defensa en respuesta al incremento de la producción de las especies de oxígeno reactivo y de etileno.

4.- En esta Memoria de Tesis se ha descrito por vez primera el patrón de proteínas fosforiladas de peroxisomas de hojas, identificándose la CAT, GOX, MDH, HSP 60 y Mn-SOD, entre ellas. El tratamiento con 2,4-D produce un incremento de la fosforilación de proteínas que podría regular la actividad de enzimas antioxidantes y del ciclo de la fotorrespiración.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdellatif AG, Pr at V, Vamecq J, Nilsson R, Roberfroid M** (1990) Peroxisome proliferation and modulation of rat liver carcinogenesis by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, perfluorooctanoic acid and nafenopin. *Carcinogenesis* **11**: 1899-1902
- Abdrakhamanova A, Wang QY, Khokhlova L, Nick P** (2003) Is microtubule disassembly a trigger for cold acclimation? *Plant & Cell Physiology* **44**: 676-686
- Abel S, Theologis A** (1996) Early genes and auxin action. *Plant Physiology* **111**: 9-17
- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME** (1992) Ethylene in plant biology. Academic Press, San Diego (USA)
- Aebi H** (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* **105**: 121-126
- Ahrens WH** (1994) *Herbicide Handbook*, Ed 7th. Weed Science Society of America
- Alfenito MR, Souer E, Goodman CD, Buell R, Mol J, Koes R, Walbot V** (1998) Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *The Plant Cell* **10**: 1135-1150
- Alscher RG, Donahue JL, Cramer CL** (1997) Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiologia Plantarum* **100**: 224-233
- Allan AC, Fluhr R** (1997) Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *The Plant Cell* **9**: 1559-1572
- Allan AC, Rubery PH** (1991) Calcium deficiency and auxin transport in *Cucurbita pepo* L. seedlings. *Planta* **183**: 604-612
- Allan V, Vale R** (1994) Movement of membrane tubules along microtubules in vitro: evidence for specialised sites of motor attachment. *J Cell Sci* **107**: 1885-1897
- Allender W, Cresswell GC, Kaldor J, Kennedy IR** (1997) Effect of lithium and lanthanum on herbicide induced hormesis in hydroponically-grown cotton and corn. *Journal of Plant Nutrition* **20**: 81-95
- Allwood E, G., Smertenko A, P., Hussey P, J.** (2001) Phosphorylation of plant actin-depolymerising factor by calmodulin-like domain protein kinase. *FEBS Letters* **499**: 97-100
- Ananvoranich S, Gulick P, Ibrahim RK** (1995) Flavonol sulfotransferase-like cDNA clone from *Flaveria bidentis*. *Plant Physiology* **107**: 1019-1020
- Anderson J, Thomson W** (1973) The effects of herbicides on the ultrastructure of plant cells. *Residue Reviews* **47**: 167-189
- André B, Scherer GFE** (1991) Stimulation by auxin of phospholipase A in membrane vesicles from an auxin-sensitive tissue is mediated by an auxin receptor. *Planta* **185**: 209-214
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 373-399
- Apostol I, Heinstejn PF, Low PS** (1989) Rapid Stimulation of an Oxidative Burst during Elicitation of Cultured Plant Cells : Role in Defense and Signal Transduction. *Plant Physiology* **90**: 109-116
- Arteca RN, Arteca JM** (2008) Effects of brassinosteroid, auxin, and cytokinin on ethylene production in *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of Experimental Botany* **59**: 3019-3026
- Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J** (1989) The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and

Bibliografía

hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine* **6**: 593-597

Asada K (1992) Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **85**: 2235-2241

Asada K (1994a) Molecular properties of ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. En: *Frontiers of Reactive Oxygen Species in Biology and Medicine*. (K Asada, T Yoshikawa, eds). pp 103–106. Amsterdam, Elsevier

Asada K (1994b) Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. En: *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*. (C Foyer, P Mullineaux, eds). pp 77-104. Boca Raton, CRC Press

Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* **141**: 391-396

Asada K, Takahashi M (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. En: *Photoinhibition*. (DJ Kyle, CB Osmond, CJ Arntzen, eds). pp 227-287. Amsterdam, Elsevier

Avisar D, Prokhnovsky AI, Makarova KS, Koonin EV, Dolja VV (2008) Myosin XI-K is required for rapid trafficking of golgi stacks, peroxisomes, and mitochondria in leaf cells of *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiology* **146**: 1098-1108

Babior BM (2004) NADPH oxidase. *Current opinion in immunology* **16**: 42-47

Badescu GO, Napier RM (2006) Receptors for auxin: will it all end in TIRs? *Trends in Plant Science* **11**: 217-223

Baker A, Graham IA (2002) Plant peroxisomes, biochemistry, cell biology and biotechnological applications. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands

Banan A, Fields JZ, Zhang Y, Keshavarzian A (2001) iNOS upregulation mediates oxidant-induced disruption of F-actin and barrier of intestinal monolayers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**: G1234-1246

Banan A, Zhang Y, Losurdo J, Keshavarzian A (2000) Carbonylation and disassembly of the F-actin cytoskeleton in oxidant induced barrier dysfunction and its prevention by epidermal growth factor and transforming growth factor alpha in a human colonic cell line. *Gut* **46**: 830– 837

Barber J (1998) Photosystem two. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Bioenergetics* **1365**: 269-277

Barnes D, Mayfield S (2003) Redox control of posttranslational process in the chloroplast. *Antioxidants & Redox Signaling* **5**: 89-94

Barr R, Garcia C, Morr  DJ (2000) Touch-sensitive NADH oxidase activity of pea and cucumber tendrils and soybean hypocotyl sections. *International Journal of Plant Sciences* **161**: 387-391

Bartoli CG, Guamet JJ, Kiddle G, Pastori GM, Di Cagno R, Theodoulou FL, Foyer CH (2005) Ascorbate content of wheat leaves is not determined by maximal l-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) activity under drought stress. *Plant, Cell & Environment* **28**: 1073-1081

Basler E, Hansen TL (1964) Some effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and sucrose on orotic-acid uptake in nucleic acids of excised cotton cotyledons. *Botanical Gazette* **125**: 50-55

Basu D, Le J, Zakharova T, Mallery EL, Szymanski DB (2008) A SPIKE1 signaling complex controls actin-dependent cell morphogenesis through the heteromeric WAVE and ARP2/3 complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 4044-4049

Beauchamp P, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase. Improved assays and

an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**: 276-287

Benjamins R, Scheres B (2008) Auxin: The looping star in plant development. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 443-465

Bennett MJ, Marchant A, Green HG, May ST, Ward SP, Millner PA, Walker AR, Schulz B, Feldmann KA (1996) *Arabidopsis* AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* **273**: 948-950

Bennoun P (1982) Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **79**: 4352-4356

Bertagnolli BL, Nadakavukaren MJ (1971) Effect of 2,4-D on the fine structure of *Chlorella pyrenoidosa* chick. *Journal of phycology* **7**: 98-100

Bilang J, Macdonald H, King PJ, Sturm A (1993) A soluble auxin-binding protein from *Hyoscyamus muticus* is a glutathione S-transferase. *Plant Physiology* **102**: 29-34

Binet M-N, Humbert C, Lecourieux D, Vantard M, Pugin A (2001) Disruption of microtubular cytoskeleton induced by cryptogein, an elicitor of hypersensitive response in tobacco cells. *Plant Physiology* **125**: 564-572

Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Lee OR, Mravec J, Titapiwatanakun B, Sauer M, Makam SN, Cheng Y, Bouchard R, Adamec J, Geisler M, Nagashima A, Sakai T, Martinoia E, Friml J, Peer WA, Murphy AS (2007) Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**: 131-147

Blancaflor EB, Masson PH (2003) Plant gravitropism. Unraveling the ups and downs of a complex process. *Plant Physiology* **133**: 1677-1690

Blancaflor EB, Zhao L, Harrison MJ (2001) Microtubule organization in root cells of *Medicago truncatula* during development of an

arbuscular mycorrhizal symbiosis with *Glomus versiforme*. *Protoplasma* **217**: 154-165

Blazquez S, Olmos E, Hernández J, Fernández-García N, Fernández J, Piqueras A (2009) Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **97**: 49-57

Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* **433**: 39-44

Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* **91**: 179-194

Bogër P, Sadmann G (1988) Action of modern herbicides. En: *Photosynthesis*. (Raghavedra, ed). pp 337-351 Cambridge, UK, Cambridge University Press

Boldogh IR, Pon LA (2006) Interactions of mitochondria with the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1763**: 450-462

Bolwell GP, Butt V, Savies DR, Zimmerlin A (1995) The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radical Research* **23**: 517-532

Bors W, Heller W, Michel C, Saran M (1990) Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology* **186**: 343-355

Bowler C, Montagu MV, Inzé D (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**: 83-116

Bradberry SM, Watt BE, Proudfoot AT, Vale JA (2000) Mechanisms of toxicity, clinical features, and management of acute

chlorophenoxy herbicide poisoning: a review. *Clinical Toxicology* **38**: 111-122

Broekaert W, Lee H, Kush A, Chua NH, Raikhel NV (1990) Wound-induces accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). Proceedings of the National Academy of Sciences **87**: 7633-7637

Bronsema FBF, van Oostveen WJF, van Lammeren AAM (2001) Influence of 2,4-D, TIBA and 3,5-D on the growth response of cultured maize embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **65**: 45-56

Brough D, Schell MJ, Irvine RF (2005) Agonist-induced regulation of mitochondrial and endoplasmic reticulum motility. *Biochemical Journal* **392**: 291-297

Brul S, Nussbaum J, Dielbandhoesing SK (1997) Fluorescent probes for wall porosity and membrane integrity in filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods* **28**: 169-178

Buchanan B, Gruissem W, Jones R (2000) *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, USA

Buchanan B, Luan S (2005) Redox regulation in the chloroplast thylakoid lumen: a new frontier in photosynthesis research. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1439-1447

Budde RJA, Chollet R (1988) Regulation of enzyme activity in plants by reversible phosphorylation. *Physiologia Plantarum* **72**: 435-439

Buege J, Aust S (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* **52**: 302-310

Burnett EC, Desikan R, Moser RC, Neill SJ (2000) ABA activation of an MBP kinase in *Pisum sativum* epidermal peels correlates with stomatal responses to ABA. *Journal of Experimental Botany* **51**: 197-205

Butt D (1980) *Metabolism and Respiration*. En: *The Biochemistry of Plants*. (D David D, ed). Vol 2, Academic Press

Cadenas E (1989) *Biochemistry of Oxygen Toxicity*. *Annual Review of Biochemistry* **58**: 79-110

Cajaraville MP, Cancio I, Ibabe A, Orbea A (2003) Peroxisome proliferation as a biomarker in environmental pollution assessment. *Microscopy Research and Technique* **61**: 191-202

Calderon-Villalobos LIA, Kuhnle C, Li H, Rosso M, Weisshaar B, Schwechheimer C (2006) LucTrap vectors are tools to generate luciferase fusions for the quantification of transcript and protein abundance *in vivo*. *Plant Physiology* **141**: 3-14

Cao C, Leng Y, Kufe D (2003) Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 29667-29675

Cárdenas J, Slife F, Hanson JB, Butler H (1968) Physiological changes accompanying the death of cocklebur plants treated with 2,4-D. *Weed Science* **16**: 96-100

Casey R (1999) *Lipoxygenases*. En: *Seed proteins*. (R Casey, PR Shewry, eds). London, Chapman and Hall .

Cobb A (1992) *Auxin-type herbicides*. En: *Herbicides and plant physiology* (AH Cobb, ed). pp 82-106. London, UK, Chapman and Hall

Collings DA, Harper JDI, Marc J, Overall RL, Mullen RT (2002) Life in the fast lane: actin-based motility of plant peroxisomes. *Canadian journal of botany* **80**: 430-441

Corpas F, Palma J, Sandalio L, Valderrama R, Barroso J, del Río L (2008) Peroxisomal xanthine oxidoreductase: Characterization of the enzyme from pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Journal of Plant Physiology* **165**: 1319-1330

- Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Quiros M, León AM, Romero-Puertas MC, Esteban FJ, Valderrama R, Palma JM, Sandalio LM, Gómez M, del Río LA** (2004a) Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiology* **136**: 2722-2733
- Corpas FJ, Barroso JB, del Río L** (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science* **6**: 145-150
- Corpas FJ, Barroso JB, del Río LA** (2004b) Enzymatic sources of nitric oxide in plant cells - beyond one protein - one function. *New Phytologist* **162**: 246-248
- Corpas FJ, Barroso JB, Sandalio LM, Distefano S, Palma JM, Lupiáñez JA, del Río LA** (1998) A dehydrogenase-mediated recycling system of NADPH in plant peroxisomes. *Biochemical Journal* **330**: 777-784
- Corpas FJ, Palma JM, Sandalio LM, López-Huertas E, Romero-Puertas MC, Barroso JB, del Río LA** (1999) Purification of catalase from pea leaf peroxisomes: Identification of five different isoforms. *Free Radical Research* **31**
- Cosgrove DJ** (1999) Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 391-417
- Cousins AB, Pracharoenwattana I, Zhou W, Smith SM, Badger MR** (2008) Peroxisomal malate dehydrogenase is not essential for photorespiration in *Arabidopsis* but its absence causes an increase in the stoichiometry of photorespiratory CO₂ release. *Plant Physiology* **148**: 786-795
- Creissen G, Edwards EA, Mullineaux P** (1994) Glutathione reductase and ascorbate peroxidase. En: *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. (CH Foyer, P Mullineaux, eds). Boca Raton, CRC Press
- Creissen G, Firmin J, Fryer M, Kular B, Leyland N, Reynolds H, Pastori G, Wellburn F, Baker N, Wellburn A, Mullineaux P** (1999) Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *The Plant Cell* **11**: 1277-1292
- Creissen G, Mullineaux P** (2002) The molecular biology of the ascorbate-glutathione cycle in higher plants. En: *Oxidative Stress in Plants*. (D Inzé, M Van Montagu, eds). pp 247-269. London, Taylor and Francis
- Csar XF, Wilson NJ, Strike P, Sparrow L, McMahon KA, Ward AC, Hamilton JA** (2001) Copper/zinc superoxide dismutase is phosphorylated and modulated specifically by granulocyte-colony stimulating factor in myeloid cells. *PROTEOMICS* **1**: 435-443
- Cummins I, Cole DJ, Edwards R** (1997) Purification of multiple glutathione transferases involved in herbicide detoxification from wheat (*Triticum aestivum* L.) treated with the safener fenchlorazole-ethyl. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **59**: 35-49
- Cummins I, Cole DJ, Edwards R** (1999) A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *The Plant Journal* **18**: 285-292
- Cutler SR, Ehrhardt DW, Griffitts JS, Somerville CR** (2000) Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 3718-3723
- Chance B, Sies H, Boveris A** (1997) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews* **59**: 527-535
- Chen G-X, Asada K** (1989) Ascorbate peroxidase in tea leaves: Occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant & Cell Physiology* **30**: 987-998

Bibliografía

- Chen L, Switzer C, Fletcher R** (1972) Nucleic acid and protein changes induced by auxin-like herbicides. *Weed Science* **20**: 53-55
- Cheong YH, Chang H-S, Gupta R, Wang X, Zhu T, Luan S** (2002) Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **129**: 661-677
- Choi S, Jeong S, Jeong W, Kwon S, Chow W, Park Y-I** (2002) Chloroplast Cu/Zn-superoxide dismutase is a 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. *Analytical Biochemistry* **162**: 156-159
- Chrispeels MJ, Hanson JB** (1962) The increase in ribonucleic acid content of cytoplasmic particulates of soybean hypocotyl induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Weeds* **10**: 123-125
- Chu W, Kwan CY, Chan KH, Chong C** (2004) An unconventional approach to studying the reaction kinetics of the Fenton's oxidation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Chemosphere* **57**: 1165-1171
- Chuong SDX, Good AG, Taylor GJ, Freeman MC, Moorhead GBG, Muench DG** (2004) Large-scale identification of tubulin-binding proteins provides insight on subcellular trafficking, metabolic channeling, and signaling in plant cells. *Molecular & Cellular Proteomics* **3**: 970-983
- Dalle-Donne I, Rossi R, Milzani A, Di Simplicio P, Colombo R** (2001) The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free Radical Biology and Medicine* **31**: 1624-1632
- Dantán-González E, Rosenstein Y, Quinto C, Sánchez F** (2001) Actin monoubiquitylation is induced in plants in response to pathogens and symbionts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 1267-1273
- Dat J, Lopez-Delgado H, Foyer C, Scott IM** (1998) Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiology* **116**: 1351-1357
- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* **57**: 779-795
- Davies BJ** (1964) Disc electrophoresis II. Methods and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* **121**: 407-427
- de Azevedo Neto AD, Prisco JT, Enéas-Filho J, Rolim Medeiros J-V, Gomes-Filho E** (2005) Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants. *Journal of Plant Physiology* **162**: 1114-1122
- del Río L, Corpas FJ, Barroso JB** (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* **65**: 783-792
- del Río L, Fernández V, Rupérez F, Sandalio LM, Palma JM** (1989) NADH induces the generation of superoxide radicals in leaf peroxisomes. *Plant Physiology* **89**: 728-731
- del Río L, 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*. (A Baker, I Graham, eds). Netherlands, Kluwer Academic Publishers
- del Río L, 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. *Journal of Inorganic Biochemistry* **24**: 25-34
- del Río LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gómez M, Barroso JB** (2002b) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1255-1272
- del Río LA, Gómez M, Leal A, López G** (1977) A more sensitive modification of the catalase assay with the Clark oxygen electrode. *Analytical Biochemistry* **80**: 409-415
- del Río LA, Sandalio LM, Altomare DA, Zilinskas BA** (2003) Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **54**: 923-933
- del Río LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB** (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* **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 Radical Biology and Medicine* **13**: 557-580
- Delbarre A, Muller P, Imhoff V, Guern J** (1996) Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* **198**: 532-541
- Delker C, Raschke A, Quint M** (2008) Auxin dynamics: the dazzling complexity of a small molecule's message. *Planta* **227**: 929-941
- Desikan R, A.-H.-Mackerness S, Hancock JT, Neill SJ** (2001) Regulation of the Arabidopsis Transcriptome by Oxidative Stress. *Plant Physiology* **127**: 159-172
- Devine M, Duke S, Fedtke C** (1993) *Physiology of herbicide action*, Ed 2. Prentice-Hall., New York, US
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M** (2005a) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 441-445
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Jones AM, Estelle M** (2003) Auxin Action in a Cell-Free System. *Current Biology* **13**: 1418-1422
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E, Yamada M, Hobbie L, Ehrismann JS, Jürgens G, Estelle M** (2005b) Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Developmental Cell* **9**: 109-119
- Díaz M, De Haro V, Munoz R, Quiles MJ** (2007) Chlororespiration is involved in the adaptation of *Brassica* plants to heat and high light intensity. *Plant, Cell & Environment* **30**: 1578-1585
- Dietz K-J, Scheibe R** (2004) Redox regulation: an introduction. *Physiologia Plantarum* **120**: 1-3
- Doke N** (1985) NADPH-dependent O₂-generation in membrane fraction isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiological plant pathology* **27**: 311-322
- Dollinger M** (2005) Classification of herbicides according to mode of action. *En HRAC*, ed, Herbicide Resistance Action Committee, Leverkusen
- Douce R, Heldt H-W** (2000) Photorespiration *En: Photosynthesis: physiology and metabolism*. (R Leegood, T Sharkey, S von Cammerer, eds). pp 115-136. Dordrecht, Holland, Kluwer Academic Publishers
- Drotar A, Phelps P, Fall R** (1985) Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Science* **42**: 35-40

Bibliografía

- Durner J, Klessig DF** (1999) Nitric oxide as a signal in plants Current Opinion in Plant Biology **2**: 369-374
- Edwards R** (1996) Characterisation of glutathione transferases and glutathione peroxidases in pea (*Pisum sativum*). Physiologia Plantarum **98**: 594-604
- Edwards R, Dixon DP, Walbot V** (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. Trends in Plant Science **5**: 193-198
- Eising R, Trelease RN, Ni W** (1990) Biogenesis of catalase in glyoxysomes and leaf-type peroxisomes of sunflower cotyledons. Archives of Biochemistry and Biophysics **278**: 258-264
- Engvild KC** (1996) Herbicidal activity of 4-chloroindoleacetic acid and other auxins on pea, barley and mustard. Physiologia Plantarum **96**: 333-337
- Esaka M, Fujisawa K, Goto M, Kisu Y** (1992) Regulation of ascorbate oxidase expression in pumpkin by auxin and copper. Plant Physiology **100**: 231-237
- Eshdat Y, Holland D, Faltin Z, Ben-Hayyim G** (1997) Plant glutathione peroxidases. Physiologia Plantarum **100**: 234-240
- Eubel H, Meyer EH, Taylor NL, Bussell JD, O'Toole N, Heazlewood JL, Castleden I, Small ID, Smith SM, Millar AH** (2008) Novel proteins, putative membrane transporters, and an integrated metabolic network are revealed by quantitative proteomic analysis of Arabidopsis cell culture peroxisomes. Plant Physiology **148**: 1809-1829
- Falka J, Andersena G, Kernebeck B, Krupinska K** (2003) Constitutive overexpression of barley 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in tobacco results in elevation of the vitamin E content in seeds but not in leaves. FEBS Letters **540**: 35-40
- Fang SC, Teeny F, Butts JS** (1960) Influence of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on pathways of glucose utilization in bean stem tissues. Plant Physiology **35**: 405-408
- Fang SC, Teeny F, Butts JS** (1961) Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on utilization of labeled acetate by bean leaf & stem tissues. Plant Physiology **36**: 192-196
- Fauconnier M-L, Mouttalib A, Diallo B, Jaziri M** (2001) Changes in lipoxygenase and hydroperoxide decomposition activities in tissue cultures of soybean Journal of Plant Physiology **158**: 953-955
- Feraru E, Friml J** (2008) PIN Polar Targeting. Plant Physiology **147**: 1553-1559
- Feussner I, Kuhn H, Wasternack C** (2001) Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. Trends in Plant Science **6**: 268-273
- 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. American Journal of Physiology. Cell Physiology **287**: C895-902
- Foissner I, Lichtscheidl IK, Wasteneys GO** (1996) Actin-based vesicle dynamics and exocytosis during wound wall formation in characean internodal cells. Cell Motility and the Cytoskeleton **35**: 35-48
- Folkes LK, Dennis MF, Stratford MRL, Candeias LP, Wardman P** (1999) Peroxidase-catalyzed effects of indole-3-acetic acid and analogues on lipid membranes, DNA, and mammalian cells in vitro. Biochemical Pharmacology **57**: 375-382
- Foyer C, Lelandais M, Galap C, Kunert KJ** (1991) Effects of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. Plant Physiology **97**: 863-872

- Foyer CH** (1993) Ascorbic acid. En: *Antioxidants in Higher Plants*. (RG Alscher, JI Hess, eds). Boca Raton, CRC Press
- Foyer CH** (2001) Prospects for enhancement of the soluble antioxidants, ascorbate and glutathione. *BioFactors* **15**: 75-78
- Foyer CH, Halliwell B** (1977) Purification and properties of dehydroascorbate reductase from spinach leaves. *Phytochemistry* **16**: 1347-1350
- Foyer CH, López-Delgado H, Dat JF, Scott IM** (1997) Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum* **100**: 241-254
- Foyer CH, Noctor G** (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* **119**: 355-364
- Foyer CH, Noctor G** (2005a) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment* **28**: 1056-1071
- Foyer CH, Noctor G** (2005b) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell* **17**: 1866-1875
- Frahry G, Schopfer P** (1998) Inhibition of O₂-reducing activity of horseradish peroxidase by diphenyleneiodonium. *Phytochemistry* **48**: 223-227
- Fry SC** (1998) Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochemical Journal* **332**: 507-515
- Fryer MJ, Oxborough K, Mullineaux PM, Baker NR** (2002) Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1249-1254
- Fuchs I, Philippar K, Hedrich R** (2006) Ion channels meet auxin action. *Plant Biology* **8**: 353-359
- Fujita M, Hanada Y, Tomita H, Takao N, Taniguchi N** (1998) Preliminary studies on organ specificities of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid-inducible glutathione S-transferases and new glutathione S-transferases preferential to developing organs in pumpkin (*Cucurbita maxima* Duch.). *Tech Bull Fac Agr Kagawa Uni* **50**: 105-113
- Fukao Y, Hayashi M, Hara-Nishimura I, Nishimura M** (2003) Novel glyoxysomal protein kinase, GPK1, identified by proteomic analysis of glyoxysomes in etiolated cotyledons of *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology* **44**: 1002-1012
- Fukao Y, Hayashi M, Nishimura M** (2002) Proteomic analysis of leaf peroxisomal proteins in greening cotyledons of *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology* **43**: 689-696
- Garnier L, Simon-Plas F, Thuleau P, Agnel J-P, Blein J-P, Ranjeva R, Montillet J-LUC** (2006) Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. *Plant, Cell and Environment* **29**: 1956-1969
- Gazaryan IG, Lagrimini LM, Ashby GA, Thorneley RN** (1996) Mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by plant peroxidases: anaerobic stopped-flow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases. *Biochemical Journal* **131**: 841-847
- Gehring CA, Irving HR, Parish RW** (1990a) Effects of auxin and abscisic acid on cytosolic calcium and pH in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**: 9645-9649
- Gehring CA, Williams DA, Cody SH, Parish RW** (1990b) Phototropism and geotropism in maize coleoptiles are spatially correlated with increases in cytosolic free calcium. *Nature* **345**: 528-530

- Geigenberger P, Kolbe A, Tiessn A** (2005) Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1469-1479
- Geisler M, Kolukisaoglu HU, Bouchard R, Billion K, Berger J, Saal B, Frangne N, Koncz-Kalman Z, Koncz C, Dudler R, Blakeslee JJ, Murphy AS, Martinoia E, Schulz B** (2003) TWISTED DWARF1, a unique plasma membrane-anchored immunophilin-like protein, interacts with *Arabidopsis* multidrug resistance-like transporters AtPGP1 and AtPGP19. *Molecular Biology of the Cell* **14**: 4238-4249
- Geisler M, Murphy AS** (2006) The ABC of auxin transport: The role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Letters* **580**: 1094-1102
- Gerhardt B** (1983) Localization of β -oxidation enzymes in peroxisomes isolated from nonfatty plant tissues. *Planta* **159**: 238-246
- Gogorcena Y, Iturbe-Ormaetxe I, Escuredo P, Becana M** (1995) Antioxidant defenses against activated oxygen in pea nodules subjected to water stress. *Plant Physiology* **108**
- Gonneau J, Mornet R, Laloue M** (1998) A *Nicotiana plumbaginifolia* protein labeled with an azido cytokinin agonist is a glutathione S-transferase. *Physiologia Plantarum* **103**: 114-124
- Gordon SA** (1954) Occurrence, formation, and inactivation of auxins. *Annual Review of Plant Physiology* **5**: 341-378
- Goyer A, Johnson TL, Olsen LJ, Collakova E, Shachar-Hill Y, Rhodes D, Hanson AD** (2004) Characterization and metabolic function of a peroxisomal sarcosine and pipercolate oxidase from *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 16947-16953
- Graeve K, Schaewen A, Scheibe R** (1994) Purification, characterization, and cDNA sequence of glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solatum tuberosum* L.). *The Plant Journal* **5**: 353-361
- Graham IA** (2008) Seed storage oil mobilization. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 115-142
- Grantz A, Brummell D, Bennett A** (1995) Ascorbate free radical reductase mRNA levels are induced by wounding. *Plant Physiology* **108**: 411-418
- Gray WM, del Pozo JC, Walker L, Hobbie L, Risseuw E, Banks T, Crosby WL, Yang M, Ma H, Estelle M** (1999) Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & development* **13**: 1678-1691
- Gray WM, Hellmann H, Dharmasiri S, Estelle M** (2002) Role of the Arabidopsis RING-H2 protein RBX1 in RUB modification and SCF function. *The Plant Cell* **14**: 2137-2144
- Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O, Estelle M** (2001) Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* **414**: 271-276
- Green M, Fry SC** (2005) Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. *Nature* **433**: 83-87
- Griffith OW** (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry* **106**: 207-212
- Grossmann K** (2000a) Mode of action of auxin herbicides: a new ending to a long, drawn out story. *Trends in Plant Science* **5**: 506-508
- Grossmann K** (2000b) The mode of action of quinclorac: a case study of a new auxin-type herbicide. En: *Herbicides and their mechanisms of action*. (AH Cobb, R Kirkwood, eds). pp 181-214. Sheffield, Sheffield Academic Press

- Grossmann K** (2003) Mediation of herbicide effects by hormone interactions. *Journal of Plant Growth Regulation* **22**: 109-122
- Grossmann K, Hansen H** (2001) Ethylene-triggered abscisic acid: A principle in plant growth regulation? *Physiologia Plantarum* **113**: 9-14
- Grossmann K, Kwiatkowski J** (1995) Evidence for a causative role of cyanide, derived from ethylene biosynthesis, in the herbicidal mode of action of quinclorac in barnyard grass. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **51**: 150-160
- Grossmann K, Kwiatkowski J, Tresch S** (2001) Auxin herbicides induce H₂O₂ overproduction and tissue damage in cleavers (*Galium aparine* L.). *Journal of Experimental Botany* **52**: 1811-1816
- Grossmann K, Retzlaff G** (1997) Bioregulatory effects of the fungicidal strobilurin kresoxim-methyl in wheat (*Triticum aestivum*). *Pesticide Science* **50**: 11-20
- Grossmann K, Scheltrup F, Kwiatkowski J, Caspar G** (1996) Induction of abscisic acid is a common effect of auxin herbicides in susceptible plants. *Journal of Plant Physiology* **149**: 475-478
- Guan LM, Scandalios JG** (2002) Catalase gene expression in response to auxin-mediated developmental signals. *Physiologia Plantarum* **114**: 288-295
- Guilfoyle T** (2007) Plant biology: Sticking with auxin. *Nature* **446**: 621-622
- Guilfoyle TJ, Hagen G** (2007) Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 453-460
- Guillén G, Valdés-López V, Noguez R, Olivares J, Rodríguez-Zapata LC, Pérez H, Vidali L, Villanueva MA, Sánchez F** (1999) Profilin in *Phaseolus vulgaris* is encoded by two genes (only one expressed in root nodules) but multiple isoforms are generated in vivo by phosphorylation on tyrosine residues. *The Plant Journal* **19**: 497-508
- Gutteridge JMC, Richmond R, Halliwell B** (1980) Oxygen free-radicals and lipid peroxidation: inhibition by the protein caeruloplasmin. *FEBS Letters* **112**: 269-272
- Habig W, MJ P, Jakoby W** (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of biological chemistry* **249**: 7130-7139
- Hagen G, Guilfoyle T** (2002) Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Molecular Biology* **49**: 373-385
- Hagen G, Martin G, Li Y, Guilfoyle TJ** (1991) Auxin-induced expression of the soybean GH3 promoter in transgenic tobacco plants. *Plant Molecular Biology* **17**: 567-579
- Hahlbrock K, Grisebach H** (1979) Enzymic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids. *Annual Review of Plant Physiology* **30**: 105-130
- Hall LN, Langdale JA** (1996) Molecular genetics of cellular differentiation in leaves. *New Phytologist* **132**: 533-553
- Hallam ND** (1970) Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and related compounds on the fine structure of the primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Experimental Botany* **21**: 1031-1038
- Hallam ND, Sargent JA** (1970) The localization of 2,4-D in leaf tissue. *Planta* **94**: 291-295
- Halliwell B, Gutteridge JMC** (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology* **186**: 1-85
- Halliwell B, Gutteridge JMC** (2000) *Free radicals in biology and medicine*, Oxford

Hansch R, Lang C, Rennenberg H, Mendel RR (2007) Significance of plant sulfite oxidase. *Plant Biology*: 589-595

Hansch R, Lang C, Riebeseel E, Lindigkeit R, Gessler A, Rennenberg H, Mendel RR (2006) Plant sulfite oxidase as novel producer of H₂O₂: combination of enzyme catalysis with a subsequent non-enzymatic reaction step. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 6884-6888

Hansen H, Grossmann K (2000) Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. *Plant Physiology* **124**: 1437-1448

Hanson AD, Roje S (2001) One-carbon metabolism in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 119-137

Hanson J, Slife F (1969) Role of RNA metabolism in the action of auxin-herbicides. *Residue Reviews* **25**: 59-67

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 Physiology* **46**: 782-789

Hashimoto K, Igarashi H, Mano S, Takenaka C, Shiina T, Yamaguchi M, Demura T, Nishimura M, Shimmen T, Yokota E (2008) An isoform of Arabidopsis myosin XI interacts with small GTPases in its C-terminal tail region. *Journal of Experimental Botany* **59**: 3523-3531

Hassan HM (1989) Microbial superoxide dismutases. En: *Advances in genetic*. (JG Scandalios, ed). pp 65-97. San Diego, Academic Press

Hatton PJ, Cummins I, Cole DJ, Edwards R (1999) Glutathione transferases involved in herbicide detoxification in the leaves of *Setaria faberi* (giant foxtail). *Physiologia Plantarum* **105**: 9-16

Hatton PJ, Cummins I, Price LJ, Cole DJ, Edwards R (1998) Glutathione transferases and herbicide detoxification in suspension-cultured cells of giant foxtail (*Setaria faberi*). *Pesticide Science* **53**: 209-216

Havir EA, Brisson LF, Zelitch I (1996) Distribution of catalase isoforms in *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* **41**: 699-702

Hayashi K-i, Tan X, Zheng N, Hatate T, Kimura Y, Kepinski S, Nozaki H (2008) Small-molecule agonists and antagonists of F-box protein-substrate interactions in auxin perception and signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 5632-5637

Hayashi M, Nishimura M (2003) Entering a new era of research on plant peroxisomes. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 577-582

Hayashi M, Toriyama K, Kondo M, Nishimura M (1998) 2,4-Dichlorophenoxybutyric acid-resistant mutants of *Arabidopsis* have defects in glyoxysomal fatty acid β -oxidation. *The Plant Cell* **10**: 183-195

Hellmann H, Hobbie L, Chapman A, Dharmasiri S, Dharmasiri N, Del Pozo C, Reinhardt D, Estelle M (2003) Arabidopsis AXR6 encodes CUL1 implicating SCF E3 ligases in auxin regulation of embryogenesis. *EMBO Journal* **22**: 3314-3325

Hewitt EJ (1966) Sand and Water Culture Methods used in the Study of Plant Nutrition. En: *Technical Communication No. 22* Ed Revised 2nd, pp 273-315. Commonwealth Agricultural Bureaux Farnham Royal Bucks

Hideg E, Barta C, Kalai T, Vass I, Hideg K, Asada K (2002) Detection of singlet oxygen and superoxide with fluorescent sensors in leaves under stress by photoinhibition or UV radiation. *Plant & Cell Physiology* **43**: 1154-1164

Hirt H (2000) Connecting oxidative stress, auxin, and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinase pathway.

Proceedings of the National Academy of Sciences **97**: 2405-2407

Holm RE, O'Brien TJ, Key JL, Cherry JH (1970) The Influence of auxin and ethylene on chromatin-directed ribonucleic acid synthesis in soybean hypocotyl. *Plant Physiology* **45**: 41-45

Hong JK, Yun B-W, Kang J-G, Raja MU, Kwon E, Sorhagen K, Chu C, Wang Y, Loake GJ (2008) Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance. *Journal of Experimental Botany* **59**: 147-154

Hong YN, Schopfer P (1981) Control by phytochrome of urate oxidase and allantoinase activities during peroxisome development in the cotyledons of mustard (*Sinapsis alba* L.) seedlings. *Planta* **152**: 325-335

Hossain MA, Asada K (1984a) Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: Its protection by ascorbate. *Plant & Cell Physiology* **25**: 1285-1295

Hossain MA, Asada K (1984b) Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant & Cell Physiology* **25**: 85-92

Huang AHC, Trelease RN, Moore TSJ (1983) *Plant Peroxisomes*. Academic Press, New York, NY

Humphreys TE, Dugger WM, Jr. (1957) The Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid on the Respiration of Etiolated Pea Seedlings. *Plant Physiology* **32**: 530-536

Hunter T (2000) Signaling-2000 and beyond. *Cell* **100**: 113-127

Hush JM, Overall RL (1996) Cortical microtubule reorientation in higher plants: dynamics and regulation. *Journal of Microscopy* **181**: 129-139

Ikeda-Iwai M, Umehara M, Satoh S, Kamada H (2003) Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **34**: 107-114

Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH (2001) Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nature Cell Biology* **3**: 193-197

Jedd G, Chua N-H (2002) Visualization of peroxisomes in living plant cells reveals actomyosin-dependent cytoplasmic streaming and peroxisome budding. *Plant & Cell Physiology* **43**: 384-392

Jia SR, Kumar PP, Kush A (1996) Oxidative stress in *Agrobacterium*-induced tumors on *Kalanchoe* plants. *The Plant Journal* **10**: 545-551

Jiang IW, Bunkelmann J, Towill I, 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 Physiology* **106**: 293-302

Jiménez A, Hernandez JA, del Rio LA, Sevilla F (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology* **114**: 275-284

Johansson E, Olsson O, Nystrom T (2004) Progression and specificity of protein oxidation in the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of biological chemistry* **279**: 22204-22208

Johnson TL, Olsen LJ (2001) Building new models for peroxisome biogenesis. *Plant Physiology* **127**: 731-739

Jones JF, Kende H (1979) Auxin-induced ethylene biosynthesis in subapical stem sections of etiolated seedlings of *Pisum sativum* L. *Planta* **146**: 649-656

- Joo JH, Bae YS, Lee JS** (2001) Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiology* **126**: 1055-1060
- Jouanneau J-P, Lapous D, Guern J** (1991) In plant protoplasts, the spontaneous expression of defense reactions and the responsiveness to exogenous elicitors are under auxin control. *Plant Physiology* **96**: 459-466
- Kahl G, Schäfer W, Wechselberger M** (1979) Changes in non-histone chromosomal proteins during the development of potato tubers; their involvement in wound- and hormone-induced processes. *Plant Cell Physiol.* **20**: 1217-1228
- Kameyama K, Kishi Y, Yoshimura M, Kanzawa N, Sameshima M, Tsuchiya T** (2000) Tyrosine phosphorylation in plant bending. *Nature* **407**: 37-37
- Kampfenkel K, Van Montagu M, Inze D** (1995) Effects of iron excess on *Nicotiana plumbaginifolia* plants (Implications to oxidative stress). *Plant Physiology* **107**: 725-735
- Karcz W, Burdach Z** (2002) A comparison of the effects of IAA and 4-Cl-IAA on growth, proton secretion and membrane potential in maize coleoptile segments. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1089-1098
- Kasprzewska A** (2003) Plant chitinases regulation and function. *Cellular & Molecular Biology Letters* **8**: 809-824
- Kavitha K, Garyatri V, Parida A** (2008) An oxidative and salinity stress induced peroxisomal ascorbate peroxidase from *Avicennia marina*: Molecular and functional characterization *Plant Physiology* **46**: 794-804
- Kawano N, Kawano T, Lapeyrie F** (2003) Inhibition of the indole-3-acetic acid-induced epinastic curvature in tobacco leaf strips by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Annals of Botany* **91**: 465-471
- Keller CP, Van Volkenburgh E** (1997) Auxin-Induced epinasty of tobacco leaf tissues (A nonethylene-mediated response). *Plant Physiology* **113**: 603-610
- Keller CP, Volkenburgh E** (1996) The electrical response of avena coleoptile cortex to auxins. *Planta* **198**: 404-412
- Keller T, Damude HG, Werner D, Doerner P, Dixon RA, Lamb C** (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH Oxidase gp91^{phox} subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *The Plant Cell* **10**: 255-266
- Kelly S, Avery JGS** (1949) The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and other physiologically active substances on respiration. *American Journal of Botany* **36**: 421-426
- Kende H, Zeevaart JAD** (1997) The five "classical" plant hormones. *The Plant Cell* **9**: 1197-1210
- Kepinski S, Leyser O** (2002) Ubiquitination and auxin signaling: A degrading story. *The Plant Cell* **14**: S81-95
- Kepinski S, Leyser O** (2004) Auxin-induced SCFTIR1-Aux/IAA interaction involves stable modification of the SCFTIR1 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 12381-12386
- Kepinski S, Leyser O** (2005) The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 446-451
- Kerr MW, Groves D** (1975) Purification and properties of glycolate oxidase from *Pisum sativum* leaves. *Phytochemistry* **14**: 359-362
- Keten RH** (1955) The oxidation of indolyl-3-acetic acid by waxpod bean root sap and peroxidase systems. *Biochemical Journal* **59**: 110-121

- Key JL, Hanson JB, Bils R** (1960) Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid application on activity and composition of mitochondria from soybeans. *Plant Physiology* **2**: 177-183
- Key JL, Shannon JC** (1964) Enhancement by auxin of ribonucleic acid synthesis in excised soybean hypocotyl tissue. *Plant Physiology* **38**: 360-364
- Kim M-S, Kim H-S, Kim Y-S, Baek K-H, Oh H-W, Hahn K-W, Bae R-N, Lee I-J, Joung H, Jeon J-H** (2007) Superoxide anion regulates plant growth and tuber development of potato. *Plant Cell Reports* **26**: 1717-1725
- Kisu Y, Harada Y, Goto M, Esaka M** (1997) Cloning of the pumpkin ascorbate oxidase gene and analysis of a Cis-acting region involved in induction by auxin. *Plant & Cell Physiology* **38**: 631-637
- Kitajima S, Sato F** (1999) Plant pathogenesis-related proteins: molecular mechanisms of gene expression and protein function. *The Journal of Biochemistry* **125**: 1-8
- Knights KM** (2003) Long-chain-fatty-acid CoA ligases: the key to fatty acid activation, formation of xenobiotic acyl-CoA thioesters and lipophilic xenobiotic conjugates. *Current Medicinal Chemistry* **3**: 235-244
- Kobayashi K, Masuda T, Takamiya K-i, Ohta H** (2006) Membrane lipid alteration during phosphate starvation is regulated by phosphate signaling and auxin/cytokinin cross-talk. *The Plant Journal* **47**: 238-248
- Koh S, André A, Edwards H, Ehrhardt D, Somerville S** (2005) *Arabidopsis thaliana* subcellular responses to compatible *Erysiphe cichoracearum* infections. *The Plant Journal* **44**: 516-529
- Kojima H, K S, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T** (1998a) Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **46**: 373-375
- Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T** (1998b) Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diamino fluoresceins. *Analytical Chemistry* **70**: 2446-2453
- Kotake T, Nakagawa N, Takeda K, Sakurai N** (2000) Auxin-induced elongation growth and expressions of cell wall-bound exo- and endo- β -glucanases in barley coleoptiles. *Plant & Cell Physiology* **41**: 1272-1278
- Kovtun Y, Chiu W-L, Tena G, Sheen J** (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 2940-2945
- Kovtun Y, Chiu W-L, Zeng W, Sheen J** (1998) Suppression of auxin signal transduction by a MAPK cascade in higher plants. *Nature* **395**: 716-720
- 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. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 109-136
- Lamb C, Dixon RA** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 251-275
- Läuchli A** (1993) Selenium plants: uptake, functions and environmental toxicity. *Botanica Acta* **106**: 455-468
- Laurent F, Debrauwer L, Pascal-Lorber S** (2006) Metabolism of [14 C]-2,4-dichlorophenol in edible plants. *Pest Management Science* **62**: 558-564
- Lee JS, Mulkey TJ, Evans ML** (1983) Gravity-induced polar transport of calcium

across root tips of maize. *Plant Physiology* **73**: 874-876

Lee U, Wie C, Fernandez BO, Feelisch M, Vierling E (2008a) Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **20**: 786-802

Lee Y, Jung J-W, Kim S-K, Hwang Y-S, Lee J-S, Kim S-H (2008b) Ethylene-induced opposite redistributions of calcium and auxin are essential components in the development of tomato petiolar epinastic curvature *Plant Physiology and Biochemistry* **46**: 685-693

Leshem Y, Kuiper P (1996) Is there a gas (general adaptation syndrome) response to various types of environmental stress? *Biologia Plantarum* **38**: 1-18

Leterrier M, Corpas FJ, Barroso JB, Sandalio LM, del Río LA (2005) Peroxisomal monodehydroascorbate reductase. Genomic clone characterization and functional analysis under environmental stress conditions. *Plant Physiology* **138**: 2111-2123

Leverentz MK, Wagstaff C, Rogers HJ, Stead AD, Chanasut U, Silkowski H, Thomas B, Weichert H, Feussner I, Griffiths G (2002) Characterization of a novel lipoxygenase-independent senescence mechanism in *Alstroemeria peruviana* floral tissue. *Plant Physiology* **130**: 273-283

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 in Enzymology* **186**: 464-478

Levine R, Williams J, Stadtman E, Shacter E (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* **233**: 346-357

Leyser O (2001) Auxin signalling: the beginning, the middle and the end. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 382-386

Leyser O, Berleth T (1999) A molecular basis for auxin action. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **10**: 131-137

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

Liszakay A, Kenk B, Schopfer P (2003) Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta* **217**: 658-667

Liszakay A, Trebst A (2006) Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1677-1684

Liszakay A, van der Zalm E, Schopfer P (2004) Production of reactive oxygen intermediates (O₂⁻, H₂O₂, and [•]OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiology* **136**: 3114-3123

Liu J, Wang X-J (2006) An Integrative analysis of the effects of auxin on jasmonic acid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology* **48**: 99-103

Liu L, Hausladen A, Zeng M, Que L, Heitman J, Stamler JS (2001) A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**: 490-494

Liu W, Hildebrand DF, Collins GB (1995) Auxin-regulated changes of fatty acid content and composition in soybean zygotic embryo cotyledons. *Plant Science* **106**: 31-42

Liu W, Hildebrand DF, Grayburn WS, Phillips GC, Collins GB (1991) Effects of exogenous auxins on expression of lipoxygenases in cultured soybean embryos. *Plant Physiology* **97**: 969-976

Lohse G, Hedrich R (1992) Characterization of the plasma-membrane H⁺-ATPase from

- Vicia faba guard cells : modulation by extracellular factors and seasonal changes. *Planta* **188**: 206-214
- Loos MA** (1975) Phenoxyalkanoic acids. En: *Herbicides: Their Chemistry, Degradation and Mode of Action*. (PC Kearney, DD Kaufman, eds). Vol 1, pp 34-57. New York, Marcel Dekker
- López- Huertas E, Sandalio LM, del Río LA** (1995) Integral membranes polypeptides of pea leaf peroxisomes: Characterization and response to plant stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **33**: 295-302
- López-Huertas E, Corpas FJ, Sandalio LM, del Río LA** (1999) Characterization of membrane polypeptides from pea leaf peroxisomes involved in superoxide radical generation. *Biochemical Journal* **337**: 531-536
- López-Huertas E, Sandalio LM, del Río LA** (1996) Superoxide generation in plant peroxisomal membranes: characterization of redox proteins involved. *Biochemical Society transactions* **24**: 195s
- Lui L, Yan Y, Zeng M, Zhang J, HAnes MA, Ahearn G, McMahon T, Dickfel T, Marshall H, Que L, Stamler JS** (2004) Essential roles of S-nitrosoyls in vascular homeostasis and endotoxic shock. *Cell* **116**: 617-628
- Luo Y, Koop H-U** (1997) Somatic embryogenesis in cultured immature zygotic embryos and leaf protoplasts of *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Planta* **202**: 387-396
- Luschnig C** (2002) Auxin transport: ABC proteins join the club. *Trends in Plant Science* **8**: 329-332
- Luschnig C, Fink GR** (1999) Two pieces of the auxin puzzle. *Trends in Plant Science* **4**: 162-164
- Ma C, 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 Physiology* **141**: 47-60
- Mannella CA, Bonner WD, Jr.** (1978) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid inhibits the outer membrane NADH dehydrogenase of plant mitochondria. *Plant Physiology* **62**: 468-469
- Mannick JB, Schonhoff CM** (2002) Nitrosylation: the next phosphorylation? *Archives of Biochemistry and Biophysics* **408**: 1-6
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S** (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**: 1912-1934
- Mano S, Nakamori C, Hayashi A, Kato A, Kondo M, Nishimura M** (2002) Distribution and characterization of peroxisomes in *Arabidopsis* by visualization with GFP: dynamic morphology actin-dependent movement. *Plant & Cell Physiology* **43**: 331-341
- Marrs KA** (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 127-158
- Martínez MC, Achkor H, Persson B, Fernández MR, Shafqat J, Farrés J, Jörnvall H, Parés X** (1996) *Arabidopsis* formaldehyde dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry* **241**: 849-857
- Masferrer A, Arró M, Manzano D, Schaller H, Fernández-Busquets X, Moncaleán P, Fernández B, Cunillera N, Boronat A, Ferrer A** (2002) Overexpression of *Arabidopsis thaliana* farnesyl diphosphate synthase (FPS1S) in transgenic *Arabidopsis* induces a cell death/senescence-like response and reduced cytokinin levels. *The Plant Journal* **30**: 123-132
- 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 Physiology* **128**: 1031-1045

Bibliografía

- Matlib MA, Kirkwood RC, Smith JE** (1972) Differential effect of selected phenoxy-acid compounds on oxidative phosphorylation of mitochondria from *Vicia faba* L. *Journal of Experimental Botany* **23**: 886-898
- Matringe M, Ksas B, Rey P, Havaux M** (2008) Tocotrienols, the unsaturated forms of vitamin E, can function as antioxidants and lipid protectors in tobacco leaves. *Plant Physiology* **147**: 764-778
- Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L** (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 8271-8276
- McCarthy I** (2004) Estudio del Estrés Oxidativo Inducido por el 2,4-D en Plantas de Guisante (*Pisum sativum* L.) y en Peroxisomas de Hojas Universidad de Granada, Granada
- McCord JM, Fridovich I** (1969) Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *The Journal of biological chemistry* **244**: 6049-6055
- McCracken DA, Ort DR, Nadakavukuren M** (1981) The effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid altered chloroplast development on photosynthesis. *Physiologia Plantarum* **52**: 285-291
- McKeon TA, Fernandez-Maculet JC, Yang S-F** (1995) B 4. Biosynthesis and metabolism of ethylene. En: *Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. (PJ Davies, ed). pp 118-139. Netherlands, Kluwer Academic Publ
- Mehler AH** (1951) Studies on reactions of illuminated chloroplasts. II. Stimulation and inhibition of the reaction with molecular oxygen. *Archives of biochemistry* **34**: 339-352
- Meister A, Anderson J** (1983) Glutathione. *Annual Review of Biochemistry* **52**: 711-760
- Millar A, Mittova V, Kiddle G** (2003) Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiology* **133**: 443-447
- Miller GAD, Mittler RON** (2006) Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants? *Annals of Botany* **98**: 279-288
- Minetti M, Forte T, Soriani M, Quaresima U, Menditto A, Ferrari M** (1992) Ironinduced ascorbate oxidation in plasma as monitored by ascorbate free radical formation. *FEBS Letters* **352**
- Miteva L, Ivanov S** (2007) Alteration of ascorbate pool upon influence of oxidative inducing herbicides. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci* **60**: 883-888
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**: 490-498
- Miwa S, St-Pierre J, Partridge L, Brand MD** (2003) Superoxide and hydrogen peroxide production by *Drosophila* mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine* **35**: 938-948
- Miyake C, Asada K** (1992) Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant & Cell Physiology* **33**: 541-553
- Miyazawa Y, Kato H, Muranaka T, Yoshida S** (2002a) Amyloplast formation in cultured tobacco BY-2 cells requires a high cytokinin content. *Plant & Cell Physiology* **43**: 1534-1541
- Miyazawa Y, Kutsuna N, Inada N, Kuroiwa H, Kuroiwa T, Yoshida S** (2002b) Dedifferentiation of starch-storing cultured tobacco cells: effects of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid on multiplication, starch content, organellar DNA content, and starch synthesis gene expression. *Plant Cell Reports* **21**: 289-295

- Mizoguchi T, Gotoh Y, Nishida E, Yamaguchi-Shinozaki K, Hayashida N, Iwasaki T, Kamada H, Shinozaki K** (1994) Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in *Arabidopsis thaliana* and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells. *The Plant Journal* **5**: 111-122
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA** (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews* **43**: 109-142
- Moons A** (2005) Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs). *Vitamins & Hormones* **72**: 155-202
- Mordhorst AP, Voerman KJ, Hartog MV, Meijer EA, van Went J, Koornneef M, de Vries SC** (1998) Somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* is facilitated by mutations in genes repressing meristematic cell divisions. *Genetics* **149**: 549-563
- Morell S, Follmann H, de Tullio M, Häberlein I** (1997) Dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase are phantom indicators of oxidative stress in plants. *FEBS Letters* **414**: 567-570
- Morré DJ, Gomez-Rey ML, Schramke C, Em O, Lawler J, Hobeck J, Morré DM** (1999) Use of dipyriddyldithio substrates to measure directly the protein disulfide-thiol interchange activity of the auxin stimulated NADH: Protein disulfide reductase (NADH oxidase) of soybean plasma membranes. *Molecular and Cellular Biochemistry* **200**: 7-13
- Morris DA, Friml J, Zažímalová E** (2004) *Plant Hormones - Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Kluwer Acad. Publ, Dordrecht
- Morris RL, Hollenbeck PJ** (1995) Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *Journal of Cell Biology* **131**: 1315-1326
- Moyen C, Bonmort J, Roblin G** (2007) Membrane effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in motor cells of *Mimosa pudica* L. *Plant Physiology and Biochemistry* **45**: 420-426
- Muench DG, Mullen RT** (2003) Peroxisome dynamics in plant cells: a role for the cytoskeleton. *Plant Science* **164**: 307-315
- Mullen RT** (2002) Targeting and import of matrix proteins into peroxisomes. En: *Plant Peroxisomes: Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications*. (A Baker, I Graham, eds). pp 339-383. Dordrecht, Kluwer Academic
- Mulligan RM, Chory J, Ecker JR** (1997) Signaling in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 2793-2795
- Mullineaux PM, Creissen GP, Broadbent P, Reynolds H, Kular B, Wellburn AR** (1994) Elucidation of the role of glutathione reductase using transgenic plants. *Biochemical Society transactions* **22**: 931-936
- Murray MG, Key JL** (1978) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-enhanced phosphorylation of soybean nuclear proteins. *Plant Physiology* **61**: 190-198
- Murthy S, Zilinskas B** (1994) Molecular cloning and characterization of a DNA encoding pea monodehydroascorbate reductase. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 31129-31133
- Nadakavukaren MJ, McCracken DA** (1977) Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the structure and function of developing chloroplasts. *Planta* **137**: 65-69
- Nakagami H, Pitzschke A, Hirt H** (2005) Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling *Trends in Plant Science* **10**: 339-346
- Nakatsubo N, Kojima H, Kikuchi K, Nagoshi H, Hirata Y, Maeda D, Imai Y, Irimura T, Nagano T** (1998) Direct evidence of nitric

Bibliografía

oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. *FEBS Letters* **427**: 263-266

Napier RM, David KM, Perrot-Rechenmann C (2002) A short history of auxin-binding proteins. *Plant Molecular Biology* **49**: 339-348

Navari-Izzo F, Izzo R (1994) Induction of enzyme activities and antioxidant production in barley plants as a results of SO₂ fumigation. *Plant Science* **96**: 31-40

Navari-Izzo F, Pinzino C, Quartacci M, Sgherri C (1999) Superoxide and hydroxyl radical generation, and superoxide dismutase in PSII membrane fragments from wheat.. *Free Radical Research* **31**: Suppl: S3-9

Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JDG (2006) A Plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* **312**: 436-439

Neely WC, Martin JM, Barker SA (1988) Products and relative reaction rates of the oxidation of tocopherols with singlet molecular oxygen. *Photochemistry and Photobiology* **48**: 423-428

Nila A, Sandalio LM, López M, Gómez M, del Río LA, Gómez-Lim M (2006) Expression of a peroxisome proliferator-activated receptor gene (xPPAR α) from *Xenopus laevis* in tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. *Planta* **224**: 569-581

Nixon PJ (2000) Chlororespiration. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **355**: 1541-1547

Noctor G (2000) Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society London* **355**: 1465-1475

Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathion: Keeping active oxygen under

control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 249-279

Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH (2002) Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1283-1304

Nover L, Bharti K, Döring P, Mishra S, Ganguli A, Scharft K (2001) Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones* **6**: 177-189

Nyathi Y, Baker A (2006) Plant peroxisomes as a source of signalling molecules. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1763**: 1478-1495

Nyporko AY, Demchuk ON, Blume YB (2003) Cold adaptation of plant microtubules: structural interpretation of primary sequence changes in a highly conserved region of [alpha]-tubulin. *Cell Biology International* **27**: 241-243

O'Neill RA, Scott TK (1987) Rapid effects of IAA on cell surface proteins from intact carrot suspension culture cells. *Plant Physiology* **84**: 443-446

Oakes DJ, Pollak JK (1999) Effects of a herbicide formulation, Tordon 75D®, and its individual components on the oxidative functions of mitochondria. *Toxicology* **136**: 41-52

Ohashi Y, Ohshima M (1992) Stress-induced expression of genes for pathogenesis-related proteins in plants. *Plant & Cell Physiology* **33**: 819-826

Oikawa K, Kasahara M, Kiyosue T, Kagawa T, Suetsugu N, Takahashi F, Kanegae T, Niwa Y, Kadota A, Wada M (2003) CHLOROPLAST UNUSUAL POSITIONING1 Is essential for proper chloroplast positioning. *The Plant Cell* **15**: 2805-2815

- Okamura M** (1980) An improved method for determination of L-ascorbic acid and L-dehydroascorbic acid in blood plasma. *Clinica Chimica Acta* **103**: 259-268
- Orozco-Cardenas ML, Narvaez-Vasquez J, Ryan CA** (2001) Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *The Plant Cell* **13**: 179-191
- Ort DR, Baker NR** (2002) A photoprotective role for O₂ as an alternative electron sink in photosynthesis? *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 193-198
- Osswald W, 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). *Journal of Plant Physiology* **139**: 742-748
- Ötvös K, Pasternak TP, Miskolczi P, Domoki M, Dorjgotov D, Szúcs A, Bottka S, Dudits D, Fehér A** (2005) Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *The Plant Journal* **43**: 849-860
- Overmyer K, Brosché M, Kangasjärvi J** (2003) Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends in Plant Science* **8**: 335-342
- Pagnussat GC, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L** (2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiology* **129**: 954-956
- Palma JM, Garrido M, Rodríguez-García MI, del Río LA** (1991) Peroxisome proliferation and oxidative stress mediated by activated oxygen species in plant peroxisomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **287**: 68-74
- Palma JM, Jimenez A, Sandalio LM, Corpas FJ, Lundqvist M, Gómez M, Sevilla F, del Río LA** (2006) Antioxidative enzymes from chloroplasts, mitochondria, and peroxisomes during leaf senescence of nodulated pea plants. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1747-1758
- Palmeira CM, Moreno AJ, Madeira VMC** (1995) Effects of paraquat, dinoseb and 2,4-D on intracellular calcium and on vasopressin-induced calcium mobilization in isolated hepatocytes. *Archives of Toxicology* **69**: 460-466
- Paponov IA, Teale WD, Trebar M, Blilou I, Palme K** (2005) The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends in Plant Science* **10**: 170-177
- Pastori GM, del Río LA** (1997) Natural senescence of pea leaves (an activated oxygen-mediated function for peroxisomes). *Plant Physiology* **113**: 411-418
- Pei Z-M, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI** (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**: 731-734
- Peixoto FP, Gomes-Laranjo J, Vicente JA, Madeira VMC** (2008) Comparative effects of the herbicides dicamba, 2,4-D and paraquat on non-green potato tuber calli. *Journal of Plant Physiology* **165**: 1125-1133
- Pellinen R, Palva T, Kangasjärvi J** (1999) Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *The Plant Journal* **20**: 349-356
- 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. *The Plant Cell* **16**: 2785-2794

Perrin RM, Young L-S, Narayana Murthy UM, Harrison BR, Wang YAN, Will JL, Masson PH (2005) Gravity signal transduction in primary roots. *Annals of Botany* **96**: 737-743

Pfeiffer W, Höftberger M (2001) Oxidative burst in *Chenopodium rubrum* suspension cells: Induction by auxin and osmotic changes. *Physiologia Plantarum* **111**: 144-150

Pignocchi C, Foyer CH (2003) Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 379-389

Pireaux JC, Dizengremel P, Botton B (1992) Effects of pesticides on oxidative phosphorylation and electron transfer in potato tuber mitochondria. *Plant Science* **83**: 23-30

Porta H, Rocha-Sosa M (2002) Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiology* **130**: 15-21

Pracharoenwattana I, Cornah JE, Smith SM (2007) Arabidopsis peroxisomal malate dehydrogenase functions in β -oxidation but not in the glyoxylate cycle. *The Plant Journal* **50**: 381-390

Prasad TK, Anderson MD, Martin BA, Stewart CR (1994) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *The Plant Cell* **6**: 65-74

Prokhnovsky AI, Peremyslov VV, Dolja VV (2008) Overlapping functions of the four class XI myosins in *Arabidopsis* growth, root hair elongation, and organelle motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 19744-19749

Purvis AC (1997) Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* **100**: 165-170

Quessada M, Macheix J (1984) Caractérisation d'une peroxidase impliquée spécifiquement dans la lignification, en relation

avec l'incompatibilité au greffage chez l'abricotier. *Physiologie Végétale* **22**: 533-540

Quint M, Gray WM (2006) Auxin signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 448-453

Raghavan C, Ong E, Dalling M, Stevenson T (2006) Regulation of genes associated with auxin, ethylene and ABA pathways by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Arabidopsis*. *Functional & Integrative Genomics* **6**: 60-70

Raghavan C, Ong EK, Dalling MJ, Stevenson TW (2005) Effect of herbicidal application of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Arabidopsis*. *Functional & Integrative Genomics* **5**: 4-17

Raghavan V (2004) Role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of *Arabidopsis*: cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D. *American Journal of Botany* **91**: 1743-1756

Raghothama KG, Reddy ASN, Friedmann M, Poovaiah BW (1987) Calcium-regulated *in vivo* protein phosphorylation in *Zea mays* L. root tips. *Plant Physiology* **83**: 1008-1013

Rahman A, Bannigan A, Sulaman W, Pechter P, Blancaflor EB, Baskin TI (2007) Auxin, actin and growth of the *Arabidopsis thaliana* primary root. *The Plant Journal* **50**: 514-528

Rajagopalan KV (1985) Purification of bovine milk xanthine. En: *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. (RA Greenwald, ed). pp 21-23. Boca Raton, FL, USA, CRC Press

Ranieri A, Castagna A, Pacini J, Baldan B, Mensuali Sodi A, Soldatini GF (2003) Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. *Journal of Experimental Botany* **54**: 2529-2540

- Ray P, Ruesink A** (1962) Kinetic experiments on the nature of the growth mechanism in oat coleoptile cells. *Developmental Biology* **4**: 377–397
- Rayle DL, Cleland RE** (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology* **99**: 1271-1274
- Reade JPH, Milner LJ, Cobb AH** (2004) A role for glutathione S-transferases in resistance to herbicides in grasses. *Weed Science* **52**: 468-474
- Reumann S** (2002) The photorespiratory pathway of leaf peroxisomes. En: *Plant Peroxisomes: Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications*. (A Baker, I Graham, eds). pp 141-189. Dordrecht, Kluwer Academic
- Reumann S, Quan S, Aung K, Yang P, Manandhar-Shrestha K, Holbrook D, Linka N, Switzenberg R, Wilkerson C, Weber AP, Olsen LJ, Hu J** (2009) In-depth proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes combined with in vivo subcellular targeting verification indicates novel metabolic and regulatory functions of peroxisomes. *Plant Physiology* **150**: 125-143
- Reumann S, Weber APM** (2006) Plant peroxisomes respire in the light: Some gaps of the photorespiratory C2 cycle have become filled--Others remain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1763**: 1496-1510
- Roberts DM, Harmon AC** (1992) Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**: 375-414
- Robertson MM, Kirkwood RC** (1970) The mode of action of foliage-applied translocated herbicides with particular reference to the phenoxy-acid compounds. II. The mechanism and factors influencing translocation, metabolism and biochemical inhibition. *Weed Research* **10**: 94-120
- Rodríguez-Serrano M** (2007) Mecanismos Moleculares de Respuesta al Cadmio en Plantas de *Pisum sativum* L.: Función de las Especies de Oxígeno y Nitrógeno Reactivo. Universidad de Granada, Granada
- Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Pastori GM, Corpas FJ, Sandalio LM, del Río LA, Palma JM** (2007) Peroxisomal membrane manganese superoxide dismutase: characterization of the isozyme from watermelon (*Citrullus lanatus* Schrad.) cotyledons. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2417-2427
- Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Pazmino DM, Testillano PS, Risueno MC, del Río LA, Sandalio LM** (2009) Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross-talk between reactive oxygen species, nitric oxide and calcium. *Plant Physiology*: pp.108.131524
- Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Zabalza ANA, Corpas FJ, Gomez M, Del Río LA, Sandalio LM** (2006) Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant, Cell & Environment* **29**: 1532-1544
- Romero-Puertas MC, Campostrini N, Mattè A, Righetti PG, Perazzolli M, Zolla L, Roepstorff P, Delledonne M** (2008) Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana* undergoing hypersensitive response. *PROTEOMICS* **8**: 1459-1469
- Romero-Puertas MC, Corpas FJ, Sandalio LM, Leterrier M, Rodríguez-Serrano M, del Río LA, Palma JM** (2006) Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New Phytologist* **170**: 43-52
- Romero-Puertas MC, Laxa M, Matte A, Zaninotto F, Finkemeier I, Jones AME, Perazzolli M, Vandelle E, Dietz K-J, Delledonne M** (2007) S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-

Bibliografía

mediated tyrosine nitration. *The Plant Cell* **19**: 4120-4130

Romero-Puertas MC, McCarthy I, Mez M, Sandalio LM, Corpas FJ, del Río LA, Palma JM (2004a) Reactive oxygen species-mediated enzymatic systems involved in the oxidative action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant, Cell & Environment* **27**: 1135-1148

Romero-Puertas MC, McCarthy I, Sandalio LM, Palma JM, Corpas FJ, Gómez M, del Río LA (1999) Cadmium toxicity and oxidative metabolism of pea leaf peroxisomes. *Free Radical Research* **31**: S25-S31

Romero-Puertas MC, Palma JM, Gómez M, del Río LA, Sandalio LM (2002) Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant, Cell & Environment* **25**: 677-686

Romero-Puertas MC, Rodríguez-Serrano M, Corpas FJ, Gómez M, del Río LA, Sandalio LM (2004b) Cadmium-induced subcellular accumulation of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 in pea leaves. *Plant, Cell & Environment* **27**: 1122-1134

Rosell DF, White EH (1978) *Methods in Enzymology* **57**: 409

Ross C, Küpper FC, Jacobs RS (2006) Involvement of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in the wound response of *Dasycladus vermicularis*. *Chemistry & Biology* **13**: 353-364

Rosso SB, Caceres AO, de Duffard AME, Duffard RO, Quiroga S (2000) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid disrupts the cytoskeleton and disorganizes the golgi apparatus of cultured neurons. *Toxicological Sciences* **56**: 133-140

Roy P, Roy S, Mitra A, Kulkarni A (1994) Superoxide generation by lipoxygenase in the presence of NADH and NADPH. *Biochimica et Biophysica Acta* **1214**: 171-179

Roy P, Sajan MP, Kulkarni AP (1995) Lipoxygenase-mediated glutathione oxidation

and superoxide generation. *Journal of Biochemical Toxicology* **10**: 111-120

Ruegger M, Dewey E, Gray WM, Hobbie L, Turner J, Estelle M (1998) The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes & development* **12**: 198-207

Rutherford AW, Govindjee, Inoue Y (1984) Charge accumulation and photochemistry in leaves studied by thermoluminescence and delayed light emission. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81**: 1107-1111

Sakai A, Yashiro K, Kawano S, Kuroiwa T (1996) Amyloplast formation in cultured tobacco cells; effects of plant hormones on multiplication, size, and starch content. *Plant Cell Reports* **15**: 601-605

Sakamoto A, Ueda M, Morikawa H (2002) *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Letters* **515**: 20-24

Sakihama Y, Mano J, Sano S, Asada K, Yamasaki H (2000) Reduction of phenoxyl radicals mediated by monodehydroascorbate reductase. *Biochemical and biophysical research communications* **279**: 949-954

Salimath BP, Marmé D (1983) Protein phosphorylation and its regulation by calcium and calmodulin in membrane fractions from zucchini hypocotyls. *Planta* **158**: 560-568

Salisbury FB, Ross CW (1992) *Plant Physiology*. En. Ed 4, pp 399-402. Belmont, California, Wasworth Publishing Company

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. *Journal of Experimental Botany* **52**: 2115-2126

Sandalio LM, Fernandez VM, Ruperez FL, del Río LA (1988) Superoxide free radicals

- are produced in glyoxysomes. *Plant Physiology* **87**: 1-4
- Sandalio LM, Palma JM, del Río LA** (1987) Localization of manganese superoxide dismutase in peroxisomes isolated from *Pisum sativum* L. *Plant Science* **51**: 1-8
- Sandalio LM, Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, del Río LA** (2008) Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide in vivo in plant tissues. *Methods in Enzymology* **440**: 397-409
- Sangwan R, Bourgeois Y, Brown SVG, Sangwan-Norreel B** (1992) Characterization of competent cells and early events of Agrobacterium-mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **188**: 439-456
- Sano S, Asada K** (1994) cDNA cloning of monodehydroascorbate radical reductase from cucumber: A high degree of homology in terms of amino acid sequence between this enzyme and bacterial flavoenzymes. *Plant & Cell Physiology* **35**: 425-437
- Santelia D, Vincenzetti V, Azzarello E, Bovet L, Fukao Y, Düchtig P, Mancuso S, Martinoia E, Geisler M** (2005) MDR-like ABC transporter AtPGP4 is involved in auxin-mediated lateral root and root hair development. *FEBS Letters* **579**: 5399-5406
- Sargent JA, Blackman GE** (1965) Studies on Foliar Penetration: 2. The role of light in determining the penetration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Journal of Experimental Botany* **16**: 24-47
- Sato Y, Wada M, Kadota A** (2001) Choice of tracks, microtubules and/or actin filaments for chloroplast photo-movement is differentially controlled by phytochrome and a blue light receptor. *Journal of Cell Science* **114**: 269-279
- 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. *The Plant Cell* **16**: 1419-1432
- Satyavathi VV, Jauhar PP, Elias EM, Rao MB** (2004) Effects of growth regulators on *in vitro* plant regeneration in durum wheat. *Crop Science* **44**: 1839-1846
- Sävenstrand H, Brosché M, Ängelsten M, Strid Å** (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 & Environment* **23**: 689-700
- Scandalios JG** (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **38**: 995-1014
- Schäfer W, Kahl G** (1981) Auxin-induced changes in chromosomal protein phosphorylation in wounded potato tuber parenchyma. *Plant Molecular Biology* **1**: 5-17
- Scheibe R, Backhausen J, Emmerlich V** (2005) Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1481-1489
- Scherer GFE, Zahn M, Callis J, Jones AM** (2007) A role for phospholipase A in auxin-regulated gene expression. *FEBS Letters* **581**: 4205-4211
- Schevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M** (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry* **68**: 850-858
- Schneider EA, Wightman F** (1974) Metabolism of auxin in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* **25**: 487-513
- Schopfer P** (2001) Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening *in vitro* and *in vivo*: implications for the control of elongation growth. *The Plant Journal* **28**: 679-688

Bibliografía

- Schopfer P, Liskay A** (2006) Plasma membrane-generated reactive oxygen intermediates and their role in cell growth of plants. *BioFactors* **28**: 1872-8081
- Schopfer P, Liskay A, Bechtold M, Frahy G, Wagner A** (2002) Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta* **214**: 821-828
- Schubert KR** (1986) Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. *Annual Review of Plant Physiology* **37**: 539-574
- Sen S** (1978) The level of action of 2,4-D on transcription. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* **34**: 724-724
- Sharkey T** (1988) Estimating the rate of photorespiration in leaves. *Physiologia Plantarum* **73**: 147-152
- Simoes T, Teixeira MC, Fernandes AR, Sa-Correia I** (2003) Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to the Herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, mediated by Msn2p- and Msn4p-regulated genes: important role of SPI1. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 4019-4028
- Skowrya D, Craig KL, Tyers M, Elledge SJ, Harper JW** (1997) F-Box Proteins Are Receptors that Recruit Phosphorylated Substrates to the SCF Ubiquitin-Ligase Complex. *Cell* **91**: 209-219
- Smirnov N** (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation *New Phytologist* **125**: 27-58
- Smirnov N** (1998) Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology* **9**
- Smirnov N** (2000) Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 229-235
- Stadman T** (1990) Selenium biochemistry. *Annual Review of Biochemistry* **59**: 111-127
- Stafford HA** (1994) Anthocyanins and betalains: Evolution of the mutually exclusive pathways. *Plant Science* **101**: 91-98
- Staiger CJ** (2000) Signaling to the actin cytoskeleton in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 257-288
- Steiner AA** (1961) A universal method for preparing nutrient solution of a certain desired composition. *Plant Soil* **15**: 134-154
- Sterling TM, Hall C** (1997) Mechanism of action of natural auxins and the auxinic herbicides. En: *Herbicide activity: toxicology, biochemistry and molecular biology*. (R Roe, J Burton, R Kuhr, eds). pp 111-141. Amsterdam, IOS Press
- Stewart ER, Freebairn HT** (1969) Ethylene, seed germination, and epinasty. *Plant Physiology* **44**: 955-958
- Sugaya S, Sakai S** (1996) Identification of a soluble auxin-binding protein as a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. *Plant Science* **114**: 1-9
- Sun H, Basu S, Brady SR, Luciano RL, Muday GK** (2004) Interactions between auxin transport and the actin cytoskeleton in developmental polarity of fucus distichus embryos in response to light and gravity. *Plant Physiology* **135**: 266-278
- Sun J, Steenbergen C, Murphy E** (2006) S-nitrosylation: NO-related redox signaling to protect against oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling* **8**: 1693-1705
- Sung D, Kaplan F, Lee K, Guy C** (2003) Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends in Plant Science* **8**: 179-187
- Sung DY, Kaplan F, Guy CL** (2001) Plant Hsp70 molecular chaperones: Protein

structure, gene family, expression and function. *Physiologia Plantarum* **113**: 443-451

Sunohara Y, Matsumoto H (2008) Quinclorac-induced cell death is accompanied by generation of reactive oxygen species in maize root tissue. *Phytochemistry* **69**: 2312-2319

Suurmeijer CNSP, Perez-Gilbert M, van der Hijden HTWM, Veldink GA, Vliegenthart JFG (1998) Purification, product characterization and kinetic properties of soluble tomato lipoxygenase. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**: 657-663

Swindell W, Huebner M, Weber A (2007) Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics* **8**: 125

Taiz L, Zeiger E (2006) *Plant Physiology*, Ed 4. Sinauer Associates, Sunderland

Takagi S (2003) Actin-based photo-orientation movement of chloroplasts in plant cells. *J Exp Biol* **206**: 1963-1969

Takahama U (1988) Hydrogen peroxide-dependent oxidation of flavonoids and hydroxycinnamic acid derivatives in epidermal and guard cells of *Tradescantia virginiana* L. *Plant & Cell Physiology* **29**: 475-481

Takemoto D, Hardham AR (2004) The cytoskeleton as a regulator and target of biotic interactions in plants. *Plant Physiology* **136**: 3864-3876

Takesue K, Shibaoka H (1999) Auxin-induced longitudinal-to-transverse reorientation of cortical microtubules in nonelongating epidermal cells of azuki bean epicotyls. *Protoplasma* **206**: 27-30

Tan X, Calderon-Villalobos LIA, Sharon M, Zheng C, Robinson CV, Estelle M, Zheng N (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* **446**: 640-645

Tateishi Y, Umemura Y, Esaka M (2001) A basic class I chitinase expression in winged bean is up-regulated by osmotic stress. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **65**: 1663-1668

Teixeira MC, Telo JP, Duarte NF, Sá-Correia I (2004) The herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induces the generation of free-radicals and associated oxidative stress responses in yeast. *Biochemical and biophysical research communications* **324**: 1101-1107

Tenhaken R, Levine A, Brisson LF, Dixon RA, Lamb C (1995) Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**: 4158-4163

Terman A, Brunk UT (2006) Oxidative stress, accumulation of biological 'Garbage', and aging. *Antioxidants & Redox Signaling* **8**: 197-204

Thorpe GHG, Kricka LJ, Moseley SB, Whitehead TP (1985) Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in the luminescence-monitored enzyme immunoassays. *Clinical Chemistry* **31**: 1335

Titapiwatanakun B, Murphy AS (2008) Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1093-1107

Tittle FL, Goudey JS, Spencer MS (1990) Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on endogenous cyanide, β -cyanoalanine synthase activity, and ethylene evolution in seedlings of soybean and barley. *Plant Physiology* **94**: 1143-1148

Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle T (2003) The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *The Plant Cell* **15**: 533-543

- Tiwari SB, Wang X-J, Hagen G, Guilfoyle TJ** (2001) AUX/IAA Proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *The Plant Cell* **13**: 2809-2822
- Tokunaga T, Miyahara K, Tabata K, Esaka M** (2005) Generation and properties of ascorbic acid-overproducing transgenic tobacco cells expressing sense RNA for I - galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Planta* **220**: 854-863
- Torres MA, Dangl JL, Jones JDG** (2002) *Arabidopsis* gp91^{phox} homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 517-522
- Torres MA, Onouchi H, Hamada S, Machida C, Hammond-Kosack KE, Jones JDG** (1998) Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91^{phox}). *The Plant Journal* **14**: 365-370
- Trumper N, Follmann H, Haberland Y** (1994) A novel dehydroascorbate reductase from spinach chloroplast homologous to plant trypsin inhibitor. *FEBS Letters* **352**: 159-162
- Tsugane K, Kobayashi K, Niwa Y, Ohba Y, Wada K, Kobayashi H** (1999) A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *The Plant Cell* **11**: 1195-1206
- Tzeng DD-S, Chen R-S** (1992) Involvement of Haber-Weiss reaction in the photochemical production of ethylene from methionine riboflavin mixture. *Botanical bulletin of Academia Sinica* **33**: 349-358
- Utriainen M, Kokko H, Auriola S, Sarrazin O, Kärenlampi S** (1998) PR-10 protein is induced by copper stress in roots and leaves of a Cu/Zn tolerant clone of birch, *Betula pendula*. *Plant, Cell & Environment* **21**: 821-828
- Vale RD** (2003) The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* **112**: 467-480
- van Bentem SdIF, Roitinger E, Anrather D, Csaszar E, Hirt H** (2006) Phosphoproteomics as a tool to unravel plant regulatory mechanisms. *Physiologia Plantarum* **126**: 110-119
- Van Breusegem F, Bailey-Serres J, Mittler R** (2008) Unraveling the tapestry of networks involving reactive oxygen species in plants. *Plant Physiology* **147**: 978-984
- van Loon L, Pierpoint W, Boller T, Conejero V** (1994) Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter* **12**: 245-264
- van Loon LC** (1997) Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* **103**: 753-765
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ** (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**: 135-162
- Vanacker H, Carver TLW, Foyer CH** (2000) Early H₂O₂ Accumulation in Mesophyll Cells Leads to Induction of Glutathione during the Hyper-Sensitive Response in the Barley-Powdery Mildew Interaction. *Plant Physiology* **123**: 1289-1300
- Vaughn KC, Stegink SJ** (1987) Peroxisomes of soybean (*Glycine max*) root nodule vascular parenchyma cells contain a "nodule-specific" urate oxidase. *Physiologia Plantarum* **71**: 251-256
- Veluthambi K, Poovaiah BW** (1984) Calcium-promoted protein phosphorylation in plants. *Science* **223**: 167-169
- Venis MA, Napier RM, Oliver S** (1996) Molecular analysis of auxin-specific signal transduction. *Plant Growth Regulation* **18**: 1-6

- Verma DP, Maclachlan GA, Byrne H, Ewings D** (1975) Regulation and in vitro translation of messenger ribonucleic acid for cellulase from auxin-treated pea epicotyls. *The Journal of Biological Chemistry* **250**: 1019-1026
- Vernoux T, Sanchez-Fernandez R, May M, Saltveit ME** (2002) Glutathione biosynthesis in plants. En: *Oxidative Stress in Plants*. (D Inzé, M Montagu, eds). pp 297-311. London, Taylor and Francis
- Veselov D, Langhans M, Hartung W, Aloni R, Feussner I, Götz C, Veselova S, Schlomski S, Dickler C, Bächmann K, Ullrich C** (2003) Development of *Agrobacterium tumefaciens* C58-induced plant tumors and impact on host shoots are controlled by a cascade of jasmonic acid, auxin, cytokinin, ethylene and abscisic acid. *Planta* **216**: 512-522
- Villalba J, 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*. (J Haris, ed). Ed 4, pp 57-81. New York, Plenum press
- Vuylsteker C, Dewaele E, Rambour S** (1998) Auxin induced lateral root formation in Chicory. *Annals of Botany* **81**: 449-454
- Wada M, Suetsugu N** (2004) Plant organelle positioning *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 626-631
- Wagner AM** (1995) A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells. *FEBS Letters* **368**: 339-342
- Wall DA, Hall JC, Morrison IN** (1991) Uptake, translocation and fate of 2,4-D and chlorsulfuron in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. *Weed Research* **31**: 81-88
- Wang C, Jarlfors U, Hildebrand DF** (1999) Regulation and subcellular localization of auxin-induced lipoxygenases. *Plant Science* **148**: 147-153
- Wasteneys GO, Galway ME** (2003) Remodeling the cytoskeleton for growth and form: An overview with some new views. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 691-722
- Wedding RT, Black MK** (1961) Uncoupling of phosphorylation in chlorella by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant and Soil* **14**: 242-248
- Wei YD, Zheng H-G, Hall JC** (2000) Role of auxinic herbicide-induced ethylene on hypocotyl elongation and root/hypocotyl radial expansion. *Pest Management Science* **56**: 377-387
- West SH, Hanson JB, Key JL** (1960) Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid on the Nucleic Acid and Protein Content of Seedling Tissue. *Weeds* **8**: 333-340
- Westhoff P** (1998) Phytohormones. En: *Molecular Plant Development From Gene to Plant*. New York, Oxford University Press
- White PJ, Broadley MR** (2003) Calcium in plants. *Annals of Botany* **92**: 487-511
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W** (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *EMBO Journal* **16**: 4806-4816
- Wingler A, Brownhill E, Pourtau N** (2005) Mechanisms of the light-dependent induction of cell death in tobacco plants with delayed senescence. *Journal of Experimental Botany* **56**: 2897-2905
- Wisniewska J, Xu J, Seifertova D, Brewer PB, Ruzicka K, Bilou I, Rouquie D, Benkova E, Scheres B, Friml J** (2006) Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science* **312**: 883-

- Woo E-J, Marshall J, Baulry J, Chen J-G, Venis M, Napier RM, Pickersgil RW** (2002) Crystal structure of auxin-binding protein 1 in complex with auxin. *EMBO Journal* **21**: 2877-2885
- Wright RM, Hagen G, Guilfoyle T** (1987) An auxin-induced polypeptide in dicotyledonous plants. *Plant Molecular Biology* **9**: 625-634
- Wu C-T, 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 Physiology* **133**: 263-273
- Wu S-C, Blumer JM, Darvill AC, Albersheim P** (1996) Characterization of an endo-p-1,4-glucanase gene induced by auxin in elongating pea epicotyls'. *Plant Physiology*: 163-170
- Yamagata Y, Masuda Y** (1975) Comparative studies on auxin and fusicoccin actions on plant growth. *Plant & Cell Physiology* **16**: 41-52
- Yamasaki H, Sakihama Y, Ikehar N** (1997) Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H_2O_2 . *Plant Physiology* **115**: 1405-1412
- Yang J-G, Miyao S, Uchiyama T** (1999) Responses of *Mentha* suspension-cultured cells to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and accumulation of esterified phenolic acids in their cell walls. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**: 1522-1527
- Yang T, Poovaiah BW** (2000) Molecular and biochemical evidence for the involvement of calcium/calmodulin in auxin action. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 3137-3143
- Yang T, Poovaiah BW** (2002) Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 4097-4102
- Yokota E, Muto S, Shimmen T** (1999) Inhibitory regulation of higher-plant myosin by Ca^{2+} ions. *Plant Physiology* **119**: 231-240
- Yoon IS, Park DH, Mori H, Imaseki H, Kang BG** (1999) Characterization of an auxin-inducible 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene, VR-ACS6, of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) and hormonal interactions on the promoter activity in transgenic tobacco. *Plant & Cell Physiology* **40**: 431-438
- Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S** (2002) Identification of a cis element for tissue-specific alternative splicing of chloroplast ascorbate peroxidase pre-mRNA in higher plants. *The Journal of biological chemistry* **277**: 40623-40632
- Zaninotto F, Camera SL, Polverari A, Delledonne M** (2006) Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response. *Plant Physiology* **141**: 379-383
- Zhao D, Yang M, Solava J, Ma H** (1999) The ASK1 gene regulates development and interacts with the UFO gene to control floral organ identity in *Arabidopsis*. *Developmental Genetics* **25**: 209-223
- Zhao Y, Li W, Chou I** (1987) Cytoskeletal perturbation induced by herbicides, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T). *Journal of toxicology and environmental health* **20**: 11-26
- Zheng HG, Hall JC** (2001) Understanding auxinic herbicide resistance in wild mustard: Physiological, biochemical, and molecular genetic approaches. *Weed Science* **49**: 276-281
- Zi H, Xiang Y, Li M, Wang T, Ren H** (2007) Reversible protein tyrosine phosphorylation affects pollen germination and pollen tube growth via the actin cytoskeleton. *Protoplasma* **230**: 183-191

**Zimmerman PW, Hitchcock AE (1948) Plant
Hormones. Annual Review of Biochemistry 17:** 601-626

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1.1: Similitudes estructurales entre la auxina AIA y el herbicida axúnico 2,4-D..... | 5 |
| Figura 1.2: Modelo de acción de los herbicidas auxínicos..... | 13 |
| Figura 1.3: Ruta de señalización por auxinas..... | 16 |
| Figura 1.4: Generación de especies de oxígeno reactivo..... | 21 |
| Figura 1.5: Producción y degradación de ROS en cloroplastos..... | 26 |
| Figura 1.6: Producción de ROS en la cadena de transporte electrónico mitocondrial..... | 27 |
| Figura 1.7: Ciclo ascorbato-glutation..... | 32 |
| Figura 1.8: β -oxidación de ácidos grasos y ciclo del glioxilato en peroxisomas..... | 38 |
| Figura 1.9: Esquema de la fotorrespiración..... | 39 |
| Figura 1.10: Esquema de la producción de ROS/RNS y sistemas antioxidantes en peroxisomas..... | 40 |
| Figura 3.1 Preparación de brotes y tiras de hojas de guisante, para el análisis de la curvatura epinástica..... | 54 |
| Figura 3.2: Purificación de peroxisomas en gradientes de sacarosa..... | 56 |
| Figura 4.1: Efecto del 2,4-D sobre el fenotipo de la parte aérea de plantas de guisante.... | 83 |
| Figura 4.2: Efecto del 2,4-D (22,6 mM) sobre la estructural de hojas y tallos apicales de plantas de guisante..... | 84 |
| Figura 4.3: Efecto de la aplicación de 2,4-D 22,6 mM, en plantas de <i>Arabidopsis</i> | 85 |
| Figura 4.4: Actividad xantina oxidoreductasa (XOD/XDH)..... | 86 |
| Figura 4.5: Actividad Acil-CoA oxidasa (ACX)..... | 86 |
| Figura 4.6: Efecto del 2,4-D sobre plantas de <i>Arabidopsis</i> wt y <i>acx1</i> | 87 |
| Figura 4.7: Actividad glicolato oxidasa (GOX)..... | 88 |
| Figura 4.8: Efecto del 2,4-D (22,6 mM) sobre la actividad lipoxigenasa (LOX)..... | 88 |
| Figura 4.9: Efecto del 2,4-D sobre la actividad superóxido dismutasa (SOD) y sus isoenzimas..... | 90 |
| Figura 4.10: Efecto del 2,4-D sobre la actividad catalasa (CAT)..... | 91 |
| Figura 4.11: Efecto del 2,4-D sobre la actividad glutatión-S-transferasa (GST)..... | 91 |
| Figura 4.12: Efecto del 2,4-D sobre la actividad ascorbato peroxidasa (APX)..... | 92 |
| Figura 4.13: Efecto del 2,4-D sobre la actividad glutatión reductasa (GR)..... | 92 |
| Figura 4.14: Efecto del 2,4-D sobre la actividad guayacol peroxidasa (GPX)..... | 92 |
| Figura 4.15: Efecto del tratamiento con 2,4-D 22,6 mM, sobre la expresión de enzimas antioxidantes..... | 93 |
| Figura 4.16: Efecto del 2,4-D sobre el contenido de glutatión..... | 94 |

| | |
|--|-----|
| Figura 4.17: Efecto del 2,4-D sobre el contenido de ascorbato..... | 95 |
| Figura 4.18: Efecto del 2,4-D sobre la producción de H ₂ O ₂ en hojas apicales y basales de plantas de guisante..... | 96 |
| Figura 4.19: Efecto del 2,4-D sobre la producción de H ₂ O ₂ en plantas de <i>Arabidopsis</i> | 96 |
| Figura 4.20: Producción de H ₂ O ₂ en <i>Arabidopsis</i> wt y <i>acx1</i> en condiciones de día largo..... | 97 |
| Figura 4.21: Efecto del 2,4-D sobre la acumulación de H ₂ O ₂ <i>in situ</i> en hojas de guisante..... | 98 |
| Figura 4.22: Efecto del 2,4-D sobre la acumulación de H ₂ O ₂ <i>in situ</i> en hojas de <i>Arabidopsis</i> | 98 |
| Figura 4.23: Visualización <i>in vivo</i> de la acumulación de H ₂ O ₂ en cortes de hojas apicales de plantas de guisante..... | 100 |
| Figura 4.24: Visualización <i>in vivo</i> de la acumulación de O ₂ ⁻ en cortes de hojas apicales de plantas de guisante..... | 102 |
| Figura 4.25: Visualización <i>in vivo</i> de la acumulación de O ₂ ⁻ en cortes de tallos de plantas tratadas con 2,4-D 22,6 mM..... | 103 |
| Figura 4.26: Visualización <i>in vivo</i> de la acumulación de O ₂ ⁻ en cortes de hojas de <i>Arabidopsis</i> | 105 |
| Figura 4. 27: Visualización <i>in vivo</i> de la acumulación de NO en cotes de hojas apicales de plantas de guisante | 107 |
| Figura 4.28: Efecto del 2,4-D sobre la actividad nitrosoglutation reductasa (GSNOR)..... | 108 |
| Figura 4.29: Visualización <i>in vivo</i> de la acumulación de NO en cortes de hojas de <i>Arabidopsis</i> | 109 |
| Figura 4.30: Efecto del 2,4-D sobre la producción de NO de hojas de <i>Arabidopsis</i> | 110 |
| Figura 4.31: Contenido de grupos carbonilo en hojas apicales y basales, de plantas tratadas con 2,4-D..... | 111 |
| Figura 4.32: Efecto del 2,4-D sobre la tasa de peroxidación lipídica en hojas apicales y basales..... | 111 |
| Figura 4.33: Efecto del 2,4-D sobre la oxidación de proteínas en <i>Arabidopsis</i> | 112 |
| Figura 4.34: Patrón de proteínas S-nitrosiladas en <i>Arabidopsis</i> | 113 |
| Figura 4.35: Efecto del tratamiento con 2,4-D 22,6 mM, sobre la producción de de etileno en plantas de guisante..... | 113 |

| | |
|---|-----|
| Figura 4.36: Efecto del tratamiento con 2,4-D 22,6 mM, sobre la expresión de proteínas de defensa..... | 114 |
| Figura 4.37: Efecto del 2,4-D (20 µM) y moduladores sobre brotes de plantas de guisante | 116 |
| Figura 4.38: Efecto de moduladores sobre la curvatura de tiras de hojas de guisante y su grado de curvatura..... | 118 |
| Figura 4.39: Producción de H ₂ O ₂ en hojas de brotes de plantas de guisante..... | 119 |
| Figura 4.40: Efecto del 2,4-D sobre la actividad XOD en geles..... | 120 |
| Figura 4.41: Efecto de inhibidores y/o moduladores sobre la actividad de enzimas antioxidantes en brotes de guisante..... | 121 |
| Figura 4.42: Efecto del EDTA 200 µM, sobre la actividad glutatión-S-transferasa (GST) en brotes..... | 121 |
| Figura 4.43: Efecto del 2,4-D e inhibidores, sobre el contenido de ascorbato en brotes..... | 122 |
| Figura 4.44: Efecto del 2,4-D e inhibidores, sobre el contenido de glutatión en brotes..... | 123 |
| Figura 4.45: Efecto de inhibidores sobre la producción de etileno en brotes..... | 124 |
| Figura 4.46: Efecto del tratamiento con 2,4-D y EDTA, sobre la velocidad de desplazamiento de peroxisomas..... | 125 |
| Figura 4.47: Efecto del 2,4-D sobre la estructura del citoesqueleto..... | 126 |
| Figura 4.48: Identificación del grado de oxidación de la actina en hojas de <i>Arabidopsis</i> | 127 |
| Figura 4.49: Efecto del 2,4-D y del alopurinol sobre el contenido de grupos carbonilo y grado de oxidación de la actina en hojas de <i>Arabidopsis</i> | 128 |
| Figura 4.50: Efecto del 2,4-D y del alopurinol sobre el contenido de grupos carbonilo y grado de oxidación de la actina en hojas de <i>Arabidopsis</i> | 129 |
| Figura 4.51: Identificación del grado de S-nitrosilación de la actina en hojas de <i>Arabidopsis</i> | 130 |
| Figura 4.52: Patrón de proteínas fosforiladas en extractos crudos de plantas control y tratadas con 2,4-D 22,6 mM..... | 131 |
| Figura 4.53: Patrón de proteínas fosforiladas de peroxisomas de hojas de plantas de guisante..... | 132 |
| Figura 4.54: Análisis 2D-DIGE de peroxisomas de hojas de plantas de guisante..... | 133 |
| Figura 4.55: Tinción de proteínas totales Sypro y ubicación de las proteínas analizadas por MS MADI-TOF..... | 134 |

| | |
|--|-----|
| Figura 4.56: Análisis cuantitativo de spots según BVA..... | 135 |
| Figura 5.1: Esquema del efecto del herbicida 2,4-D sobre el metabolismo de ROS y NO en plantas..... | 156 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1.1: Especies de oxígeno reactivo (ROS)..... | 21 |
| Tabla 3.1: Concentraciones de 2,4-D y de inhibidores/moduladores, usadas para la incubación de brotes de guisante..... | 53 |
| Tabla 3.2: Concentraciones de 2,4-D y de inhibidores / moduladores, usadas para la incubación de tiras de hojas de guisante..... | 53 |
| Tabla 3.3: Oligonucleotidos específicos de guisante..... | 71 |
| Tabla 3.4: Diseño Experimental para 2-D-DIGE de proteínas peroxisomales fosforiladas..... | 74 |
| Tabla 3.5: Longitudes de onda de excitación y emisión de fluorocromos..... | 78 |
| Tabla 3.6: Concentraciones de 2,4-D, e inhibidores/secuestradores, usadas en plantas de <i>Arabidopsis</i> | 78 |
| Tabla 4.1: Efecto de inhibidores y/o moduladores sobre la epinastia foliar y curvatura de tallos en brotes de guisante..... | 117 |
| Tabla 4.2: Proteínas peroxisomales fosforiladas identificadas por MALDI-TOF..... | 136 |

| | |
|---|---|
| 2,4,5-TES: | Caps: ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propano sulfónico |
| 2,4-D : ácido 2,4-diclorofenoxiacético | CAT: catalasa |
| 2,4-DB: ácido 2,4-fenoxi hidroxi butirico | CDNB: cloro-2,4-dinitrobencono |
| 2D-DIGE: electroforesis bidimensional (del Inglés: <i>Differential gel electrophoresis</i>) | CTR: genes constitutivos de la triple respuesta (del inglés: <i>constitutive triple response</i>) |
| 6PGDH: 6-fosfo gluconato deshidrogenasa | CHS: chalcón sintasa |
| ABA: ácido abcísico | DAB: 3,3'-diaminobencidina |
| ABP: proteínas de unión a auxina (del inglés: <i>auxin binding protein</i>) | DAF-2 DA: 4,5-diacetato de diaminofluoresceína |
| ACC: ácido 1-aminopropano-1 carboxílico | DCF-DA: carboxi-diclorofluoresceína diacetato |
| ACCS: 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa | DEPC: dietil piro carbonato |
| ACX : acil-CoA oxidasa | DETAPAC: ácido dietilentriaminopentaacético |
| ACT: actina | DHA: deshidroascórbico |
| ACX: acil-CoA oxidasa | DHAR: deshidroascorbato reductasa |
| ADN: ácido desoxirribonucleico | DHE: dihidroetidio |
| AIA: ácido indolacético | DMSO: dimetil sulfóxido |
| AMP: adenosín monofosfato | DNP: dinitrofenil |
| AOX: oxidasa alternativa | DNPH: 2,4-dinitrofenilhidracina |
| AP (Leu-): (Leucina) aminopeptidasa | dNTP: desoxinecleótido |
| APX: ascorbato peroxidasa | DPI: difeniliodonio |
| ARF: Auxin Response Factor | DTNB: ácido 5-5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) |
| ARN: ácido ribonucleico | DTT: 1,4-ditiotreitól |
| ASB: albúmina de suero bovino | DTT: 1,4-ditiotreitól |
| ASC: ascorbato | EDTA-Na ₂ : sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético |
| ATP: trifosfato de adenosina | EGL1: 1,4-β endo-glucanasa |
| AVG: Amino-etoxi-vinil glicina | EGPA: electroforesis en gel de poliacrilamida |
| BCIP: fosfato 5-bromo-4-cloro-3indolil | EM: enzima málico |
| BHA : Hidroxianisol butilado | EP: endoproteasa |
| BPDS: ácido batofenantrolindisulfónico | ERS: proteína receptora de etileno (del inglés: <i>ethylene response sensor</i>) |
| CaM: calmodulina | ERT: proteína receptora de etileno |
| | ES: estoma |
| | ET: etileno |

Abreviaturas

| | |
|--|--|
| F3ST: flavonol 3-sulfotransferasa | IAA: ácido indoacético (del inglés, <i>indol acetic acid</i>) |
| FAD: flavín adenín dinucleótido | IBA: ácido indolbutírico (del inglés, <i>indol butiric acid</i>) |
| FBPasa: fructosa bisfosfatasa | IEF: isoelectroenfoque |
| Fd: ferredoxina | IRGA: analizador de gases en el infrarrojo |
| FDNB: fluoro-dinitro-benceno | JA: ácido jasmónico |
| Feo: feofitina | KAT: 3-cetoacil-CoA tiolasa |
| FMN: flavín mononucleótido | LB: medio de Luria-Bertani |
| FSI/II: fotosistema I/II | L-NAME: N-nitro L- arginina metil éster |
| G6PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa | LOX: lipoxigenasa |
| GFP: Proteína verde fluorescente (del Inglés, <i>green fluorescent protein</i>) | MALDI-TOF: espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz (del Inglés: <i>Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization-Time-Of-Flight</i>) |
| GLDH: L-galactono-1,4-lactono deshidrogenasa | MAPK: proteínas quinasa activadas por mitógenos |
| GMPc: monofosfato de guanosina | MCPB: 4-(4-chloro-o-tolyloxy)butyric acid |
| GOX: glicolato oxidasa | MCPES: 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid |
| GPX: glutation peroxidasa | isooctyl (2-ethylhexyl) ester |
| GR: glutation reductasa | MDA: malondialdehido |
| GSH/GSSG: glutation reducido (γ -glutamil-cisteinil glicina)/oxidado | MDHA: monodeshidroascorbato |
| GSNO: S-nitrosoglutation | MDHAR: monodeshidroascorbato reductasa |
| GSNOR: nitroso glutatión reductasa | Mes: ácido 2-(N-morfolino) etonosulfónico |
| GST: glutation-S-transferasa | MFP: proteína multifuncional |
| GTP: trifosfato de guanidina | MFP: proteína multifuncional de peroxisomas (del inglés: <i>multifunctional protein</i>) |
| Hepes: ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2-etanosulfónico | MGD: monogalactosil diacilglicerol |
| HPLC: cromatografía líquida de alta presión | Mops: ácido 3-morfolino propano sulfónico |
| HPR: hidroxipiruvato reductasa | MP: membrana plasmática |
| HR: respuesta hipersensible | MS: malato sintasa |
| HRAC: Herbicide Resistente Action Committee | NAA: ácido naftalen acético |
| HSPs: proteínas de choque térmico | NAC: N-acetil-cisteína |
| HVA: ácido homovanilínico | NAD(P)/NAD(P)H: 2-fosfonucleótido de nicotinamida y adenina oxidado/reducido |

| | |
|---|---|
| NBT: azul de nitrotetrazolio | PQ: plastoquinona |
| NEM: N-etilmaleimida | PRs: proteínas de defensa |
| NOS: oxido nítrico sintasa | Psa A-F: polipéptidos del FSI |
| NPA: ácido naftilfitalámico | PTIO: 2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido |
| ODQ: 1H[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-ona | PTS1: <i>peroxisomal targeting signal</i> |
| Oxy-E : oxietidio | PVC: cloruro de polivinilo |
| PAA: ácido fenilacético (del inglés, <i>phenylacetic acid</i>) | PVDF : difluoruro de polivinilo |
| PAL: fenilalanina amonioliasa | RNS: especies de nitrógeno reactivo |
| PAR: radiación disponible para fotosíntesis | ROS: especies de oxígeno reactivo |
| PAT: transporte polar de auxinas (del inglés: <i>polar auxin transport</i>) | RUB: related to ubiquitin |
| PC: plastocianina | Rubisco: ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa |
| pCMS: ácido p-cloromercurifenilsulfónico | SA: ácido salicílico |
| PCR: reacción en cadena de la ADN polimerasa | SAM: S-adenosilmetionina |
| PCs: fitoquelatinas | SAR: resistencia sistémica adquirida |
| PDI: disulfuro isomerasa | SAUR: small auxin up RNAs |
| PE: parénquima en empalizada | SDS: lauril sulfato sódico |
| PGP: p-glicoproteínas | SIPK: quinasa inducida por SA |
| PHMB: <i>p</i> -hidroximercuribenzoato | S-NAP : |
| PI3K: fosfatidil inositol 3-quinasa | SNP : Nitoprusiato sódico |
| PL: parénquima lagunar | SO: sulfito oxidasa |
| PMAC: enriquecimiento de fosfoproteínas por cromatografía de afinidad metálica (del Inglés: <i>Phosphoprotein Enrichment by phosphate metal affinity chromatography</i>) | SOD (CuZn-/ Fe-/ Mn-): (cuprozinc/ ferro/ manganeso) superóxido dismutasa |
| PMPs: proteínas integrales de membranas de peroxisomas | SOX: sarcosina oxidasa |
| PMSF: fluoruro de fenil metil sulfonilo | TBE/TE: tampón tris de baja concentración salina |
| | TBS: tampón tris salino |
| | TCA: ácido tricloroacético |
| | TCB: 2,4-Trichlorobenzene |
| | TEMED: N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina |
| | TIR: receptor de auxinas (del Inglés: <i>Transport inhibitor response</i>) |
| | TMP: tetrametilpiperidina |
| | Tris: tris-hidroximetilaminometano |


Abreviaturas

UV: luz ultravioleta

X: xilema

XDH: xantina deshidrogenasa

XOD: xantina oxidasa



El 2,4-D es un compuesto análogo de la auxina natural, el ácido indolacético (IAA), que se utiliza bien como estimulador del crecimiento o herbicida dependiendo de la concentración aplicada. Recientemente se ha demostrado la implicación de especies de oxígeno reactivo (ROS) en el mecanismo de acción de este herbicida, si bien la fuente de ROS y los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la respuesta al herbicida, no están bien establecidos.

En esta Memoria de Tesis Doctoral se ha demostrado la participación de ROS y de los peroxisomas en el mecanismo de acción de este herbicida, en plantas de guisante y de *Arabidopsis*. Así, se ha identificado a la Acil CoA oxidasa (ACX) como una de las principales fuentes de ROS, y también se ha demostrado la participación de otras enzimas como la xantina oxidasa (XOD), la NADPH oxidasa y la lipoxigenasa. Uno de los síntomas más característicos de la acción del 2,4-D es la inducción de la epinastia foliar y en este trabajo hemos demostrado que este proceso es dependiente de la proliferación de haces vasculares y modificaciones del citoesqueleto. Ambos procesos son dependientes de ROS y NO. El 2,4-D produce desestructuración del citoesqueleto como consecuencia de la modificación oxidativa y por S-nitrosilación de la actina, lo que conlleva una considerable reducción del movimiento de los peroxisomas, y por tanto importantes alteraciones en el metabolismo celular.

La epinastia foliar inducida por el 2,4-D es dependiente de ROS, etileno, canales de Ca^{2+} y también depende de procesos de fosforilación/desfosforilación de proteínas. Para identificar las dianas de quinasas y fosfatasa, y obtener más información sobre la regulación del metabolismo peroxisomal, se ha analizado el patrón de proteínas fosforiladas de peroxisomas mediante análisis diferencial 2D-DIGE y MS/MALDI-TOF. De esta forma se ha demostrado que la catalasa, glicolato oxidasa, malato deshidrogenasa y Mn-superóxido dismutasa, entre otras, son susceptibles de fosforilación. Estos resultados abren nuevos campos en el estudio de la regulación del metabolismo peroxisomal por procesos de fosforilación hasta la fecha no explorados.

