



TESIS DOCTORAL

María Sanz Fernández



Selección y caracterización de mutantes de *Arabidopsis* alterados en la respuesta a metales pesados



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)

Estación Experimental del Zaidín

UNIVERSIDAD DE GRANADA 2017

**Selección y caracterización de mutantes de
Arabidopsis alterados en la respuesta a metales
pesados**



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)

Estación Experimental del Zaidín

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Programa Oficial de Doctorado en Biología Fundamental y de Sistemas

María Sanz Fernández

TESIS DOCTORAL

Granada 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: María Sanz Fernández
ISBN: 978-84-9163-690-8
URI:<http://hdl.handle.net/10481/49162>

Selección y caracterización de mutantes de *Arabidopsis* alterados en la respuesta a metales pesados

Memoria que presenta la licenciada en Ciencias Ambientales
María Sanz Fernández para optar al grado de Doctora.



Fdo. María Sanz Fernández

VºBº
LAS DIRECTORAS DEL TRABAJO



Fdo: Dra. María C Romero Puertas
Dra. en Ciencias Biológicas
Científica Titular del CSIC



Fdo: Dra. Luisa Mª Sandalio González
Dra. en Ciencias Biológicas
Investigadora Científica del CSIC

Granada, Junio 2017

El doctorando María Sanz Fernández y las directoras de la tesis, Dra. María C. Romero Puertas y la Dra. Luisa M^a Sandalio:

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

/

The doctoral candidate María Sanz Fernández and the thesis supervisors Dra. María C. Romero Puertas y Dra. Luisa M^a Sandalio:

Guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the thesis supervisors and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of the authors to be cited (when their results or publications have been used) have been respected.

Lugar y fecha/Place and date: Granada 12 de junio 2017

Directores de la tesis/Thesis supervisors:

Doctorando/Doctoral candidate:



Firma/Signed

Firma/Signed

María C. Romero Puertas Luisa M^a Sandalio

María Sanz Fernández

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 (CSIC) de Granada, dentro del grupo de investigación “Señalización por Especies de Oxígeno y Nitrógeno Reactivo en Situaciones de Estrés en Plantas”. Asimismo, ha sido financiado por la Fundación Ramón Areces.

Parte de los resultados de esta tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos y reuniones científicas:

- XXII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (SEFV), XV Congreso Hispano-Portugués de Fisiología Vegetal. Barcelona. Junio 2017.
 - ✓ Comunicación oral “**Identification and characterization of Arabidopsis mutants in genes useful for phytoremediation**”. M Sanz-Fernández, A Sevilla-Perea, L Pena, M Rodríguez-Serrano, D Mingorance LM Sandalio, MC Romero-Puertas.

- Simposio Jóvenes investigadores. Estación Experimental del Zaidín (CSIC). Granada. Diciembre, 2016.
 - ✓ Comunicación oral “**Identificación y caracterización de líneas mutantes de Arabidopsis thaliana con diferente sensibilidad a metales pesados**”. M Sanz-Fernández, LM Sandalio, MC Romero-Puertas.

- Desgranando Ciencia 3. Parque de las Ciencias de Granada. Abril, 2016.
 - ✓ Participación con poster “**Metales pesados Vs Plantas ¡A grandes males, grandes remedios!**” Laura Terrón-Camero, María Sanz-Fernández, María C. Romero-Puertas, Luisa M. Sandalio.

- XII International POG Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants: from model systems to field. Verona, Italia, Junio 2015.
 - ✓ Participación con poster “**Identification and characterization of Arabidopsis mutants with different sensitivity to heavy metals: Oxidative metabolism**”. Sanz-Fernández M, Sánchez-Guerrero AM, Rodríguez-Serrano M, Sevilla-Perea A, Mingorance MD, Sandalio LM, Romero-Puertas MC.

-
- International Congress on Phytoremediation of Polluted Soils. Vigo, Julio 28– 29, 2014.
 - ✓ Comunicación oral. “**Identification of Arabidopsis mutants with different sensitivity to heavy metals**”. M Sanz-Fernández, M Rodríguez-Serrano, D Mingorance, LM Sandalio, MC Romero-Puertas.

Parte de los resultados de estas tesis Doctoral han dado lugar a la siguiente publicación:

- Sanz-Fernández, M., Rodríguez-Serrano, M., Sevilla-Perea, A., Pena, L., Mingorance, M.D., Sandalio, L.M., and Romero-Puertas, M.C. (2017). Screening Arabidopsis mutants in genes useful for phytoremediation. **J. Hazard. Mater.** 335: 143–151.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras de tesis, la Dra. María C. Romero Puertas y la Dra. Luisa M^a Sandalio por transmitirme la ilusión por este trabajo y darme la oportunidad de introducirme en el mundo de la investigación, también por su confianza, por su orientación científica, por su continuo aporte de ideas y por su apoyo durante estos años. Muchas gracias a las dos por las facilidades del día a día en el laboratorio, siempre resolviendo las dudas con un trato agradable y amable. Ambas son un ejemplo de dedicación y admiro enormemente su sabiduría, su pasión por la ciencia y su capacidad de trabajo y esfuerzo. Gracias por todo.

También tengo que dar las gracias a la Dra. Adela Olmedilla, por su ayuda, enseñanzas con las técnicas de microscopia, su paciencia y su minuciosidad y a la Dra. María Rodríguez que me transmitió sus conocimientos en mi primera etapa en el laboratorio sobre biología molecular. Tengo que agradecer a todos los compañeros con los que me he cruzado a lo largo de los años, a aquellos con los que compartí los primeros tiempos: Katy, Vero, Juani, gracias por tantas risas y buenos ratos de conversaciones que hacían el trabajo tan ameno y divertido, y a los de estos últimos tiempos: Laura y Leyre, tan alegres y energéticas, Nieves, M^a Ángeles... mucho ánimo a todas para seguir adelante. A todos mis compis de fatigas y salidas de la EEZ, ¡gracias por todos los buenos ratos! También tengo que dar las gracias a todos mis amigos por sus visitas, que también han aportado a esta tesis dando ánimos y acortando tiempos y distancias.

Gracias a mi familia, mis abuelos, que son tan importantes para mí, tíos y primos, en especial mi prima Paula, ¡espero ahora ser yo la que te visite a ti!, a mi hermano, por ser tan bueno como es, porque siempre está ahí, aunque ande perdido por alguna montaña y en especial a mi madre, que también ha puesto su granito de arena, porque siempre me apoya y me ayuda constantemente en todo lo que puede, que es mucho, pero sobretodo, a quién tengo que dar las gracias es a Antonio, que ha estado presente durante todo el desarrollo de esta tesis y la ha sufrido tanto como yo, no lo habría conseguido sin su ayuda sin límites, su paciencia, su cariño, su tiempo y su aportación con la estadística y la informática entre otras muchas cosas, gracias por todo y sobre todo por estar siempre a mi lado.

A ANTONIO

Resumen

La acumulación de metales pesados en los suelos de áreas localizadas, debido principalmente a las actividades mineras, conduce a una disminución de la calidad del suelo y es tóxica para las plantas, dando lugar a una disminución o pérdida de la cubierta vegetal, lo que plantea un importante problema desde el punto de vista medioambiental. La fitorremediación representa una alternativa sostenible y de bajo coste para la rehabilitación de estas zonas contaminadas (Raskin, 1996), en la que se emplean plantas denominadas hiperacumuladoras de metales, con una mayor tolerancia a estos, unida a una mayor capacidad para su acumulación en la parte aérea (Pilon-Smits, 2005; Peng et al., 2009). No obstante, la fitorremediación es un proceso lento y en gran parte sin efecto debido a la fitotoxicidad de estos metales pesados en las plantas y sólo podría ser considerada como una solución a largo plazo (Dhankher y col, 2011). Además, a día de hoy, hay pocas descripciones de los mecanismos moleculares involucrados en la percepción y señalización de metales pesados en las plantas. Así, a pesar de los avances producidos en los últimos años, centrados fundamentalmente en la entrada, translocación y efectos de metales, son pocos los genes esenciales en la tolerancia a metales pesados identificados. Un conocimiento más profundo en lo que respecta a los genes que puedan producir tolerancia e hiperacumulación para generar plantas que mejoren la entrada, transporte y secuestro de metales puede abrir nuevas puertas que incrementen la eficiencia de la fitorremediación y la conservación de suelos a través de la ingeniería genética (Cherian and Oliveira, 2005; Pilon-Smits, 2005).

El objetivo de este trabajo ha sido generar un conjunto de genes útiles con fines de fitorremediación, para ello se realizó una selección de líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana* en relación a su respuesta a los metales pesados presentes en un medio seleccionado a partir de las condiciones de pH y los metales presentes en los suelos de dos zonas mineras españolas: Riotinto, altamente contaminada y Alquife, moderadamente contaminada. Se seleccionaron 74 líneas más resistentes y 46 más sensibles, concluyendo que la respuesta al estrés por metales pesados implica prácticamente todos los procesos fisiológicos en la planta, incluyendo proteínas relacionadas con el estrés, con el transporte de metales, con procesos redox, con proteínas reguladoras de mecanismos de señalización, enzimas y proteínas relacionadas con la transcripción.

Para verificar la selección realizada y estudiar el posible empleo de estos mutantes con fines de fitorremediación, se seleccionaron varias líneas resistentes (*Athpp9*, *Atnramp5*, *Atkup8*) y otra sensible (*Atala4*), todas ellas relacionadas con la función de transporte y se analizaron en mayor profundidad frente a la mezcla de metales pesados y el Cd, estudiando diferentes parámetros fisiológicos, expresión de los genes, el contenido de metales en sus tejidos y parámetros oxidativos, con el fin de profundizar en el estudio de las funciones de estos transportadores y dilucidar acerca de su posible función para la descontaminación de suelos.

Como principal contribución de este trabajo, se puede indicar que el transportador de *Arabidopsis thaliana*, NRAMP5, podría estar implicado en la translocación de Mn y Fe y como efecto colateral podría también estar involucrado en el transporte de Cd y Cr, de la raíz a la parte aérea. Además, se puede indicar que esta es la primera vez que se han estudiado las proteínas HPP9, ALA4 y KUP8 en respuesta a metales pesados y se ha determinado que las dos primeras podrían ser útiles para fitorremediación y la recuperación de suelos contaminados, ya que parecen estar involucrados en la entrada y translocación de los metales pesados desde el suelo y además, los mutantes *Athpp9* y *Atala4* conservan su fenotipo con un extracto de los suelos originales con dos enmiendas diferentes. El KUP8 sin embargo, más que estar directamente involucrado en la entrada o translocación de los metales pesados, parece estar relacionado con la distribución subcelular de potasio o la señalización dependiente de metales pesados, que lleva a la reducción de tamaño en las plantas

Índice

1	Introducción	1
1.1	Contaminación por metales pesados	3
1.1.1	Fuentes.....	4
1.1.2	Biodisponibilidad de metales pesados para la planta.....	5
1.1.3	El cadmio.....	7
1.1.4	El cromo	8
1.1.5	El cobre.....	9
1.1.6	El hierro y el manganeso	9
1.1.7	El arsénico	12
1.2	Interacción metales pesados-planta	13
1.2.1	Entrada de metales pesados a la planta.....	13
1.2.2	Mecanismos de tolerancia.....	16
1.2.3	Toxicidad de los metales pesados en planta	19
1.3	Degradación de suelos.....	21
1.3.1	Contaminación derivada de la minería	21
1.3.2	Suelos de las minas de Riotinto y Alquife.....	23
1.3.3	Estrategias de fitorremediación	26
1.3.4	La ingeniería genética para fines de fitorremediación.....	30
1.4	Identificación de genes involucrados en la tolerancia a metales pesados	33
1.4.1	Familia NRAMP.....	33
1.4.2	Familia de transportadores de K ⁺ , KT/KUP/HAK	37
1.4.3	Familia de ATPasas tipo P ₄ de Arabidopsis (ALA).....	43
1.4.4	Familia de metalochaperonas (HPP)	45
1.5	Metabolismo de especies de oxígeno reactivo (ROS).....	47
1.5.1	Especies de oxígeno reactivo.....	47
1.5.2	Mecanismos de defensa antioxidante	48

1.5.3	Estrés oxidativo	50
1.5.4	Toxicidad de los metales pesados y estrés oxidativo	51
1.5.5	Papel de las ROS en la señalización celular	54
2	Objetivos	57
3	Materiales y métodos.....	61
3.1	Material vegetal	63
3.1.1	Comprobación de la homocigosis de las líneas mutantes	63
3.1.2	Polinización dirigida y selección de dobles homocigotos	65
3.2	Condiciones de cultivo y medios de crecimiento	66
3.2.1	Crecimiento en tierra	66
3.2.2	Crecimiento en placa	66
3.2.3	Crecimiento en hidroponía.....	67
3.2.4	Crecimiento en extractos de suelo original y suelos enmendados	68
3.2.4.1	Preparación de los extractos del suelo original de Riotinto y el suelo enmendado	68
3.2.4.2	Cultivo en medios preparados a partir del suelo original y los suelos enmendados.....	69
3.2.5	Medios empleados	70
3.3	Recolección y preparación de las muestras vegetales	73
3.4	Análisis fenotípico.....	73
3.4.1	Germinación	73
3.4.2	Medida de peso fresco y seco	74
3.4.3	Medida de longitud de raíz	74
3.4.4	Número de hojas verdaderas.....	74
3.4.5	Número de hojas de roseta y de silicuas	74
3.5	Determinación de actividades enzimáticas.....	74
3.5.1	Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6).....	75
3.5.2	Glicolato Oxidasa (GOX; EC 1.1.3.1).....	75
3.6	Determinación de proteínas totales.....	75
3.7	Peroxidación lipídica	76
3.8	Análisis de peróxido de hidrógeno	76

3.8.1	Método fluorimétrico.....	76
3.8.2	Método histoquímico.....	77
3.9	Análisis del contenido de metales.....	77
3.10	Desarrollos electroforéticos y Western-blot.....	78
3.10.1	Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (EGPA-SDS).....	78
3.10.2	Transferencia de Proteínas (Western-blot) e Inmunodetección.....	78
3.11	Análisis de ácidos nucleicos.....	79
3.11.1	Extracción y purificación de RNA total.....	79
3.11.2	Electroforesis de ácidos nucleicos.....	80
3.11.3	Transcripción inversa.....	80
3.11.4	Extracción de DNA genómico.....	80
3.11.5	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	81
3.11.6	Oligonucleótidos utilizados.....	85
3.12	Microscopia.....	87
3.12.1	Preparación de muestras.....	87
3.12.2	Tinciones histológicas.....	88
3.12.3	Localización de proteínas mediante análisis de GFP (green fluorescence protein)...	90
3.12.4	Técnicas inmunohistoquímicas.....	90
3.13	Análisis bioinformático.....	91
3.14	Análisis estadístico.....	92
4	Resultados.....	95
4.1	Selección del medio de cultivo y mezcla de metales pesados para la selección de mutantes.....	97
4.1.1	Concentración de metales en los suelos de estudio.....	97
4.1.2	Búsqueda del medio de cultivo de trabajo.....	97
4.1.3	Ajuste en la concentración de metales del medio.....	101
4.2	Selección de mutantes con diferente tolerancia a metales pesados.....	104
4.2.1	Colección de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> L. y criterio de selección.....	104
4.2.2	Comprobación de los resultados de la selección.....	106
4.3	Identificación y clasificación de los genes responsables de la diferente tolerancia a metales pesados.....	107

4.3.1	Clasificación de los genes responsables del fenotipo diferencial en respuesta a los metales	113
4.4	Caracterización de los mutantes <i>Athpp9</i> y <i>Atala-4</i> en la respuesta a metales pesados....	116
4.4.1	Estudio “in silico”	116
4.4.2	Comprobación de la homocigosis de las líneas y el fenotipo frente a la mezcla de metales	118
4.4.3	Análisis del metabolismo oxidativo.....	120
4.4.4	Captación y translocación de metales pesados en los mutantes <i>Athpp9</i> y <i>Atala4</i> ...	121
4.4.5	Análisis de la expresión de <i>HPP9</i> y <i>ALA4</i> en respuesta a metales	124
4.4.6	Respuesta de <i>Athpp9</i> y <i>Atala4</i> a extractos de suelos enmendados	125
4.5	Estudio de los transportadores KUP	127
4.5.1	Estudio de expresión “in silico” de KUP8	127
4.5.2	Homocigosis de <i>Atkup8</i> y fenotipo frente a la mezcla de metales.....	129
4.5.3	Estudio de homologías entre proteínas KUP	130
4.5.4	Expresión de la familia KUP en plántulas	131
4.5.5	Estudio de expresión “in silico” de KUP1	132
4.5.6	Homocigosis de <i>Atkup1</i> y fenotipo frente a la mezcla de metales.....	134
4.5.7	Respuesta de <i>Atkup8</i> y <i>Atkup1</i> frente a diferentes metales por separado	135
4.5.8	Respuesta de plántulas de <i>Atkup1kup8</i> frente a la mezcla de metales y el cadmio .	138
4.5.9	Caracterización fenotípica en tierra y en cultivo hidropónico de <i>Atkup8</i> , <i>Atkup1</i> y <i>Atkup1kup8</i>	140
4.5.10	Respuesta de plantas adultas frente a la mezcla de metales.....	141
4.5.10.1	Crecimiento de <i>Atkup8</i> y <i>Atkup1</i> en cultivo hidropónico	141
4.5.10.2	Análisis del contenido de metales de <i>Atkup8</i> y <i>Atkup1</i>	142
4.5.10.3	Estudio de expresión de <i>KUP8</i> en hoja y en raíz	145
4.5.10.4	Estudio de parámetros oxidativos	146
4.5.11	Respuesta de plantas adultas frente al cadmio	146
4.5.11.1	Crecimiento de <i>Atkup8</i> en cultivo hidropónico.....	147
4.5.11.2	Análisis del contenido de metales	147
4.5.11.3	Estudio de expresión de <i>KUP8</i> en hoja y raíz.....	149
4.5.11.4	Estudio de parámetros oxidativos	150

4.5.11.5	Expresión de KUP8 en los mutantes <i>Atrboh C</i> , <i>Atrboh D</i> y <i>Atrboh F</i>	151
4.5.11.6	Resumen de la respuesta de <i>Atkup8</i> en tratamiento con la mezcla de metales vs Cd	152
4.5.12	Respuesta de <i>Atkup8</i> , <i>Atkup1</i> y <i>Atkup1kup8</i> en condiciones alteradas de manganeso ..	154
4.5.13	Respuesta de <i>Atkup8</i> , <i>Atkup1</i> y <i>Atkup1kup8</i> en condiciones alteradas de hierro.....	158
4.6	Estudio del transportador NRAMP5	161
4.6.1	Estudio de expresión “in silico”	161
4.6.2	Estudio de homologías entre proteínas NRAMP	162
4.6.3	Caracterización fenotípica de <i>Atnramp5</i>	163
4.6.4	Homocigosis de <i>Atnramp5</i>	164
4.6.5	Respuesta de <i>Atnramp5</i> frente a la mezcla de metales	165
4.6.5.1	Fenotipo de plántulas de <i>Atnramp5</i> frente a la mezcla de metales y análisis de expresión de NRAMP5	165
4.6.5.2	Expresión de la familia NRAMP en plántulas	166
4.6.5.3	Crecimiento de <i>Atnramp5</i> en cultivo hidropónico	168
4.6.5.4	Análisis del contenido de metales	168
4.6.5.5	Estudio de parámetros oxidativos	171
4.6.6	Respuesta de <i>Atnramp5</i> frente a diferentes metales por separado	172
4.6.7	Respuesta de <i>Atnramp5</i> frente al cadmio	175
4.6.7.1	Fenotipo de plántulas de <i>Atnramp5</i> frente al cadmio y análisis de expresión de NRAMP5	175
4.6.7.2	Acumulación de cadmio en los tejidos de la plántula	176
4.6.7.3	Crecimiento de <i>Atnramp5</i> en cultivo hidropónico con Cd.....	177
4.6.7.4	Análisis del contenido de metales	178
4.6.7.5	Estudio de parámetros oxidativos	180
4.6.7.6	Localización de la expresión de NRAMP5 mediante GUS	182
4.6.7.7	Localización de NRAMP5 mediante GFP	184
4.6.7.8	Expresión de NRAMP5 en los mutantes <i>Atrboh C</i> , <i>Atrboh D</i> y <i>Atrboh F</i>	189
4.6.7.9	Resumen de la respuesta de <i>Atnramp5</i> en tratamiento con la mezcla de metales vs Cd	190
4.6.8	Estudio de NRAMP5 en condiciones alteradas de manganeso	191

4.6.8.1	Estudio fenotípico en plántulas	191
4.6.8.2	Expresión de <i>NRAMP5</i> en plántulas	195
4.6.9	Estudio de <i>NRAMP5</i> en condiciones alteradas de hierro	196
4.6.9.1	Estudio fenotípico en plántula.....	196
4.6.9.2	Expresión de <i>NRAMP5</i> en plántulas	199
4.6.9.3	Detección de acúmulos de hierro mediante tinción Perls	200
4.6.10	Respuesta de <i>Atnramp5</i> en suelos enmendados.....	202
5	Discusión	205
5.1	Metabolismo de proteínas y señalización en la tolerancia de plantas a metales pesados	208
5.2	Proteínas relacionadas con el transporte en la tolerancia a metales pesados: <i>HPP9</i> y <i>ALA4</i>	210
5.3	Función de los transportadores KUP8 y KUP1 en la resistencia frente a metales pesados... ..	213
5.4	Función del transportador <i>NRAMP5</i> en la resistencia frente a metales pesados	218
6	Conclusiones	229
	Bibliografía	233

Anexos

Abreviaturas

Índice de figuras

Índice de tablas

1 Introducción

1.1 Contaminación por metales pesados

La contaminación por metales pesados debido al desarrollo industrial es uno de los problemas ambientales más graves que enfrenta hoy en día la humanidad. Como “metales pesados” se definen a un grupo amplio de elementos químicos naturales de la corteza terrestre y del suelo que presentan densidad igual o superior a 5.0 g cm^{-3} cuando están en forma elemental, o tienen propiedades metálicas y número atómico superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalinotérreos; Jing y col., 2007; Sarma, 2011). En general, el término “metal pesado” se refiere a cualquier elemento químico metálico que tiene una alta densidad y es tóxico para la célula a bajas concentraciones (Suresh Kumar y col., 2015). Aproximadamente 53 elementos químicos entran en la categoría de metales pesados, entre ellos hay algunos que, aunque son metales ligeros o no metales, se suelen englobar con ellos por origen y comportamiento asociados; como es el caso de As, B, Ba y Sb (Duruipe y col., 2007; Navarro-Aviñó y col., 2007). Su presencia en la corteza terrestre es inferior al 0,1 % y casi siempre menor del 0,01 % (García y Dorronsoro., 2005). Sin embargo, algunos de ellos están entre los diez contaminantes más peligrosos según la agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (Chen y col; 2006).

Muchos metales pesados son oligoelementos o micronutrientes, necesarios en pequeñas cantidades para los organismos y sólo son tóxicos una vez pasado cierto umbral de concentración, en este grupo se incluyen Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni, Se y Zn. Sólo un grupo pequeño de metales no tiene función biológica conocida y son altamente tóxicos, incluso a dosis bajas. Entre ellos se encuentran el As, Cd, Hg, Pb, Sb y Bi (Emsley, 2011; Salt y col., 1995; Schützendübel y Polle, 2002). Sin embargo, en un sentido ecológico, cualquier metal o metaloide que cause la contaminación del medio ambiente, o que no pueda ser biológicamente degradado (y por lo tanto se bioacumule), podría ser considerado como un metal pesado (Herrera-Estrella y Guevara-García, 2009). Los metales pesados como cadmio, cobre, plomo, cromo, zinc y níquel son importantes contaminantes ambientales, particularmente en las áreas de alta presión antropogénica. Wang y Chen, (2009) clasifican los metales pesados en tres categorías: metales tóxicos (tales como Hg, Cr, Pb, Zn, Cu, Ni, Cd, As, Co, Sn, etc.), metales preciosos (tales como Pd, Pt, Ag, Au, Ru etc.) y radionucleidos (como U, Th, Ra, Am, etc.; Wang y Chen, 2009). También es importante tener en cuenta el estado del elemento, si se trata del elemento puro, o de alguno de sus diversos estados de oxidación (compuestos), que no presentan

las mismas propiedades físicas, químicas, tóxicas ni ecotóxicas, complicando todavía más su clasificación (Navarro-Aviñó y col., 2007).

1.1.1 Fuentes

La acumulación de metales pesados en concentraciones anómalas en el suelo conduce a una disminución de la calidad del mismo y además es tóxica para las plantas, dando lugar a una disminución o pérdida de la cubierta vegetal, favoreciendo la erosión y transporte de contaminantes hacia otros compartimentos (aguas subterráneas y superficiales y cadena trófica), lo que plantea un importante problema mundial desde el punto de vista medioambiental y de salud humana. Las características del suelo también juegan un papel importante en la reducción o aumento de la toxicidad de los metales, así como su distribución en los perfiles del suelo y su disponibilidad (Colombo y col., 1998).

La acumulación de metales por factores naturales depende de la geodisponibilidad, esto es la cantidad que puede liberarse a la superficie o cerca de la superficie por procesos mecánicos, químicos o biológicos (Plumlee, 1994). Los metales pesados son muy estables en el suelo por lo que la geodisponibilidad de los elementos de las rocas y su aportación al suelo es insignificante respecto a la derivada de las acciones antropogénicas (Figura 1.1).



Figura 1.1. Fuentes antropogénicas de contaminación por metales pesados.

Las principales concentraciones anómalas de metales pesados en suelos provienen fundamentalmente de las menas metálicas (sulfuros, óxidos). La explotación y extracción de metales produce anualmente millones de toneladas de residuos, la mayoría con pirita

y otros sulfuros, cuya oxidación libera grandes cantidades de metales pesados al ambiente, y en particular a los suelos, incrementando su concentración a niveles de macroelementos, afectando negativamente la calidad del suelo, inhibiendo la descomposición de la materia orgánica, produciendo una clase textural desequilibrada, provocando ausencia o baja presencia de la estructura edáfica, alteración de las propiedades químicas, desequilibrio o disminución en el contenido de nutrientes fundamentales, ruptura de los ciclos biogeoquímicos, dificultad de enraizamiento, baja retención de agua y presencia de compuestos tóxicos (García y Dorronsoro, 2005), afectando también la diversidad y actividad de los organismos del suelo (Salomons, 1995). En estas áreas, las capas superiores de los suelos presentan concentraciones elevadas de Cu, Ni, As, Se, Cd, Fe, etc., dependiendo del tipo de mineral explotado (Galán Huertos y Romero Baena, 2008).

Otra de las principales fuentes antropogénicas de metales pesados en suelos es la actividad agrícola, por el riego, el estiércol, las enmiendas calizas, el uso de fertilizantes inorgánicos y pesticidas y los lodos residuales de depuradoras. Además, la generación eléctrica, por la combustión del carbón, es una de las principales fuentes de deposición de metales en el suelo; las centrales térmicas que usan petróleo pueden ser fuentes de Pb, Ni y V. En cuanto a las actividades industriales, las principales industrias contaminantes son las fundiciones de hierro y acero, que emiten metales asociados a las menas de Fe y Ni. La fabricación de baterías que produce cantidades considerables de Pb; las industrias de productos químicos, fármacos, pigmentos y tintes, el curtido de pieles, etc. que también producen distintos tipos de contaminantes. En general las áreas altamente industrializadas contienen As, Cd, Cr, Hg, Fe, Ni, Pb y Zn. Además, el 10 % de los residuos domésticos están compuestos por metales (Galán Huertos y Romero Baena, 2008).

1.1.2 Biodisponibilidad de metales pesados para la planta

La toxicidad de una sustancia química es su capacidad para producir efectos perjudiciales al entrar en contacto con un ser vivo. Los metales pesados son especialmente peligrosos debido a la capacidad de bioacumulación que presentan. En un suelo contaminado por metales pesados, su toxicidad viene determinada por las concentraciones de los metales en las fases bioasimilables. Por este motivo podría decirse que la concentración de metales pesados en la fase bioasimilable es una medida de la toxicidad real del suelo, mientras que la concentración total de metales sirve para

determinar la peligrosidad o toxicidad potencial de dicho suelo. Por tanto, la toxicidad de un metal es distinta en función del tipo de suelo y las características del mismo (Aguilar y col, 2001). Los metales tienden a acumularse en la superficie del suelo quedando accesibles al consumo de las raíces de los cultivos (Baird, 1999). Las plantas cultivadas en suelos contaminados absorben en general más oligoelementos y la concentración de éstos en los tejidos vegetales está a menudo directamente relacionada con su abundancia en los suelos, y especialmente en la fracción húmeda (Kabata-Pendias, 2011).

La movilidad y biodisponibilidad que presentan los metales en los suelos se encuentra condicionada por distintos factores químicos, físicos y biológicos que influyen en la reactividad de los metales en un sustrato tan heterogéneo como son los suelos (He y col, 1993; García, 2005). Los equilibrios que se dan entre los metales y los diferentes componentes del suelo provocan que estos elementos se repartan entre fracciones solubles en agua, en posiciones intercambiables de arcillas y materia orgánica, enlazados a óxidos, carbonatos, sulfatos y fosfatos, o dentro de redes cristalinas (Figura 1.2; Shuman, 1991). En los procesos de movilidad de los metales en los suelos se dan reacciones de adsorción-desorción, y precipitación-disolución, así como reacciones de complejación y cambios redox que afectan a la reactividad del metal (solubilidad y biodisponibilidad; Navas y Lindhorfer, 2003; Basta y col; 2005). Todas estas reacciones y equilibrios se encuentran controlados por diversos factores, siendo los más importantes el pH, la capacidad de intercambio iónico (CIC) o el potencial redox de los metales (Adriano, 1986; Alloway, 1995; Sposito, 1989).

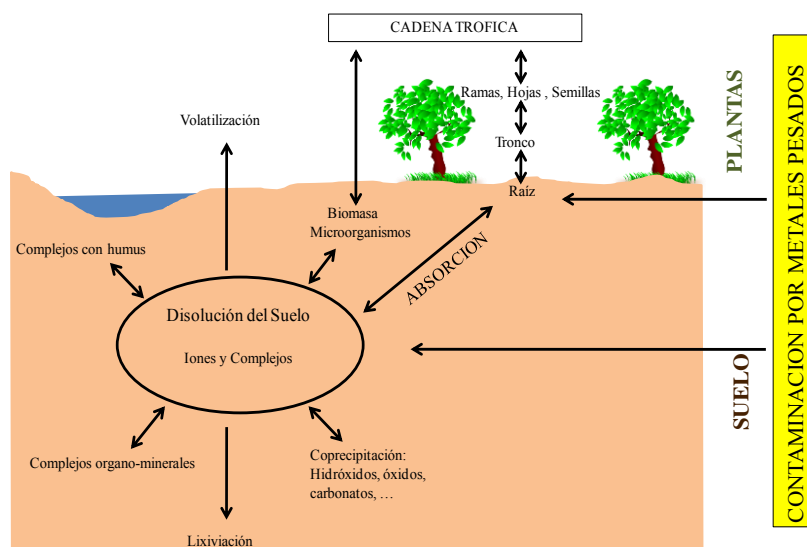


Figura 1.2. Distribución de los metales en los suelos. Modificado de López Arias y col, (2004) y Calvo de Anta, (1997).

El pH influye en la complejación de los metales con la materia orgánica, en las reacciones de precipitación o disolución y en las reacciones redox. Por ejemplo, la solubilidad del Cd aumenta al reducir el pH por debajo de 6,5 (Scheffer y Schachtschabel, 1989). Por otro lado, la CIC del suelo depende de la superficie de adsorción determinada por la presencia y tipo de arcillas, materia orgánica y óxidos de Fe, Al y Mn. La materia orgánica presenta la propiedad de intercambio de iones y también la de formación de complejos con los metales (Stumm y Morgan, 1981). Otros factores que influyen en la movilidad de los metales son el contenido de humedad de los suelos a través de reacciones de oxidación-reducción, o las propiedades fisicoquímicas de los elementos como son su electronegatividad o radio iónico (Adriano, 1986). Considerando todos estos factores, el riesgo de toxicidad por metales en los diversos seres vivos no puede determinarse únicamente en función de la concentración total del metal, sino teniendo en cuenta su movilidad y estado fisicoquímico (Mulligan y col 2001; Galán y col., 2003).

1.1.3 El cadmio

El cadmio (Cd) es un elemento químico con número atómico 48 y con una masa atómica de 112,40. Es un metal del grupo de los elementos de transición, de color blanco plateado y maleable. Debido a su elevada densidad se incluye dentro del grupo de los metales pesados (Barceló y Poschenrieder, 1990). Es un metal altamente perjudicial, se estima que su vida media es aproximadamente de 15 a 30 años (Henson y Chedrese, 2004; Maruthi y col., 2007). La Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR) consideró al Cd, en 2013 como la séptima sustancia tóxica con más prioridad, teniendo en cuenta su frecuencia, toxicidad y exposición potencial para humanos (<http://www.atsdr.cdc.gov/>). Su concentración en un suelo no contaminado, según la agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (EPA, 1999), debe mantenerse en niveles inferiores a 1 mg kg^{-1} .

Se trata de un elemento no esencial salvo cuando funciona como cofactor de la anhidrasa carbónica en diatomeas bajo escasez de nutrientes (Lane y Morel, 2000; Morel y Malcolm, 2005). Es poco abundante en la corteza terrestre y tóxico a concentraciones bajas en todos los organismos vivos (Cullen y Maldonado, 2013). Como todos los metales pesados, el Cd puede acumularse en los organismos, transferirse de un nivel trófico al siguiente y multiplicar su concentración a lo largo de las cadenas tróficas produciéndose fenómenos de bioacumulación (De Acevedo, 2003). El Cd generado por erupciones

volcánicas y actividades antropogénicas es removido de la atmósfera por deposición de partículas o por precipitación, para luego ser posteriormente transportado a ríos y océanos. De igual forma, los efluentes industriales con Cd llegan a los ríos donde es absorbido por la materia particulada y acumulado en sedimentos (Salazar y Reyes, 2000). Cuando se combina con otros elementos formando compuestos como cloruros, óxidos o sulfuros, que se unen fuertemente a las partículas del suelo permanece en él por muchos años. Por otro lado, la aplicación reiterada de fertilizantes fosfatados incrementa las cantidades de Cd en el suelo y puede llegar a afectar a los cultivos (Bonomelli y col., 2003).

La biodisponibilidad del Cd para la planta depende de numerosos factores físicos, químicos y biológicos que modifican su solubilidad y el estado del metal en el suelo y la presencia de otros cationes como el Cu, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn y Ni (McLaughlin y Singh, 1999; Rodríguez-Serrano y col., 2009; Liu y col., 2015). También es importante el tipo de planta, ya que no todas acumulan Cd en igual medida. Posteriormente el Cd se transloca desde la raíz de las plantas a la parte aérea, pudiendo ser ingerido por la fauna, pasando al siguiente nivel trófico (Sanità di Toppi y Gabbrielli, 1999).

1.1.4 El cromo

El Cr aparece frecuentemente como un contaminante ambiental debido a diferentes actividades industriales (Shahid y col., 2017). El Cr añadido a los suelos puede mostrar dos estados de oxidación que difieren en su movilidad y peligrosidad, el Cr (VI) y el Cr (III) (Wittbrodt y Palmer, 1996; Kabata-Pendias, 2011). En un rango de pH de neutro a alcalino, las especies de Cr (III) se consideran insolubles y poco móviles y tienden a oxidarse a Cr (VI), con una mayor solubilidad y movilidad en estas condiciones, estimándose aproximadamente 100 veces más tóxico (Welch y col., 1975; Srivastava y col., 1999; Adriano, 2001).

El Cr no es un elemento esencial en las plantas, por lo que no tiene un mecanismo específico para su absorción. El Cr (VI) utiliza una vía de transporte activo de aniones esenciales tales como el sulfato (López-Bucio y col., 2014) y compite con aniones esenciales como Fe, S y P por la unión a los ligandos (Shanker y col., 2005; Singh y col., 2013). El Cr se acumula fundamentalmente en raíces y en menor medida en los órganos reproductivos y vegetativos. Es posible que esto se deba a que el Cr se inmoviliza en las

vacuolas de las células de las raíces como respuesta natural frente a su toxicidad, donde se reduce de Cr(VI) a Cr(III) disminuyendo así sus efectos tóxicos (Shanker y col., 2005; Shahid y col., 2017).

1.1.5 El cobre

El cobre es un micronutriente esencial que participa en numerosos procesos fisiológicos y un cofactor esencial para muchas metaloproteínas, debido a que presenta una configuración electrónica que le permite formar complejos con moléculas orgánicas o con las cadenas laterales de aminoácidos. Sin embargo, es potencialmente tóxico cuando se acumula en exceso en las células (Lippard y Berg, 1994; Puig y col, 2007). La contaminación con este metal se produce mayoritariamente en la cercanía de las minas donde se extrae y procesa, y en las refinerías durante su purificación (Riedel, 2008), aunque también plantea serios problemas debido a su amplio uso en la industria y la agricultura. El cobre no es fácilmente bioacumulable y por lo tanto su toxicidad para el hombre y otros mamíferos es relativamente baja.

Las plantas han desarrollado distintos sistemas moleculares tanto extracelulares como intracelulares, para mantener el Cu a unos niveles adecuados en la célula y así reducir su fitotoxicidad. Existen dos tipos de polipéptidos ricos en cisteína encargados de secuestrar el Cu: las metalotioneínas (MTs), que se acumulan principalmente en los tricomas de las hojas, y las fitoquelatinas (PCs), que son específicas de plantas y de algunos hongos (Rauser, 1995; Sharma y Dietz, 2009). En plantas de *Arabidopsis* expuestas a concentraciones entre 5 y 50 μM de Cr, se inhibía el crecimiento de la raíz principal y aumentaba la densidad de las raíces laterales, también se producía la disminución de la biomasa de la raíz. Además se produjo una alteración en el contenido de iones metálicos: Mg, Ca, Fe y Zn aumentaron y el K y S disminuyeron. También se observaron cambios en la acumulación de auxinas y citoquininas y una muerte del meristemo apical superior (Lequeux y col., 2010).

1.1.6 El hierro y el manganeso

El hierro (Fe) es un micronutriente esencial para las plantas debido a que interviene en procesos fisiológicos como la fotosíntesis, la respiración y la asimilación de nitrógeno (Marschner, 1995). Es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre

y en el suelo se encuentra principalmente como Fe^{3+} (Lindsay y Schwab, 1982). Sin embargo, debido a que es un elemento poco móvil en el suelo y muy insoluble a pH básico (Römheld y Marschner, 1986), su disponibilidad para las plantas suele ser baja, a pesar de ser un micronutriente abundante (Chaney, 1984; 1988).

Las plantas han desarrollado mecanismos para incrementar el hierro de la rizosfera y favorecer su movilidad desde el suelo hasta el interior de la raíz. La Estrategia I es la que utilizan todas las plantas excepto las gramíneas y se centra en reducir el Fe^{3+} , la forma más abundante en el suelo, a Fe^{2+} , previamente a su absorción (Römheld y Marschner, 1986; Curie y Briat, 2003; Kobayashi y Nishizawa, 2012). Esta reducción se produce mediante una enzima reductasa, localizada en la membrana de las células epidérmicas de la raíz, cuyo gen ha sido clonado en *Arabidopsis* (*AtFRO2*; Robinson y col., 1999), y en otras especies, como pepino (*CsFRO1*; Waters y col., 2007) y tomate (*SIFRO1*; Xudong Cheng y col., 2004). El hierro reducido, es transportado hacia el interior de las células a través de un transportador localizado en la membrana de las células epidérmicas de la raíz, cuyo gen también ha sido clonado en *Arabidopsis* (*AtIRT1*; Eide y col., 1996) y del que también se conocen ortólogos en otras especies, como pepino (*CsIRT1*; Waters y col., 2007) y tomate (*SIIRT1*; Eckhardt y col., 2001). Estos genes están regulados a nivel transcripcional por un factor de transcripción de tipo bHLH (FIT) en *Arabidopsis*, que actúa conjuntamente con otros dos factores de transcripción, *bHLHH38* y *bHLH39* (Colangelo y Guerinot, 2004; Jakoby y col., 2004; Yuan y col., 2008; Wang y col., 2007). Cuando las plantas de Estrategia I sufren deficiencia de hierro, inducen cambios fisiológicos (incremento de la capacidad reductora del Fe^{3+} y de la capacidad para transportar Fe^{2+} , acidificación de la rizosfera y excreción de compuestos fenólicos, quelantes del Fe) y morfológicos (desarrollo de engrosamientos subapicales con abundantes pelos radicales); y desarrollo de células de transferencia en sus raíces, para mejorar la absorción de este nutriente (Römheld y Marschner, 1986). Se ha sugerido que el transporte de Fe^{2+} de las células de la raíz hasta los vasos del xilema se realiza formando parte de un complejo con nicotianamina (Hell y Stephan, 2003).

La deficiencia de hierro en la planta produce clorosis férrica y se manifiesta como un amarilleamiento internervial de las hojas más jóvenes y da lugar a una disminución de la fotosíntesis y de la acumulación de materia orgánica, lo que origina un descenso del crecimiento y de la productividad de los cultivos afectados (Chaney, 1984).

El manganeso es una sustancia que se encuentra de forma natural en el ambiente, constituyendo el 0,095 % de la corteza terrestre (CICAD, 2004). Se presenta en formas compuestas, siendo los más abundantes óxidos, sulfuros, carbonatos y silicatos. Todos los organismos requieren Mn en niveles traza para su supervivencia. Es un metal de transición que puede existir con diferentes estados de valencia y por lo tanto juega el papel de catalizador en la transferencia de electrones cuando se utiliza como cofactor de proteínas. Así, es un constituyente de metaloenzimas esenciales para la defensa antioxidante como la enzima Mn-superóxido dismutasa (MnSOD; Marschner, 1995). Además, el Mn es un activador de numerosas enzimas implicadas en diversas rutas metabólicas, tales como la síntesis de DNA, el metabolismo de azúcares, la modificación de proteínas, la fotólisis del agua en cloroplastos y la síntesis de lignina (Socha y Guerinot, 2014).

A pesar de la importancia del Mn en el desarrollo de las plantas, se sabe relativamente poco acerca de su entrada y circulación entre los tejidos y dentro y fuera de los orgánulos. Hay pocos transportadores de Mn identificados en las plantas, esto puede deberse a que el Mn comparte muchos de los transportadores de otros cationes divalentes tales como el Fe (Socha y Guerinot, 2014). La deficiencia de Mn puede deberse a múltiples factores, incluyendo altas concentraciones de otros minerales en el suelo (Fe, Mg, Ca, P), que pueden interferir con la absorción de Mn así como la alcalinidad del suelo (Lynch y St.Clair, 2004; Marschner, 2012).

El Mn intracelular se encuentra en múltiples lugares de la célula, incluyendo el cloroplasto, la pared celular, las mitocondrias y el aparato de Golgi (Marschner, 1995). El Mn también se encuentra en la vacuola, un orgánulo que es crítico para la homeostasis de metales, sirviendo como sumidero intracelular cuando los metales están en exceso y como fuente cuando los metales son limitados (Pittman, 2005; Fernando y col., 2006; Lanquar y col., 2010).

Las plantas deficientes en Mn presentan un crecimiento menor y son más susceptibles a patógenos y daños a temperaturas de congelación (Marschner, 2012), también se caracterizan por la disminución de la fotosíntesis neta, la necrosis tisular debido a una disminución de los niveles de manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) y un aumento de los radicales libres de oxígeno (Marschner, 2012). Debido a que el Mn

es un cofactor en la biosíntesis del ácido cinámico y su polimerización en lignina, la disminución de la concentración de lignina es especialmente prominente en las raíces de las plantas deficientes en Mn (Marschner, 2012; Salvador y col., 2013).

Debido a que el Mn y el Fe compiten por los transportadores comunes y los ligandos, la toxicidad del Mn se debe en parte a la inducción de una deficiencia de Fe.

1.1.7 El arsénico

El arsénico se encuentra en estado sólido principalmente en forma de sulfuros y es un elemento ampliamente distribuido en el ambiente. Se encuentra en diferentes estados (-III, 0, + III y + V), principalmente como arseniato (AsV) y arsenito (AsIII), y presenta un amplio rango de solubilidad dependiendo del ambiente iónico y del pH (Finnegan y Chen, 2012). El arsénico inorgánico está presente en suelo, agua, aire y se acumula en cultivos que crecen en suelos contaminados (Meharg y Hartley-Whitaker, 2002). Las principales actividades antropogénicas fuente de As son: la minería, la siderurgia, la agricultura, la silvicultura, las plantas de tratamiento de combustibles fósiles, los desechos urbanos y la ganadería (Adriano, 2001; Cullen y Reimer, 1989; Fitz y Wenzel, 2002). Además, los residuos urbanos que derivan en la obtención de lodos de depuradora y compost, que son usados ocasionalmente como enmiendas orgánicas de suelos, pueden contener arsénico en cantidades variables.

La tasa de absorción y acumulación de As por las plantas depende de factores tales como el tipo de suelo, la especiación, las especies de plantas y los mecanismos de absorción (Zhao y col., 2009; Finnegan y Chen, 2012). Las raíces de las plantas toman selectivamente formas específicas de As a través de vías y transportadores distintos (Farooq y col., 2016). Aunque la información sobre la capacidad de movilizar/inmovilizar As por las plantas no es abundante, la analogía fosfato/arseniato permite establecer relaciones en la dinámica del P y del As en la rizosfera (Fitz y Wenzel, 2002). Por otro lado, el arsénico en suelos está retenido en gran proporción en óxidos-hidróxidos y cualquier estrategia capaz de atacar los óxidos-hidróxidos de Fe para movilizar el Fe alterará por tanto las superficies de retención del As, pudiendo incluso solubilizarlo (Fitz y Wenzel, 2002).

1.2 Interacción metales pesados-planta

1.2.1 Entrada de metales pesados a la planta

La entrada de metales pesados en la planta viene determinada por la esencialidad o no de los mismos. Para los metales esenciales existen transportadores específicos pero para los metales pesados que no son esenciales, se asume que no existen mecanismos de entrada específicos y entran en la célula a través de los transportadores esenciales para multitud de procesos fisiológicos (Clemens, 2001). Se ha sugerido que metales tóxicos, tales como el cadmio, entran en las células vegetales mediante transportadores de cationes esenciales, tales como Fe y Ca (Thomine y col., 2000). Un exceso de cationes esenciales como el Zn^{2+} y el Ca^{2+} , producen un efecto protector frente a la toxicidad del cadmio (Aravind y Prasad, 2005), lo que sugiere la existencia de una competencia de estos cationes por la entrada a la planta. Se ha demostrado la implicación de los canales de alta afinidad de Ca^{2+} con unión a calmodulina (NtBP4), que han sido localizados en la membrana plasmática de plantas de tabaco y pueden interactuar con Pb^{+2} y Ni^{+2} (Arazi y col., 1999); canales de Ca^{2+} como la proteína LCT1 de trigo (*Triticum aestivum L.*) que regula también el transporte de Ca^{2+} y Cd^{2+} en levaduras (Clemens y col., 1998; Perfus-Barbeoch y col., 2002).

La familia de transportadores de Zn (ZIP, *Zrt*-, *Irt-like Protein*), que son transportadores de iones metálicos divalentes de baja especificidad, están implicados en la entrada de Fe^{2+} y Zn^{2+} (Fox y Guerinot, 1998), si bien, ZIP2 y ZIP4 podrían presentar cierta especificidad por el Cu (Guerinot, 2000; Wintz y col., 2003). Entre estas proteínas se encuentra el IRT1, regulado por Fe como se ha mencionado anteriormente (*Iron Responsive Transporter 1*), que es el principal sistema de entrada del Fe^{2+} en raíces de *Arabidopsis* (Vert y col., 2002; Guerinot, 2000) y aunque el sustrato preferente es el Fe, este transportador también es capaz de incorporar Cu, Mn, Zn y Cd (Eide y col., 1996; Korshunova y col., 1999). Por lo tanto, en las plantas, el gen IRT1 se regula transcripcionalmente en respuesta a la deficiencia de Fe, pero una vez expresado puede ser capaz de transportar otros metales divalentes además de éste (Welch y col., 1993). Existen evidencias que apuntan a un papel de IRT1 en la mediación de la acumulación de Cd en plantas deficientes en hierro. La capacidad de IRT1 para transportar Cd podría resultar útil para eliminar Cd de suelos contaminados (Cohen y col., 1998). Otros estudios realizados en *Saccharomyces*, *Thlaspi* y *Arabidopsis* han identificado transportadores de

Zn^{2+} , como son ZRT1, ZRT2, ZRT3 y ZRT4, también pertenecientes a las proteínas ZIP (Zhao y Eide, 1996; Grotz y col., 1998; Pence y col., 2000). Este grupo de proteínas no sólo está implicado en la entrada de metales a la célula, sino que también poseen funciones de transporte a la vacuola para la inmovilización del metal, como es el caso de ZRT3 (MacDiarmid y col., 2000).

Existen distintos tipos de transportadores de membrana implicados en la absorción de AsIII, como las acuaporinas y los transportadores de fosfato. Pertenecientes a la familia de las acuaporinas están las proteínas intrínsecas de tipo nodulina 26 (NIP), que transportan moléculas neutras como el glicerol y el ácido silícico (Zhao y McGrath, 2009; Chen y col., 2016; Farooq y col., 2016). NIP1; 1, NIP1; 2, NIP3; 1; NIP5; 1; NIP6; 1 y NIP7; 1, están implicados en la captación y transporte de AsIII en las raíces de *Arabidopsis* (Bienert y col., 2008; Xu y col., 2015b). Además, estudios fisiológicos han demostrado el papel principal de los canales fosfato, que están altamente regulados en las plantas, para la absorción de AsV por las raíces (Finnegan y Chen, 2012; Souri y col., 2017). Se ha demostrado que la modulación de la actividad de los transportadores de alta afinidad de fosfato es una estrategia eficaz para la tolerancia a arsénico, como el transportador PHT1 de *Arabidopsis*, implicado en la absorción de arsénico, y el factor de transcripción WRKY6, que regula la expresión del gen transportador de arseniato / fosfato, restringiendo la activación del transposón inducida por el arsenato (Sánchez-Bermejo y col., 2014; Catarecha y col., 2007; Castrillo y col., 2013). Otra familia de proteínas implicadas en la entrada de metales en plantas son los transportadores NRAMP (proteínas de macrófagos asociada a la resistencia natural), que fueron identificadas por primera vez en bacterias (Vidal y col., 1995) y son transportadores de iones metálicos de amplio espectro (Thomine y col., 2003; Lanquar y col., 2005), de los que se habla más ampliamente en el apartado 1.4.1. En *Arabidopsis thaliana* se han identificado varias familias de transportadores de Cu, como los transportadores COPT y la familia de transportadores YSL (con forma de franja amarilla), que se han descrito como transportadores de metales, conjugados con nicotianamina (Curie y col., 2009).

La mayoría de los transportadores implicados en la translocación de Mn tienen una amplia especificidad para varios cationes divalentes incluyendo Fe, Zn, Cu, Cd, Ca, Co y Ni e incluyen NRAMP, YSL, ZIP, CAX (intercambiador de cationes), CDF / MTP (facilitador de difusión catiónica / proteína de tolerancia metálica), ATPasas de tipo P y VIT (transportador de hierro vacuolar; Socha y Guerinot, 2014). Los transportadores más

destacados, implicados tanto en la captación como en la translocación y los metales principales que transportan, se presentan en la Figura 1.3.

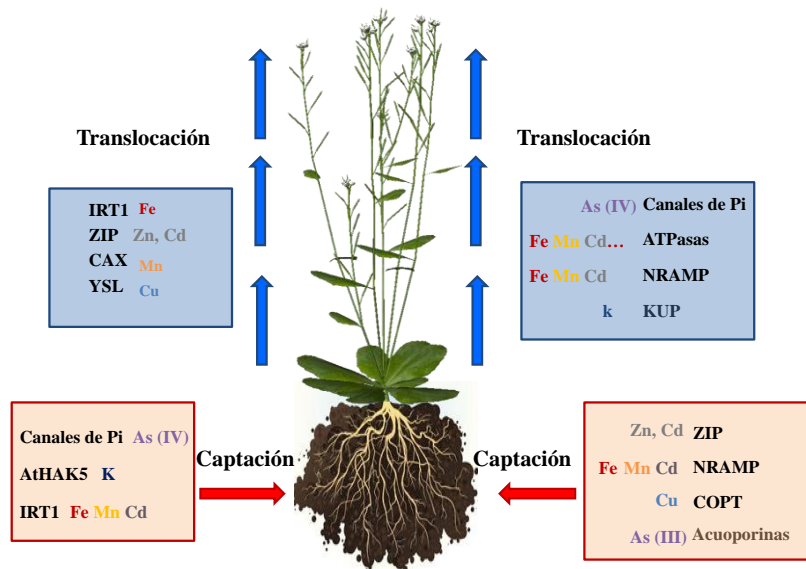


Figura 1.3. Familia de transportadores implicados en la entrada y translocación de metales en plantas.

Una vez en la célula, los metales pesados se pueden unir a donadores de N y S, de grupos funcionales de macromoléculas y ligandos de bajo peso molecular que están presentes de forma constitutiva o bien se sintetizan en respuesta a los metales. Estos complejos pueden ser transportados a vacuolas u otros orgánulos celulares (Frausto Da Silva y Williams, 2001). Una vez en la raíz, los metales pueden pasar al xilema a través del apoplasto y/o simplasto formando complejos. Algunos metales pueden quedar retenidos en la raíz y otros pasan en mayor o menor medida a tallos, hojas, frutos y semillas en orden decreciente (Blum, 1997). La eficiente translocación del metal al tallo requiere un paso radial por el simplasto, una carga activa en el xilema y la disponibilidad de ligandos adecuados en el mismo (Clemens, 2006). También se ha estudiado la implicación indirecta de las fitoquelatinas en el transporte de cadmio de la raíz al tallo (Gong y col., 2003) y del tallo a la raíz (Chen, 2006). El paso de metales desde el citosol de células de la raíz a los haces vasculares requiere un transporte de los iones metálicos y/o la unión de los mismos a ligandos con los que atraviesan la membrana (Axelsen y Palmgren, 2001; Frausto Da Silva y Williams, 2001). Un buen candidato para este transporte es la superfamilia de las ATPasas de tipo P, que desempeña la función de transporte de una amplia gama de cationes a través de las membranas celulares. Las ATPasas de metales pesados poseen ocho dominios transmembrana con un gran bucle

citoplásmico (Mills y col., 2012; Axelsen y Palmgren, 2001). Existen 8 ATPasas de metales pesados, 6 Nramps y 15 ZIPs presentes en Arabidopsis (Mills y col., 2012; Mäser y col., 2001). La superfamilia ABC es otra familia de proteínas transmembrana implicadas en una amplia gama de funciones de transporte mediante el uso de energía procedente de la hidrólisis de ATP (Kang y col., 2011; Theodoulou y Kerr, 2015). En plantas, se han identificado 13 subfamilias de esta superfamilia, siendo las proteínas de resistencia múltiple (MDR) las más numerosas (Kang y col., 2011). Otras subfamilias importantes de la superfamilia (ABC) son homólogos de proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos (MRP), homólogos de proteínas de membrana peroxisomal (PMPs), homólogos pleiotrópicos de resistencia a fármacos (PDR), etc.

1.2.2 Mecanismos de tolerancia

Las plantas han desarrollado una serie de mecanismos homeostáticos que sirven para controlar la entrada, acumulación, movimiento y detoxificación de los metales pesados (Clemens, 2006). Algunos mecanismos celulares de tolerancia de las plantas a un exceso de metales pesados son:

1. **La membrana plasmática:** Para evitar la acumulación tóxica de iones metálicos en el citoplasma, las plantas tienen mecanismos para alterar la permeabilidad de la membrana plasmática y evitar el transporte de estos iones a través de ella, reduciendo la captación o estimulando las bombas de flujo de metales que promueven la entrada al citosol (Navarro-Aviñó y col., 2007). Así, se han descrito transportadores que facilitan la entrada/salida a través de la membrana plasmática como ATPasas, NRAMPs, familia CDF o la familia ZIP (Navarro-Aviñó y col., 2007).
2. **Pared Celular:** La incorporación de los metales tóxicos en las paredes celulares es otro mecanismo distinto de tolerancia y acumulación de metal por parte de las plantas (Memon y Schröder, 2009). Debido a una interacción electrostática entre los metales y la pared celular, estos quedan retenidos por la estructura de la lignina y la celulosa (Navarro-Aviñó y col., 2007).
3. **Exudados de la raíz:** Entre los exudados de bajo peso molecular encontramos ácidos orgánicos, azúcares, fenoles, aminoácidos y gases como el etileno que pueden facilitar la disponibilidad de los metales. Así, se ha observado que los exudados favorecen la absorción de Fe en suelos deficientes en el mismo

(Navarro-Aviñó y col., 2007). La exudación de mucílagos que forman una capa externa a la raíz (mucigel), también favorece la formación de complejos de metales pesados como el Cd, Cu y Pb (Navarro-Aviñó y col., 2007). Los exudados de alto peso molecular son productos de lisados (autólisis de células epidérmicas y corticales), secreciones y mucílagos y también facilitan la disponibilidad de los metales (Navarro-Aviñó y col., 2007). Estos exudados pueden además mantener una diversa microflora en el suelo contribuyendo a la resistencia y capacidad fitorremediadora de metales pesados por parte de la planta o del sistema suelo-planta (Chen y col., 2006; Jing y col., 2007).

4. **Ácidos orgánicos y aminoácidos:** Los aminoácidos y ácidos orgánicos reaccionan con los iones metálicos a través de los átomos de S, N y O. Citrato, oxalato y malato están implicados en multitud de procesos incluidos en la tolerancia y transporte de metales a través del xilema y su secuestro en la vacuola (Rauser, 1999). El cadmio puede pasar al xilema a través del apoplasto y/o a través del simplasto formando complejos (Clemens y col., 2002).
5. **Formación de complejos:** Las raíces de las plantas secretan activamente compuestos de bajo peso molecular que pueden funcionar como quelantes de metales. De esta manera el metal queda estabilizado iónicamente, impidiendo la interacción química. La mayoría de los metales de transición recogidos en células están unidos a ligandos de alto o bajo peso molecular (Clemens, 2006). La planta también utiliza el mecanismo de formación de complejos en el interior de la célula para detoxificar los metales pesados. Los ligandos que utilizan son principalmente aminoácidos y ácidos orgánicos, como ácido cítrico y málico, la histidina, la cisteína, etc (Navarro-Aviñó y col., 2007), y dos clases de péptidos: fitoquelatinas y metalotioneínas (Clemens, 2006; Kühnlenz y col., 2016).

Las fitoquelatinas son ligandos de alta afinidad que tienen un papel fundamental en el secuestro de metales pesados presentes en el citoplasma de las células vegetales. Se conoce por ejemplo, que plantas que sobreexpresan la enzima fitoquelatina sintasa, muestran una mayor tolerancia frente al cadmio (Pomponi y col., 2006). Las metalotioneínas son pequeñas proteínas ricas en cisteína capaces de formar complejos con cationes mediante el grupo sulfhidrilo que poseen como radical. Si bien en plantas estas moléculas no son las principales responsables de la detoxificación de metales, como ocurre en células animales (Hamer, 1986), se ha visto que confieren tolerancia al Cd cuando se expresan en

levaduras. En algunas plantas se han encontrado genes que codifican metalotioneínas que están reguladas positivamente por exceso de metales (Cobbett y Goldsbrough, 2002; Rauser, 1999).

6. **Compartimentalización vacuolar:** El transporte al interior de la vacuola y la acumulación de complejos fitoquelatina-metal en la vacuola es una manera de reducir la concentración de metales tóxicos en el citoplasma involucrando diferentes sistemas de transporte (Navarro-Aviñó y col., 2007). Existen otras vías de secuestro del metal en la vacuola como es el antiporte metal pesado/protones (Clemens, 2006). La compartimentalización vacuolar del Cd^{2+} mediante fitoquelatinas está muy estudiada, se ha demostrado en células de levadura que el Cd entra en la vacuola unido a fitoquelatinas utilizando los canales tipo ABC (Ortiz y col., 1995). Otro posible transportador de Cd^{2+} a la vacuola es un cotransportador de $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^+$ (Salt y Wagner; 1993). Los transportadores de cationes CAX, implicados en el transporte de calcio a la vacuola, también pueden transportar otros metales como cadmio (Park y col., 2005).
7. **Biotransformación:** Son rutas metabólicas por medio de las cuales los tejidos incrementan la polaridad de un tóxico, por lo que aumenta la difusibilidad del mismo y por tanto puede incrementar la velocidad de excreción del compuesto (Navarro-Aviñó y col., 2007).
8. **Hipertolerancia e Hiperacumulación:** Algunas plantas son capaces de crecer en suelos con alta concentración de metales pesados como Zn, Cu, Ni, Cd o Pb (Schat, 1999). Se han descrito más de 400 especies de plantas que se sabe que no solo toleran sino que hiperacumulan uno o más de estos metales (Baker y Brooks, 1989). El análisis genético en diversas plantas hipertolerantes o hiperacumuladoras demostró que son caracteres independientes (Bert y col, 2003), por ello las plantas hiperacumuladoras han de tener mecanismos de absorción y de tolerancia para poder resistir los elevados niveles de metales acumulados en sus tejidos. La hiperacumulación es un proceso activo que parece estar implicado en la protección de la planta frente a patógenos y herbívoros, confiriéndole una ventaja adaptativa que aún no está completamente estudiada (Behmer y col., 2005; Poschenrieder y col., 2006). Algunas plantas basan su resistencia en la restricción del transporte del metal a la parte aérea; otras, acumulan el metal en la parte aérea en una forma no tóxica para la planta. La exclusión de metales es más característica de especies sensibles/tolerantes a los

metales, mientras que la acumulación es más común en especies endémicas de suelos contaminados o metalíferos.

9. **Micorrizas:** Las plantas micorrizadas presentan una mayor tolerancia a los metales pesados (Göhre y Paszkowski, 2006), gracias a su capacidad para inmovilizar los metales en la raíz impidiendo que estos pasen a la parte aérea (Navarro-Aviñó y col., 2007). La primera barrera de la entrada del metal a la planta es la pared celular del hongo, que tiene una gran capacidad para adsorber cationes sobre su superficie. Sin embargo, se ha observado también una intensa actividad de translocación y absorción de metales pesados en algunas especies por efecto de las micorrizas, por lo que funcionan en ambos sentidos y por tanto podrían ser una alternativa para fitorremediación (Tamayo y col., 2014; Navarro-Aviñó y col., 2007).

1.2.3 Toxicidad de los metales pesados en planta

En plantas, algunos metales pesados y metaloides pueden ser tóxicos incluso a muy bajas concentraciones, siendo por esa razón elementos fitotóxicos (Corpas y col, 2010; Xiong y col., 2010; Rascio y Navari-Izzo, 2011). Así, podemos distinguir dos categorías de metales pesados: elementos esenciales requeridos para el normal crecimiento y el metabolismo como son Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni y Zn (micronutrientes); y elementos no esenciales ya que no tienen ningún papel fisiológico conocido como son Cd, Hg, Pb o As, potencialmente tóxicos aun cuando se encuentran en concentraciones bajas.

La toxicidad de los metales no esenciales es provocada por la similitud con otros que sí lo son, reemplazándolos en sus funciones debido a la afinidad por ligandos celulares como sulfhidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo. El resultado de estas uniones ligando-metal puede ser muy perjudicial para la célula, bien actuando sobre proteínas e inhibiendo su actividad o compitiendo con elementos esenciales del metabolismo produciendo efectos de deficiencia (Schiavon y col., 2012; Quig, 1998; Sharma y Dubey, 2005). La toxicidad por metales pesados también se debe en parte a un estrés oxidativo, como consecuencia de la mayor generación de especies de oxígeno reactivo (ROS) como se verá en el apartado 1.5.4. Los metales capaces de modificar su estado de oxidación como el hierro y el cobre pueden participar en las reacciones de Haber-Weiss y Fenton que resultan en la formación del radical hidroxilo (Ver apartado

1.5.4). Los metales que no experimentan cambios de óxido-reducción, como el cadmio y el plomo, no actúan directamente en la generación de ROS pero alteran el sistema de defensa antioxidante de la célula (Singh y col., 2015b).

Algunos síntomas que pueden observarse en plantas debido a la toxicidad por la exposición a Cd y otros metales pesados son: la disminución de la germinación de semillas y crecimiento de la plántula, la reducción de los pigmentos de clorofila, la perturbación en la apertura de los estomas, la conductividad hidráulica de la raíz, la alteración de la fotosíntesis, necrosis, pardeamiento y atrofiado de las raíces (Usharani y Vasudevan, 2014), la perturbación en el equilibrio hídrico, así como desequilibrios nutricionales (Sanità di Toppi y Gabbrielli, 1999; Poschenrieder y col., 1989; Sandalio y col., 2001).

Las plantas en general, son muy sensibles a la toxicidad del Cu, ya que la acumulación en sus tejidos puede producir alteraciones metabólicas y la inhibición del crecimiento (Fernandes y Henriques, 1991). La longitud de la raíz es un parámetro muy sensible al Cu, un defecto en la homeostasis de Cu afecta fuertemente a la elongación de la raíz de *Arabidopsis* (Sancenón y col., 2004; Andrés-Colás y col., 2006). Una de las principales causas de toxicidad del Cu, es el desplazamiento de otros iones esenciales de las metaloproteínas alterando su función biológica (Ochiai, 1995; Desideri y Falconi, 2003; Yang y col, 2006). Por otro lado, las mismas propiedades redox que hacen del Cu un elemento esencial en el metabolismo aerobio, lo convierten en un importante agente citotóxico por su alta capacidad de incrementar y acelerar la producción de radicales hidroxilo a través de las reacciones de tipo Fenton y Haber-Weiss (Singh y col., 2015b).

En cuanto al As, se sabe que el AsIII es más tóxico y móvil que el AsV (Kumar y col., 2015). Los síntomas que provoca el arseniato son la reducción de la elongación radicular (Meharg y Hartley-Whitaker, 2002; Vazquez Reina y col., 2005; Geng y col., 2006), la falta de ramificación radicular, clorosis en las hojas (Moreno-Jimenez y col., 2008), marchitamiento foliar, o el achaparramiento e incluso la necrosis en la parte aérea (Carbonell-Barrachina y col., 1998). En el caso del arseniato algunos autores han relacionado esta reducción con la disminución de la concentración de P provocada por altas dosis de As. El arseniato compite con el fosfato en las reacciones de fosforilación, por ejemplo en la síntesis de ATP, pudiendo formar ADP-As altamente inestable que altera el ciclo energético celular (Verbruggen y col., 2009). Sin embargo, la toxicidad de

AsIII se debe principalmente a su tendencia a reaccionar con grupos tiol (-SH) de enzimas y proteínas que contienen residuos de cisteína o cofactores de ditiol que alteran su estructura y función (Finnegan y Chen, 2012).

Los cromatos y dicromatos pueden ser absorbidos a través de las raíces y la superficie foliar de las plantas produciendo clorosis, disminución en la incorporación de Ca, K, P, Fe y Mn, una reducción del peso seco de las hojas, alteración del metabolismo de los carbohidratos y una disminución en la concentración de las clorofilas (Shanker y Pathmanabhan, 2004; Shanker y col., 2005; Nagarajan y Ganesh, 2015; Jun y col., 2009). Además, el Cr produce alteraciones en la germinación de semillas, reducción del crecimiento de raíces y hojas, que adquieren una coloración pardo-rojiza con la aparición de pequeñas manchas necróticas (Poschenrieder y col, 1993; Panda y Choudhury, 2005; Panda, 2007). A nivel celular el cromo causa modificaciones en la estructura de cloroplastos y de las membranas celulares (Bassi y col, 1990; Panda y Choudhury, 2005). A nivel metabólico afecta a enzimas antioxidantes provocando estrés oxidativo, graves daños celulares y alteraciones del metabolismo de carbohidratos (Panda y Choudhury, 2005; Panda, 2007; Choudhury y col., 2013; Eleftheriou y col., 2015).

1.3 Degradación de suelos

1.3.1 Contaminación derivada de la minería

Una de las actividades humanas que más metales pesados emite al medio ambiente es la minería. Debido a las actividades mineras, los suelos sufren un deterioro químico y físico que genera un elevado grado de degradación y la pérdida de sus funciones por lo que normalmente carecen de cubierta vegetal. Las actividades mineras producen un fuerte impacto ambiental debido a los procesos de extracción mineral, la trituración, molienda, clasificación, concentración y los procesos de extracción metalúrgica. En estas operaciones se producen residuos sólidos, líquidos y gaseosos que pueden acabar contaminando los suelos del entorno (Singh y col., 2015a). Los residuos líquidos se originan principalmente en determinadas etapas de los procesos de extracción metalúrgica, siendo el vertido directo de éstos la causa de contaminación de los suelos. Los residuos gaseosos se generan fundamentalmente en los procesos de extracción metalúrgica, incorporándose a los suelos vía deposición atmosférica (Singh y col., 2015a). Son partículas transportadas por el viento como resultado de excavaciones, voladuras, transporte de materiales, erosión eólica, polvo proveniente de los depósitos y

también emisiones gaseosas provenientes de la quema de combustibles. Los residuos sólidos se producen en todos los procesos involucrados en la actividad minera, y son la principal fuente de contaminación debido al gran volumen que de ellos se genera. Éstos incluyen las rocas estériles resultantes del proceso de extracción mineral, los distintos subproductos derivados del proceso de beneficio de minerales y las escorias producidas en la extracción metalúrgica. Estos residuos son depositados en escombreras y en balsas o presas, pudiendo tener lugar a partir de éstas la dispersión de los elementos tóxicos al entorno, ya sea por transporte mecánico de partículas minerales, o por lixiviación (“Environmental, Health y Safety Guidelines for Mining” <http://www.ifc.org/>). Cuando los escombros, lixiviados y materiales de desecho de la lixiviación se excavan y se exponen al oxígeno y al agua, se puede formar ácido si el hierro y materiales sulfurosos son abundantes. A su vez, el ácido puede por lixiviación disolver metales y otros contaminantes formando una solución ácida con alto contenido de sulfatos y rica en metales (incluyendo elevadas concentraciones de cadmio, cobre, plomo, zinc, arsénico, etc.). El lixiviado de compuestos tóxicos tales como el arsénico, selenio y otros metales puede ocurrir aun en ausencia de condiciones ácidas. Los compuestos de cianuro y nitrógeno (amonio, nitrato, nitrito) pueden también elevarse. Estas partículas minerales dispersas en los suelos sufren procesos de oxidación y otras reacciones de meteorización que dan lugar a la liberación de elementos tóxicos, provocando que éstos se encuentren en formas más móviles y biodisponibles (Alloway, 1995). La erosión de los suelos debido a la esorrentía superficial cargada de sedimentos causa la acumulación de capas gruesas de partículas finas de mineral y de sedimentos en las regiones inundables, también la alteración del hábitat acuático, así como la pérdida de la capacidad de almacenamiento en las aguas superficiales (Singh y col., 2015a). Los impactos producidos en las especies silvestres por la pérdida del hábitat se deben a la perturbación y redistribución de la superficie de terreno, así como la contaminación del agua, disminuyendo la calidad y disponibilidad de los recursos hídricos en la zona afectada para la vida de las especies acuáticas y la vida silvestre; y para el consumo humano (Salomons, 1995).

Las mejoras introducidas en la minería han ido disminuyendo paulatinamente el contenido de los elementos tóxicos en los residuos generados. Por otra parte, la adopción de medidas legislativas más estrictas sobre gestión de los residuos de las industrias extractivas (Directiva 2006/21/CE; Real Decreto 975/2009) ha supuesto un importante paso para el establecimiento de medidas para prevenir o reducir en la medida de lo posible

los efectos adversos que sobre el medio ambiente y la salud humana puedan producir los residuos resultantes de la actividad minera. No obstante, los emplazamientos mineros, sobre todo los históricos, continúan siendo uno de los principales focos de contaminación por elementos tóxicos; por ello, a la hora de planificar una regeneración de la vegetación hay que tener en cuenta el uso de especies compatibles con la presencia de metales pesados presentes en el suelo.

1.3.2 Suelos de las minas de Riotinto y Alquife

Los suelos que se han utilizado como modelo en este trabajo pertenecen a las zonas mineras de Riotinto (Huelva) y Alquife (Granada), situadas en la región de Andalucía (Figura 1.4). Estas áreas sufrieron una intensa actividad minera en los siglos XIX y XX. Las minas de Riotinto fueron el principal productor mundial de cobre y Alquife, hasta finales del siglo XX, contribuyó con el 40% del hierro extraído en España.

La acumulación de materiales de desecho, debido al desarrollo de la minería produce un importante impacto medioambiental. Así, Alquife y Riotinto, han sufrido una seria degradación y una pérdida de la cubierta vegetal.



Figura 1.4. Localización de los entornos mineros de Riotinto y Alquife.

Minas de Riotinto

El área minera de Riotinto está situada en las proximidades de la localidad de Nerva, provincia de Huelva (SO España), en el cinturón de piritas Ibérica (37 ° 42 '4.5 "N 6 ° 33' 35.1" W). Fue declarada como “Bien de interés Cultural” con la categoría de “Sitio Histórico” (Decreto 236/2005, de 25 de octubre). Estas minas estuvieron destinadas principalmente a la extracción de cobre y han sufrido una intensa minería ya desde el asentamiento de los Tartesos, hasta su máximo apogeo a finales del siglo XIX. Esta fuerte actividad minera ha generado numerosos residuos que han acidificado las aguas y el suelo (pH 5,35) y lo han enriquecido con metales pesados asociados a la explotación del cobre (Sevilla-Perea y col., 2010). En determinados puntos se han encontrado concentraciones de 50 µM de Cd, 100 µM de Cu y hasta 160 µM de Pb (Sevilla-Perea y col., 2010).

La región se caracteriza por un clima semi-árido (régimen de humedad xérico-árido con 564 mm de precipitación y temperaturas del suelo entre 14-26°C) y las precipitaciones se producen durante el otoño y el invierno con una media de 70 mm/mes; en primavera la media es de 25 mm/mes y en verano de 8 mm/mes. Además se caracteriza por un gran déficit de humedad del suelo (Instituto Nacional de Meteorología de España, 2002). Por lo tanto, hay poca agua disponible desde abril hasta octubre para los procesos de translocación de elementos traza.

En este entorno minero en el que la mayor parte de su superficie está desprovista de masa vegetal, podemos encontrar algunas especies silvestres que crecen esporádicamente en zonas localizadas, como *Erica andevalensis*, *E. australis*, *Nerium oleander* y sobretodo *Cistus ladanifer*, un arbusto de hoja perenne de la familia de las Cistáceas, de hojas aromáticas y pegajosas, en detrimento de casi cualquier otro tipo de vegetación (Chopin y Alloway, 2007). Estas especies parecen haberse adaptado a suelos contaminados presentando mecanismos de exclusión, tolerancia o acumulación (Chopin y Alloway, 2007).

Los suelos en Riotinto se clasifican como Entisoles (FAO / UNESCO, 1972). Son suelos poco desarrollados, inmaduros y poco profundos con un bajo contenido de materia orgánica (Buol y col., 1973; Tan, 1994). Son suelos ácidos (pH 5,35) y de composición franco arenosa. Las propiedades fisicoquímicas se describen en la Tabla 1.1. El contenido de algunos metales potencialmente peligrosos presentes en estas zonas mineras (arsénico, cadmio, cobre, plomo) excepto níquel y cromo, están por encima de las normativas

locales para las concentraciones totales (Peña y col., 2015) pudiendo inhibir el desarrollo vegetal y causando alteraciones en el medio ambiente. Los suelos de Riotinto presentan unas características, en especial pH ácido, que favorecen la movilidad de los metales, en particular de Cu y Pb, que se encuentra altamente disponible (IV Congreso ibérico de la ciencia y el suelo, Sevilla-Perea y col., 2010).

Minas de Alquife

Las minas de Alquife se encuentran en la provincia de Granada, concretamente en la comarca del Marquesado de Zenete (Andalucía oriental, SE de España). Esta zona fue declarada como “Bien de interés Cultural” con la categoría de “Lugar de interés industrial” (Resolución de 27 de julio de 2009, de la Dirección General de Bienes Culturales). Estas minas estaban destinadas principalmente a la extracción de hierro y hasta mediados del siglo XX su explotación fue subterránea; a partir de entonces se explotó a cielo abierto, hasta su clausura en 1996. Actualmente, se prevé la reapertura de estas minas en agosto de 2017, lo que supondría para Andalucía y Granada, la recuperación de uno de los yacimientos de hierro más importantes de Europa con una producción prevista de cuatro millones de toneladas de mineral al año (Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico. Consejería de Cultura. Junta de Andalucía). El yacimiento consta de óxidos e hidróxidos de Fe (fundamentalmente de goetita y hematita), estratos consolidados en los mármoles del Pérmico-Triásico. La minería generó grandes cantidades de residuos, que se acumularon durante muchos años dando lugar a una escombrera, que cubre más de 260 hectáreas y cuya altura varía de 60 a 90 m (Sevilla-Perea y col., 2010). En la escombrera, el suelo se clasifica como Spolic Tecnosol (Unión Internacional de Ciencias del Suelo, 2006).

La zona tiene un clima mediterráneo continental, con precipitación media anual baja (promedio de 357 mm), concentrada principalmente en otoño e invierno. Los veranos son extremadamente secos, con una temperatura máxima de 35°C y los inviernos son fríos, con frecuentes heladas y bajas temperaturas cercanas a 0°C en enero. El suelo de Alquife presenta un pH alcalino (8,0), con un bajo contenido de carbono orgánico, baja conductividad eléctrica y está ligeramente contaminado (Rodríguez-Liébaña y col., 2013; Peña y col., 2015). Las propiedades fisicoquímicas del suelo, de acuerdo con los métodos estándar se describen en la Tabla 1.1 (Sevilla-Perea y Mingorance, 2015; Rodríguez-Liébaña y col., 2014).

Tabla 1.1. Propiedades físico-químicas de los suelos de Alquife y Riotinto (Peña y col., 2015; Chopin y Alloway, 2007; Sevilla-Perea y Mingorance, 2015; Rodríguez-Liébana y col., 2014).

Composición	Concentración Alquife	Concentración Riotinto
pH	8,0	5.35
% Arcilla	8%	55%
% Limo	28%	-
% Arena	64%	14%
% Materia orgánica	<1%	1,40%
CIC	6-12 meq/100g	-
CaCO ₃ (g kg ⁻¹)	224	-
N total (g kg ⁻¹)	0,6	-
As(mg kg ⁻¹)	-	94
Cu(mg kg ⁻¹)	30-60	216
Pb(mg kg ⁻¹)	6-12	172
Cd(mg kg ⁻¹)	1-11	13
Cr(mg kg ⁻¹)	70-80	-
Ni(mg kg ⁻¹)	40-50	-
Mn(g kg ⁻¹)	10,3	569
Fe (g kg ⁻¹)	355	43,2

En el área de Alquife, el contenido de estos metales pesados es menor que en Riotinto, y su distribución espacial es más homogénea. En Alquife, el metal más biodisponible es el Cd, mientras que los otros metales están disponibles en cantidades inferiores al 2% del total. El contenido en materia orgánica es menor del 1%, la capacidad de intercambio iónico de 6-12 meq/100g, y el contenido en N y P es inferior al 0,01%. De acuerdo a los valores límite establecidos en España, solamente el Cd supera la concentración máxima establecida en algunos de los puntos del entorno de Alquife, por ello se puede considerar con un nivel de contaminación medio-severo, pero las características del suelo inducen la retención de los metales en la fase sólida del suelo reduciendo su movilidad (IV Congreso ibérico de la ciencia y el suelo, Sevilla-Perea y col., 2010).

1.3.3 Estrategias de fitorremediación

La creciente emisión al ambiente de sustancias contaminantes procedentes de las actividades industriales, mineras, agropecuarias, artesanales y domésticas representa una amenaza para los seres vivos, por lo que se han desarrollado una serie de métodos para enmendar el impacto causado. En general, los mecanismos involucrados en la retirada de contaminantes son de tres tipos: físicos (sedimentación, filtración, adsorción, volatilización), químicos (precipitación, hidrólisis, reacciones de óxido-reducción o fotoquímicas) y biológicos (resultado del metabolismo microbiano, del metabolismo de plantas o de procesos de bioabsorción). Los métodos convencionales suelen ser costosos

y pueden afectar de manera irreversible las propiedades del suelo, agua y su fauna (Padmavathiamma y Li, 2007). Debido a esto y al elevado coste y su limitada eficacia, se han desarrollado nuevas tecnologías dedicadas a remediar zonas contaminadas mediante el uso de plantas (fitorremediación) y microorganismos asociados (biorremediación).

La fitorremediación representa así, una alternativa sostenible y de bajo coste para la rehabilitación de ambientes afectados por contaminantes naturales y antropogénicos. (Raskin, 1996). Es una “tecnología verde” en la cual las plantas hiperacumuladoras son capaces de acumular al menos 100 µg/g (0.01% peso seco) de Cd y As; 1000 µg/g (0.1% peso seco) de Co, Cu, Cr, Ni y Pb; y 10 000 µg/g (1.0% peso seco) de Mn (Watanabe, 1997; Reeves y col., 1999; 2006; McGrath y col., 2001; Kamal y col., 2004; Yang y col., 2004; Padmavathiamma y Li, 2007).

Tecnologías de fitorremediación

Se han descrito distintas técnicas de fitorremediación agrupadas en distintas categorías: fitoextracción, fitoacumulación, fitoestabilización, fitodegradación, fitotransformación, rizofiltración, rizodegradación, fitovolatilización y fitorrestauración (Figura 1.5; Lim y col., 2016; Mosa y col., 2016).

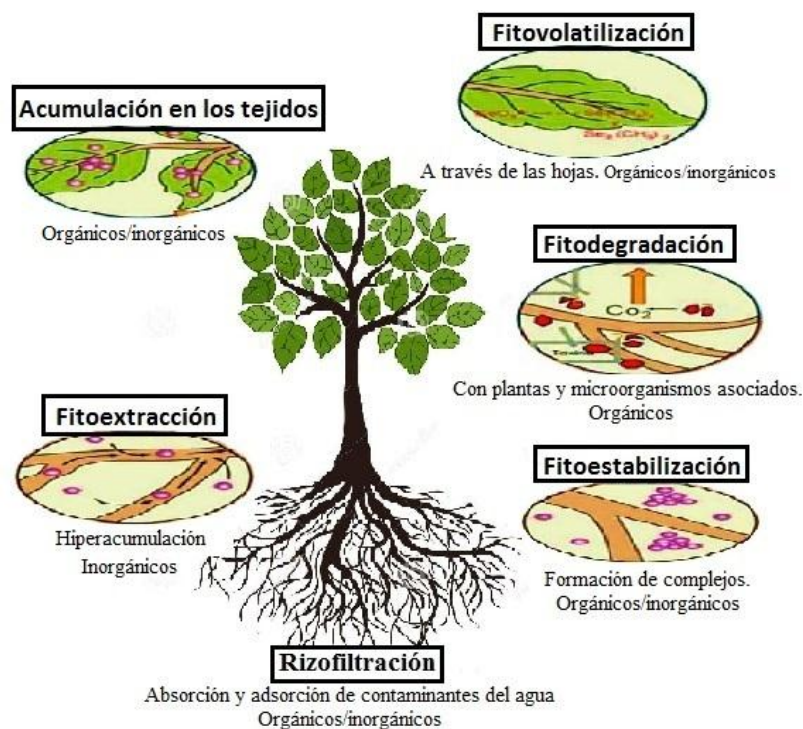


Figura 1.5. Mecanismos de fitorremediación. Modificado de Lim y col., 2016 y Mosa y col., 2016.

La estrategia para la elección de plantas de potencial interés en fitorremediación implica una mayor tolerancia a los metales, unida a una mayor capacidad para su acumulación en la parte aérea (Pilon-Smits, 2005; Peng y col., 2009). Además, la planta de elección debería producir una gran biomasa y tener una tasa rápida de crecimiento. Algunas de ellas, debido a su gran capacidad para acumular metales pesados, reciben el nombre de hiperacumuladoras pero carecen de la biomasa crítica necesaria para la fitorremediación y están restringidas a determinadas condiciones geoclimáticas (Hussain Wani y col., 2016). El desarrollo que se ha conseguido en la descontaminación de metales pesados por esta técnica es bastante significativo (Navarro-Aviñó y col., 2007). La identificación de las especies hiperacumuladoras y su potencial uso en la fitorremediación ha atraído recientemente un considerable interés en los mecanismos que regulan las adaptaciones de las plantas a altas concentraciones de As (Karimi y col., 2013; Danh y col., 2014). Existen varias especies de plantas capaces de hiperacumular y desintoxicar niveles elevados de As, la mayoría pertenecen a la familia Pteridaceae (Xie y col., 2009) como *Pteris vittata*, *Pteris criteca*, *Pteris longifolia*, *Pteris umbrosa*; otras son *Pitrogram macalomelanos* e *Isatis cappadocica* (Kumar y col., 2015). Dos de estas especies, *P. vittata* (Xie y col., 2009) e *I. cappadocica* (Karimi y col., 2009) se consideran modelos adecuados para descifrar los mecanismos implicados en la hiperacumulación y la tolerancia (Souri y col., 2017). Estas plantas hiperacumuladoras han desarrollado estrategias coordinadas para la captación, transporte y translocación a los brotes, como la quelación con GSH y fitoquelatinas, un eficiente transporte a vacuolas y además un eficiente sistema antioxidante regulado por ROS y NO (Karimi y col., 2009; Souri y col., 2017). El helecho *Pteris vittata* está equipado con sistemas eficientes para la captación AsV / AsIII, la translocación a los brotes y el secuestro en vacuolas (Xie y col., 2009; Danh y col., 2014). Por otro lado, la translocación de As a hojas en especies hiperacumuladoras es altamente eficiente y los niveles de eflujo son insignificantes (Su y col., 2008; Chen y col., 2016). La eficiente translocación en hiperacumuladoras podría probablemente ser debida a la reducción efectiva del arseniato a arsenito en las raíces, al alto transporte de arsenito de la raíz a la hoja, el secuestro en vacuolas radiculares; además de un mínimo eflujo de arsenito desde las raíces al medio exterior (Su y col., 2008; Indriolo y col., 2010; Zhao y col., 2009b; Karimi y col., 2009; Raab y col., 2005).

Especies hiperacumuladoras como *I. cappadocica* y *P. vittata* acumulan aproximadamente 60-80% de As en hojas (Karimi y col., 2013; Chen y col., 2016),

mientras que sólo el 5-10% del As total se encuentra en las hojas de especies no hiperacumuladoras como el helecho *P. tremula* (Caille y col., 2004), *Arabidopsis* (Isayenkov y Maathuis, 2008) y el arroz (Ma y col., 2008).

Las plantas con tendencia a acumular Cr (1.000 mg kg^{-1} ; 0,1% del peso seco) se han clasificado como hiperacumuladoras de Cr (Reeves, 2000). Dado que el Cr se acumula en gran medida en las raíces y se transloca poco a las partes aéreas, es difícil utilizar plantas para la eliminación de Cr de las áreas contaminadas. Sin embargo, se han estudiado varias especies hiperacumuladoras de Cr (V) como *Azolla Caroliniana* (Banach y col., 2012); *Brassica juncea* (Diwan y col.; 2008., 2010), *Eichhornia crassipes* (Zhu y col., 1999); *P. laevigata* (Buendía-González y col., 2010); *Pteris Vittata* (Su y col., 2008) o *Napolea cachenillifera* (Adki y col., 2013), y otras especies hiperacumuladoras de Cr (III) como *Leersia hexandra* (Poacea) (Zhang y col., 2007) o *Laguncularia racemosa* (Rocha, 2009).

También existen ejemplos de fitorremediación para contaminantes orgánicos como hidrocarburos, explosivos, tricloroetileno o también en combinación de éstos con metales pesados (Makris y col., 2007; Van Aken, 2008, 2009; Huang y col., 2011; Becerra-Castro y col., 2013; Li y col., 2014; Halaimi y col., 2014).

Otra de las ventajas de la fitorremediación es que se puede utilizar fácilmente en cualquier área que soporte el crecimiento de plantas. La adición de fertilizantes para el crecimiento de las plantas también ayuda a proporcionar la cantidad necesaria de nutrientes y materia orgánica, lo que podría ayudar a mejorar la calidad del suelo saneado. Además, las plantas también ayudan a estabilizar el suelo debido a la estructura extensa de sus raíces (Krämer, 2005; Zhao y McGrath, 2009a).

No obstante, la fitorremediación es un proceso lento y en gran parte sin efecto debido a la fitotoxicidad de los metales pesados en plantas (Dhankher y col., 2011) y sólo podría ser considerada como una solución a largo plazo. Es un proceso complicado con muchos parámetros externos, tales como el tipo y la concentración del contaminante (características del ión metálico), las propiedades del suelo, el contenido de agua, la concentración de nutrientes, el tipo y características de la planta (condiciones de crecimiento, el estado fisiológico y la edad celular), la resistencia de la planta a los efectos fitotóxicos y otros factores como las condiciones ambientales (pH, temperatura, fuerza iónica, tiempo de contacto, y concentración) que podrían afectar el éxito del proceso

(Chen y col., 2006). Otro de los problemas a tener en cuenta es la eliminación de las plantas contaminadas y la utilización de los subproductos resultantes. En este sentido, el uso de determinados árboles representa una ventaja por la ausencia de riesgo de entrada del metal a través de la cadena trófica y la posibilidad de reutilización de la madera con el consiguiente beneficio económico. El cultivo de chopo (*Populus sp.*) se ha considerado como una de las principales posibilidades en la eliminación de compuestos orgánicos y metales pesados del suelo, especialmente debido a su crecimiento rápido y capacidad de adaptación a suelos contaminados (Gallardo y col., 2006; Komárek y col., 2008; Van Aken, 2008; Hassinen y col., 2009).

1.3.4 La ingeniería genética para fines de fitorremediación

Un conocimiento más profundo en lo que respecta a los genes que puedan producir tolerancia e hiperacumulación en plantas para generar plantas que mejoren la entrada, transporte y secuestro de metales puede abrir nuevas puertas que incrementen la eficiencia de la fitorremediación y la conservación de suelos a través de la ingeniería genética (Cherian y Oliveira, 2005; Pilon-Smits, 2005). Se han realizado algunos estudios en plantas de *Arabidopsis* genéticamente modificadas que están adaptadas específicamente para la fitorremediación de Cd, Hg o bifenilos policlorados (PCB's) (Raskin, 1996; Bizily y col., 1999; Pilon-Smits y col., 2009; Eapen y col., 2007; Kotrba y col., 2009). Los mecanismos implicados en el desarrollo de esta tolerancia y/o hiperacumulación incluyen genes implicados en la homeostasis de metales, distintos tipos de transportadores (ZIP, tipo ABC, CDF, entre otros), la nicotianamina y fitoquelatinas o metalotioneínas (Clemens, 2006).

Varios estudios recientes que emplean tecnologías “ómicas”, incluyendo la genómica, transcriptómica, la proteómica y la metabolómica se han llevado a cabo para elucidar los determinantes genéticos y vías implicadas en la tolerancia de metales pesados y metaloides en las plantas. Actualmente se están empleando nuevos enfoques biotecnológicos para la fitorremediación de metales pesados y metaloides como el mercurio (Hg), cadmio (Cd), plomo (Pb), selenio (Se), cobre (Cu) y arsénico (As). Los principales enfoques son: la manipulación de genes transportadores y los sistemas de captación del metal; la inducción de ligandos de metales y la conversión de metales a formas menos tóxicas y volátiles (Kotrba y col., 2009).

La manipulación de genes de transportadores y de los sistemas de captación de metal

La mejora en la tolerancia y la acumulación de metales se ha logrado en diferentes especies de plantas mediante la manipulación de los transportadores de metales. Por ejemplo, plantas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan YCF1 (“Yeast Cadmium factor 1”) muestran una mayor tolerancia a Pb (II) y Cd (II) y una mayor acumulación de estos metales en las plantas (Song y col., 2003). YCF1 participa en el transporte de Cd a las vacuolas por conjugación con glutatión (GSH). Además, mutantes de T-DNA de los genes de *Arabidopsis AtCNGCI* que codifican una proteína homóloga a la proteína de tabaco de membrana plasmática *NtCBP4*, también muestran tolerancia al Pb²⁺. Estos resultados sugieren que *AtCNGCI* desempeña un papel importante en el transporte de Pb²⁺ (Zeng y col., 2015).

Por otro lado, se ha realizado el análisis de expresión de todo el genoma de raíz en arroz expuesto a diferentes metales pesados y metaloides como As (V), Cd, Cr (VI) y Pb, lo que ha permitido identificar varios genes únicos que se expresan de forma diferencial como los citocromos P450, las proteínas de choque térmico (HSPs) y los factores de transcripción NAC en respuesta a estrés abiótico (Dubey y col., 2014). Además, se han identificado genes que confieren tolerancia al Cu en *Paeonia ostii* utilizando métodos de secuenciación de RNA “RNAseq” (Wang y col., 2016).

Inducción de ligandos de metales

La manipulación genética para el aumento en la producción de agentes quelantes de metales puede mejorar la tolerancia y la acumulación de metales pesados en las plantas. Existen estudios sobre fitoquelatinas (PCs), metalotioneinas (MT) y glutatión (GSH) que actúan como ligandos de unión a un metal y pueden ser útiles para la desintoxicación o la acumulación de metales pesados. Por ejemplo, estudios en *A. thaliana* que sobreexpresan el gen de guisante (PsMTa) (*Pisum sativum*), mostraron aumento de la acumulación de Cu²⁺ en las raíces (Evans y col., 1992). Cuando el gen de *E. coli*, gshII (GS) que codifica la GSH sintetasa, se sobreexpresa en el citosol de la mostaza india (*Brassica juncea*), las plantas transgénicas mostraron una mayor tolerancia y acumulación de Cd respecto al tipo silvestre (WT) (Liang Zhu y col., 1999). La tolerancia al arsénico (As) en plantas también se puede mejorar mediante la modificación del contenido de GSH y PCs. Cuando dos genes bacterianos, la arsenato reductasa (arsC) y γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -ECS)

de *E. coli* se co-expresan en Arabidopsis, las plantas transgénicas cultivadas en presencia de 125 μM de arseniato de sodio acumulaban tres veces más el metaloide que las plantas WT (Dhankher y col., 2002). En otro estudio se observó que la sobreexpresión del gen que codifica la fitoquelatina sintasa1 (AtPCS1) en *A. thaliana* mostró una mayor tolerancia a la acumulación de arseniato (Li y col., 2004).

Recientemente, la secuenciación masiva de microRNAs se ha utilizado para identificar los genes expresados diferencialmente en raíz de rábano (*Raphanus sativus L.*) en respuesta al estrés por Cd y se ha sugerido que los genes que codifican las MT y PCs, así como otros genes pertenecientes a transportadores de tipo ABC y ZIP desempeñan un papel importante en la acumulación de Cd y su desintoxicación (Xie y col., 2015; Xu y col., 2015a).

La conversión de metales a formas menos tóxicas y volátiles

Estudios que pretenden desarrollar estrategias de fitorremediación para selenio y mercurio emplean la conversión de estos metales a formas menos tóxicas y volátiles. El selenio (Se) es un micronutriente esencial para muchos organismos; sin embargo, en exceso, es muy tóxico y es un contaminante del medio ambiente en todo el mundo (Zwolak y Zaporowska, 2012; Pilon-Smits, 2009 y LeDuc, 2009). Plantas de *A. thaliana* que sobreexpresan de forma constitutiva la ATP sulfurilasa (APS) que convierte el seleniato a selenito, mostraron una mayor tolerancia a seleniato transformándolo en formas orgánicas del selenio, mucho menos tóxicas, en comparación con las plantas WT que acumulaban mayores concentraciones de seleniato (Pilon-Smits y col., 2009).

El mercurio (Hg) es un contaminante global (Moreno y col., 2005) que se libera al medio ambiente en sus formas inorgánicas de mercurio metálico elemental Hg (0) o iónico Hg (II) (Ruiz y Daniell, 2009). Las estrategias utilizadas para la fitorremediación de mercurio han empleado dos genes bacterianos: MerA, que codifica una reductasa de iones de mercurio, y MerB, que codifica una liasa organomercuriada, para convertir el mercurio en formas menos tóxicas (Bizily y col., 2000; Dhankher y col., 2011). Plantas de Arabidopsis que expresan ambos genes, crecen 50 veces más que las plantas WT a altas concentraciones de metilmercurio y hasta 10 veces más que las plantas que expresan MerB únicamente (Bizily y col., 2000).

Perspectivas futuras

La fitorremediación a pesar de su enorme potencial para la rehabilitación de suelos contaminados, sedimentos y agua, no se ha comercializado y empleado a gran escala. Existen muchos estudios sobre captación, desintoxicación, y acumulación de metales, pero la mayoría de ellos han sido descritos a escala de laboratorio únicamente en plantas modelo y con un solo metal (Dhankher y col., 2011; Hossain y col., 2012; Ovečka y Takáč, 2014). Por otra parte, el progreso hacia la comercialización de la fitorremediación ha sido obstaculizado debido a una falta de comprensión completa de los procesos de absorción de metales del suelo por las raíces, la translocación raíz-hoja y la acumulación en los tejidos. Varios estudios recientes han tratado de desentrañar los mecanismos utilizando enfoques de transcriptómica y proteómica (Cyjetko y col., 2014). Además, el análisis metabolómico puede ayudar a identificar los metabolitos asociados con metales pesados, a las cuales se les pueden asignar sus vías metabólicas para identificar los genes candidatos relacionados (kumar A y col., 2014). Un enfoque interesante para mejorar nuestro conocimiento es desarrollar técnicas adecuadas para la obtención de imágenes mediante espectrometría con plasma láser (LA-ICP-MS) asistida por matriz de desorción ionización y la transformada de Fourier Ion ciclotrón Resonancia Espectrometría de Masas (FT-ICR-MS) (Jones y col., 2015). Sin embargo, se necesitan más estudios para permitir la visualización y la localización de la distribución de los metales pesados en los tejidos de la planta.

1.4 Identificación de genes involucrados en la tolerancia a metales pesados

1.4.1 Familia NRAMP

La familia de proteínas integrales de membrana NRAMP (“natural resistance-associated macrophage protein”), se identificó inicialmente en diferentes selecciones genéticas asociadas a la sensibilidad intracelular frente a bacterias patógenas (Cellier y col., 1995; Vidal y col., 1993). Constituyen una gran familia que está evolutivamente conservada en numerosos organismos, incluyendo bacterias, levaduras, algas, plantas y animales (Thomine y col., 2000). Los miembros de la familia NRAMP comparten una identidad notable de secuencias entre las proteínas de levadura (28%), de planta (40%), y de mosca (55%) con las proteínas de mamíferos; con un 46%, 58% y 73% de similitud, respectivamente (Nevo y Nelson, 2006). Así, un estudio “in silico” mostró la relación de los transportadores NRAMP entre genotipos animales y vegetales mediante el análisis de

homologías en el alineamiento de sus secuencias aminoacídicas (Pottier y col., 2015). Esta familia está definida por un núcleo hidrofóbico altamente conservado que codifica para 10 segmentos transmembrana lo cual, junto a otras características estructurales, sugería desde las primeras investigaciones que se trataba de proteínas transportadoras o canales (Cellier y col., 1995). Así, en la década de los 90 se empezó a describir su función como transportadores de metales en levadura y ratones (Supek y col., 1996; Gunshin y col., 1997). Actualmente se conoce que los NRAMPs tienen una función importante en la homeostasis de iones metálicos; especialmente en la captación de hierro en mamíferos, y de manganeso en levaduras y bacterias. Se han caracterizado en los mamíferos como transportadores de metales de transición divalentes implicados en el metabolismo del hierro y los mecanismos de resistencia del huésped a ciertos patógenos que implican el secuestro de Fe^{2+} y Mn^{2+} , que son cofactores de catalasas y superóxido dismutasas, tanto de procariotas como de eucariotas, no sólo para proteger al macrófago en contra de su propia generación de especies de oxígeno reactivo, sino además para reducir la disponibilidad de cationes al patógeno impidiendo la síntesis de sus propias enzimas protectoras (Kehres y col., 2000).

Las primeras secuencias descritas en planta se publicaron en 1997 (OsNRAMP1, OsNRAMP2, y OsNRAMP3; Belouchi y col., 1997), si bien no se describió su funcionalidad como transportadores hasta el año 2000 en el que se demostró la capacidad de AtNRAMP1, AtNRAMP3, AtNRAMP4 y OsNRAMP1 para transportar Fe (Thomine y col., 2000; Curie y col., 2000). Actualmente, se ha descrito que diferentes miembros de esta familia transportan un amplio rango de metales incluyendo Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} y Pb^{2+} (Tabla 1.2). Este transporte es activo y está acoplado al de protones (Thomine y col., 2000; Korshunova y col., 1999; Pence y col., 2000). El papel fisiológico de los NRAMP se reconoce principalmente para el hierro y en menor medida, para el manganeso (Cailliatte y col., 2009; Ishimaru y col., 2012). Así, los transportadores NRAMPs están implicados en la movilización de Fe y en menor medida de Mn desde la vacuola (Thomine y col., 2003) y también podrían movilizar Zn (Curie y col., 2000a; Maestri y col., 2010; van de Mortel y col., 2006). En estrés por Cd y concentraciones elevadas de iones metálicos intracelulares, las proteínas NRAMP transportan Cd para evitar la acumulación rápida de grandes cantidades de iones metálicos libres en el citosol que podrían dañar a la célula (Zha y col., 2016). De hecho, los genes que codifican los transportadores NRAMPs muestran en las plantas hiperacumuladoras una sobreexpresión

constitutiva (Klein y col., 2008; Roosens y col., 2008). Además, un estudio en tonoplasto de cebada confirmó que las proteínas pertenecientes a las familia NRAMP se encuentran sobre-expresadas en presencia de $20 \mu\text{M Cd}^{2+}$ (Schneider y col., 2009). Estudios en *Malus xiaojinensis* demostraron la función en la captación y transporte de hierro de MxNRAMP1 y su expresión se localizó principalmente en la membrana plasmática y vesículas, y en situaciones de estrés por deficiencia de hierro, también transportaba iones de hierro a orgánulos específicos (lisosoma y cloroplasto) a través de la formación de vesículas de endocitosis (Pan y col., 2015).

En *Arabidopsis thaliana* existen seis miembros NRAMP, y al menos tres de ellos, se han caracterizado funcionalmente. En otras especies como arroz, *Thlaspija* o *Medicago* también se ha caracterizado algún miembro de la familia cuyas características principales se describen en la Tabla 1.2 Así, en *Arabidopsis*, AtNRAMP1, puede transportar Fe, Mn y Cd en levadura, al igual que el transportador de membrana vacuolar AtNRAMP3, que transporta Cd y ha sido aislado también en la especie hiperacumuladora *T. caerulescens* (Maestri y col., 2010) y AtNRAMP4 también transporta Fe y Mn (Curie y col., 2000a; Thomine y col., 2000; Lanquar y col., 2005); mientras que AtNRAMP6 transporta Cd pero no Fe (Cailliatte y col., 2009). AtNRAMP2 sin embargo, no muestra capacidad para transportar Fe en levaduras y su función exacta es desconocida (Figura 1.6; Curie y col., 2000a).

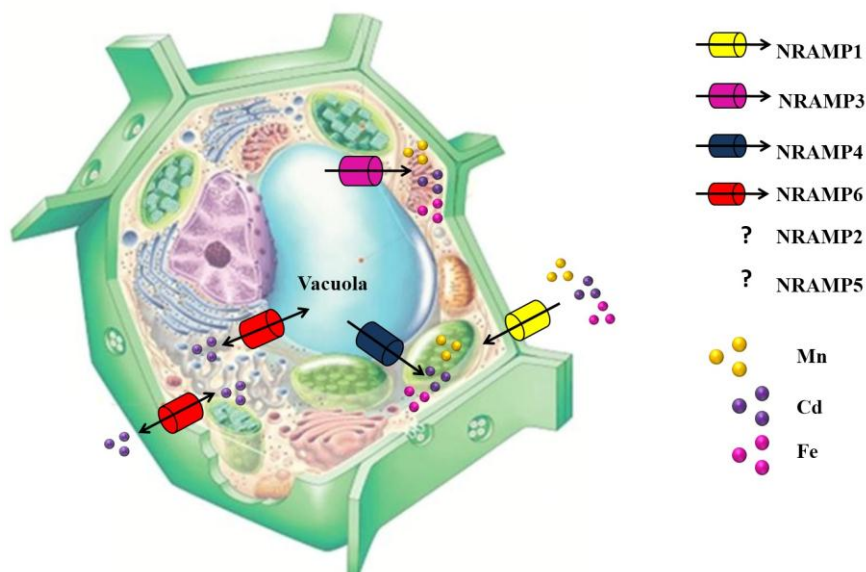


Figura 1.6. Localización subcelular de los transportadores NRAMP en *Arabidopsis thaliana* y los metales que transportan (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Principales características de los transportadores NRAMP en diferentes especies.
At: *Arabidopsis thaliana*; Mt: *Medicago truncatula*; Os: *Oryza sativa*; Tj: *Thlaspija ponicum*.

Transportador	Metales que transporta	Localización	Regulación	Referencias
AtNRAMP1	Fe, Mn (alta afinidad), Cd.	Endosomas Membrana plasmática Raíz	Activado por deficiencia de Fe y Mn, y presencia de Cd.	(Curie, y col, 2000); (Cailliatte y col, 2009;2010).
AtNRAMP2	No descrito	No descrito	No descrito	(Thomine, 2000)
AtNRAMP3	Fe, Mn, Zn	Vacuola	Inducido por deficiencia en Fe.	(Cailliatte y col., 2009); (Thomine y col., 2000); (Lanquar y col., 2005)
AtNRAMP4	Fe, Mn, Zn	Vacuola	Inducido por deficiencia en Fe.	(Cailliatte y col., 2009); (Thomine y col., 2000); (Lanquar y col., 2005)
AtNRAMP6	Cd	Membrana intracelular Semilla/embrión Tejido vascular de hojas jóvenes Flores/silicuas	Depende del pH	(Cailliatte y col., 2009).
MtNRAMP1	Fe	Membrana plasmática. Raíz y Nódulos	Inducido por nodulación.	(Tejada-Jiménez y col., 2015)
TjNRAMP4	Ni	No descrito	No descrito	(Cailliatte y col., 2009)
OsNRAMP5	Fe, Mn, Cd	Membrana plasmática Xilema, epidermis, exodermis, capas exteriores del cortex de la raíz.	Disminuye en presencia de Cd.	(Ishimaru y col., 2012); (Sasaki, 2012); (Yang y col., 2014).

La comparación de secuencias sugiere que hay dos clases de proteínas NRAMP en las plantas según Curie y col., (2000): uno en el que están AtNRAMP1 y OsNRAMP1 y 3; y otro en el que se incluyen AtNRAMP2-5 y OsNRAMP2 (Curie y col., 2000; Figura 1.7A). Similares estudios se han realizado comparando entre proteínas NRAMP de *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* y *Medicago truncatula* (Tejada-Jiménez y col 2015; Figura 1.7B).

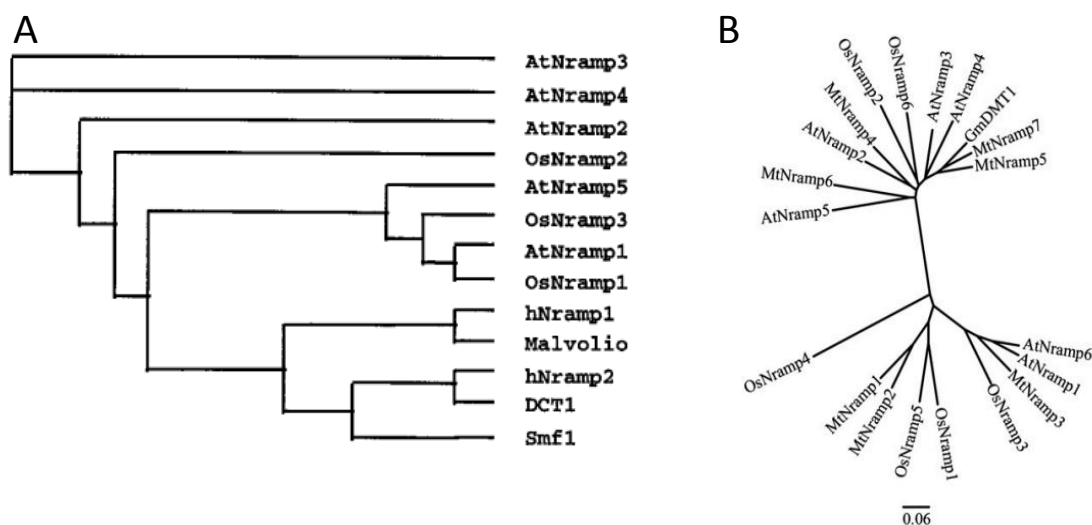


Figura 1.7. Árbol filogenético de proteínas NRAMP. Tomados de Curie y col., 2000 (A) y Tejada-Jiménez y col., 2015 (B).

Recientemente se ha realizado un análisis “in silico” en el que se han identificado 49 transportadores de Mn (NRAMP1) en 17 especies de plantas diferentes. En general, los ortólogos identificados en este estudio poseían características similares, indicando que los ortólogos de NRAMP1 en las diferentes especies vegetales podrían tener una estructura de secuencia conservada (Vatansever y col., 2016).

1.4.2 Familia de transportadores de K^+ , KT/KUP/HAK

El potasio es un elemento esencial para las células puesto que los niveles intracelulares de este catión regulan diversos parámetros fisiológicos. Para hacer frente a los requerimientos intracelulares de K^+ , los organismos han desarrollado diferentes sistemas de transporte. Así, han sido identificados dos tipos de transportadores de K^+ en bacterias, hongos y plantas, no presentes en células animales, denominados: TRK/KTR/HKT (“Transport of K^+ ” en hongos y bacterias, “ K^+ transporter” en bacterias y “High-affinity K^+ transporter” en plantas; Schachtman y Schroeder, 1994); y HAK/KUP/KT (“High-affinity K^+ uptake” en hongos y plantas, “ K^+ uptake” en bacterias y “ K^+ transporter” en plantas; Bañuelos y col., 1995). En plantas, además se han caracterizado varios canales de K^+ implicados tanto en la entrada como en la salida de este catión (Santa-María y col., 1997).

La familia de transportadores KT/KUP/HAK está involucrada en el transporte y translocación de K^+/H^+ y fue originalmente identificada en *Escherichia coli* como KUPs (“ K^+ uptake permease”; Schleyer y Bakker, 1993). Este transportador es esencial para la absorción del potasio por las células en condiciones de estrés como la hiper-osmolaridad a bajo pH (Trchounian y Kobayashi, 1999). Solo el 38% de especies bacterianas contienen este transportador, siendo en Arqueas aún más bajo con dos especies (<http://img.jgi.doe.gov>). Posteriormente, se identificaron genes homólogos a los transportadores HAK (high-affinity K^+) en el hongo *Schwanniomyces occidentalis* (Bañuelos y col., 1995). En plantas, los genes transportadores KT/KUP/HAK se han encontrado en diversos organismos que van desde las algas verdes a las angiospermas y se ha demostrado que desempeñan un papel clave en la fisiología vegetal como la adquisición de K^+ , la adaptación al estrés abiótico y los procesos de desarrollo (Figura 1.8; Grabov, 2007).

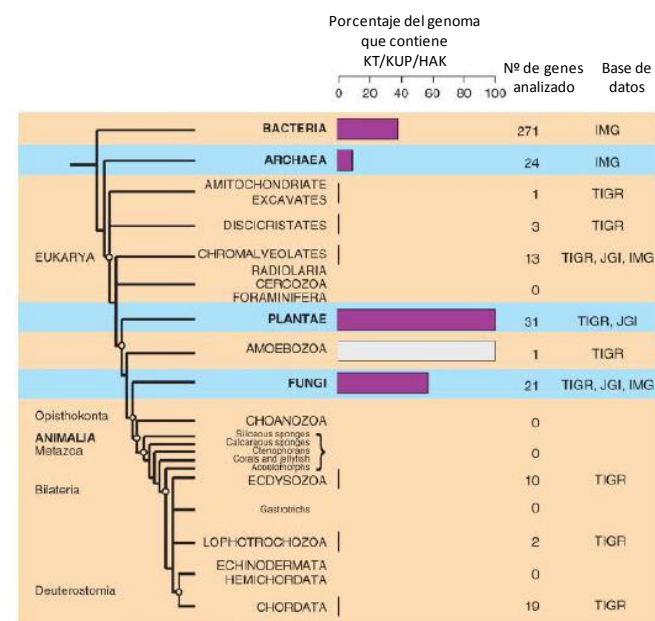


Figura 1.8. Distribución de los transportadores KT/KUP/HAK en los distintos reinos en los que se han descrito. Modificado de Grabov, (2007).

En *Arabidopsis thaliana* se identificaron como AtKT1, AtKT2, AtKT3 y AtKT4 (Quintero y Blatt, 1997). Posteriormente, los mismos transportadores fueron aislados y los renombraron como AtKUP1, AtKUP2, AtKUP3 y AtKUP4 (Fu y Luan, 1998; Kim y col., 1998). AtKUP1, idéntico a AtKT1, se caracterizó en bacterias y en suspensiones celulares de *A. thaliana* que sobreexpresaban AtKUP1 mostrándose como un transportador de K^+ de baja afinidad (Kim y col., 1998) y también KUP9 (Kobayashi y col., 2010). Posteriormente se estudió AtHAK5, cuya proteína mostró gran homología

con HvHAK1, implicado en el transporte de K^+ de alta afinidad que no discriminaba entre K^+ , Rb^+ y Cs^{2+} (Rubio y col., 2000; Alemán y col., 2014) y se expresa en la epidermis, córtex y en raíces con limitaciones de K^+ (Gierth y col., 2005). También se ha descrito que la expresión de AtHAK5 puede estar regulada por etileno y por especies de oxígeno reactivo (Jung y col., 2009; Schachtman y Schroeder, 1994).

Existen evidencias de que algunos miembros de la familia KT/HAK/ KUP de diferentes especies vegetales son candidatos como transportadores de K^+ de alta afinidad, tales como HvHAK1 en cebada (Santa-Maria, 1997), OsHAK1 en arroz (Banuelos y col., 2002) y CaHAK1 en pimiento (Martinez-Cordero y col., 2004). En *Arabidopsis*, KUP1 (Kim y col., 1998), KUP4 / TRH1 (Rigas y col., 2001) y HAK5 (Rubio y col., 2000) han sido identificados como transportadores de K^+ de alta afinidad.

El análisis filogenético de Martínez-Cordero y col., (2004) muestra la distribución de los diferentes miembros de la familia de transportadores KT/HAK/KUP y propone la existencia de 4 grupos como se aprecia en el árbol filogenético de la Figura 1.9. El grupo I incluye a los transportadores de K^+ de alta afinidad ya mencionados. El grupo II engloba a KT1/KUP1 (Fu y Luan, 1998; Kim y col., 1998; Quintero y Blatt, 1997) y a KT2/KUP2 de *A. thaliana* (Kim y col., 1998; Quintero y Blatt, 1997). El grupo III incluye secuencias genómicas de *A. thaliana* y el grupo IV una secuencia traducida de cDNA incompleto de arroz, que fue posteriormente completado, si bien, la función de los transportadores de estos dos últimos grupos no se conoce (Martinez-Cordero y col., 2004).

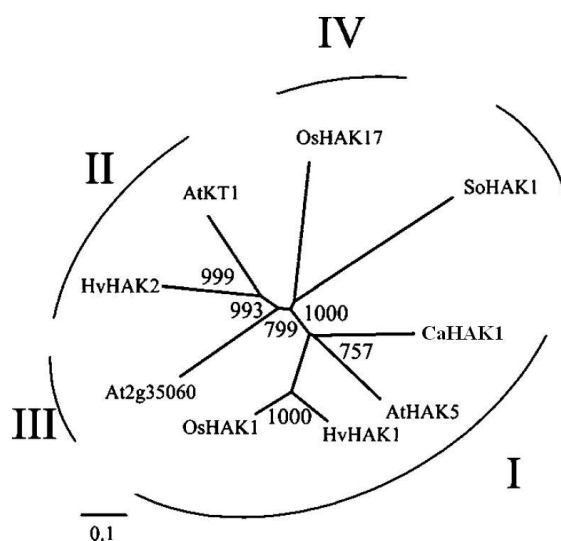


Figura 1.9. Árbol filogenético representativo de los transportadores de K^+ de la familia HAK. Se incluyen los transportadores de cebada, arroz, *A. thaliana*, pimiento y el hongo *S. occidentalis*. Los números romanos representan los cuatro grupos filogenéticos identificados para la familia. Tomado de Martínez-Cordero y col., (2004).

Estos transportadores están presentes en el genoma como familias multigénicas y, en *Arabidopsis*, existen 13 genes KT/KUP/HAK distribuidos en sus 5 cromosomas (Mäser y col., 2001). Estos genes están siempre presentes en plantas lo que explica la importancia de éstos en la adquisición de nutrientes y en la capacidad de las plantas para sobrevivir en ambientes pobres en potasio (Figura 1.10).

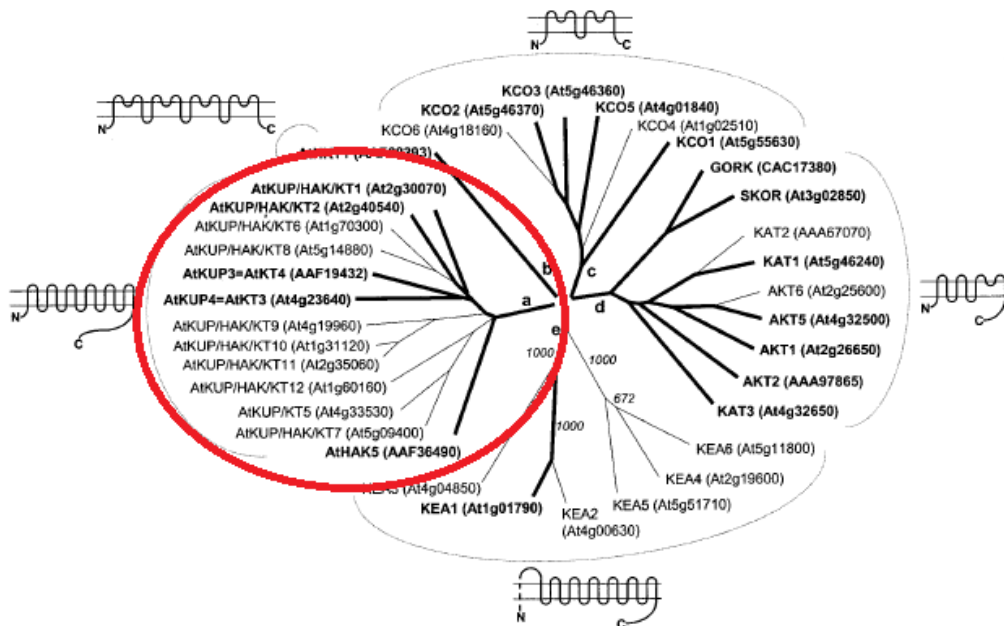


Figura 1.10. Transportadores de K⁺ en *Arabidopsis*. Adaptación de Mäser y col., (2001).

Estudios recientes sugieren que los transportadores KT/HAK/KUP están involucrados en gran medida en la homeostasis y regulación osmótica por K⁺, ya que estos transportadores participan en el transporte de iones en la membrana plasmática y en la vacuola (Senn y col., 2001). La localización y función de cada uno de ellos se especifica en la Tabla 1.3.

A pesar de todos los estudios realizados, tan solo en algunos transportadores AtKT/HAK/KUPs se ha demostrado que realmente transporten K⁺ como son: AtKT/KUP1 (Fu y Luan, 1998) y AtKT/KUP2 en *E.coli* (Kim y col., 1998; Elumalai y col., 2002), AtKT3/KUP4 en levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) (Rigas y col., 2001; Rubio y col., 2000) y KUP7, que se ha identificado como un transportador de K⁺ de alta afinidad en *Escherichia coli* (Han y col., 2016). En todos ellos se ha visto que aun siendo deficientes en la absorción de potasio son capaces de suplir esa carencia. El papel de

KUP2/6/8 ha sido estudiado respecto al flujo de K^+ en la raíz de *Arabidopsis* (Osakabe y col., 2013) y desempeña funciones importantes en la captación de K^+ y el transporte de la raíz hacia el xilema en *Arabidopsis*, especialmente en condiciones de K^+ ilimitada; sin embargo se ha demostrado que también puede mediar el transporte de K^+ de baja afinidad en levaduras (Ahn y col., 2004).

La expresión de la familia KUP en *Arabidopsis*, se muestra en la Figura 1.11. Así, AtKT/KUP5 y AtKT/KUP12 se expresan específicamente en los pelos radicales, mientras que todos los demás se encuentran más homogéneamente distribuidos por la planta (Ahn y col., 2004). Además, la expresión de 10 de los 13 genes AtKT/KUP en pelos radicales demuestra el papel tan importante que pueden desempeñar en la absorción de potasio (Figura 1.11).

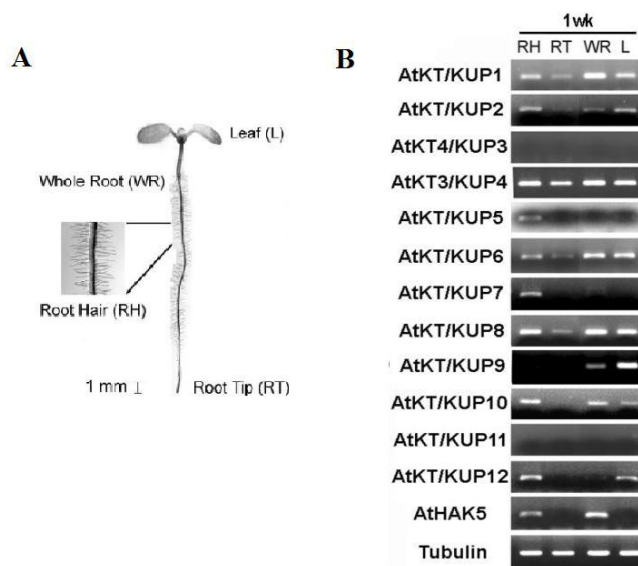


Figura 1.11. Patrones de expresión de los genes KT/KUP en plántulas de *Arabidopsis thaliana* de una semana.

El diagrama A muestra las regiones muestreadas de la raíz. La figura B muestra los resultados de RT-PCR en pelos radicales (RH), ápice de la raíz (RT), toda la raíz (WR) y hojas (L). Adaptado de Ahn y col., (2004).

Algunas proteínas HAK/KUP/KT pueden ser consideradas como candidatas interesantes para futuras estrategias de mejora de cultivos, por ejemplo GhKT1 específicamente inducido durante el alargamiento de la fibra de algodón, (Ruan y col., 2001); VvKUP1/VvHAK1-a, altamente expresado durante la primera etapa de desarrollo del fruto (Nieves-Cordones y col., 2016) y OsHAK1, que es crítico para el rendimiento de grano de arroz, (Chen y col., 2015). Futuras investigaciones sobre esta familia de transportadores contribuirán a entender cómo podemos diseñar plantas para la producción de alimentos y de biomasa renovable (Nieves-Cordones y col., 2016).

Tabla 1.3. Características y localización de las proteínas KUP de *Arabidopsis thaliana*.

AtKUP	Metal que transporta	Localización	Función	Expresión	Referencias
AtKUP1	K ⁺ Alta/baja afinidad, Rb baja afinidad	Vacuola/Membrana plasmática	Procesos de desarrollo. Papel fisiológico sin atribuir	Pelo radical/ápice raíz/raíz completa/hoja	Quintero y Blatt, 1997; Fu y Luan, 1998; Kim y col., 1998
AtKUP2	K ⁺ Alta afinidad	Vacuola (Tonoplasto)	Regulan el crecimiento de plantas y tamaño celular. Flujo de K ⁺ en la raíz	Pelo radical/raíz completa/hoja	Osakabe y col., 2013; Senn y col., 2001
AtKUP3	K ⁺ Alta afinidad	Vacuola/Membrana plasmática	Procesos de desarrollo		Osakabe y col., 2013
AtKUP4	K ⁺ Alta afinidad	Vacuola/Membrana plasmática	Procesos de desarrollo. Establece gradientes de auxina para la formación del pelo radical	Pelo radical/ápice raíz/raíz completa/hoja	Rigas y col., 2001, 2013; Vicente-Agullo y col., 2004
AtKUP5	K ⁺ Alta afinidad	Tonoplasto	Procesos de desarrollo	Pelo radical	Osakabe y col., 2013
AtKUP6	K ⁺ Alta afinidad	Vacuola/Membrana plasmática	Adaptación del estrés osmótico. Flujo de K ⁺ en la raíz. Regulan el crecimiento de plantas y el tamaño celular	Pelo radical/raíz completa/hoja	Osakabe y col., 2013
AtKUP7	K ⁺ Alta afinidad	Membrana plasmática	Procesos de desarrollo. Transporte en la raíz hacia el xilema	Pelo radical	Osakabe y col., 2013
AtKUP8	K ⁺ Alta afinidad	Vacuola/Membrana plasmática	Regulan el crecimiento de las plantas y el tamaño celular	Pelo radical/ápice raíz/raíz completa/hoja	Osakabe y col., 2013
AtKUP9	K ⁺ Baja afinidad	Vacuola/Membrana plasmática	Procesos de desarrollo. Flujo de K ⁺ en la raíz	Raíz completa/hoja	Nieves-Cordones y col., 2007; Rubio y col., 2008; Aleman y col., 2009
AtKUP10	K ⁺ Alta afinidad	Vacuola/Membrana plasmática	Procesos de desarrollo	Pelo radical/raíz completa/hoja	Nieves-Cordones y col., 2007; Rubio y col., 2008; Aleman y col., 2009
AtKUP11	K ⁺ Alta afinidad	Vacuola/Membrana plasmática	Procesos de desarrollo		Nieves-Cordones y col., 2007; Rubio y col., 2008; Aleman y col., 2009
AtKUP12	K ⁺ Alta afinidad	Vacuola/Membrana plasmática	Procesos de desarrollo	Pelo radical/raíz completa	Nieves-Cordones y col., 2007; Rubio y col., 2008; Aleman y col., 2009
AtHAK5	K ⁺ Alta afinidad. Dicotiledoneas	Membrana plasmática	Transporte de K ⁺ a parte aérea cuando hay deficiencia de K o estrés salino	Pelo radical/raíz completa	Nieves-Cordones y col., 2007; Rubio y col., 2008; Aleman y col., 2009

1.4.3 Familia de ATPasas tipo P₄ de Arabidopsis (ALA)

Las ATPasas de tipo P son una familia grande de bombas de membrana que impulsan la translocación de sustratos dependiente de ATP, fosforilandose durante el proceso de transporte y cuya función es mantener el equilibrio homeostático. Se denominan ATPasas de tipo P porque durante su ciclo catalítico el ATP cede su fosfato terminal a un resto de aspártico, formándose un intermediario fosforilado de la enzima. En todas ellas hay un polipéptido responsable, tanto del transporte como de la hidrólisis del ATP y de la fosforilación específica; en el caso de eucariotas ese polipéptido tiene un dominio transmembrana formado por 10 hélices, y un dominio citosólico en donde se encuentra el sitio de hidrólisis de ATP y de fosforilación. Normalmente presentan otras subunidades, que pueden ser o no imprescindibles para el transporte y cuya función no se conoce en profundidad (estructura del tipo $\alpha\beta$). Otros miembros de la superfamilia ATPasa de tipo P, codifican bombas que translocan H^+ , Ca^{2+} , Na^+/K^+ y metales pesados (P_1) a través de las membranas celulares y han sido anteriormente caracterizados (Axelsen y Palmgren, 1998). La estructura de las ATPasas P_2 (Ca^{2+}) y P_3 (H^+) es muy similar a P_4 y pueden aportar una visión sobre el mecanismo de translocación de lípidos, que implica hidrolizar el ATP y fosforilar el aspartato, causando un cambio conformacional en la bomba que conduce el transporte de iones o la traslocación de fosfolípidos (Palmgren y Nissen, 2011; Tanaka y col., 2011).

Aunque existen cinco subgrupos de la familia ATPasa de tipo P (Axelsen y Palmgren, 1998, 2001; Palmgren y Axelsen, 1998; Baxter y col., 2003), el cuarto subgrupo, o ATPasa de tipo P_4 , sólo se ha observado en eucariotas (Palmgren y Axelsen, 1998). Las ATPasas de tipo P_4 codifican una familia compleja en organismos eucariotas (Palmgren y Harper, 1999); sin embargo, las ATPasas P_4 vegetales permanecen en gran parte sin caracterizar tanto en sus funciones fisiológicas, como en los mecanismos por los cuales translocan fosfolípidos a través de las membranas. En Arabidopsis, las ATPasas pertenecen a una familia de 45 genes; divididos en cinco subfamilias, que se agrupan según los iones que transportan (Axelsen y Palmgren, 1998).

Al igual que otras ATPasas de tipo P, las ATPasas P_4 se encuentran en estructuras de membrana y tienen diez dominios transmembrana (TM) y un bucle de ATPasa entre los dominios TM 4 y 5, que también contiene un sitio de fosforilación ATPasa conservado

(Tanaka y col., 2011). Las ATPasas P₄ requieren una subunidad beta para funcionar (Saito y col., 2004; Poulsen y col., 2008; Lopez-Marques y col., 2015). Las ATPasas P₄ han sido identificadas en varios organismos incluyendo humanos, *Drosophila Melanogaster*, *Leishmania donovani*, *Caenorhabditis elegans*, *Cyptococcus Neoformans* y *A. thaliana* (Tanaka y col., 2011), pero se han estudiado más en profundidad en levaduras. Se han asociado con la formación de asimetría de membrana y se supone que causan la formación de vesículas (Pomorski y Menon, 2006).

El genoma de *A. thaliana* contiene doce ATPasas P₄ conocidas como aminofosfolipido-ATPasa (ALA), que van desde ALA1 a ALA12 (Baxter y col., 2003; Tanaka y col., 2011). Hasta la fecha, sólo tres de ellos han sido funcionalmente caracterizados y ALA3 es el más estudiado. Un mutante con una pérdida de función en ALA3 presenta una deformación dependiente de la temperatura en la raíz, el polen, enanismo en la roseta y deformidades en los tricomas (Poulsen y col., 2008; Zhang y Oppenheimer, 2009; McDowell y col., 2013). Cuando se expresan con una subunidad beta, se ha demostrado que ALA3 y ALA2 participan en el transporte de vesículas. ALA2 emplea como sustrato la fosfatidilserina (PS) mientras que ALA3 puede absorber fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC) y, en menor grado, PS (Poulsen y col., 2008; Lopez-Marques y col., 2014; 2015). Otros estudios indican que ALA6 y ALA7 funcionan directa o indirectamente en los cambios de la distribución y abundancia de lípidos en el polen, siendo críticos en la fisiología del polen en condiciones normales y de estrés por temperatura (McDowell y col., 2015).

ALA1 ha sido parcialmente caracterizado y se sabe que desempeña un papel indirecto en la tolerancia al frío (Gomès y col., 2000), sin embargo, el mecanismo involucrado sigue siendo desconocido. Recientemente se ha descubierto una subunidad beta necesaria para el correcto funcionamiento de ALA1 (López-Marqués y col., 2012). Estas subunidades beta en *A. thaliana*, pertenecientes a la familia CDC50 son conocidas como subunidades que interactúan con ALA (ALIS) que van desde ALIS1 a ALIS5 y fueron identificadas por primera vez en levadura. Estudios en levadura y *A. thaliana* han demostrado que las proteínas CDC50 son necesarias para el tráfico de fosfolípidos desde el retículo endoplasmático. Existe un número mayor de proteínas ATPasa P₄, que proteínas CDC50 en todos los organismos en los que ambos existen, poniendo en cuestión la especificidad de las interacciones ATPasa P₄- CDC50 (Lopez-Marques y col., 2015).

1.4.4 Familia de metalochaperonas (HPP)

Las metalochaperonas (HPP) quelan los iones metálicos que entran en la célula evitando la liberación de metales en el citosol y protegiendo a la célula frente a su toxicidad y también regulan el suministro de iones esenciales para proteínas que los necesitan como componentes estructurales o como cofactores enzimáticos (de Abreu-Neto y col., 2013; Robinson y Winge, 2010). En algas, hongos y animales, existe un pequeño número de proteínas tipo metalochaperona. Sin embargo, en las plantas, este grupo se ha diversificado en una gran familia que comprende dos tipos de proteínas: las proteínas vegetales asociadas a metales pesados (HPPs) y las proteínas vegetales isopreniladas asociadas a metales pesados (HIPPs). Sólo unos pocos HIPPs han sido estudiados hasta el momento, y los estudios más detallados se centran en *Arabidopsis*. En esta especie encontramos una gran familia de 67 proteínas con 45 HIPPs y 22 HPPs identificadas, incluyendo los HPPs: AtATX1, AtCCH con una función predominante en el suministro de Cu y AtCCS con un dominio terminal carboxilo adicional (CTD) (Barth y col., 2009; Tehseen y col., 2010; Puig y col., 2007; Mira y col., 2001). Las HIPP se caracterizan por la presencia de uno o dos dominios asociados a metales pesados (HMA) y un motivo de isoprenilación. Además, la mayoría de HIPPs presentan una región rica en glicina entre estos elementos (Barth y col., 2009; Suzuki y col., 2002b).

Los HIPPs se describen de dos maneras diferentes: en la homeostasis de metales pesados y mecanismos de desintoxicación, especialmente la tolerancia al cadmio, como sugieren algunos estudios sobre el papel de desintoxicación de este metal (Tehseen y col., 2010; Suzuki y col., 2002a; Gao y col., 2009; Chandran y col., 2008) y como elementos reguladores en la respuesta de la transcripción al frío y la sequía (Barth y col., 2004, 2009).

El estudio comparativo de las secuencias de las metalochaperonas ha permitido dividir estas proteínas en siete grupos principales (I-VII) (Figura 1.12). El grupo IV destaca por la presencia de un residuo de aspartato conservado antes del motivo de unión metálica CysXXCys, análogo al motivo de unión a Zn en *E. coli*, ZntA (Tehseen y col., 2010). HIPP20, HIPP21, HIPP22, HIPP26 y HIPP27, pertenecientes al grupo IV, se han estudiado con más detalle. Poco se sabe sobre los otros componentes de la familia, incluyendo HPP9 que forma parte del grupo VII de las metalochaperonas. Curiosamente,

los siete miembros del grupo VII se encuentran dentro de un tándem en el cromosoma 5 (Figura 1.13; Tehseen y col., 2010).

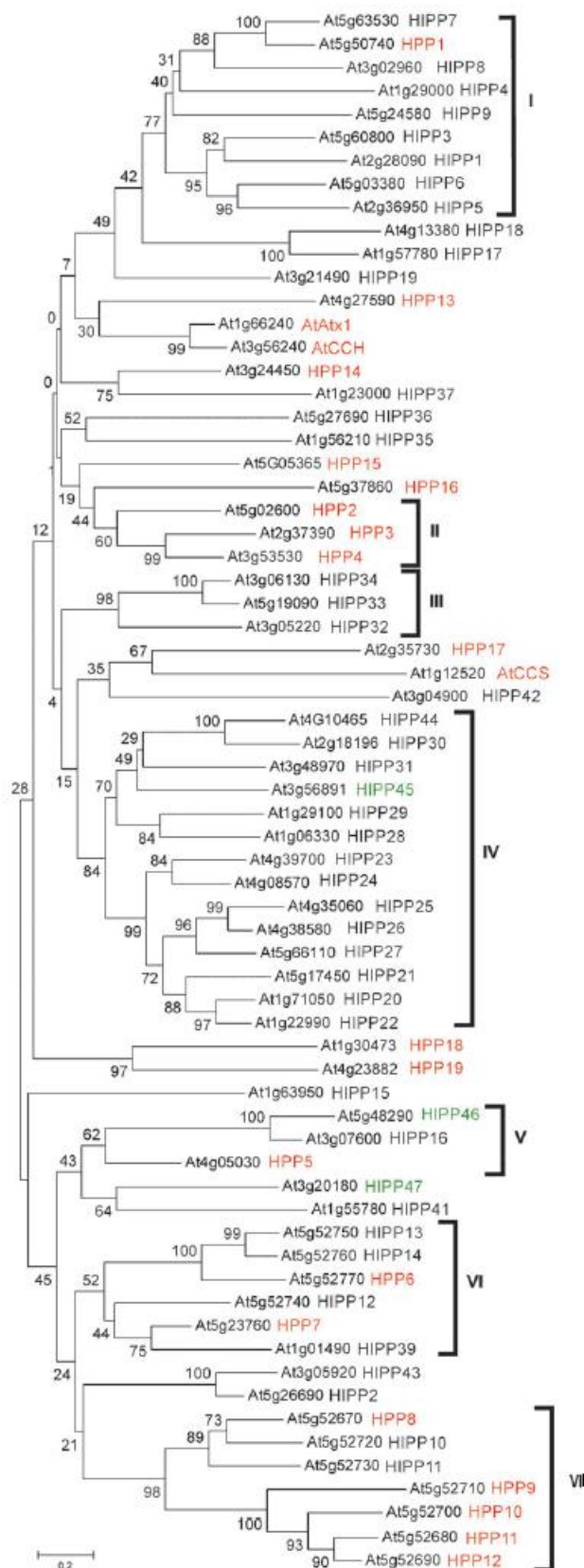


Figura 1.12. Relación filogenética de las proteínas HIPP y HPP. Se muestra el código AGI. Las proteínas se agrupan en siete grupos principales (Tehseen y col., 2010).

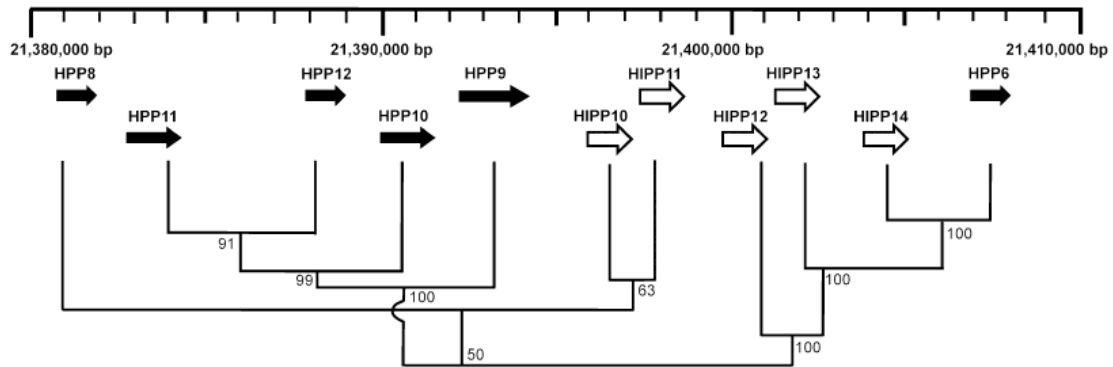


Figura 1.13. Relación filogenética de los genes HPP y HIPP de los grupos VI y VII dentro del tándem en el cromosoma 5. La escala indica pares de bases a lo largo de cromosomas 5. La dirección de la transcripción de los genes se indica mediante una flecha. HIPP (blanco) y HPP (negro) (Tehseen y col., 2010).

1.5 Metabolismo de especies de oxígeno reactivo (ROS)

1.5.1 Especies de oxígeno reactivo

El término especies de oxígeno reactivo (ROS) se refiere, tanto a los radicales libres del oxígeno, el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilo ($\cdot OH$) y peroxilo (RO_2^{\cdot}), como a otras moléculas que no son radicales, como el oxígeno singlete (1O_2), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o el ozono (O_3). Un radical libre es cualquier molécula que contiene uno o más electrones desapareados y que capta electrones para compensar el exceso electrónico hasta completar el orbital en el que se encuentra, por lo que son muy inestables y reactivos. Los radicales libres pueden formarse a través de numerosos mecanismos, entre los cuales se incluye la adición de un electrón a un no-radical (Figura 1.14). La molécula de oxígeno en su estado fundamental se denomina también oxígeno triplete. Su configuración electrónica presenta dos electrones desapareados con el mismo número cuántico de spin, es decir, los dos electrones desapareados tiene sus spines paralelos en dos orbitales antienlazantes. Esta configuración electrónica es lo que proporciona al oxígeno molecular su reactividad con otras moléculas para formar radicales (Halliwell, 2006).

Este estado basal o fundamental del oxígeno molecular puede ser modificado y formar diferentes ROS por dos medios principalmente: por transferencia de energía transformándose en oxígeno singlete; o por transferencia de electrones con formación de

especies reducidas como el radical superóxido, el peróxido de hidrogeno y el radical hidroxilo (Figura 1.14).

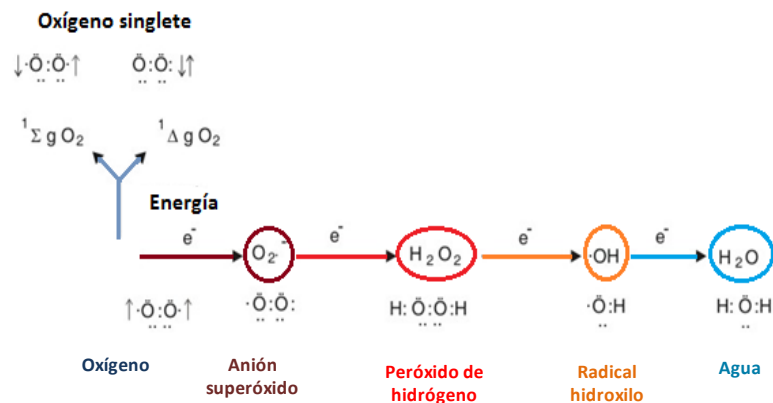


Figura 1.14. Formación de especies de oxígeno reactivo.

Las ROS se producen prácticamente en todos los compartimentos celulares, destacando mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas (Sewelam y col., 2016). Su producción tiene lugar durante los procesos de respiración y fotosíntesis en condiciones fisiológicas normales y se puede incrementar cuando la planta está expuesta a un medioambiente desfavorable (Gill y Tuteja, 2010). La regulación de la acumulación de ROS tiene lugar a través de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos localizados en diferentes compartimentos celulares anteriormente descritos (Alscher y col., 1997; Perl-Treves y Perl, 2002).

1.5.2 Mecanismos de defensa antioxidante

Las células poseen mecanismos antioxidantes para regular la concentración de ROS y así prevenir daños celulares. Halliwell y Gutteridge, (2000) definen antioxidante como toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable, retarda o previene la oxidación del mismo. Entre los mecanismos de defensa antioxidante, se encuentran las moléculas de bajo peso molecular (antioxidantes no enzimáticos) y enzimas antioxidantes.

La función de los antioxidantes enzimáticos consiste en prevenir la iniciación de las oxidaciones en cadena, eliminando las especies de oxígeno reactivo parcialmente reducidas ($O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 ; Wilson, 1990). Algunos de los más importantes son: la

superóxido dismutasa (SOD) que lleva a cabo la dismutación catalítica de los radicales libres $O_2^{\cdot-}$ con formación de O_2 y H_2O_2 ; la catalasa (CAT) que cataliza la descomposición del H_2O_2 con formación de O_2 y H_2O (Chance y col., 1979); las enzimas del ciclo Ascorbato-Glutation: ascorbato peroxidasa (APX), monodeshidro ascorbato reductasa (MDHAR), deshidroascorbato reductasa (DHAR) y glutation reductasa (GR) que actúan en conjunto y de manera eficiente para la eliminación del H_2O_2 en distintos compartimentos celulares en plantas (Foyer y Halliwell, 1976; Asada, 1984).

Los antioxidantes no enzimáticos actúan generalmente a concentraciones relativamente elevadas (Halliwell y Gutteridge, 2000) y se pueden clasificar en tres grupos:

1. **Reductores hidrosolubles:** Se incluyen en este grupo compuestos como la cisteína (N-acetilcisteína), glutation (GSH), el ascorbato (AA, vitamina C), ácido úrico, glucosa, manitol y albúmina (Aruoma y col., 1989; Halliwell y Gutteridge, 2007).
2. **Reductores liposolubles:** En este grupo se incluye la vitamina E (α -tocoferol), presente en membranas de plastidios y mitocondrias de todas las plantas y en algunas algas y cianobacterias (Sattler y col., 2004). También están incluidos en este grupo los flavonoides, una familia de compuestos fenólicos que actúan como antioxidantes (Hayashi y col.; 1998; Halliwell y Gutteridge, 2000). Los fenoles también son importantes inhibidores de la peroxidación lipídica, secuestradores de ROS y quelantes de metales (Rohnert y col.; 1998; Halliwell y Gutteridge, 2000). Además, los β -carotenos son miembros de este grupo y actúan atrapando el oxígeno singlete fundamentalmente en cloroplastos (Halliwell y Gutteridge, 2007).
3. **Quelantes de metales:** A este grupo pertenecen proteínas como la transferrina, ceruloplasmina, ferritina o fitoquelatinas. Estos compuestos atrapan los iones metálicos e impiden su participación en reacciones tipo Fenton generadoras de $\cdot OH$.

1.5.3 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un estado alterado de la homeostasis redox celular. En situaciones ambientales desfavorables, por factores bióticos o abióticos, se produce un desequilibrio del estado redox que se caracteriza por una sobreproducción de ROS frente a las defensas antioxidantes (Figura 1.15; Romero-Puertas y col., 2004; Sewelan, 2016).

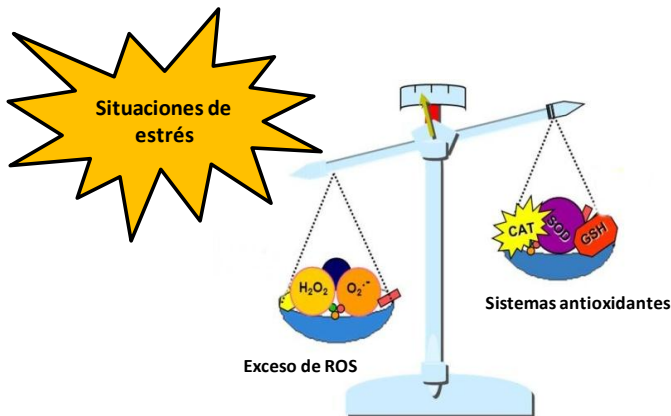


Figura 1.15. Balance entre las reacciones de oxidación y la defensa antioxidante. En condiciones de estrés se produce un exceso de reacciones oxidativas que superan la capacidad de los antioxidantes produciéndose estrés oxidativo que puede evolucionar hacia los procesos de degeneración celular.

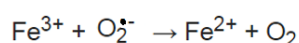
Esta alteración produce diversas respuestas según la duración, severidad y velocidad del estrés al que están sometidas las plantas, pudiendo ocasionar una reducción en las tasas de crecimiento y productividad como consecuencia de las alteraciones del metabolismo celular y la expresión génica (Sandalio y col., 2013). También producen daños en la estructura y la función de las células, como en membranas, proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares pudiendo llevar finalmente a la muerte celular o a la aparición de lesiones necróticas (Simontacchi y col.; Doke, 1997; Foyer y Noctor, 2005). Como marcadores de estrés oxidativo se utiliza la medida de grupos carbonilo de proteínas, que puede conducir a la inactivación de proteínas y enzimas; el análisis del contenido de malondialdehído (MDA), un producto de la fragmentación de lípidos (daños a membranas); y daños oxidativos de bases del DNA, que pueden conducir a mutaciones e interferir en los sistemas de reparación de daños en el DNA (Halliwell y Gutteridge, 2007).

1.5.4 Toxicidad de los metales pesados y estrés oxidativo

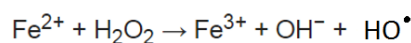
En gran medida la toxicidad por metales pesados se debe al estrés oxidativo producido por las especies de oxígeno reactivo (ROS) que se producen a través de distintos mecanismos, dependiendo del metal pesado de que se trate y a un desequilibrio en la capacidad antioxidante de la planta (Romero-Puertas y col., 2004; Rodríguez-Serrano y col., 2009; Gupta y Sandalio, 2012; Luo y col., 2016)

El estrés oxidativo inducido por los metales pesados en el interior de la célula de un organismo viene determinado en gran medida por las reacciones de tipo Fenton y tipo Haber-Weiss, en las que intervienen $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 , y requieren la presencia de metales que puedan experimentar cambios redox como el Cu o el Fe. Como resultado se forman radicales hidroxilo que son los oxidantes más potentes que se conocen (Halliwell y Gutteridge, 2015; Figura 1.16).

Reducción del catión férrico a catión ferroso:



Reacción de Fenton:



Reacción de Haber-Weiss:

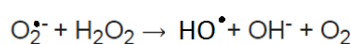


Figura 1.16. Reacciones tipo Fenton y tipo Haber-Weiss, Halliwell y Gutteridge, (2015).

El Cd^{2+} y el Pb^{2+} no experimentan cambios redox y por tanto, a diferencia del Fe^{2+} o Cu^{2+} , no actúan directamente en la generación de ROS a través de estas dos reacciones. Sin embargo, pueden actuar como prooxidantes a través de la disminución del glutatión reducido (GSH), necesario para la síntesis de fitoquelatinas (PCs) disminuyendo así su disponibilidad para la defensa antioxidante (Rodríguez-Serrano y col., 2009; Pinto y col., 2003). Estos metales pueden afectar la funcionalidad de algunos antioxidantes como la catalasa y favorecer la formación de los ROS mediante el desvío de e^- en cadenas de transporte electrónico, fundamentalmente en mitocondrias y cloroplastos, como

consecuencia de procesos de competencia con otros metales, lo que se traduce en la deficiencia de metales como el Cu o Fe (Romero-Puertas y col., 2007).

El estrés oxidativo inducido por el cadmio se manifiesta por daños oxidativos en las membranas, tales como la peroxidación lipídica (Lozano-Rodríguez y col, 1997; Sandalio y col., 2001; Wua y Zhang, 2003; Balestrasse, 2004) y por daños oxidativos a proteínas debido a la formación de grupos carbonilo (Romero-Puertas y col., 2002; Pérez-Chaca y col., 2014). Las actividades de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), glutathion reductasa (GR), ascorbato peroxidasa (APX), peroxidasas (POD) y la catalasa (CAT), encargadas de la defensa celular frente a las ROS, pueden experimentar reducciones o incremento de su actividad dependiendo de la concentración de cadmio añadida en el medio de crecimiento, la duración del tratamiento, el tipo de tejido y la especie vegetal de que se trate (Sandalio y col., 2013; Benavides y col., 2005; Figura 1.17).

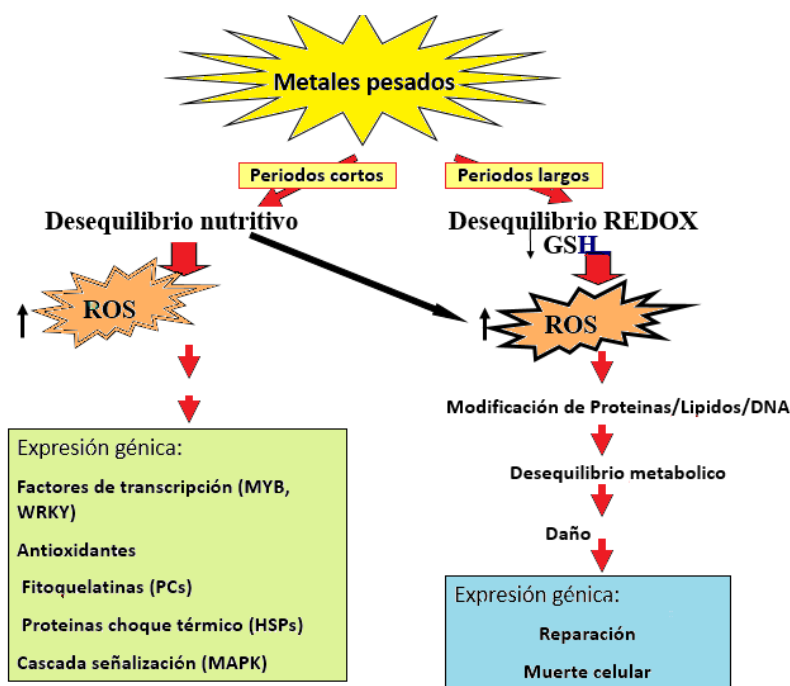


Figura 1.17. Respuesta diferencial en la planta dependiendo del tiempo de exposición a metales pesados. Modificado de (Sandalio y col., 2012).

Distintos estudios llevados a cabo en diferentes especies vegetales confirman que el estrés oxidativo es un componente importante en la toxicidad del Cd y otros metales, que se caracteriza por la reducción del crecimiento, daños oxidativos a distintas macromoléculas, alteración de la defensa antioxidante y desequilibrios redox,

fundamentalmente asociados a la tasa GSH/ GSSG (Romero-Puertas y col., 2002; Cuypers y col., 2011; Gupta y Sandalio, 2012).

Existen datos que indican que el metabolismo de ROS puede estar implicado en la toxicidad de As causando un estrés oxidativo (Zhao y col., 2009b; Dwivedi y col., 2010; Gupta y col., 2013). En plantas de *Arabidopsis thaliana* se ha descrito una alteración de las enzimas antioxidantes catalasa y glutatión reductasa (Fayiga y Saha, 2016; Kumar y col., 2015; Souri y col., 2017; Thao y col., 2015). Varios estudios han demostrado una correlación positiva entre una mayor capacidad antioxidante y la tolerancia al As en plantas hiperacumuladoras (Visioli y Marmiroli, 2013; Kumar y col., 2015; Souri y col., 2017; Fayiga y Saha, 2016). En *P. vittata*, el GSH ayuda a minimizar el estrés oxidativo inducido por As, aumentando la tolerancia (Singh y col., 2006). La NADPH oxidasa probablemente sea una de las primeras fuentes de ROS en respuesta a metales pesados (Cuypers y col., 2011; Rodríguez-Serrano y col., 2009; Romero-Puertas y col., 2002). Otros autores observaron que células de tabaco BY-2 sufrieron una rápida acumulación de H₂O₂ después de sólo 15 min (Olmos y col., 2003) o después de 24 h (Garnier y col., 2006) de exposición a concentraciones extremas de Cd (1 a 5 mM). En plantas de guisante, la exposición a Cd generó una respuesta caracterizada por una acumulación de ROS dependiente en parte de NADPH oxidasas (Romero-Puertas y col., 2004). Heyno y col., (2008), en cambio, estudiaron la producción de ROS dependiente de Cd²⁺ y han propuesto que la producción de H₂O₂ se origina desde el interior de las células de las raíces, principalmente en la cadena de transporte de electrones mitocondrial concluyendo que las NADPH oxidasas no tienen un papel esencial como fuente de H₂O₂ en estrés con Cd (Heyno y col., 2008). También se ha descrito que las ROS producidas por la NADPH oxidasa C en plantas de *Arabidopsis*, pueden regular la absorción y translocación de As y Cd, además de diversos nutrientes, aunque el mecanismo involucrado no se conoce completamente (Gupta y col., 2013, 2017). Por otra parte, la producción de ROS intracelular aumentó constantemente en plántulas de alfalfa expuestas a Cd, con un incremento menor de H₂O₂ extracelular (Ortega-Villasante y col., 2007). Sin embargo, la exposición breve de células epidérmicas de las raíces de alfalfa a Hg 30 µM causó un estallido oxidativo, proceso que estuvo ligeramente desfasado con la generación de H₂O₂ extracelular, el cual aumentó constantemente en raíces tratadas con Hg, mientras que las ROS intracelulares se acumularon de forma transitoria (Ortega-Villasante y col., 2007). Esto sugiere que Hg y Cd disparan diferentes mecanismos de toxicidad, y que el

Hg causa la liberación de grandes cantidades de ROS apoplástico que era inhibido por la adición de DPI (Ortega-Villasante y col., 2007). Varios estudios han demostrado que la exposición a Cr (III, VI) también produce un estrés en las plantas que provoca la generación de ROS, lo que resulta en la peroxidación lipídica y daños oxidativos (Montes-Holguin y col., 2006), lo que conlleva a una inhibición del crecimiento (Kotaš y Stasicka, 2000). La generación de ROS y la peroxidación lipídica eran más pronunciadas con Cr (VI) que con Cr (III) (Shanker y Pathmanabhan, 2004; Scoccianti y col., 2016). Por ejemplo, la exposición a $\geq 50 \mu\text{M}$ Cr (III, VI) aumentó la peroxidación lipídica en raíces y hojas de *S. bicolor* (Shanker y Pathmanabhan, 2004). Pandey y col, (2005) también observaron que en estrés por Cr (VI), la acumulación de MDA era mayor en las raíces que en hojas de *B. juncea*. El estrés de Cr (III, VI) también induce la generación de grupos carbonilo, radicales superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (Shanker y Pathmanabhan, 2004; Panda y Choudhury, 2005; Gangwar y Singh, 2011). La actividad de las enzimas antioxidantes se altera debido a la toxicidad del Cr, así, en *V. radiata*, la exposición a $50 \mu\text{M}$ de Cr (VI) causó un aumento significativo en glutatión reductasa (GR), deshidroascorbato reductasa (DHAR) y monodehidroascorbato (MDHAR) y la actividad catalasa (CAT) (Shanker y col, 2004). Sin embargo, Gangwar y Singh, (2011) observaron una disminución en CAT, GR, Y DHAR en las raíces y hojas de *P. sativum* después 11 días de tratamiento con $50\text{-}250 \mu\text{M}$ Cr (VI).

1.5.5 Papel de las ROS en la señalización celular

Las especies de oxígeno reactivo (ROS) pueden causar graves daños a la integridad celular a altas concentraciones, mientras que a bajas concentraciones actúan como moléculas señal en numerosos procesos de gran importancia a nivel subcelular y fisiológico (Romero-Puertas y col., 2002; Rodríguez-Serrano y col ,2012, 2015; Zhu y col., 2013; Sewelan y col, 2016). Así, las ROS desempeñan un papel como segundos mensajeros en respuesta a distintas situaciones de estrés biótico y abiótico (Figura 1.18; Grun y col., 2006), controlando procesos tales como el crecimiento, el desarrollo, la respuesta a estímulos medioambientales y la muerte celular programada (Apel y Hirt, 2004; Bailey-Serres y Mittler, 2006; Gill y Tuteja, 2010). Debido a esa doble función de las ROS, las plantas necesitan mecanismos diferentes para regular su concentración intracelular: uno con finalidad de señalización que permita controlar niveles bajos de ROS

y otro que permita la eliminación de un exceso de ROS, especialmente en condiciones de estrés (Mittler y col., 2011).

El papel señalizador de estas moléculas se ha demostrado en los últimos años gracias al desarrollo de las técnicas de análisis transcriptómico mediante microarrays que han permitido identificar los genes que se expresan diferencialmente en respuesta a los diferentes tipos de estrés.

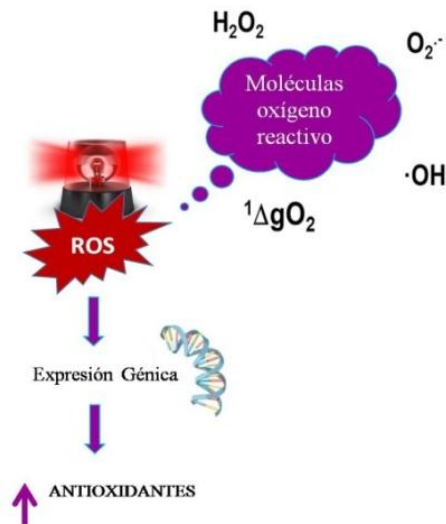


Figura 1.18. Papel señalizador de las ROS activando la respuesta antioxidante y de defensa en la planta.

La producción a nivel subcelular de ROS y la localización subcelular de modificaciones dependientes de ROS (oxidación) pueden actuar como señales específicas y activar determinadas redes redox celulares (Rosenwasser y col., 2013). Entre las ROS, el H_2O_2 es la especie más apropiada para funcionar como molécula señal por su estabilidad y su capacidad para difundir a otras células. El H_2O_2 actúa modificando la regulación de la expresión génica bien activando sensores de ROS, mediante la oxidación de otras moléculas señal, o bien modificando la actividad de factores de transcripción (Mittler y col., 2011; Sewelam y col., 2016). El H_2O_2 también es un componente de la vía de señalización dependiente del ácido abscísico (ABA), el ácido salicílico, el ácido jasmónico, y el etileno (Sewelam y col., 2016). En la Figura 1.19 se muestra un esquema de la producción de ROS en la respuesta de la planta ante cualquier estrés y que lleva a la misma a un proceso de aclimatación o no (Choudhury y col., 2013; Van Breusegem y Dat; 2006).

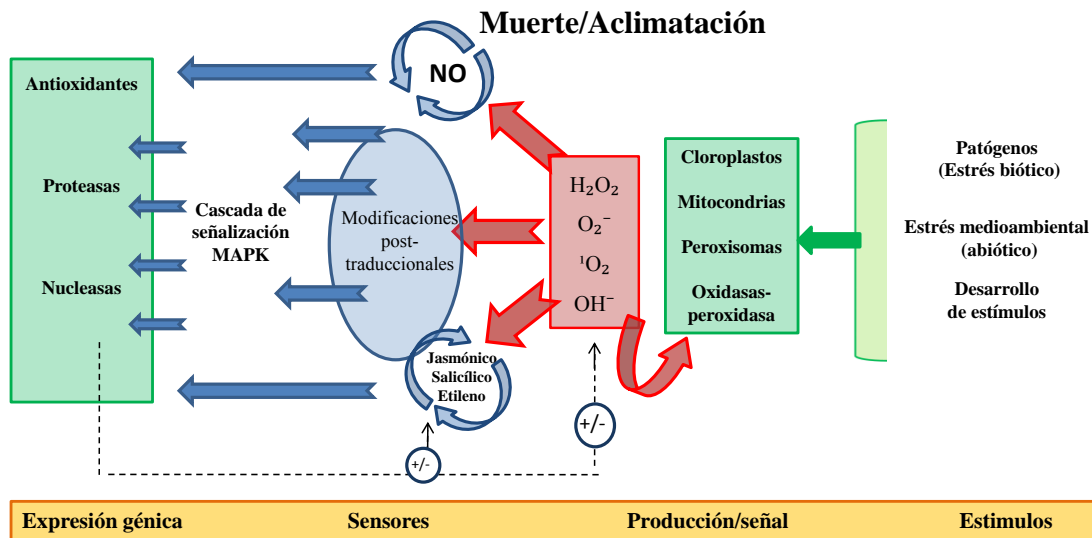


Figura 1.19. Papel de señalización de los ROS en respuesta a diferentes tipos de estrés. Modificado de Van Breusegem, (2006).

En cuanto al papel de señalización de los ROS en respuesta a metales pesados, varios estudios han demostrado que un incremento de H₂O₂ inducido por Hg, Cd, Zn y Cu, atribuido a un efecto de los metales sobre la NADPH oxidasa, inicia una cascada de señalización donde están involucradas las proteínas quinasas (MAPK) (Maksymiec y col., 2007; Jonak y col., 2002; Islam y col., 2015). Los niveles de ácido jasmónico, ácido salicílico y etileno aumentan después de la exposición a los metales pesados (Cánovas y col., 2004; Metwally y col., 2004; Maksymiec y col., 2005; Opdenakker y col., 2012). Estas hormonas juegan un doble papel en la tolerancia a metales pesados, ya que tienen efectos beneficiosos como la neutralización de la toxicidad de Mn y Cd por la activación de antioxidantes (Metwally y col., 2004; Shi, 2008); y efectos negativos, tales como el aumento de producción de H₂O₂ (Zawoznik y col., 2007). El Cd y el Cu desencadenan diferentes mecanismos de toxicidad en alfalfa, y aunque los mecanismos de tolerancia de ambos, están ligados a una concentración de glutatión limitada, el Cd promovía la síntesis de fitoquelatinas mientras que el Cu daba lugar a una disminución del glutatión (Flores-Cáceres y col., 2015).

2 Objetivos

La señalización y la respuesta celular en condiciones de estrés abiótico, en células vegetales, especialmente debido a la toxicidad de metales pesados, constituye una de las líneas principales de investigación de nuestro grupo “Señalización por Especies de Oxígeno y Nitrógeno Reactivo en Situaciones de Estrés en Plantas”, del Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC) de Granada. En los últimos años, el interés de nuestro grupo de investigación se ha centrado en el estudio de los mecanismos implicados en la toxicidad de metales pesados, más concretamente en el Cd y la implicación de las especies de oxígeno y nitrógeno reactivo en la respuesta de la planta frente a este metal.

A pesar de los avances producidos en los últimos años en nuestro conocimiento de los síntomas de toxicidad por metales y mecanismos de entrada y translocación de los mismos, es escasa la información sobre los mecanismos de señalización, las dianas primarias de la toxicidad de metales pesados, el grado de especificidad y la regulación génica de la planta en respuesta a metales. Son especialmente escasos los estudios de la respuesta de la planta a una mezcla de metales compleja, como sucede en zonas mineras. Esta información es esencial para el desarrollo de protocolos de fitorremediación de utilidad para la recuperación de estos suelos altamente contaminados.

Por ello, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

1. La selección e identificación de genes esenciales implicados en la tolerancia simultánea a distintos metales pesados de suelos contaminados, a partir de una colección de mutantes de *Arabidopsis thaliana* L. de 6867 líneas mutantes homocigotas, con una inserción de T-DNA.
2. Caracterización fenotípica, bioquímica y nutricional de algunos de los mutantes seleccionados, así como la localización a nivel tisular y celular de las proteínas correspondientes y la especificidad de la respuesta a los diferentes metales.
3. Validación de la selección y del uso de enmiendas para la recuperación de suelos con alta concentración de metales pesados.

3 Materiales y métodos

3.1 Material vegetal

Para la realización de este trabajo se han utilizado semillas de *A. thaliana* L. Heynh, ecotipo Columbia (Col-0) y Wassilewskija (Ws) que tiene su origen en las estirpes silvestres de *A.thaliana* recolectadas por F. Laibach, estando depositadas y distribuidas por el NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, U.K). Además se ha utilizado la colección de 6867 líneas transgénicas de T-DNA homocigotas del instituto SALK, distribuidas así mismo por el NASC (NAS ID: N27941). Estas líneas han sido generadas a partir de una transformación desde el genotipo silvestre Col-0 y cada línea representa una inserción de T-DNA en un único gen. Las líneas mutantes y transgénicas empleadas en este trabajo se presentan en la Tabla 3.1.

3.1.1 Comprobación de la homocigosis de las líneas mutantes

Las líneas de interés se genotiparon y se comprobó la homocigosis para la inserción de T-DNA. Para ello, se empleó el DNA genómico y los oligonucleótidos específicos localizados antes y después de la inserción de T-DNA (LP, RP) descritos más adelante en la Tabla 3.10 y se utilizó también un oligo específico para el T-DNA como se describe en la Figura 3.1.

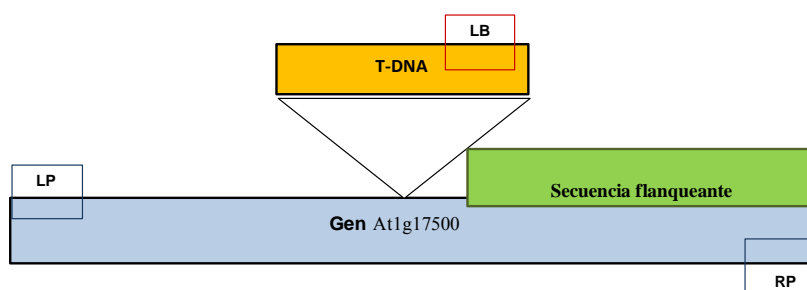


Figura 3.1. Esquema general de la inserción del T-DNA en el gen At1g17500. Modificado de la web. <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler Nexus. La enzima empleada fue la i-Taq™ DNA Polymerase de “iNtRON Biotecnology” incluida en la 2x “PCR Master Mix Solution” que incluye también los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), el tampón de reacción y el tampón de carga. Para llevar a cabo la PCR se siguieron las especificaciones de la casa comercial (iNtRON Taq DNA Polimerasa). En un volumen final de 15 µL se emplearon: 1µl de DNA genómico, 1µl de cada oligo, 7,5 µl de Master Mix y 4,5 µl de agua ultra pura hasta completar el volumen.

Para cada par de oligonucleótidos se estableció un programa de PCR específico. La amplificación de los productos de PCR se evaluaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1 % (p/v) en tampón Tris-HCl 45 mM (pH 8,0), ácido acético glacial 45 mM y EDTA 1 mM (TAE) y una posterior tinción con bromuro de etidio 1.26 μ M. Se visualizaron los productos de la PCR en el equipo ChemiDoc MPTM de Biorad.

Tabla 3.1. Líneas mutantes y transgénicas empleadas.

Línea	Fondo	Características	Utilización	Referencia
Colección de líneas transgénicas de T-DNA NASC ID: N27941	Col-0	Mutantes con inserción de T-DNA	Selección de mutantes con diferente tolerancia a metales pesados	NASC
<i>Atala4</i> (N656653)	Col-0	Mutante con inserción de T-DNA en <i>ALA4</i>	Validación del método de selección	NASC
<i>Athpp9</i> (N655720)	Col-0	Mutante con inserción de T-DNA en <i>HPP9</i>	Validación del método de selección	NASC
<i>Atnramp5</i> (N655822)	Col-0	Mutante con inserción de T-DNA en <i>NRAMP5</i>	Estudios de caracterización, expresión y estrés oxidativo por metales pesados	NASC
<i>Atkup1</i> (N662453)	Col-0	Mutante con inserción de T-DNA en <i>KUP1</i>	Estudios de caracterización, expresión y estrés oxidativo por metales pesados	NASC
<i>Atkup8</i> (N655047)	Col-0	Mutante con inserción de T-DNA en <i>KUP8</i>	Estudios de caracterización, expresión y estrés oxidativo por metales pesados	NASC
<i>Atkup1Atkup8</i>	Col-0	Mutante con inserciones de T-DNA en <i>KUP8</i> y en <i>KUP1</i>	Estudios de caracterización, expresión y estrés oxidativo por metales pesados	Obtenido en el laboratorio
<i>NRAMP5::NRAMP5:GFP</i> líneas 3.2 y 8.3	Ws	Gen <i>NRAMP5</i> con marcador de fluorescencia GFP y bajo su propio promotor	Localización de la expresión de <i>NRAMP5</i>	Cedidas por el prof. S Thomine (CNRS)
<i>NRAMP5::GUS</i> líneas 1.1 y 2.1	Ws	Promotor del gen <i>NRAMP5</i> con marcador GUS	Localización de la expresión de <i>NRAMP5</i>	Cedidas por el prof. S Thomine (CNRS)
<i>AtrbohC</i>	Col-0	Mutante con inserción de T-DNA en NADPH oxidasa C	Estudio de expresión en respuesta a Cadmio	NASC
<i>AtrbohD</i>	Col-0	Mutante con inserción de T-DNA en NADPH oxidasa D	Estudio de expresión en respuesta a Cadmio	Cedidas por el prof. J Jones (The Sainsbury Laboratory, Norwich, UK)
<i>AtrbohF</i>	Col-0	Mutante con inserción de T-DNA en NADPH oxidasa F	Estudio de expresión en respuesta a Cadmio	Cedidas por el prof. J Jones (The Sainsbury Laboratory, Norwich, UK)

3.1.2 Polinización dirigida y selección de dobles homocigotos

Para la obtención de dobles mutantes se realizaron fecundaciones dirigidas entre individuos homocigotos crecidos previamente en maceta de tierra. Los cruces entre las distintas líneas de *Arabidopsis thaliana*, se llevaron a cabo inmediatamente antes del estadio de antesis. En los individuos receptores de los gametos masculinos, se seleccionó una inflorescencia que tuviera como mínimo un botón floral cerrado, que nos indica la ausencia de autopolinización. Del botón floral cerrado se aisló el gineceo retirando además los sépalos, pétalos y estambres con ayuda de pinzas de cirugía y una lupa de aumentos. Posteriormente, se pusieron en contacto las anteras maduras del donante de polen (parental masculino) al gineceo seleccionado favoreciendo así la fecundación cruzada como se muestra en la Figura 3.2.

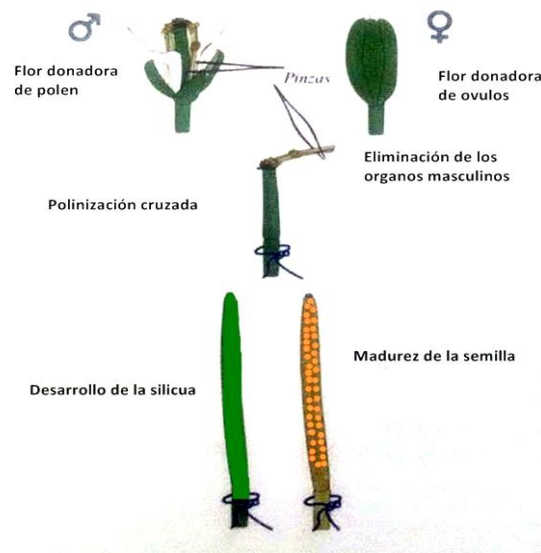


Figura 3.2. Esquema de polinización dirigida.

La selección de las líneas se realizó mediante PCR como se ha indicado en el apartado anterior y empleando los oligonucleótidos de la Tabla 3.10. El proceso hasta obtener el doble homocigoto y el número de plantas analizadas hasta conseguir las líneas deseadas se describe en la Figura 3.3.

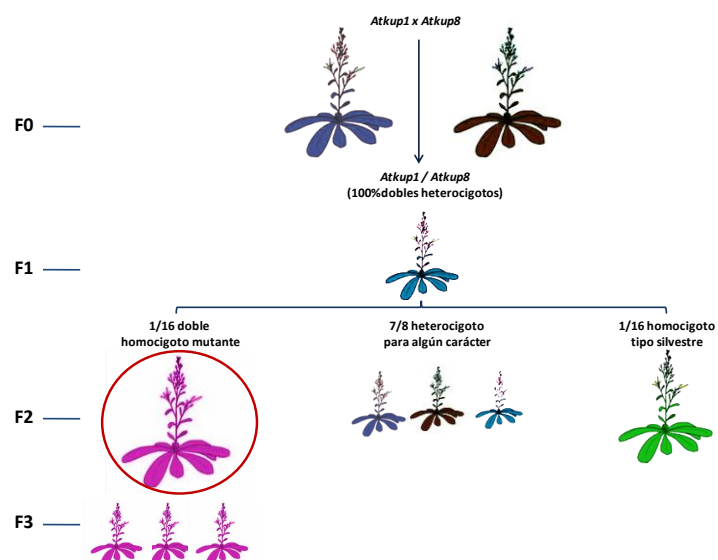


Figura 3.3. Esquema de los cruces realizados para generar dobles mutantes homocigotos.

3.2 Condiciones de cultivo y medios de crecimiento

3.2.1 Crecimiento en tierra

Para la obtención de semillas y la caracterización fenotípica de las diferentes líneas empleadas en este estudio se sembraron semillas en tierra con una composición de sustrato universal Compo-Sana® y vermiculita en una proporción 2:1 (sustrato:vermiculita). Posteriormente, las macetas se trasladaron a una cámara de crecimiento a 22°C con fotoperiodo de 16 h día y 8 h noche con una intensidad lumínica de 120-150 μE y una humedad relativa de 50-60%. Tras terminar el ciclo de vida de la planta, las semillas fueron recolectadas en sobres de papel y almacenadas a temperatura ambiente hasta su utilización. Para tiempos más largos de almacenamiento las semillas se mantuvieron a 4°C.

3.2.2 Crecimiento en placa

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

sincronizar su germinación. Tras la desinfección, se realizó la siembra de las semillas con ayuda de una micropipeta en una cabina de flujo laminar horizontal.

Las plantas de *Arabidopsis* se cultivaron para determinados ensayos verticalmente en placas cuadradas de 10 cm² u horizontalmente en placas Petri circulares de 9 cm de diámetro, conteniendo medio MS o Hoagland (ver Tabla 3.5) y se crecieron en una cámara SANYO en condiciones controladas de temperatura 20/22°C y condiciones de día largo, 16 h de fotoperiodo, con una intensidad lumínica de 100 μE y 60-65% de humedad relativa.

3.2.3 Crecimiento en hidroponía

El sistema hidropónico empleado es una modificación del ya descrito por otros autores (Heeg y col., 2008). El cultivo en hidroponía se realizó en cubetas de plástico rígido y opacas (para evitar el crecimiento de algas) con 4L de capacidad. En su tapadera se hicieron agujeros donde se colocaron tubos eppendorf (0,5 ml) cortados en bisel por la mitad y en los cuales se colocó lana de roca autoclavada (121°C, 20 min) sin apelmazar, de modo que estuviera en contacto con la solución siendo un soporte para la semilla pero no un obstáculo para el paso de la raíz (Figura 3.4). Estas cubetas se rellenaron con medio Hoagland (Hoagland y Arnon, 1953) líquido de composición ya descrita anteriormente con la modificación para hidroponía que se especifica en la Tabla 3.5.

La solución nutritiva de las cubetas se renovó una vez cada dos semanas. A partir de la segunda semana de crecimiento se instaló un sistema de aireación para evitar el gradiente de nutrientes y la falta de oxígeno en el medio, esta aireación debía ser constante y en forma de burbujas finas. Las condiciones de crecimiento fueron de día largo (16 h luz) con temperatura 22°C, humedad relativa 50-60% e intensidad lumínica de 120 μE.

Para el tratamiento de las plantas con Cd se añadieron 4 ml de CdCl₂ 50 mM en cada cubeta con 4L quedando en una concentración final de 50 μM en la solución nutritiva. Para el tratamiento con la mezcla de metales se añadieron los volúmenes necesarios de soluciones stock de CrCl₃, CdCl₂ y Cu(NO₃)₂, hasta alcanzar las concentraciones finales de 100 μM, 50 μM y 50 μM respectivamente, en el medio de cultivo.



Figura 3.4. Sistema de cultivo hidropónico.

3.2.4 Crecimiento en extractos de suelo original y suelos enmendados

3.2.4.1 Preparación de los extractos del suelo original de Riotinto y el suelo enmendado

El suelo se recogió en una escombrera del distrito minero de Riotinto (provincia de Huelva, SW España) y una vez en el laboratorio, el suelo se diseminó (3 y 5 cm de altura) en bandejas de plástico y se secó durante una semana en condiciones ambientales. El compost de lodos de depuradora y restos vegetales (SVC) fue suministrado por una empresa local. Éste fue producido por el compostaje de un lodo de aguas residuales urbanas y subproductos agrícolas (50:50, w:w), particularmente ramas y ramas podadas de olivos. La mezcla se mantuvo en pilas de aproximadamente 3 y 4 m de alto durante 6 y 10 meses de maduración (Sevilla-Perea y col.; 2016). Las cenizas (BA) fueron suministradas por una central eléctrica de biomasa local que utiliza como combustible una mezcla de residuos de molinos de aceite de oliva (alperujo) y cultivos energéticos (40:60, w:w; Rodríguez-Liébaña y col., 2014; Sevilla-Perea y Mingorance, 2015; Sevilla-Perea y col., 2016).

Los tres materiales se homogeneizaron, se secaron al aire, se tamizaron (2 mm) y se caracterizaron. Se determinaron las propiedades fisicoquímicas, tales como la capacidad de campo, el pH en suspensión acuosa 1:2,5 (p:v), la conductividad eléctrica (CE), el carbono orgánico (CO), la capacidad de intercambio catiónico (CEC), los óxidos de Fe y Mn, y el PO_4^{3-} y NO_3 extraíble.

El suelo y las enmiendas fueron finamente trituradas (50 mm) y digeridas en un microondas (MLS-1200 Milestone) con agua regia (3051A, USEPA, 1998) y las concentraciones totales de los elementos fueron analizadas por ICP-OES.

Las mezclas (100 g) del suelo con las enmiendas se prepararon en proporción (90% suelo, 7% compost (SVC), 3% cenizas (BA)). Se humedecieron con agua Milli-Q para obtener el 50% de la capacidad de retención de agua y se mantuvieron en macetas de plástico. Los contenedores estuvieron cubiertos por una lámina de plástico con un pequeño orificio para permitir el intercambio de gases y minimizar la pérdida de humedad. La incubación se realizó a temperaturas de 30°C día / 15°C noche. La humedad del suelo se ajustó cada 3 días. Después de 30 d de incubación, las mezclas se secaron al aire y se trituraron.

Se prepararon los extractos de suelo no modificado y modificado en agua Milli-Q (1:10 w:v) agitando durante 8 horas y centrifugando a 3500 rpm durante 10 min para eliminar la materia particulada (Sevilla-Perea y col, 2016). Se utilizaron extractos acuosos de suelo no modificado y modificado con las enmiendas para preparar los medios.

3.2.4.2 Cultivo en medios preparados a partir del suelo original y los suelos enmendados

Para el estudio de los diferentes parámetros fenotípicos de las líneas mutantes en el suelo original y los suelos enmendados, se prepararon los medios líquidos a partir de los extractos del suelo original y los suelos enmendados según se especifica en el siguiente apartado 3.2.5. Las plantas crecieron en placa en la cámara de cultivo SANYO en condiciones de crecimiento de día largo, 16 h de fotoperiodo, temperatura controlada 22/20°C (día/noche), una intensidad lumínica de 100 μ E y 60-65% de humedad relativa.

Para los ensayos de peroxidación lipídica las plantas se cultivaron durante 21 días en medio Hoagland para hidroponía (Tabla 3.5) en cámara de cultivo con condiciones de día largo (16 h luz) con temperatura 22°C, humedad relativa 50-60% e intensidad lumínica de 120 μ E y se sometieron a un posterior tratamiento durante 2 y 5 días con los medios líquidos preparados a partir de los extractos del suelo original y los suelos enmendados.

3.2.5 Medios empleados

Se emplearon diferentes medios de cultivo según las necesidades del experimento. Los medios utilizados para la siembra de semillas en placa o cultivo líquido fueron preparados a partir de medio Hoagland (Hoagland y Arnon, 1953) o medio MS (Murashige y Skoog, 1962) a concentración 0.5x ó 0.25x en los tratamientos con diferentes concentración de Fe y ajustando su pH. Se añadió fitoagar (8g/l) y sacarosa (30 g/l) para los medios sólidos. Todos los medios se autoclavaron durante 20 min a 121°C y 1 atmósfera de presión y se conservaron a temperatura ambiente. La composición del medio Hoagland se especifica en la Tabla 3.2 y la composición del medio MS en la Tabla 3.4. También se especifican los iones totales en la solución del medio Hoagland en la Tabla 3.3.

Tabla 3.2. Composición del medio nutritivo Hoagland modificado para *Arabidopsis sp.*

MACRONUTRIENTES	Concentración (mM)	MICRONUTRIENTES	Concentración (µM)
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0.75	KCl	25
KNO ₃	0.625	MnSO ₄ ·H ₂ O	5
Mg(SO ₄) ₄ ·7H ₂ O	0.375	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.75
KH ₂ PO ₄	0.25	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1
		H ₃ BO ₃	25
		(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.0375
EDTA: 1,07 mM			
FeSO ₄ ·7H ₂ O: 2,05 mM			

Tabla 3.3. Concentración de iones del medio Hoagland

Iones totales de la solución	Medio Hoagland	
	Concentración (mM)	
	1X	0,5X
NO_3^-	4,247	2,1235
NH_4^+	0,00045	0,000225
K^+	1,798	0,899
Ca^{2+}	1,499	0,7495
Cl^-	0,05	0,025
SO_4^{2-}	0,806	0,403
PO_4^{3-}	0,5	0,25
Mg^{2+}	0,75	0,375
	Concentración (μM)	
Na^+	3,358	1,679
BO_3^{3-}	50,008	25,004
Mn^{2+}	9,999	4,9995
Fe^{2+}	2,248	1,124
Zn^{2+}	2	1
I^-	---	---
MoO_4^{2+}	0,451	0,2255
Co^{2+}	---	---
Cu^{2+}	1,502	0,751
Mo^+	0,075	0,0375

Tabla 3.4. Composición del medio nutritivo MS

MACRONUTRIENTES	Concentración (mM)	MICRONUTRIENTES	Concentración (μM)
NH_4NO_3	20,61	H_3BO_3	100,27
KNO_3	18,79	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	140,4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30
KH_2PO_4	1,25	KI	5
NaEDTA	0,1	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,1
		$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,1

La mayoría de los experimentos realizados en este trabajo se llevaron a cabo empleando los medios anteriormente descritos, Hoagland (Tabla 3.2) o MS (Tabla 3.4) con diferentes modificaciones, que se especifican en la siguiente Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Modificación de medios empleados

MEDIO	MODIFICACIÓN	UTILIZACION
Hoagland+Mezcla de metales (Cd+Cr+Cu)	Cr 100µM + Cd 50 µM + Cu 50 µM.	Selección de líneas mutantes de la colección con diferente tolerancia a metales pesados y estudio del fenotipo de las líneas frente a WT
Hoagland+Cd	CdCl ₂ 50 µM	Estudio de fenotipo de las líneas mutantes frente a WT
Hoagland+Cr	CrCl ₃ 50 µM	Estudio de fenotipo de las líneas mutantes frente a WT
Hoagland+As	Na ₂ AsO ₄ 30 µM	Estudio de fenotipo de las líneas mutantes frente a WT
Hoagland+Cu	Cu (NO ₃) ₂ 25 µM	Estudio de fenotipo de las líneas mutantes frente a WT
Hoagland+Exceso de Fe	4X Fe-EDTA	Estudio de la respuesta al exceso de hierro
Hoagland+Exceso de Fe	10X Fe-EDTA	Estudio de la respuesta al exceso de hierro
Hoagland+Ausencia de Fe	Sin Fe-EDTA	Estudio de la respuesta al defecto de hierro
MS+Exceso de Mn	MnSO ₄ 200µM	Estudio de la respuesta al exceso de manganeso
MS+Exceso de Mn	MnSO ₄ 400µM	Estudio de la respuesta al exceso de manganeso
MS+Ausencia de Mn	Sin MnSO ₄	Estudio de la respuesta al defecto de manganeso
Hoagland para Hidroponía	Sin sacarosa, sin Fe- EDTA, con Sequestrene 10 ml/l, pH 8	Para cultivo hidropónico

Para realizar los estudios de las líneas mutantes en el suelo original y en el suelo enmendado, se elaboraron tres tipos de medios: 1) Medio preparado a partir del extracto original del suelo de Riotinto, 2) Medio preparado a partir del extracto de suelo de Riotinto con la enmienda 1 (SVC) y 3) Medio preparado a partir del extracto de suelo de Riotinto con la enmienda 2 (BA).

Los extractos del suelo original y de los suelos enmendados se prepararon en colaboración con las Doctoras Mingorance y Sevilla-Perea del IACT-CSIC (Sevilla-Perea y col., 2016). Los medios se prepararon utilizando los extractos (Apartado 3.2.4.1) y solidificándolos con fitoagar para los ensayos de fenotipo en placa y para los ensayos de peroxidación lipídica se emplearon los medios líquidos.

3.3 Recolección y preparación de las muestras vegetales

Una vez finalizado el tratamiento aplicado, se procedió a la recogida del material, separando la parte aérea de la raíz. Las raíces se lavaron por sucesivas inmersiones en agua destilada, hasta eliminar los restos de solución de cultivo. Las muestras vegetales recolectadas se pesaron para determinar el peso fresco, se midieron los diferentes parámetros fenotípicos y parte del material se destinó a realizar estudios bioquímicos, celulares y moleculares, según se describe más adelante. El tejido no utilizado en el momento de recogida se congeló con nitrógeno líquido y se conservó a -80°C hasta su posterior uso.

3.4 Análisis fenotípico

3.4.1 Germinación

El porcentaje de germinación de las diferentes líneas se llevó a cabo en placas Petri circulares en las que se dispusieron de forma ordenada un número determinado de semillas de los genotipos, silvestre y mutante, y se monitorizó su germinación en el tiempo mediante el conteo diario de las semillas germinadas en los diferentes medios a los que se les había añadido o no los diferentes metales pesados a las concentraciones indicadas. Posteriormente, una vez recogidos los datos, se obtuvieron los porcentajes de germinación en los días posteriores a la siembra teniendo en cuenta las semillas sembradas el primer día.

3.4.2 Medida de peso fresco y seco

Como parámetro de crecimiento se evaluó el peso de las plántulas al final de su periodo de crecimiento de 7 o 21 días en placa o cultivo hidropónico, respectivamente. Para el peso fresco, se extrajeron las plantas de sus medios, se lavaron las raíces con agua destilada para eliminar restos del medio, se secaron y se pesaron en una balanza de precisión Sartorius (CPA225D). Para el peso seco las muestras pasaron un periodo de 4 días en una estufa a 60°C, y posteriormente se pesaron.

3.4.3 Medida de longitud de raíz

La longitud de la raíz principal se determinó creciendo las plántulas en posición vertical en placas Petri cuadradas de 10 cm de lado durante 7 días. Se tomaron imágenes de cada placa mediante un escáner Epson 3200. Posteriormente, se midieron las longitudes de las raíces principales utilizando el programa Image Tools 3.0 y se determinó el valor promedio de 15 plántulas por réplica.

3.4.4 Número de hojas verdaderas.

Como parámetro de resistencia, desarrollo y crecimiento se evaluó la aparición de hojas verdaderas en las plántulas de los diferentes genotipos estudiados y crecidas en los distintos medios. Para ello, las plantas crecieron en placa y a partir del séptimo día, momento en el que comienzan a aparecer las hojas verdaderas, se monitorizó su aparición durante los siguientes tres días. Los datos obtenidos fueron expresados como porcentajes de plantas con hojas verdaderas con respecto a las plantas germinadas.

3.4.5 Número de hojas de roseta y de silicuas

Para evaluar el crecimiento y el desarrollo de las plantas se contaron las hojas que forman la roseta característica de *Arabidopsis thaliana*. Esto nos permitió comparar, según su genotipo, el desarrollo de plantas adultas (21 días) crecidas bien en hidropónico o bien en tierra. Además se analizó el número de silicuas producidas por cada planta crecida en tierra durante 4 semanas.

3.5 Determinación de actividades enzimáticas

Para llevar a cabo las medidas de actividades enzimáticas se realizaron extractos de hoja. Así, se homogeneizó el material en un mortero con pistilo en tampón Tris-HCl

50mM pH 7,0 conteniendo Triton X-100 al 0,2% (v/v), EDTA 0,1mM y una mezcla de inhibidores de proteasas 1x (Sigma). Se centrifugó a 5.000 g durante 30 minutos y se recogió el sobrenadante para llevar a cabo las diferentes medidas.

3.5.1 Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6)

La actividad catalasa (CAT) se midió espectrofotométricamente según el método descrito por Aebi (1984) basado en la medida de la disminución de la absorbancia a 240 nm, debido a la desaparición del H₂O₂. La determinación se efectuó durante 2 minutos a 25°C en una mezcla de reacción que contenía 10,6 mM de H₂O₂ en tampón fosfato-K 50 mM a pH 7,0 y en un volumen de 1 ml. La actividad enzimática, expresada en $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ proteína, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el H₂O₂ de $39,58 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

3.5.2 Glicolato Oxidasa (GOX; EC 1.1.3.1)

Se midió espectrofotométricamente según el método de Kerr y Groves (1975). La mezcla de reacción, en un volumen final de 1 ml, contenía tampón fosfato-K 50 mM, pH 8,3, fenilhidracina 10 mM y glicolato 5 mM. La reacción se inició por adición de la muestra, midiéndose la formación del complejo glioxilato-fenilhidrazona a 324 nm durante 2 min. La actividad enzimática se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el complejo de $1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Kerr y Groves, 1975).

3.6 Determinación de proteínas totales

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

3.7 Peroxidación lipídica

Uno de los parámetros que se utiliza para medir el estrés oxidativo celular es la determinación de malondialdehído (MDA), un subproducto de la degradación de ácidos grasos insaturados. La tasa de peroxidación lipídica se determinó midiendo la concentración de malondialdehído (MDA) con ácido tiobarbitúrico según el método de Buege y Aust (1978). Todos los reactivos de este ensayo se prepararon en agua Milli-Q. Para el ensayo se añadieron 200 μ l de muestra a 1 ml de la siguiente mezcla de reacción: ácido tricloroacético al 15 % (p/v), ácido tiobarbitúrico al 0,375 % (p/v) y butilhidroxitolueno al 0,01 % (p/v) preparado en HCl 0,25 N. Posteriormente, la mezcla se calentó durante 15 min a 95°C, se dejó enfriar y se centrifugó a 2.000 g durante 5 minutos, efectuándose la lectura de la densidad óptica a 535 nm. La concentración de MDA en las muestras se calculó a partir de una recta de calibración con distintas concentraciones de MDA conocidas (0,1-10 μ M).

3.8 Análisis de peróxido de hidrógeno

Se emplearon dos métodos para analizar el H₂O₂, uno mediante fluorimetría y otro mediante tinción histoquímica.

3.8.1 Método fluorimétrico

La concentración de peróxido de hidrógeno en extractos crudos se determinó según el método fluorimétrico descrito por Creissen y col., (1999) con modificaciones de Romero-Puertas y col., (2004). Los extractos crudos de hojas se prepararon en HCl 25 mM (1/3, p/v) usando un mortero y se le añadió carbón activo para eliminar pigmentos que pudieran interferir en la reacción. El carbón activo y los pigmentos se eliminaron por centrifugación a 5.000 g durante 5 min. El sobrenadante resultante se neutralizó con NaOH y se utilizó para medir la concentración de H₂O₂. La mezcla de reacción, en un volumen final de 3 ml, contenía tampón Hepes 50 mM, pH 7,6, ácido homovanilínico (HVA) 5 mM y 20-100 μ l de muestra. La reacción se inició por adición de peroxidasa 40 μ M. La concentración de H₂O₂ se determinó midiendo la fluorescencia en un espectrofluorímetro con excitación a 315 nm y emisión a 425 nm, frente a una curva patrón de peróxido de hidrógeno (1-80 μ M), preparada en HCl 25 Mm previamente neutralizada con NaOH.

3.8.2 Método histoquímico

Otro método que se utilizó para visualizar la producción de H₂O₂ fue la tinción histoquímica con diaminobencidina (DAB) (Thordal-Christensen y col., 1997). Las hojas se sumergieron en 1 mg/ml de DAB (3,3'-diaminobenzidina, Sigma) pH 3,8 durante 12 horas y en oscuridad a 25°C. Pasado el periodo de incubación las hojas se enjuagaron y se hirvieron en etanol al 95% (v/v) durante 5 min. La producción de H₂O₂ se visualizó mediante precipitados de color marrón oscuro. Estos precipitados se cuantificaron a partir de imágenes calculando la intensidad del color mediante el programa Image J 1.45.

3.9 Análisis del contenido de metales.

Las muestras obtenidas del cultivo hidropónico fueron clasificadas según su tratamiento y genotipo, se dividieron en raíces y parte aérea. Las raíces se lavaron dos veces con agua destilada para eliminar los metales adheridos en el exterior de la muestra y después se secaron en una estufa a 60°C durante 4 días.

Posteriormente, se siguió el protocolo de Gupta y col., (2013) para llevar a cabo la digestión de las muestras empleando un digestor Milestone Start D. En una campana de extracción se depositaron 50 mg de cada muestra en los vasos del digestor añadiéndose también el volumen de la mezcla digestora 4HNO₃:1H₂O₂ en el interior. Todos los reactivos empleados son ultrapuros para evitar la contaminación de las muestras. Los vasos se cerraron con sus respectivas tapaderas de forma hermética empleando una llave dinamométrica. Se colocaron los vasos en el interior del digestor y se diseñó el programa para que el proceso alcanzara una temperatura de 190°C y se mantuvieron durante 15 minutos con una posterior bajada de la temperatura durante 60 minutos hasta llegar a temperatura ambiente. Una vez terminado el proceso de digestión las muestras se conservaron en tubos a 4°C hasta su posterior análisis.

Para el análisis de la concentración de los metales acumulados (Cd, Cu, Cr), así como de los macro y micronutrientes, tanto en raíz como en la parte aérea, se empleó un espectrómetro de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento inductivo (ICP-MS) del servicio técnico del CEBAS-CSIC.

El factor de translocación (% de Translocación) se calculó como el ratio del contenido de metales en hoja en relación con el contenido en raíz (H/R)*100, similar al descrito por Zhang; (2006).

3.10 Desarrollos electroforéticos y Western-blot

3.10.1 Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (EGPA-SDS)

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

3.10.2 Transferencia de Proteínas (Western-blot) e Inmunodetección

Los geles obtenidos por EGPA-SDS se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF) de Millipore, utilizando un sistema de transferencia semi-seco de Bio-Rad. En la transferencia se utilizó un tampón de ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico (CAPS) 10 mM, pH 11, conteniendo metanol al 10 % (v/v) y se llevó a cabo aplicando una corriente de 1,5 mA por cm² durante 1 h.

Para la detección de la reacción antígeno-anticuerpo y tras la transferencia de las proteínas, las membranas se permeabilizaron con metanol 100 % (v/v), tras lo cual se lavaron con agua destilada. Con objeto de bloquear los lugares inespecíficos de unión de las IgGs, las membranas se incubaron de 1 a 3 h a temperatura ambiente, o durante toda la noche a 4°C en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7,8, y NaCl 0,18 M (TBS), al que se le adicionó leche en polvo desnatada al 3 % (p/v). Posteriormente, las membranas se incubaron durante 1 h con el anticuerpo primario diluido en la concentración que se especifica en la Tabla 3.6, durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavaron las membranas con TBS y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario anti-IgG de

conejo unido a la peroxidasa de rábano (HRP) en la dilución correspondiente. Los anticuerpos empleados proceden de *Agrisera*TM (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Relación de anticuerpos empleados y sus condiciones de uso.

Anticuerpo	Primario	Secundario
Catalasa	1:5000	1:25000
GFP	1:10000	1:10000

Para el revelado, las membranas se incubaron en una solución de revelado “*ECL Plus Western Blotting detection system*” (*Amersham*TM) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La fluorescencia se detectó con un equipo QuemiDoc de BioRad. El tiempo de exposición variaba desde segundos hasta varios minutos, dependiendo de la intensidad de la señal obtenida.

3.11 Análisis de ácidos nucleicos

3.11.1 Extracción y purificación de RNA total

El aislamiento de RNA total se llevó a cabo utilizando el reactivo comercial Trizol (GIBCOBRL, Life Technologies), compuesto por una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987). El material vegetal se homogeneizó en un mortero con nitrógeno líquido. Se pesó el polvo obtenido y se añadió 1 ml del reactivo comercial por cada 100 mg de tejido. Tras una incubación de 5 min a temperatura ambiente, se añadieron 0,2 ml de cloroformo por cada ml de Trizol y se agitó por inversión durante 15 s y se incubaron nuevamente 5 min a temperatura ambiente. Tras centrifugar a 12.000 g durante 15 min a 4°C, al sobrenadante inicial que contenía el RNA, se le añadieron 0,5 ml de isopropanol por ml de Trizol inicial y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, se centrifugó a 12.000 g durante 10 min a 4°C y el precipitado, conteniendo el RNA, se lavó con 1 ml de etanol al 75% (v/v), se centrifugó de nuevo a 12.000 g durante 5 min y el precipitado se secó al aire. Por último, el RNA precipitado se resuspendió en agua DEPC 1% (dietilpirocarbonato) libre de ribonucleasas y se conservó a -80°C hasta su posterior uso.

La cuantificación del RNA se realizó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 260 nm en un equipo NanoDrop (ND-1000), asumiendo que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 µg/ml de RNA.

3.11.2 Electroforesis de ácidos nucleicos

El análisis de los fragmentos de DNA y RNA obtenidos, ya sea para comprobar la integridad de los fragmentos de RNA como para cuantificar la expresión a partir de cDNA se llevó a cabo mediante electroforesis. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % (p/v) en tampón Tris-HCl 45 mM (pH 8,0), ácido acético glacial 45 mM y EDTA 1 mM (TAE). Los geles se prepararon disolviendo la agarosa en tampón TAE por calentamiento y posteriormente se solidificaron en el molde para geles a temperatura ambiente. La electroforesis se desarrolló en 10 minutos a 100 V. Las muestras se cargaron en tampón de carga conteniendo glicerol al 4%. Las bandas se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron utilizando un sistema Chemidoc (Bio-Rad) acoplado con una cámara CCD de alta sensibilidad. La intensidad de banda se cuantificó con el programa Quantity One y expresó como unidades de absorbancia relativa respecto del control.

3.11.3 Transcripción inversa

La obtención de los cDNAs se realizó a partir del RNA total aislado de hojas y raíces según el protocolo descrito en el apartado anterior. Se partió de 1 µg de RNA como molde para llevar a cabo la reacción de transcripción inversa siguiendo las instrucciones de la casa comercial de la enzima iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad), con las condiciones de reacción: 25°C, 5 min; 42°C, 30 min, 85°C, 5 min empleando un termociclador Mastercycler (Eppendorf).

3.11.4 Extracción de DNA genómico

Se realizó la extracción de DNA genómico mediante el método descrito por Edwards y col., (1991). Se recogieron muestras de tejido foliar y se recortaron en discos para asegurar un tamaño de muestra uniforme, se realizaron los extractos macerando el tejido a temperatura ambiente con tampón de extracción (200 mM Tris HCl pH 7,5, 250 mM de NaCl, 25 mM de EDTA, 0,5% de SDS). Los extractos se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante recogido se mezcló con el mismo volumen de isopropanol manteniéndose a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 minutos y se dejó secar el precipitado. Finalmente se disolvieron en 100µl de tampón Tris-EDTA (TE). Este DNA es estable a 4 °C.

3.11.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la realización de la PCR se utilizó un termociclador Eppendorf Mastercycler. Se utilizaron distintos programas de PCR, cambiando la temperatura y los tiempos de extensión y alineamiento en función de los requerimientos de los oligonucleótidos (Tabla 3.10) y de la longitud del fragmento amplificado. La temperatura de alineamiento (T_a) se calculó dependiendo de la longitud y composición de los oligonucleótidos utilizados, siguiendo la fórmula: $T_a = 2 (A+T) + 4 (G+C)$ y tiempo de extensión teniendo en cuenta que, teóricamente, se requiere un minuto de alineamiento por Kb de DNA amplificado.

- **PCR semicuantitativa**

El método utilizado para la PCR semicuantitativa fue el descrito por Marone y col., (2001). Esta técnica permite comparar la cantidad de mRNA entre muestras distintas, ya que la reacción se detiene en la fase exponencial de amplificación, donde la cantidad de DNA amplificado es directamente proporcional a la cantidad de cDNA inicial de la muestra. En este estudio se utilizó la *TUB-4* de *Arabidopsis sp.* como gen control. Una vez obtenido el cDNA de las distintas muestras, se realizaron distintas diluciones de los mismos para asegurar que se partía de la misma concentración de cDNA en cada una de las mismas. Mediante una PCR normal preparando mezclas comunes de reacción para minimizar el error de experimentación, se seleccionó el número de ciclos correspondientes para cada uno de los genes ensayados así como para el control, realizando amplificaciones de los mismos a 25, 28, 30 y 33 ciclos, con el fin de seleccionar un ciclo de amplificación correspondiente a la fase exponencial de la misma. Una vez ajustadas las concentraciones de cDNA inicial y los ciclos de amplificación (entre 25-30 en todos los casos), se realizaron las PCRs según el protocolo descrito en la Tabla 3.7. La enzima utilizada fue la Hot Master taq polimerasa de Eppendorf y la mezcla de reacción contenía de 20-50 ng de cDNA, dNTPs 0,25 mM, 0,10 μ M de oligonucleótidos, 1x de tampón de la enzima, $MgCl_2$ 1,5 mM y 0,125 U/ μ l de enzima.

Tabla 3.7. Programa de temperatura para RT-PCR-semicuantitativa

Etapas	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	4 min	1
Desnaturalización	94°C	30 s	25-28
Alineamiento	(Ta) Según Tabla 3.9	30 s	
Extensión	72°C	30 s	
Extensión final	72°C	5 min	1

Para la cuantificación se midió la intensidad de las bandas con el programa “Quantity One” y para la normalización de los valores de las densidades de cada banda de cDNA se dividió primero por el valor de densidad de la banda de *TUB-4* en el mismo carril para compensar las variaciones en la carga de cDNA sobre el gel. El aumento o disminución relativa en la expresión génica se calculó dividiendo la densidad de banda normalizada del gen de las plantas con tratamiento por la del mismo gen de las plantas control siguiendo la fórmula matemática de Marone y col., (2001).

$$\text{Expresión relativa} = \frac{\text{Ref Control} * \text{Muestra problema}}{\text{Ref problema} * \text{Muestra control}}$$

- *Ref Control*: Intensidad de banda calculada para el gen de referencia en el control, *TUB-4*
- *Muestra problema*: Intensidad de banda calculada para el gen problema en el tratamiento.
- *Ref problema*: Intensidad de banda calculada para el gen de referencia en el tratamiento, *TUB-4*
- *Muestra control*: Intensidad de banda calculada para el gen problema en el control.

Figura 3.5. Fórmula para el cálculo de expresión relativa.

- **PCR cuantitativa**

En este trabajo, se ha utilizado como método de detección la molécula de SYBR Green I que emite fluorescencia al unirse a moléculas de cDNA de doble cadena durante la amplificación. Al final del proceso de amplificación, se obtendrá la gráfica

correspondiente que representará la intensidad de fluorescencia con respecto al número de ciclos que han tenido lugar. Esta gráfica nos permitirá extrapolar los resultados referentes a las cantidades iniciales de cDNA con las que contábamos en nuestra muestra, que tendrá su reflejo en la cantidad del transcrito, que es lo que realmente nos indica los niveles de expresión de un gen.

Para el análisis mediante PCR cuantitativa se siguieron las especificaciones de la casa comercial Takara para “iQ SYBR Green Supermix”. Para realizar la reacción de PCR se mezclaron 10,5µl de SYBR Green, 0,5µl de cada oligo 10 µM y 1µl de cDNA como molécula molde en 8,5µl de agua Mili-Q. Se aplicó el siguiente programa descrito en la Tabla 3.8 en un termociclador iCycler iQ5 (BioRad).

Tabla 3.8. Programa de temperatura para iQ-RT-PCR

Etapas	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	1
Desnaturalización	95°C	10 s	35
Alineamiento	(Ta) Según Tabla 3.11	30 s	
Extensión	72°C	30 s	
Extensión final	72°C	10 min	1

Análisis y cálculo de resultados para RT-PCR

Para calcular la eficiencia de los oligonucleótidos se prepararon diluciones seriadas del cDNA. Los cálculos se realizaron a partir de las pendientes de la curva estándar obtenida mediante el programa iQ5 utilizando la fórmula $E = [10 (1 / a)^{-1}] \times 100$, donde “a” es la pendiente. Las eficiencias y las temperaturas de trabajo de cada pareja de oligonucleótidos empleados para los estudios de expresión mediante RT-PCR se presentan en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9. Eficiencia y temperatura empleadas por cada pareja de oligonucleótidos para la RT-PCR

Gen	Temperatura (°C) (Ta)	%Eficiencia
<i>NRAMP1</i>	45	98
<i>NRAMP2</i>	55	101,3
<i>NRAMP3</i>	55	108
<i>NRAMP4</i>	55	106
<i>NRAMP5</i>	50	102,5
<i>NRAMP6</i>	50	100,4
<i>ALA-4</i>	48	100,3
<i>HPP9</i>	55	96,8
<i>KUP8</i>	60	99
<i>CAT</i>	55	95,5

La expresión relativa de cada gen se normalizó con la de la *TUB-4*, y los resultados se calcularon utilizando la relación de expresión relativa de acuerdo con el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001) que emplea un modelo matemático para la cuantificación relativa de un gen problema en comparación con uno de referencia (Figura 3.6).

$$Expresión\ Relativa = \frac{(E_{Problema})^{\Delta CP_{Problema}(Control-Muestra)}}{(E_{Ref})^{\Delta CP_{Ref}(Control-Muestra)}}$$

- $E_{problema}$: es la eficacia de PCR en tiempo real de la transcripción del gen problema.
- E_{Ref} : es la eficacia en tiempo real de la PCR de una transcripción de genes de referencia; en este caso *TUB-4*.
- $\Delta CP_{Problema}$: es la desviación CP del control - muestra problema.
- ΔCP_{Ref} : desviación CP del control - muestra de referencia.

Figura 3.6. Fórmula matemática para el cálculo de la expresión relativa. Pfaffl, (2001).

La relación de expresión relativa de un gen problema se calcula sobre la base de la eficiencia (E) y el punto en el que la fluorescencia sube apreciablemente por encima de la fluorescencia de fondo (CP) de una muestra desconocida frente a un control, y se expresa en comparación con un gen de referencia.

3.11.6 Oligonucleótidos utilizados

Los oligonucleótidos empleados para verificar la condición de homocigosis de las líneas seleccionadas son específicos de la inserción de T-DNA y se diseñaron con el programa “input3” (<http://primer3.ut.ee/>) y el programa “T-DNA Primer Design” (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) y se encuentran detallados en la Tabla 3.10.

Los oligonucleótidos utilizados para los estudios de expresión mediante PCR cuantitativa y semicuantitativa se presentan en la Tabla 3.11. Se diseñaron empleando la aplicación bioinformática “Beacon Designer” (<http://www.premierbiosoft.com/qOligo/>). Estos oligonucleótidos amplifican un segmento de cDNA entre 50-150 pb, con un contenido G-C entre el 50-60% y las temperaturas utilizadas están entre 55-60°C.

Tabla 3.10. Oligonucleótidos utilizados para comprobar la homocigosis de las líneas mutantes.

Gen	AGI Code	Salk	Oligonucleótido		T (°C)
<i>ALA4</i>	At1g17500	SALK_075228C	Oligo-s	5'-TCTTCCCTTGTTGGTACAACG-3'	58
			Oligo-as	5'-TGTGGTGAAGCTCAGAAGGAGC-3'	58
<i>HPP9</i>	At5g52710	SALK_091636C	Oligo-s	5'-CTTCTCACCAAGGTTTCAGTGC -3'	60
			Oligo-as	5'-CTGGATGTTTCCAGGTACACC-3'	60
<i>NRAMP5</i>	At4g18790	SALK_109028C	Oligo-s	5'-CATTAAACATCCAAGCGAACG-3'	60
			Oligo-as	5'-TTTGGTCTGATTCTGTACCGG -3'	60
<i>KUP8</i>	At5g14880	SALK_041357C	Oligo-s	5'-ACTACCTGATGCAGCAAATCC-3'	55
			Oligo-as	5'-TCTTGATTTTGTGGCCAAAC-3'	55
<i>KUP1</i>	At2g30070	SALK_148762	Oligo-s	5'-AGGCCAGTGTTTGTGGATAAC-3'	58
			Oligo-as	5'-AACATGAAAAGCGTTCACGTC-3'	58
<i>KUP3</i>	At3g02050	SALK_002622C	Oligo-s	5'-GGCTTTCGAGACACAACCTTG-3'	58
			Oligo-as	5'-GACGAGGATTTCTCGATTTTC-3'	58
<i>LB. b 1.3</i>		T-DNA		5'-ATTTTGCCGATTTTCGGAAC-3'	

Tabla 3.11. Oligonucleótidos empleados para PCR cuantitativa y semicuantitativa.

Gen	Oligonucleótido		Temperatura (Ta) (°C)
<i>ALA4</i>	Oligo-s	5'-TCTCCCTTGTTGGTACAACG-3'	48
	Oligo-as	5'-GCCAATGTGATTTTCCCGGT-3'	48
<i>HPP9</i>	Oligo-s	5'-CTTCTCACCAAGGTTTCAGTGC-3'	55
	Oligo-as	5'-AGCGCATGGACCTTTTAACC-3'	55
<i>NRAMP1</i>	Oligo-s	5'-GTAGCCACTTCTTCTTATTCAAG-3'	45
	Oligo-as	5'-CAACATCGGAGGTAGATA-3'	45
<i>NRAMP2</i>	Oligo-s	5'-TGCTATTGCTATTCAGATTCTT-3'	55
	Oligo-as	5'-TAACTTCCTCACACCGTAA-3'	55
<i>NRAMP3</i>	Oligo-s	5'-ATGGTTTTGTGGGTATGGC-3'	55
	Oligo-as	5'-CTCGAGCTTCCTTATTCCGT-3'	55
<i>NRAMP4</i>	Oligo-s	5'-CCAGGACTATCAAACAAGCTGT-3'	55
	Oligo-as	5'-CAATGGAGTAGTACTTGAGAGCTTC-3'	55
<i>NRAMP5</i>	Oligo-s	5'-GGGCTCGCTCGATGTTTTAA-3'	50
	Oligo-as	5'-ATCATCCAAACACCGCCAC-3'	50
<i>NRAMP6</i>	Oligo-s	5'-GTCAGAGTTCAACCATAA-3'	50
	Oligo-as	5'-GATTATAGCCAAGCATCT-3'	50
<i>KUPI</i>	Oligo-s	5'-GGAAGCGAAAAGAAGCTGGAGTAGC-3'	58
	Oligo-as	5'-TCTGTTCTCTGCAATTCGTGCTC-3'	58
<i>KUP2</i>	Oligo-s	5'-CTCCAACCAGAGAGTGTCTCCATCG-3'	58
	Oligo-as	5'-TCAGTCCGCATCTGCTTCTGC-3'	58
<i>KUP3</i>	Oligo-s	5'-ATGATGGGAGAATGGCCGTTCT-3'	58
	Oligo-as	5'-CCTCGTACACTGAACGCAAACCTCTG-3'	58
<i>KUP4</i>	Oligo-s	5'-TGGGACAAGGCTGTCTCGGTCTATA-3'	58
	Oligo-as	5'-GCCTCGGAAGCTCTTGCTCATAAC-3'	58
<i>KUP5</i>	Oligo-s	5'-GGAGGCGATGGGTCTGAGATTG-3'	58
	Oligo-as	5'-CGGAATCCATTTCCGGGTGAT-3'	58
<i>KUP6</i>	Oligo-s	5'-GCAGAGACCAACGGAGAGGATGA-3'	58
	Oligo-as	5'-CCGGGACAACAAACCTCACTCTC-3'	58
<i>KUP7</i>	Oligo-s	5'-TGGCGGAGGAAAGCAGTATGG-3'	58
	Oligo-as	5'-AGTCCAGTACCGTCGAATCCATCA-3'	58
<i>KUP8</i>	Oligo-s	5'-ATGAGAGGCTAACTGTCGTCGCG-3'	60
	Oligo-as	5'-TCGATCCTCGCACTTTCTGGTAAC-3'	60
<i>KUP9</i>	Oligo-s	5'-GATGGAGCCAACCTCAAACCTCAAGC-3'	58
	Oligo-as	5'-CCATGTTGTTGTTGTGGTTGTGGT-3'	58
<i>KUP10</i>	Oligo-s	5'-AGAGGGGATTAGGGTCTGGGT-3'	58
	Oligo-as	5'-GGCGACCAGCTTCTTCATCCATAG-3'	58
<i>KUP11</i>	Oligo-s	5'-AGTCAAACGCAGCTCTCTTGC-3'	58
	Oligo-as	5'-CACCCATCGTTGCTGCTTCTACTC-3'	58
<i>CAT</i>	Oligo-s	5'-TGGATCTTACTGGTCTCAGGC-3'	55
	Oligo-as	5'-CGAGAGACACAACAACACACAAGG-3'	55
<i>TUB4</i>	Oligo-s	5'-GAGGGAGCCATTGACAACATCTT-3'	65
	Oligo-as	5'-GCGAACAGTTCACAGCTATGTTTC-3'	65

3.12 Microscopia

3.12.1 Preparación de muestras

Preparación de muestras para inmunohistoquímica

Se realizaron dos tipos de preparaciones, una en cortes preparados a partir de bloques de acrilamida y otra en resina LR White (LRW).

Para la localización de la expresión de *NRAMP5* mediante inmunohistoquímica las plantas crecieron en hidroponía y posteriormente se aplicó el tratamiento con Cd 50 μ M durante 72 h. Se cortaron las raíces evitando la parte apical y se incubaron durante 1 h 30 min a 4°C en solución de fijación PIPES-KOH (pH 7,4) con glutaraldehído 0.2% (v/v) y paraformaldehído al 4% (p/v), se infiltraron a vacío durante 4-10 min en el caso de las hojas y posteriormente se realizaron tres lavados de 10 min cada uno en tampón PIPES.

- *Bloques de acrilamida*

Para preparar los bloques de las muestras se eliminó el tampón PIPES y se incubó en oscuridad durante 3 h en una solución de infiltración compuesta por acrilamida/bisacrilamida 30% (15%, p/v), PBS (fosfato-K 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM) y TEMED 10% (v/v). Posteriormente se obtuvieron los bloques (Figura 3.7) conteniendo el tejido mediante la polimerización de la solución de infiltración con persulfato al 2% (p/v) en moldes de 1,5 x 0,9 x 0,5 mm (Sorvall). Finalmente se sacaron los bloques cubriéndolos con PBS1x: Glicerol al 50% (1:1) y posteriormente se cortaron con un vibratomo Leica VT 1200 S con una vibración con amplitud de 0,4 y velocidad de corte de 0,4 m/s, en secciones de 60 μ m.

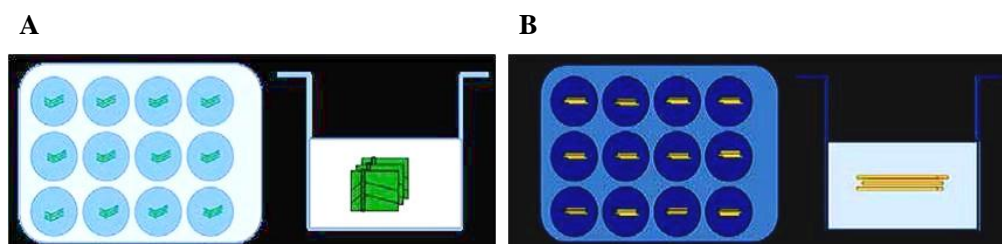


Figura 3.7. Material vegetal incluido en los bloques de acrilamida, hoja (A) y raíz (B).

Se colocaron los cortes en eppendorfs para las incubaciones posteriores.

- *Bloques en resina LR White*

Los cortes de hoja y raíz (1-2 mm²) se fijaron en una solución de glutaraldehído al 0,2% (v/v) y peformaldehído al 4% (p/v) en tampón Pipes-KOH 50 mM, pH 7,4, durante 1 hora a 4°C. Los cortes se lavaron tres veces con el mismo tampón y se deshidrataron en series escalonadas de etanol (30-100%; v/v) con intervalos de 20 min. A partir del 70 % de etanol, las muestras se mantuvieron a -20°C. Después de la deshidratación, los cortes fueron infiltrados en series graduales de resina LR White (LRW) en etanol (25-100%; v/v) con intervalos de 4 horas e infiltración final de 12 horas. La polimerización se realizó a -20°C en luz ultravioleta (Sandalio y col., 1997). Los últimos pasos se llevaron a cabo en el Centro de Instrumentación Científica de Granada (CIC).

3.12.2 Tinciones histológicas

- **Detección de núcleos (DAPI)**

La tinción de los núcleos se llevó a cabo utilizando el colorante fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) según las indicaciones del fabricante (Roche, Alemania). Para ello se lavaron las muestras tres veces con PBS y se incubaron con DAPI 3,6 µM durante 5 min para marcar los núcleos. A continuación, se colocaron las muestras en el portaobjetos y se observaron directamente en el microscopio de fluorescencia, registrando su emisión a 480 nm (Vergne y col., 1987).

- **Detección de contornos celulares (Yoduro de propidio)**

El yoduro de propidio, C₂₇H₃₄I₂N₄ (PI), es un agente que se intercala en las moléculas de DNA y RNA y una molécula fluorescente que se puede utilizar para teñir las células, ya que es impermeable a membranas biológicas. Los cortes se incubaron con PI 10 µg/ml durante 5 min y posteriormente se lavó con agua destilada. Se observó directamente en un microscopio invertido de epifluorescencia Leica DMI600B y microscopio confocal utilizando un láser Helio-Neón con excitación: 543 nm y emisión: 620 nm. El contorno celular se observó en color rojo.

- **Detección de acúmulos de hierro (Perls)**

Se empleó la tinción Perls o azul de Prusia para localizar acúmulos de Fe en los tejidos. Para ello se utilizó tejido tanto de hoja como de raíz de plantas crecidas en hidroponía o en placa y posterior tratamiento de 1 semana en presencia o ausencia de

hierro. En primer lugar los tejidos se incubaron en una solución de fijación compuesta por (metanol/cloroformo/ácido acético) en proporción (6:3:1) durante 1h a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron tres lavados en agua destilada y se aplicó el reactivo Perls (potassium ferrocyanide) preparado al 4% HCl y 4% K-ferrocyanide en proporción (1:1) y se incubó durante 8 o 24 horas a temperatura ambiente y en agitación. Durante la reacción, las zonas de los tejidos que presentan acumulación de hierro oxidan la ferrocianida a ferricianida produciendo precipitados de color azul. Para detener la reacción se lavó el tejido tres veces con agua destilada y se conservó en etanol absoluto. Las imágenes fueron escaneadas y cuantificadas con el programa ImageJ 1.45.

- **Detección y localización de acúmulos de cadmio**

El Cd se localizó en los tejidos de las plántulas de *A. thaliana* mediante el método de tinción con ditizona (Difeniltiocarbazona) (Seregin y Ivanov, 1997; Clabeaux y col, 2011). Las plántulas se cultivaron en el medio Hoagland durante 10 días, como se ha descrito anteriormente y posteriormente se sometieron a un tratamiento con cadmio 50 μM durante 24 horas. A continuación, las plántulas se lavaron minuciosamente con agua MilliQ y se tiñeron con solución de ditizona (4,5 mg de ditizona disuelta en 9 ml de acetona con adición de 15 ml de ácido acético glacial y 3 ml de agua MilliQ) durante 1 h. Después de un lavado cuidadoso para la eliminación del exceso de ditizona de la superficie, las plántulas se examinaron con un estereomicroscopio Leica M165FC.

- **Detección de la Actividad β -glucuronidasa (GUS)**

Las plantas de las líneas transgénicas crecidas en cultivo hidropónico con o sin tratamiento con Cd 50 μM durante 24 y 48 horas se colocaron en tubos eppendorf y se enjuagaron en tampón fosfato sódico 50 mM 0.05% Tritón X-100, pH 7,2. Posteriormente, se prefijaron por infiltración a vacío durante 45 min en buffer fosfato sódico pH 7,2 con 4% de formaldehído, se lavaron las muestras tres veces en buffer fosfato sódico y se embebieron en la disolución de reacción $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.5 mM, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.5 mM, Tritón X-100 0.05 % (v/v), 5-Bromo-4-chloro-3-indolil- β -D-glucuronido ciclohexilamonio (X-gluc; Applichem) 1 mM, NaPO_4 50 mM pH 7,2 (Jefferson, 1987) mediante infiltración con una bomba de vacío durante 5 min. A continuación, las muestras se incubaron en oscuridad a 37°C hasta observar la aparición de la tinción azul (16 horas) y posteriormente se lavaron con tampón fosfato sódico para

detener la reacción y eliminar la solución de GUS. Se lavó con etanol a concentraciones crecientes para eliminar los pigmentos de las clorofilas, 30% 1h, 50% 1h, y finalmente 70% (30-70%). La señal GUS se observó directamente en un estereomicroscopio Leica M165FC.

3.12.3 Localización de proteínas mediante análisis de GFP (green fluorescence protein)

Para la detección de la señal GFP (del inglés “*green fluorescence protein*”) se crecieron las líneas mutantes *pNRAMP5::NRAMP5: GFP*, en cultivo hidropónico y se sometieron a un tratamiento con Cd 50 μ M durante 24 y 48 h. Las muestras de raíces y hojas se colocaron en portas con cubreobjetos para su observación in vivo. Para la detección de la señal GFP, se utilizó un microscopio laser confocal (CLSM) Leica DMI6000 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Heidelberg, Alemania). La GFP se excitó con un láser de 480 nm, y su emisión se recogió entre 500 nm y 520 nm (máximo de emisión: 509 nm). Las imágenes finales se obtuvieron como la proyección máxima de 8 planos en el eje Z.

3.12.4 Técnicas inmunohistoquímicas

Para aumentar la señal GFP previamente identificada y confirmar los resultados se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica, de GFP.

- **Inmunohistoquímica y revelado con DAB**

Para realizar este ensayo se emplearon los cortes de 60 μ m de sección previamente preparados. Las muestras se incubaron en una solución de PBS 1% + H₂O₂ 1% durante 30 min a temperatura ambiente, se lavaron con PBS 1x y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo PBS pH 7,3 con 5% BSA y 0,1% Tween20. Posteriormente, los cortes se colocaron en los portaobjetos tratados con adhesivo TESPA para una mejor adhesión y se incubaron durante 6 h a temperatura ambiente con el anticuerpo primario anti-GFP (*Agrisera*TM) diluido 1:50 en la solución PBS (1 μ l anti-GFP con 0,5% BSA y 0,01% Tween20). Tras tres lavados con PBS 1x de 10 min cada uno se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG unido a la peroxidasa de rábano (HRP) diluido 1:50 (1 μ l α -IgG-HRP con 0.5% BSA y 0.01% Tween20) durante toda la noche a 4°C. Tras tres lavados de PBS 1x de 10 min cada uno se procedió al revelado con DAB utilizando una solución de 100 μ l Tris-HCl 50 mM pH 7,6 conteniendo 25 μ l de

DAB al 2% (0,02g/1ml agua miliQ). Se dejó secar y posteriormente se lavó con agua MiliQ y se añadió una gota de gelatina o glicerol 50% sobre las muestras, sellando finalmente con los cubreobjetos. Se observaron al microscopio óptico los precipitados marrones debidos al DAB.

- **Inmunohistoquímica de GFP**

Para llevar a cabo esta técnica se emplearon los cortes de 60 μm preparados como se ha descrito anteriormente. Primero se realizó el bloqueo con la solución descrita en el apartado anterior PBS1x con 5%BSA y 0,1 % Tween 20 durante 1 h y tras tres lavados de 15 min con PBS 1x se incubó durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C y en oscuridad con el anticuerpo primario anti-GFP preparado en dilución 1:50 en PBS 1x con 0.5% BSA y 0,01% Tween 20. Posteriormente, se lavaron las muestras tres veces durante 15 minutos cada una con PBS 1x para eliminar el exceso de anticuerpo primario. Las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario IgG Dylight 680 obtenido en cabra (Agrisera), preparado a 1:100 en PBS1x durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C y en oscuridad. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 15 min con PBS 1x y otros 3 lavados de 15 min con agua esteril y se dejó secar durante toda la noche en oscuridad. Finalmente se añadió una gota en cada portaobjetos de glicerol conteniendo “antifading” a 46,23 mM (5ml PBS 1X pH 12 y 25 mg de p-fenilendiamina) para evitar el desvanecimiento de la fluorescencia y se sellaron las preparaciones.

Se observó la fluorescencia debida al fluoróforo Dylight 680 (682 exc; 715 em) en el microscopio invertido de epifluorescencia Leica DMI600B.

3.13 Análisis bioinformático

Para determinar el gen responsable del fenotipo de los mutantes seleccionados de la colección de semillas con inserción de T-DNA, se han utilizado las bases de datos disponibles en la página web del “SALK-Institute” (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/homozygotes.cgi>). Se diseñaron oligonucleótidos para verificar la condición de homocigosis de las líneas seleccionadas y estudiar la posible disrupción o sobre-expresión del gen de interés. Para ello se empleó la aplicación bioinformática “input3” (<http://primer3.ut.ee/>), el programa “T-DNA Primer Design” (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) y la aplicación bioinformática “Beacon Designer” (<http://www.premierbiosoft.com/qOligo/>).

La clasificación de los genes responsables del fenotipo observado en diferentes categorías según su función se realizó mediante el programa MapMan (<http://mapman.gabipd.org/>). Además, se emplearon las bases de datos “BAR ePlant” (<http://bar.utoronto.ca/eplant/>) y “TAIR” (<https://www.arabidopsis.org>), para buscar los patrones de expresión de los genes identificados. También se emplearon los programas “GENEVESTIGATOR” (<https://genevestigator.com/>) y “GeneMANIA” (<http://genemania.org/>) para ampliar información sobre la función y la expresión génica.

Las secuencias correspondientes a los genes estudiados fueron obtenidas a partir de la base de secuencias del European Molecular Biology Laboratory (EMBL; www.embl.de/), de la base de datos de secuencias GeneBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) y las aplicaciones disponibles en las bases de datos “TAIR BLAST 2.2.8” (<http://www.arabidopsis.org/Blast/>). Para la construcción del árbol de homologías entre los miembros de las diferentes familias génicas se utilizó el programa “Vector NTI®” que permitió el alineamiento de las secuencias proteicas, previamente obtenidas de la base de datos “UniProt.” (<http://www.uniprot.org/>)

Las imágenes se han cuantificado con los programas “Adobe Photoshop” y el programa “ImageJ”. Las medidas de longitud de raíces se han efectuado utilizando como herramienta el programa “ImageTool”.

3.14 Análisis estadístico

Todos los resultados de este trabajo fueron tratados estadísticamente mediante el programa Microsoft Excel 2010 y el programa “IBM SPSS Statistics 20”. Se realizó una estadística descriptiva obteniendo los promedios, errores estándar, y comprobando las diferencias entre grupos de datos mediante la aplicación de pruebas de significancia por el Test de Student, asumiendo una distribución normal de los datos. De este modo cada resultado es el promedio de los datos obtenidos y lleva asociado un error estándar.

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

La significancia en las diferencias entre grupos de datos se encuentra representada en las gráficas en forma de asteriscos o letras y siempre hacen referencia a las diferencias entre genotipos mutantes y WT. La forma de indicar el grado de significancia (p valor) se establece por el número de asteriscos que acompañen al dato en forma de barra o punto ($p < 0,001 = ***$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,05 = *$) para el test de Student y la letra que acompaña al dato para el test de Duncan.

4 Resultados

4.1 Selección del medio de cultivo y mezcla de metales pesados para la selección de mutantes

4.1.1 Concentración de metales en los suelos de estudio

Para llevar a cabo la selección de mutantes fue necesario determinar previamente las condiciones óptimas de los ensayos de tolerancia fijando en los medios de cultivo las concentraciones de metales más adecuadas. Para ello se utilizó el medio Hoagland (Hoagland y Arnon, 1953) en placas Petri, al que se añadió diferentes concentraciones de metales basadas en los datos conocidos del contenido en metales pesados de los suelos mineros de Riotinto y Alquife, ambos caracterizados por la Doctora Mingorance del Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra (CSIC, IACT, Granada; Peña y col., 2015; Sevilla-Perea y Mingorance, 2015). Los metales pesados principales y sus concentraciones en los suelos de las minas de Alquife y Riotinto se presentan en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. pH y concentraciones de metales presentes en los suelos de Alquife y Riotinto.

Suelo	pH	Cadmio (μM)	Cobre (μM)	Plomo (μM)	Níquel (μM)	Cromo (μM)
Riotinto	5	50	100	160	-	-
Alquife	8	50	100	-	75	75

4.1.2 Búsqueda del medio de cultivo de trabajo

Para establecer las condiciones adecuadas para obtener un crecimiento de las plantas de *Arabidopsis silvestres* que nos permitiera realizar estudios fisiológicos en las mismas, se utilizaron distintas mezclas de metales y pH, lo más parecido a las condiciones originales del suelo. Para ello utilizamos un medio Hoagland 0,5x (Hoagland y Arnon, 1953; Tabla 3.2) modificado con una mezcla de un máximo de tres metales para permitir el crecimiento de la planta. Sobre la base de las concentraciones de metales pesados existentes en los suelos se utilizaron tres mezclas de metales diferentes, uno basado en los suelos de Riotinto (RT1) y otros dos basados en los suelos de Alquife (AL1 y AL2) como se especifica en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Concentración de metales en los distintos medios utilizados.

Medio	pH	Cadmio (μM)	Cobre (μM)	Plomo (μM)	Níquel (μM)	Cromo (μM)
RT1	5	50	50	160	-	-
AL1	8	50	100	-	-	150
AL2	8	50	100	-	75	-

En primer lugar se ensayó un medio conteniendo el 100% de las concentraciones de los metales y no se observó germinación en ninguno de los casos (Figura 4.1):

- Medio RT1: 100% Cd (50µM), 100% Cu (100µM), 100% Pb (160 µM) pH 5.0
- Medio AL1: 100% Cd (50µM), 100% Cu (100µM), 100% Cr (150 µM) pH 8.0
- Medio AL2: 100% Cd (50µM), 100% Cu (100µM), 100% Ni (75 µM) pH 8.0

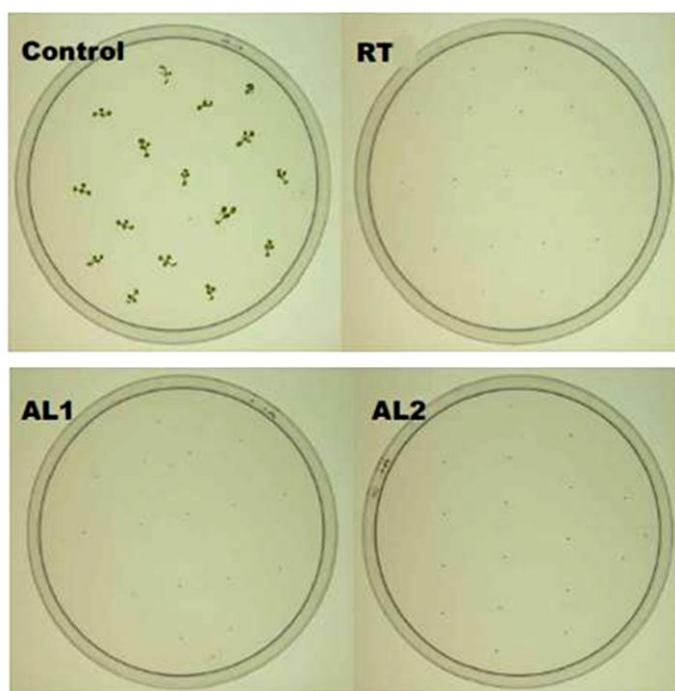


Figura 4.1. Efecto de las distintas mezclas de metales sobre la germinación de semillas de Arabidopsis WT tras 11 días después de su siembra.

Debido a la ausencia de germinación en las concentraciones de metales presentes en los suelos estudiados (100%), se utilizó un medio que contenía un 10 % respecto a la concentración original. En la Tabla 4.3 se muestran las diferentes concentraciones de metales utilizadas. En este caso se observó germinación, y desarrollo de la raíz y parte aérea de las plántulas en todos los medios (Figura 4.2).

Tabla 4.3. Concentración final de metales en el medio conteniendo el 10 % de la concentración original en los suelos.

Medio	pH	Cadmio (µM)	Cobre (µM)	Plomo (µM)	Cromo (µM)	Níquel (µM)
RT1/10	5	5	10	16	-	-
AL1/10	8	5	10	-	15	-
AL2/10	8	5	10	-	-	7,5

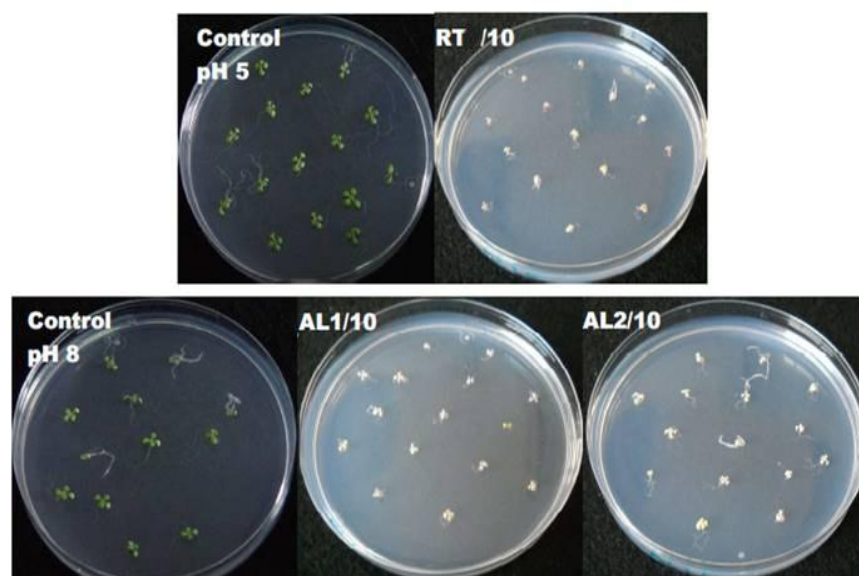


Figura 4.2. Crecimiento de las plántulas tras 11 días de la siembra en los medios al 10 % de la concentración de metales.

Posteriormente, se aumentaron progresivamente las concentraciones de metales como se muestra en la Tabla 4.4, hasta obtener las más próximas a las condiciones reales del suelo que permitían la germinación y el crecimiento de las plántulas (Figura 4.3).

Tabla 4.4. Concentración de metales en los distintos medios analizados.

Medio	pH	Cadmio (µM)	Cobre (µM)	Plomo (µM)	Níquel (µM)	Cromo (µM)
RT1a	5	25	50	52,8	---	---
RT1b	5	25	25	52,8	---	---
RT1c	5	50	25	52,8	---	---
AL1a	8	25	50	---	---	24,75
AL1b	8	25	25	---	---	24,75
AL1c	8	50	25	---	---	24,75
AL2a	8	25	50	---	50	---
AL2b	8	25	25	---	50	---
AL2c	8	50	25	---	50	---

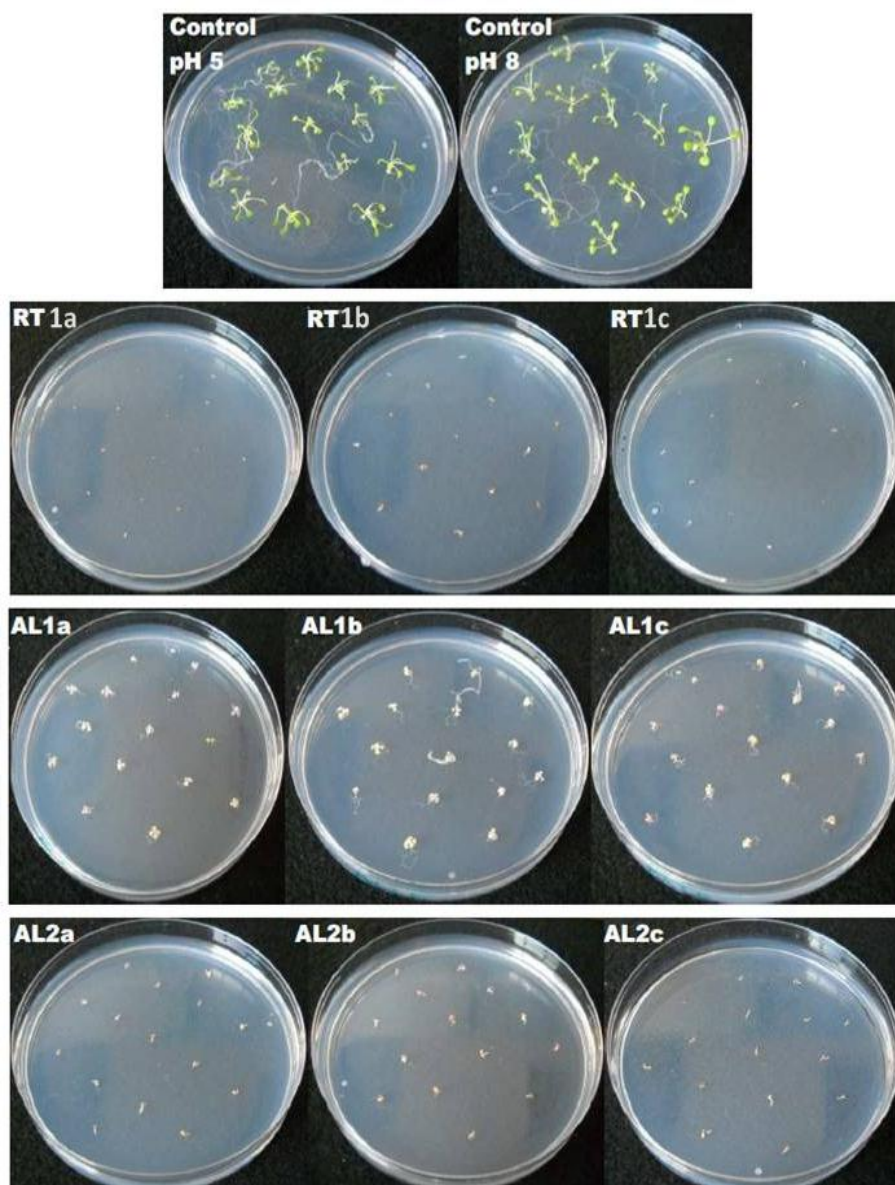


Figura 4.3. Germinación y crecimiento de plántulas de *Arabidopsis* a los 11 días en los medios con los metales de la Tabla 4.4.

Los resultados obtenidos para cada medio en cuanto a germinación, longitud de raíz y tamaño de las hojas, se describen en la Tabla 4.5. Se observó que las plantas que mejor se adaptaban a las condiciones del medio fueron las crecidas en el medio AL1 (a, b y c), mientras que las que peor respondieron fueron las crecidas en RT1, donde el pH ácido o el Pb pudieron actuar como factores limitantes.

Tabla 4.5. Germinación y crecimiento de las plántulas en los diferentes medios de la. Tabla 4.4. Se expresan con “+” la respuesta positiva y con “-” la negativa.

Medio	Germinación	Crecimiento	
		Raíz	Hoja
Control	+++	+++	+++
RT1a	-	-	-
RT1b	+++	-	+
RT1c	+	-	-
AL1a	+++	+	++
AL1b	+++	++	++
AL1c	+++	++	++
AL2a	+++	+	+
AL2b	+++	+	+
AL2c	+++	-	-

4.1.3 Ajuste en la concentración de metales del medio

Como la combinación de metales a la que mejor respondieron las semillas fue la de Cd, Cu, Cr a pH 8 (el medio AL1), se continuó trabajando únicamente con este medio. Se ajustaron nuevamente las concentraciones de metales para que se aproximaran a las condiciones del suelo original. En la Tabla 4.6 se muestra la composición de los diferentes medios a partir de AL1 que fueron ensayadas. Se utilizó también el crecimiento en vertical, lo que favorecería el desarrollo y medida de la raíz, así e observó la germinación y el crecimiento de la raíz en los diferentes medios (Figura 4.4).

Tabla 4.6. Concentraciones de metales utilizados para los distintos medios de AL1.

Medio	pH	Cadmio (μM)	Cobre (μM)	Cromo (μM)
AL1a	8	25	50	50
AL1c	8	50	25	50
AL1d	8	50	50	75
AL1e	8	50	75	75
AL1f	8	50	50	100
AL1g	8	50	25	100
AL1h	8	50	100	75
AL1i	8	50	100	50
AL1j	8	40	80	120
AL1k	8	50	25	75
AL1l	8	50	50	50

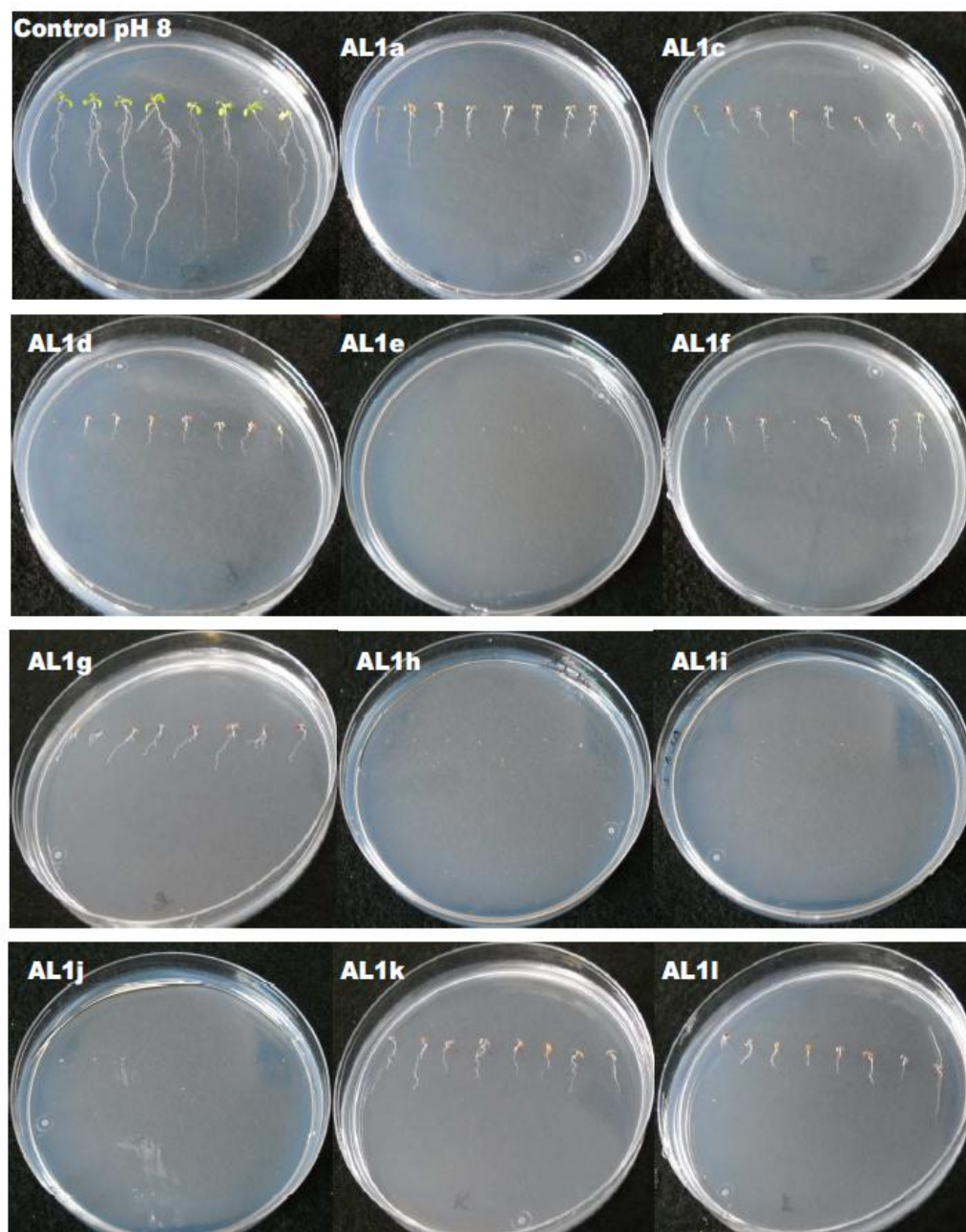


Figura 4.4. Germinación y desarrollo de la raíz de plántulas de *Arabidopsis* a los 7 días en los diferentes medios utilizados respecto del control.

Como se puede observar en la Figura 4.4, las semillas que se sembraron en los medios con una concentración de Cu superior a $50 \mu\text{M}$ no germinaron, por lo que se decidió realizar la selección con una concentración máxima de Cu de $50 \mu\text{M}$.

En la Figura 4.5 se muestra la longitud de la raíz a los 7 y 11 días de la siembra con los medios de la Tabla 4.6.

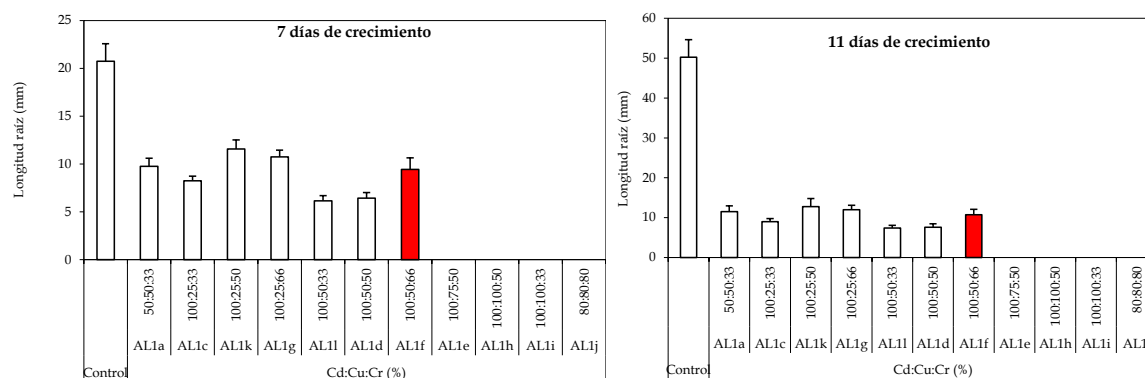


Figura 4.5. Longitud de la raíz de plantas crecidas en cada una de las concentraciones de metales de la Tabla 4.6 a los 7 y 11 días de cultivo.

Los resultados obtenidos en cuanto a germinación, longitud de raíz y tamaño de las hojas, se describen en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7. Germinación y crecimiento a los 11 días de plántulas cultivadas con los medios de la Tabla 4.6. Se expresan con “+” la respuesta positiva y con “-” la negativa.

Medio	Germinación	Crecimiento	
		Raíz	Hoja
Control	+++	+++	+++
AL1a	+++	++	++
AL1c	+++	++	+
AL1d	+++	++	++
AL1f	+++	++	++
AL1g	+++	+	+
AL1k	+++	+	+
AL1l	+++	++	++
AL1e	-	-	-
AL1h	-	-	-
AL1i	-	-	-
AL1j	-	-	-

Comprobamos de nuevo la germinación y el crecimiento de las semillas en los medios anteriormente seleccionados (AL1a, AL1c, AL1d, AL1f, AL1g, AL1k, AL1l) y se tomaron imágenes a los 7 días (Figura 4.6), ya que a partir de ese día el crecimiento prácticamente se detiene (Figura 4.5).

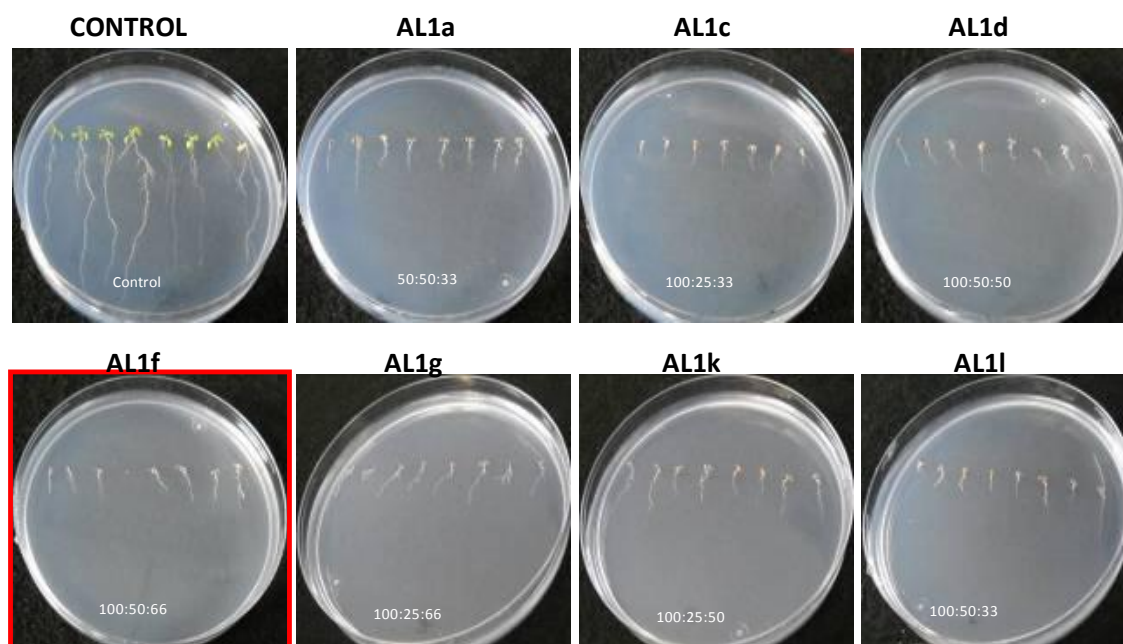


Figura 4.6. Germinación y crecimiento de plantas a los 7 días.

Como se muestra en los resultados de la Tabla 4.7, las semillas que mejor crecieron fueron las sembradas en los medios AL1a, AL1d, AL1f y AL1. Con este resultado y basándonos en la Tabla 4.6 de los medios probados a partir de AL1, la mezcla de metales que más se asemeja a las concentraciones originales en los suelos de Alquife es AL1f. Es por ello, que se eligió este medio para realizar la selección de mutantes con diferente sensibilidad a los metales con respecto al WT, siendo la concentración de metales Cd, Cu y Cr de 50, 50 y 100 μM , respectivamente; o lo que es lo mismo, 100, 50 y 66 % respectivamente de la concentración de metales sobre el suelo original y a pH 8.0.

4.2 Selección de mutantes con diferente tolerancia a metales pesados

4.2.1 Colección de semillas de *Arabidopsis thaliana* L. y criterio de selección.

Para la búsqueda de mutantes con tolerancia diferencial a metales pesados se llevó a cabo una selección utilizando una colección de mutantes de *Arabidopsis thaliana* L. de 6867 líneas mutantes homocigotas con una inserción de T-DNA disponibles en nuestro laboratorio. Todas las líneas de esta colección se han generado utilizando como fondo genético Col-0.

Se realizó una selección de las líneas mutantes en relación a la respuesta a los metales pesados presentes en el medio de trabajo seleccionado con respecto al fenotipo silvestre (WT), adoptando como criterio la longitud de la raíz principal a los 7 días de

crecimiento (como parámetro indicador de tolerancia); seleccionándose como sensibles las líneas con una reducción en la longitud de la raíz respecto del fenotipo silvestre y resistentes las que muestran mayor longitud que el fenotipo silvestre (WT) (Figura 4.7).



Figura 4.7. Selección de líneas resistentes y sensibles. Resistente (verde) y sensible (amarillo) respecto del fenotipo silvestre según la longitud de la raíz principal.

La siembra y selección se realizó en placas Petri cuadradas de 10 x10 cm con el medio seleccionado y adicionando 8 g/l de fitoagar. En cada placa se dispusieron 64 semillas, 16 líneas diferentes con cuatro semillas por línea manteniendo entre ellas una distancia apropiada para evitar el solapamiento de las raíces. En la parte izquierda de cada línea se sembró el WT como control (Figura 4.8).

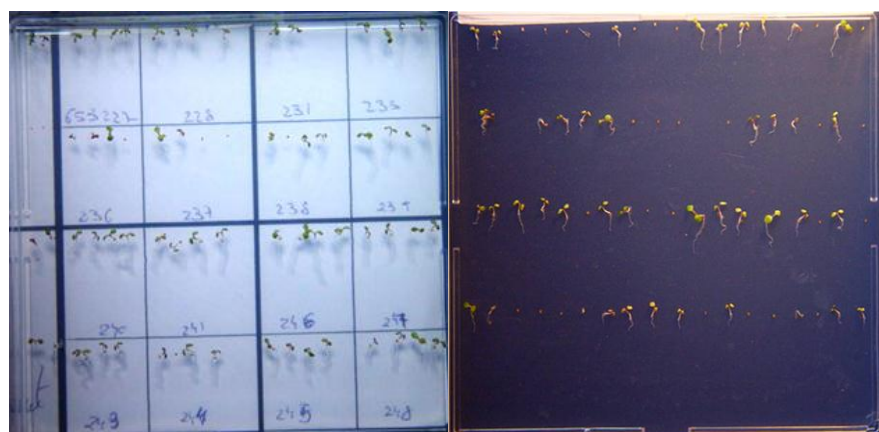


Figura 4.8. Imagen representativa de una placa de la selección con 16 líneas mutantes después de 7 días de cultivo.

En esta primera selección se obtuvieron 164 líneas más resistentes y 85 más sensibles, respecto a las plantas WT. Estas primeras líneas seleccionadas se propagaron y se recogieron semillas frescas para confirmar el fenotipo con un mayor número de semillas por línea. Así, se sembraron 10 semillas de cada línea y se repitió la selección. Confirmamos en esta segunda selección 74 líneas que presentaron fenotipo resistente y 56 líneas más sensibles respecto del fenotipo silvestre. De las 56 líneas sensibles seleccionadas solo 46 líneas no presentaban diferencias en el crecimiento respecto de las plantas WT en condiciones normales (sin metales) (Figura 4.9).

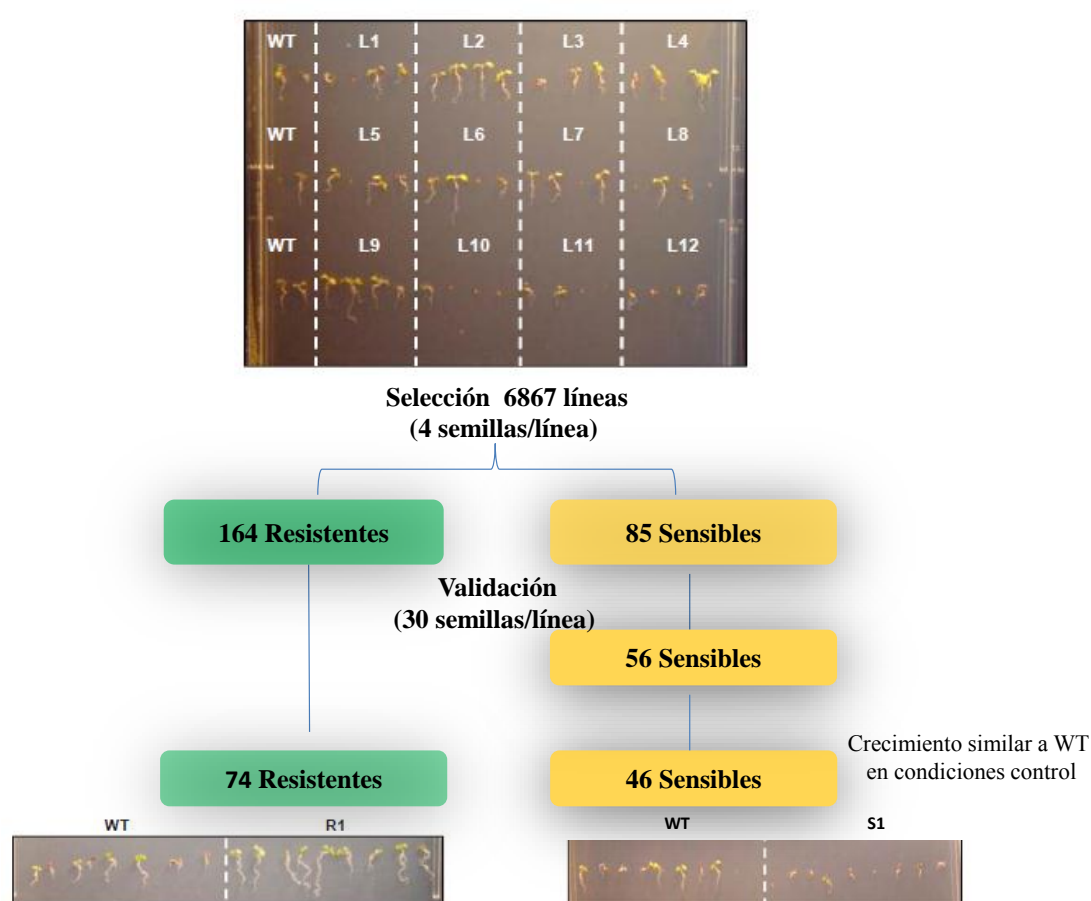


Figura 4.9. Esquema de las selecciones realizadas en la colección de mutantes (Ln). Confirmación de la 1ª selección y la verificación de las líneas identificadas como resistentes (R1) y como sensibles (S1).

4.2.2 Comprobación de los resultados de la selección

Con el fin de comprobar los resultados obtenidos, se sembraron un número mayor de semillas por línea (30) y se midió la longitud de la raíz principal de las líneas seleccionadas como resistentes respecto del WT utilizando el programa Image Tools (Figura 4.10). Se realizó el análisis estadístico con las medidas de las raíces, en el caso de las líneas resistentes ya que en el caso de las líneas sensibles la mayor parte de ellas prácticamente no presentaban raíz.

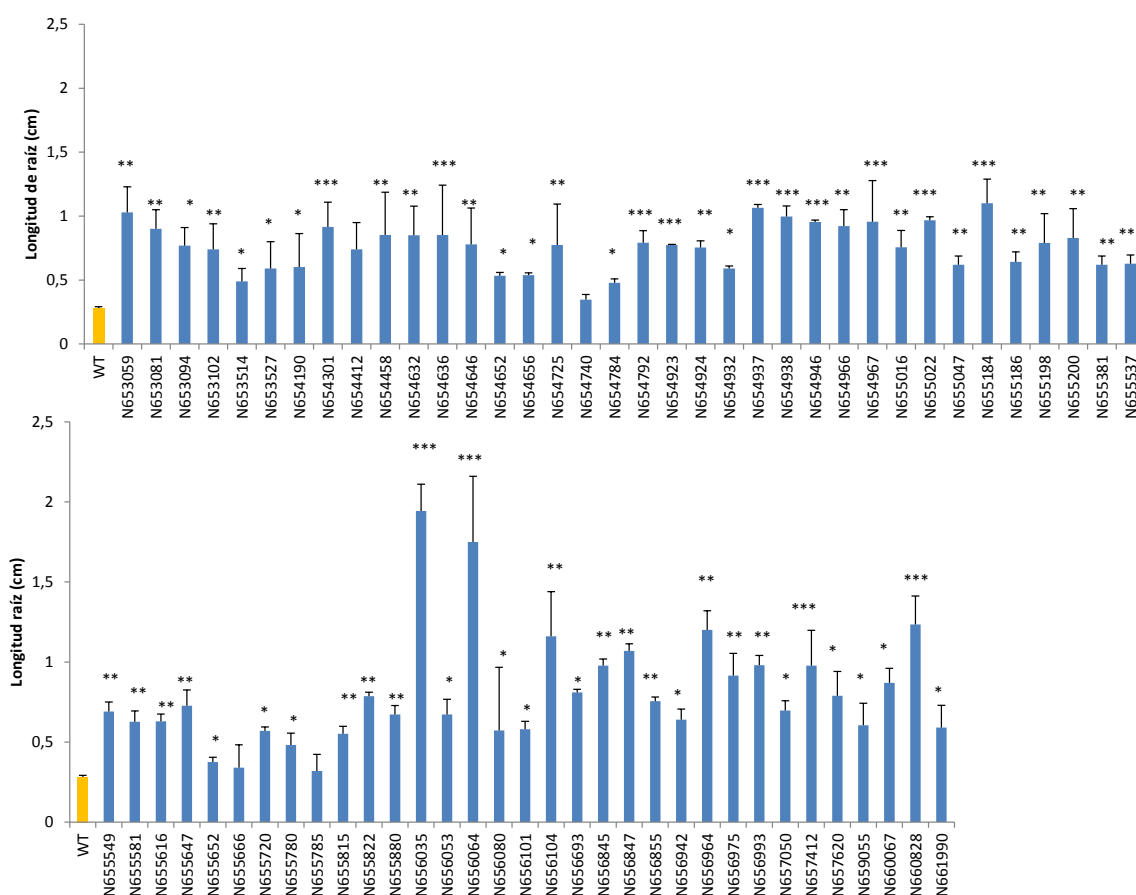


Figura 4.10. Longitud de la raíz de las líneas resistentes seleccionadas. El grado de significancia (p valor) se establece por el número de asteriscos que acompañen al dato ($p < 0,001 = ***$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,05 = *$), con respecto al WT.

4.3 Identificación y clasificación de los genes responsables de la diferente tolerancia a metales pesados

Una vez realizada la selección y conocida la respuesta frente a los metales en comparación al WT de cada una de las líneas de mutantes seleccionadas, se procedió a la identificación del gen afectado por el inserto de T-DNA, disponible en la base de datos del SALK-Institute y la función molecular asignada según las bases de datos disponibles en la página web del SALK-Institute (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/homozygotes.cgi>) y “TAIR” (<https://www.arabidopsis.org/>). Las líneas que presentaron resistencia a metales con respecto al WT se presentan en la Tabla 4.8 y las líneas de mutantes que presentaron mayor sensibilidad frente a los metales se muestran en la Tabla 4.9.

Tabla 4.8: Mutantes que presentan resistencia frente a la mezcla de metales pesados, V_s WT. Cr: crecimiento relativo (vs WT)

Cr	NASC	id	Clasificación	Descripción
2.60	N655785	at5g35560	No asignado	Dominio de proteínas que contienen DENN (AEX-3)
2.74	N654725	at4g27990	No asignado	Familia de proteínas YGGT
1.64	N657412	at1g55930	No asignado	Proteína que contiene dominio CBS / proteína que contiene el dominio
3.00	N655720	at5g52710	No asignado	Proteínas que contienen dominio asociado a metales pesados
2.52	N656993	at3g20270	No asignado	Proteína de la familia de las glicoproteínas unidas a lípidos
2.97	N654792	at2g28880	No asignado	emb1997 emb1997 Antranilato sintasa / catalizador / oxo-ácido-liasa
2.83	N656942	at3g26630	No asignado	Proteína conteniendo repetición pentatricopeptido (PPR)
2.52	N659055	at4g11390	No asignado	Dominio DC1
2.42	N654301	at4g13500	No asignado	Proteína desconocida
3.16	N656845	at5g26090	No asignado	Proteína desconocida
1.82	N654656	at1g29060	No asignado	Función molecular desconocida
1.92	N656080	at4g24970	No asignado	Región de unión a ATP, proteína que contiene dominio ATPasa
2.47	N655666	at2g32905	No asignado	Proteína desconocida
2.94	N653514	at1g54840	No asignado	Función molecular desconocida
4.21	N654938	at2g25920	No asignado	Función molecular desconocida
2.63	N654632	at1g26945	No asignado	KDR KDR (KIDAR); regulador de transcripción
2.42	N654301	at4g13510	Transporte amonio	AMT1;1, ATAMT1, ATAMT1;1 AMT1;1 transportador de amonio transmembrana
3.18	N655822	at4g18790	Transporte metales	Familia NRAMP ; transportador transmembrana de iones metálicos
5.83	N655047	at5g14880	Transporte potasio	Transporte potasio
3.20	N655616	at1g08960	transporte calcio	CAX11, ATCAX11 CAX11; transportador Ca-Na
3.20	N655616	at2g05760	Transporte	Proteína de la familia xantina / uracilo permeasa
6.12	N655184	at1g16790	Proteínas síntesis. Proteína ribosomal	Proteínas ribosómicas
3.40	N655880	at3g17340	Proteína. Núcleo	Unión / transportador de proteínas
3.38	N656847	at3g21650	Proteína modificación post-traducciona	Serina / treonina proteína fosfatasa 2A (PP2A) subunidad reguladora B'

Tabla 4.8: Mutantes que presentan resistencia frente a la mezcla de metales pesados, Vs WT. Cr: crecimiento relativo (vs WT)

Cr	NASC	id	Clasificación	Descripción
2,40	N657620	at3g26260	Proteína.degradación.cisteína.proteasa	Gen elemento transponible
1,63	N656964	at2g02360	Proteína. Degradación. Ubiquitina.E3.SCF.FBOX	AtPP2-B10 AtPP2-B10 (Phloem protein 2-B10); Unión de carbohidrato
3,59	N654646	at4g12560	Proteína. Degradación. Ubiquitina.E3.SCF.FBOX	Proteína familia F-box
2,36	N654190	at2g26850	Proteína. Degradación. Ubiquitina.E3.SCF.FBOX	Proteína familia F-box
2,42	N655381	at5g37030	Síntesis DNA/estructura cromatina	Endonucleasa tRNA-de empalme de efector-relacionado positivo
3,68	N654966	at1g23990	Síntesis DNA/estructura cromatina	Gen elemento transponible
2,79	N656104	at1g36090	Síntesis DNA/estructura cromatina	Gen elemento transponible
3,26	N655647	at5g64420	Reparación DNA	Familia de DNA polimerasa V
3,13	N656101	at4g10200	DNA.inespecifico	hAT proteína dimerización dominio-contenido / transposase-relacionada
2,90	N654932	at1g06670	DNA.inespecifico	NIH NIH (NUCLEAR DEIH-BOXHELICASE); DNA unión / DNA helicasa
2,54	N656975	at3g46960	DNA.inespecifico	ATP unión / helicasa ATP-dependiente/ hidrolasa
2,61	N660828	at5g62000	RNA.regulación transcripción	ARF2, ARF1-BP, HSS ARF2 (FACTOR DE RESPUESTA AUXINA 2)
5,14	N656035	at3g19510	RNA.regulación transcripción	HAT3.1 HAT3.1; unión DNA
2,23	N654412	at5g38620	RNA.regulación transcripción	MADS-box protein (AGL73)
9,24	N654946	at1g06910	RNA.regulación transcripción	TRFL7 TRFL7 (TRF-LIKE 7); unión DNA
3,16	N653102	at3g06490	RNA.regulación transcripción	MYB108, AtMYB108, BOS1 MYB108 ; unión DNA
2,81	N655186	at3g09230	RNA.regulación transcripción	AtMYB1 AtMYB1; unión DNA
2,76	N656693	at5g41030	RNA.regulación transcripción	TCP familia de factor de transcripción, putativa
9,07	N655022	at1g01510	RNA.regulación transcripción	AN AN (ANGUSTIFOLIA); proteína de unión
2,23	N654412	at5g57420	RNA.regulación transcripción	IAA33 IAA33 (INDOL-3-ACETICO INDUCIBLE 33); factor de transcripción
7,33	N655016	at2g26750	Procesos metabólicos	epoxide hidrolasa, putativa
2,84	N653527	at2g29460	Metabolismo. Glutation-transferasa	ATGSTU4, GST22 ATGSTU4 ; glutation transferasa
3,96	N653081	at2g46960	Metabolismo. citocromo P450	CYP709B1 CYP709B1; transportador de electrones/ unión hemo/ unión ión Fe
3,36	N655200	at1g74550	Metabolismo. citocromo P451	CYP98A9 CYP98A9; transportador de electrones/ unión hemo/ unión ión Fe
1,74	N654740	at1g53920	Metabolismo. GDSL-lipasa	GLIP5 GLIP5; carboxilesterasa/ lipasa

Tabla 4.8: Mutantes que presentan resistencia frente a la mezcla de metales pesados, Vs WT. Cr: crecimiento relativo (vs WT)

Cr	NASC	id	Clasificación	Descripción
3.64	N654923	at1g05610	Metabolismo de polisacáridos	APS2 APS2 ; glucosa-1-fosfato transferasa
2.61	N655581	at5g04180	Transformación ATC	ATACA3, ACA3 ACA3; carbonato deshidratasa/ unión ión Zinc
2.70	N655815	at1g17290	Metabolismo de síntesis de aminoácidos	AlaAT1 AlaAT1 (ALANINA AMINOTRANSFERASA
3.28	N654636	at1g06550	Metabolismo de aminoácidos. Degradación	Proteína de familia enoyl-CoA hidratasa/isomerasa
2.02	N654458	at3g52940	Metabolismo de hormonas. Brasinosteroides.	FK, HYD2, ELL1 FK (FACKEL); delta14-sterol reductasa
1.76	N653059	at4g30610	Metabolismo de hormonas. Brasinosteroides.	BRS1, SCPL24 BRS1 (BRI1 SUPPRESSOR 1); carboxipeptidasa tipo-serina
3.63	N655549	at4g25570	redox.ascorbato y glutatión	ACYB-2 ACYB-2; monóxido de carbono oxigenasa
3.26	N661990	at1g19570	redox.ascorbato y glutatión	DHAR1, ATDHAR1 DHAR1 unión ión cobre / glutatión deshidrogenasa
2.53	N660067	at4g02660	Célula. Transporte de vesículas	Proteína de la familia de repetición WD-40 / beige-relacionada
2.64	N653094	at1g64350	Célula. Transporte de vesículas	SEH1H SEH1H; Unión nucleotido
3.21	N655198	at5g22740	Pared celular. Síntesis de celulosa	ATCSLA02, CSLA02, ATCSLA2 ATCSLA02; manano sintasa/ transferasa
2.11	N654924	at4g31370	Pared celular.proteínas de la pared celular.AGPs	FLA5 FLA5 (precursor de proteína 5 arabinogalactan como-fasciclina)
2.67	N654652	at1g56480	Pared celular. Pectina-esterasas	pseudogen, pectinaesterasa
3.67	N657050	at4g04700	Señalización. Calcio	CPK27/CPK27;ATP unión/unión ión calcio/quinasa/proteína quinasa/proteína serina
5.87	N654937	at1g60480	Señalización.G-proteínas	Factor ADP-ribosilación putativo
2.40	N655780	at5g06120	Señalización.G-proteínas	Proteína unión-Ran, putativa
3.29	N656855	at4g27160	Proteínas de desarrollo. Almacenamiento	AT2S3 AT2S3; unión lípidos / reservorio de nutrientes
2.83	N656942	at3g26640	Desarrollo.Inespecífico	LWD2 LWD2 (LIGHT-REGULATED WD 2); unión de nucleotido
2.99	N655537	at5g56620	Desarrollo.Inespecífico	anac099 anac099 (Arabidopsis NAC que contiene dominio de proteína 99)
3.41	N655652	at1g63680	Desarrollo.Inespecífico	ATMURE, PDE316, MURE MURE; unión ATP / aminoácido ligasa/ ligasa
4.89	N656064	at3g55030	Metabolismo lipídico. Síntesis de fosfolípidos	PGPS2 PGPS2 ; CDP-alcohol fosfatidiltransferasa
7.51	N654967	at5g23450	Metabolismo lipídico. (esteroides, etc.)	ATLCBK1 ATLCBK1 ; D-eritro-esfingosina quinasa/ diacilglicerol quinasa
2.64	N654784	at3g15650	Metabolismo lipídico. Degradación lipídica	Proteína de la familia fosfolipasa / carboxilesterasa
3.28	N654636	at1g06550	Metabolismo lipídico. Degradación lipídica	Proteína de la familia de la enoil-CoA hidratasa / isomerasa

Tabla 4.9: Mutantes que presentan sensibilidad frente a la mezcla de metales pesados, V5 WT

NASC	id	Clasificación	Descripción
N658858	at5g43930	No asignado	Proteína de la familia de transducinas /proteína de la familia de repetición WD-40
N660316	at2g22400	No asignado	Proteína de la familia NOL1/NOP2/sun
N656089	at2g39670	No asignado	Proteína conteniendo el dominio SAM-radical
N660003	at3g25060	No asignado	Proteína conteniendo la repetición pentatricopeptido (PPR)
N654901	at1g29980	No asignado	Proceso biológico desconocido
n658688	at1g51520	No asignado	Proteína de unión a nucleotidos/ácidos nucleicos
N654473	at5g13090	No asignado	Desconocido
N656162	at4g10060	No asignado	Glucosilceramidasa/catalisis
N657296	at3g17680	No asignado	Función molecular desconocida
N654475	at1g08870	Proteína síntesis. transferencia RNA.nucleo.tRNA-Ala	pre-tRNA
N655005	at5g48465	Proteína síntesis. transferencia RNA.nucleo.tRNA-Lys	pre-tRNA
N655832	at1g03920	Proteína. posttranslacional modificación	Proteína Quinasa
N660231	at2g16750	Proteína. posttranslacional modificación. Quinasa	Familia de Quinasas
N654861	at1g20380	Proteína. degradación	Prolil-oligopeptidasa, putativa
N662129	at4g21326	Proteína. degradación. subútilasas	ATSBT3.12(subtilase 3.12); idéntica proteína de unión/endopeptidasa tipo serina
N656629	at1g05140	Proteína. degradación. metaloproteasa	Metaloproteasa de zinc asociado a la membrana, putativa
N655329	at1g62130	Proteína. degradación. tipo AAA	Proteína de la familia ATPasa tipo-AAA
N654972	at1g16890	Proteína. degradación. ubiquitina.E2	Encima conjugada-ubiquitina UBC36, UBC13B
N660409	at1g77000	Proteína. degradación. ubiquitina.E3.SCF.FBOX	ATSKP2.2, SKP2B SKP2B; Ligasa ubiquitina-proteína
N663856	at5g57990	Proteína. degradación. ubiquitina	UBP23 UBP23 (PROTEASA UBIQUITINA-ESPECIFICA 23)
N663856	at5g57980	RNA. transcripción	RPB5C RPB5C (RNA POLYMERASE II FIFTH LARGEST SUBUNIT, C)
N655849	at4g13640	RNA.regulación transcripcional	UNE16 UNE16 (unfertilized embryo sac 16); factor de transcripción
N655974	at4g20400	RNA.regulación transcripcional	Familia de proteína del factor de transcripción jumonji (jmi)/familia de proteína de dedo de Zinz (Tipo C5HC2)
N655006	at1g20696	RNA.regulación transcripcional	HMGB3, NFD3, NFD03 HMGB3 (GRUPO DE ALTA MOBILIDAD B 3);
N662130	at4g11970	RNA vinculante	Proteína de la familia como YT521-B

Tabla 4.9: Mutantes que presentan sensibilidad frente a la mezcla de metales pesados, Vs WT

NASC	id	Clasificación	Descripción
N658610	at1g13700	OPP, oxidative PP, 6-phosphogluconolactonase	Proteína de la familia glucosamina/galactosamina-6-fosfato isomerasa
N660604	at5g25370	Metabolismo lipídico. Degradación lipídica	PLDALPHA3 PLDALPHA3 (PHOSPHILIPASE D ALPHA 3); fosfolipasa D
N656340	at1g28480	Redox, glutaredoxinas	GRX480 GRX480; transportador de electrones/ proteína disulfuro oxidoreductasa
N662147	at4g30550	Metabolismo de nucleótidos. Síntesis	Proteína glutamina amidotransferasa conteniendo el dominio class-I
N659633	at5g04220	Señalización. Ca	SYTC, ATSYTC, NIMC2TYPE1.3, NIMC2T1.3 SYTC
N659321	at2g11940	Síntesis DNA/estructura cromatina	Gen elemento transponible
N656275	at1g16800	Síntesis DNA/estructura cromatina	Endonucleasa tRNA-de empalme de efector-relacionado positivo
N657311	at3g47690	Organización celular	ATEB1A, EB1A, ATEB1H2 ATEB1A; Union de microtubulos
N654464	at1g20400	Organización celular	Miosina de cadena pesada-relacionada
N659840	at1g13980	Desarrollo. Inespecífico	GN, VAN7, EMB30 GN (GNOM); GTP:GDP antiporte/ proteína homodimerización
N654990	at3g10500	Desarrollo. Inespecífico	anao053 ana053 (dominio de Arabidopsis NAC conteniendo proteina 53);
N657864	at3g02050	Transporte potasio	KUP3, ATKUP3, ATKT4 KUP3; transportador transmembrana de ión potasio
N656653	at1g17500	Transporte. Procesos metabólicos	ATPasa, acoplada al movimiento transmembrana de iones, mecanismo fosforilativo
N662129	at4g21320	Estrés abiótico. Calor	HSA32 HSA32 (HEAT-STRESS-ASSOCIATED 32); catalítico
N659733	at1g09080	Estrés abiótico. Calor	BIP3 BIP3; ATP de unión
N660269	at4g38680	Estrés abiótico. Frío	GRP2, CSDP2, CSP2, ATCSP2 GRP2 (Proteína rica en glicina 2)
N656978	at5g38460	UDP glucosil y glucoronil transferasas	ALG6, ALG8 proteína de la familia glicosiltransferasa
N660910	at5g24950	Procesos metabólicos. citocromo P450	CYP71A15 CYP71A15; transportador de electrones/ unión hemo/ unión ión Fe
N655333	at4g24640	Procesos metabólicos. invertase	APPB1 APPB1; inhibidor pectina-esterasa

Posteriormente, los genes responsables del fenotipo fueron clasificados mediante el programa MapMan (<http://mapman.gabipd.org/>; Thimm y col., 2004), lo que ha permitido distribuir los genes en diferentes categorías como metabolismo de proteínas, metabolismo de DNA, RNA, señalización, transporte, etc (Figura 4.11).

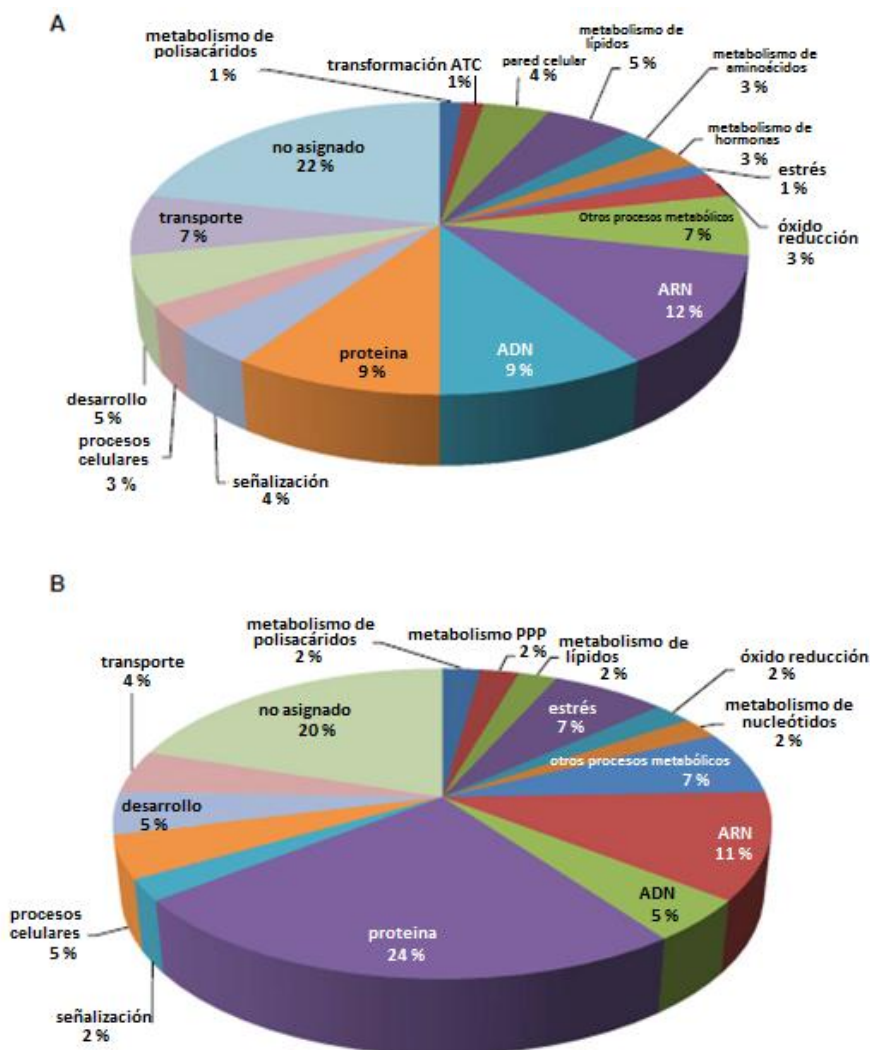


Figura 4.11. Clasificación de los genes seleccionados. Gráficos de clasificación de MapMan en diferentes categorías, y sus porcentajes, según las funciones de los genes afectados por la inserción de T-DNA en los mutantes resistentes (A) y sensibles (B) seleccionados.

4.3.1 Clasificación de los genes responsables del fenotipo diferencial en respuesta a los metales

Las principales categorías para los genes correspondientes a mutantes resistentes que hemos encontrado pertenecen al metabolismo del RNA (12%), el metabolismo de

proteínas (9%), de DNA (9%) y la señalización y transporte (4% y 7% respectivamente). También existe un gran número de genes para los que no se ha descrito aún ninguna función.

La principal categoría en los mutantes sensibles fue la relacionada con el metabolismo de las proteínas con un porcentaje de alrededor del 25%, siendo el segundo, el relacionado con el metabolismo del RNA (11%). En una clasificación más específica empleando el programa MapMan, encontramos 16 genes asociados al metabolismo general, de los cuales 13 pertenecen a los seleccionados como resistentes y 3 a los sensibles. Dentro de la categoría relacionada con la respuesta celular se encuentran 13 genes, de los cuales, 7 son resistentes y se engloban dentro de la respuesta al estrés biótico, el sistema de homeostasis redox (ciclo ascorbato-glutation) y el desarrollo, en cambio, los 6 genes asociados a la sensibilidad están relacionados con la respuesta al estrés abiótico, el sistema redox (glutarredoxina) y el desarrollo (Figura 4.12).

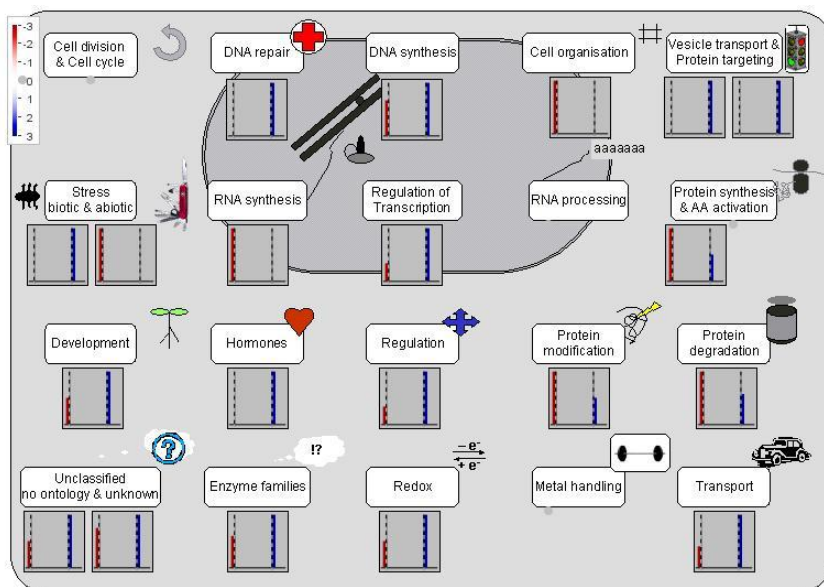


Figura 4.12. Análisis MapMan de los genes seleccionados y caracterizados en las funciones celulares. Los genes seleccionados como asociados a resistencia se muestran en cuadros azules y los asociados a sensibilidad en rojo.

En la clasificación según la función celular encontramos 101 genes, de los cuales 60 se corresponden con los seleccionados como resistentes y 41 genes sensibles. Asociados a funciones relacionadas con el estrés biótico encontramos genes relacionados con resistencia, que pertenecen a factores de transcripción MYB y hormonas que actúan en respuesta al estrés biótico como los brasinoesteroides (Figura 4.13); por el contrario,

en los sensibles no se encuentra esta categoría, sólo encontramos 3 genes relacionados con estrés abiótico (relacionadas con choque térmico).

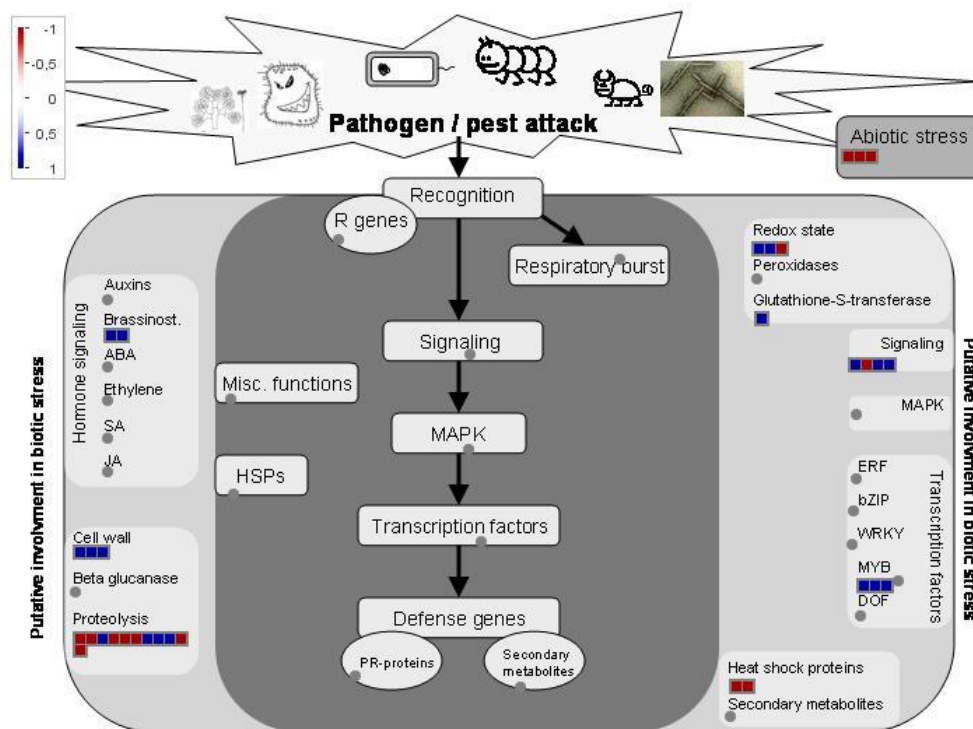


Figura 4.13. Análisis MapMan de los genes seleccionados y caracterizados en la respuesta frente a patógenos. Los genes seleccionados como asociados a resistencia se muestran en cuadros azules y los asociados a sensibilidad en rojo.

En cuanto a la regulación post-traducional, se han encontrado 35 genes implicados, 14 sensibles y 21 resistentes. Solo los resistentes se corresponden con hormonas (brasinoesteroides), proteínas G y con el sistema redox del ciclo ascorbato-glutation. En cuanto a los sensibles, destacan los genes implicados en la degradación de proteínas dependiente de ubiquitina, donde encontramos genes que codifican enzimas como la ubiquitin proteasa y la E2 ligasa (Figura 4.14).

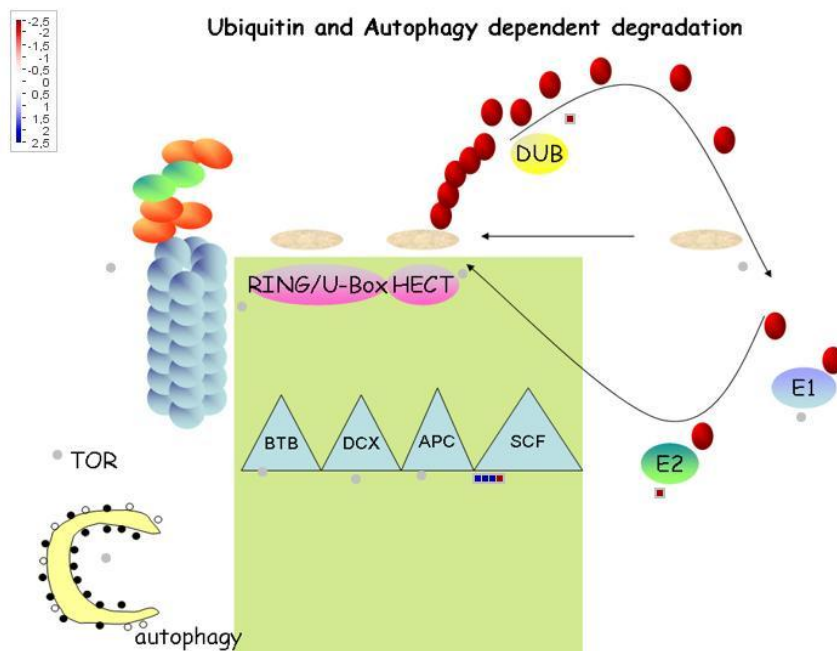


Figura 4.14. Análisis MapMan de los genes seleccionados y relacionados con la regulación post-traducional implicados en la degradación de proteínas dependiente de ubiquitina. Los genes seleccionados como asociados a resistencia se muestran en cuadros azules y los asociados a sensibilidad en rojo.

4.4 Caracterización de los mutantes *Athpp9* y *Atala-4* en la respuesta a metales pesados

4.4.1 Estudio “in silico”

Para verificar la selección realizada y estudiar el posible uso de estos mutantes con fines de fitorremediación se seleccionó una línea resistente (*Athpp9*) y otra sensible (*Atala4*), ambas relacionadas con el transporte y se analizaron en mayor profundidad. Con el fin de conocer la información disponible sobre los genes relacionados con el fenotipo, se realizó un estudio de expresión “in silico” mediante la búsqueda de información en bases de datos, eFP-Browser (<http://bar.utoronto.ca/>; Winter y col., 2007) y Genevestigator (<https://genevestigator.com/gv/>; Figura 4.15).

La línea resistente seleccionada fue *Athpp9* con la inserción de T-DNA en el gen *HPP9*, una proteína que contiene un dominio de unión a metales pesados (HMA) (de Abreu-Neto y col., 2013). La línea sensible fue el *Atala4*, con la inserción de T-DNA en el gen *ALA4*, perteneciente a la familia de bombas de iones ATPasa tipo P de la subfamilia P4 (Axelsen and Palmgren, 2001).

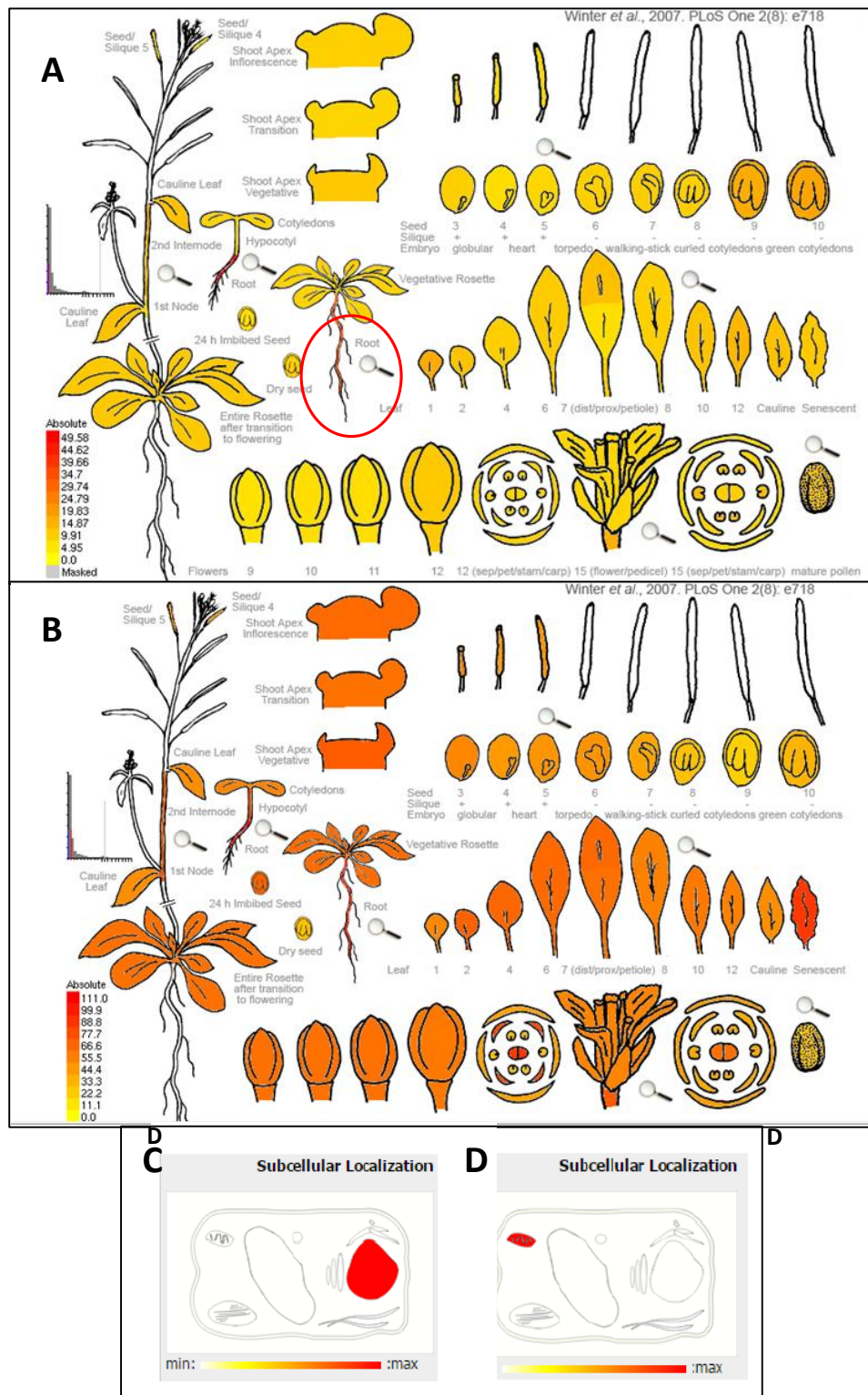


Figura 4.15. Datos de expresión de *HPP9* (A) y *ALA4* (B) y localización subcelular de las proteínas correspondientes (C y D), disponibles en <http://bar.utoronto.ca>.

Según la información disponible en estas bases de datos, *HPP9* se expresaría en raíces y la proteína se localizaría en el núcleo (Figura 4.15B y D), mientras que *ALA4* se

expresaría en toda la planta y la proteína podría estar localizada en la mitocondria (Figura 4.15A y C).

4.4.2 Comprobación de la homocigosis de las líneas y el fenotipo frente a la mezcla de metales

La línea mutante *Athpp9* presenta una inserción de T-DNA (SALK_091636C) en el locus At5g52710 (*HPP9*). La línea *Atala4* presenta una inserción de T-DNA (SALK_075228C) en el At1g17500 (*ALA4*). Las plantas fueron genotipadas mediante PCR teniendo en cuenta la posición y orientación del inserto, empleando los oligonucleótidos específicos de los genes *HPP9* y *ALA4* (LP y RP) y el oligonucleótido LBb1.3. Sus secuencias se describen en la Tabla 3.10 de esta memoria. Se comprobó que se amplificaba la región LP/LBb1.3 y no la región LP/RP confirmando así la homocigosis de las líneas mutantes (Figura 4.16).

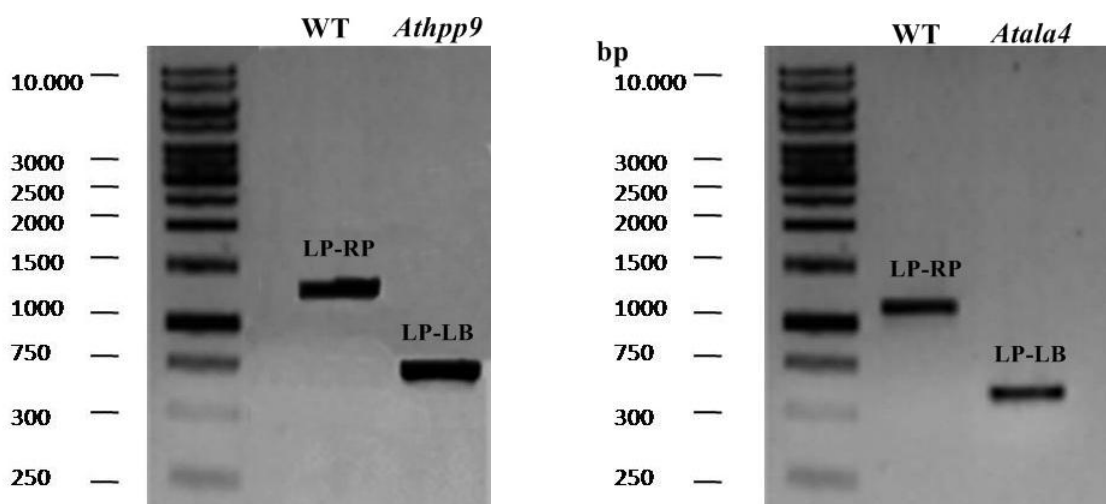


Figura 4.16. Genotipado mediante PCR de las plantas mutantes *Athpp9* Y *Atala4* y el genotipo silvestre. Los amplicones teñidos con bromuro de etidio se muestran usando los cebadores LP, RP y LBb1.3 descritos en la Tabla 3.10.

Se verificó de nuevo el fenotipo ya observado en el proceso de selección de estas líneas en respuesta a la mezcla de metales, mediante análisis del crecimiento de la raíz y además, se analizaron otros parámetros como el porcentaje de germinación, hojas verdaderas, etc, después de 7 días de crecimiento. Para ello, se cultivaron las plántulas en placa con el medio conteniendo la mezcla de metales. La línea *Athpp9* anteriormente mencionada mostró una longitud de raíz mayor y *Atala4* una longitud de raíz menor con respecto a las plántulas WT, confirmando de nuevo el fenotipo (Figura 4.17A y B).

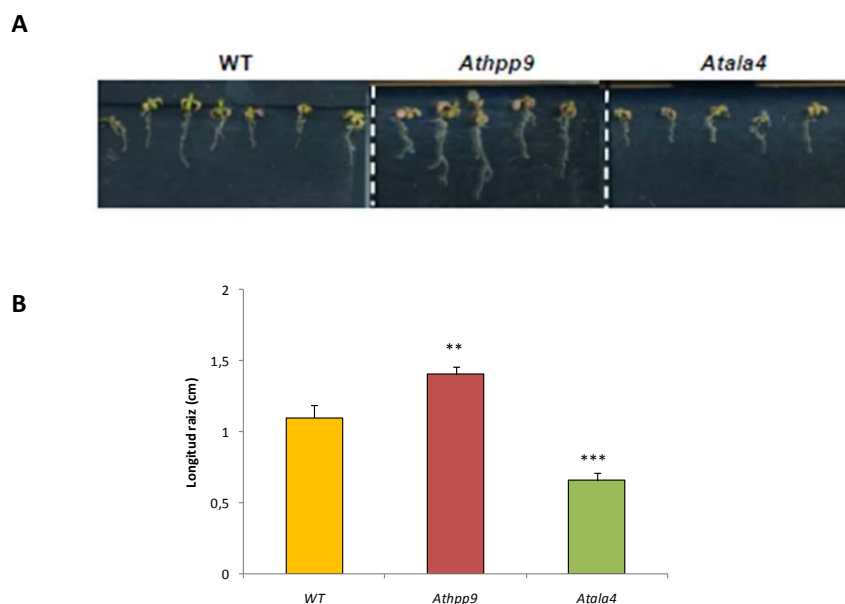


Figura 4.17. Fenotipo (A) y longitud de la raíz después de 7 días de crecimiento en el medio con la mezcla de metales (B) de los mutantes *Athpp9* y *Atala4* respecto a las plantas WT. Los datos representan la media \pm error estándar de, al menos, tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al WT ($p < 0,05$: *; $p < 0,01$: **; $p < 0,001$: ***) de acuerdo con la prueba T de Student.

Respecto a la tasa de germinación en placa, no se encontraron diferencias significativas en *Athpp9* respecto al WT, sólo *Atala4* tenía una tasa inferior en las condiciones control y con la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu) (Figura 4.18).

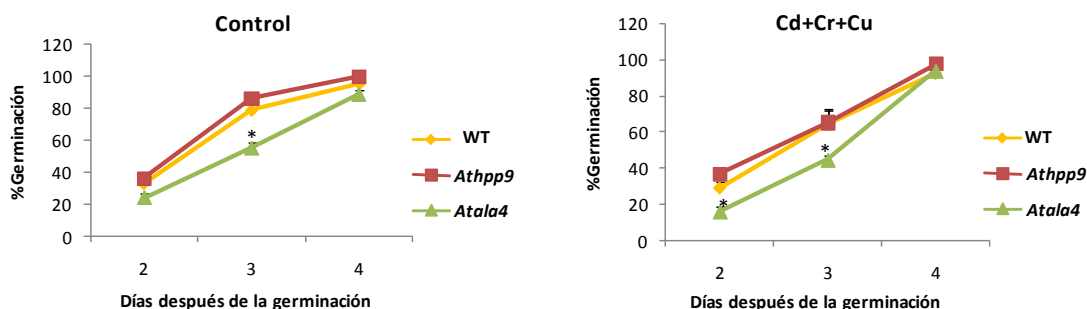


Figura 4.18. Tasas de germinación de *Athpp9* y *Atala4* respecto de WT en el medio con la mezcla de metales y en condiciones control. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$: *) de acuerdo con la prueba T de Student.

Además, se observó que el gen *ALA4* se inducía en las plántulas WT después de 7 días de crecimiento en la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu), respecto al medio control, mientras que no se encontraron diferencias significativas para el gen *HPP9* en estas condiciones (Figura 4.19).

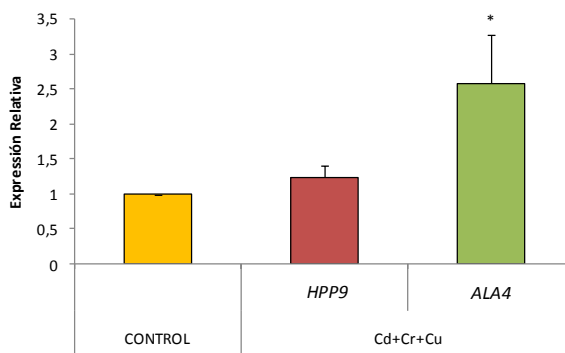


Figura 4.19. Expresión relativa mediante qRT-PCR de *HPP9* y *ALA4* en el genotipo WT, en plántulas de 7 días crecidas en placa con la mezcla de metales pesados. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$: *) de acuerdo con la prueba T de Student.

4.4.3 Análisis del metabolismo oxidativo

Una de las respuestas provocadas en plantas frente a la exposición a metales pesados consiste en la generación de estrés oxidativo con daños a membranas y macromoléculas (Rodríguez-Serrano y col., 2009). Para determinar si la inserción en *Athpp9* y *Atala4* interfiere en la respuesta oxidativa de la planta frente a los metales, se determinó el contenido de H_2O_2 mediante histoquímica con DAB en hojas completas. Las plantas se crecieron en hidroponía durante 21 días y posteriormente se adicionó la mezcla de metales durante 24 y 48 horas. Curiosamente en ambos mutantes la producción de H_2O_2 fue inferior que en las plantas WT después de 24 y 48 horas del tratamiento (Figura 4.20 A y B). Así mismo, la actividad de la catalasa fue superior en ambos mutantes después de 24 h de tratamiento, aunque disminuyó después de 48 h, frente a las plantas WT (Figura 4.20 C).

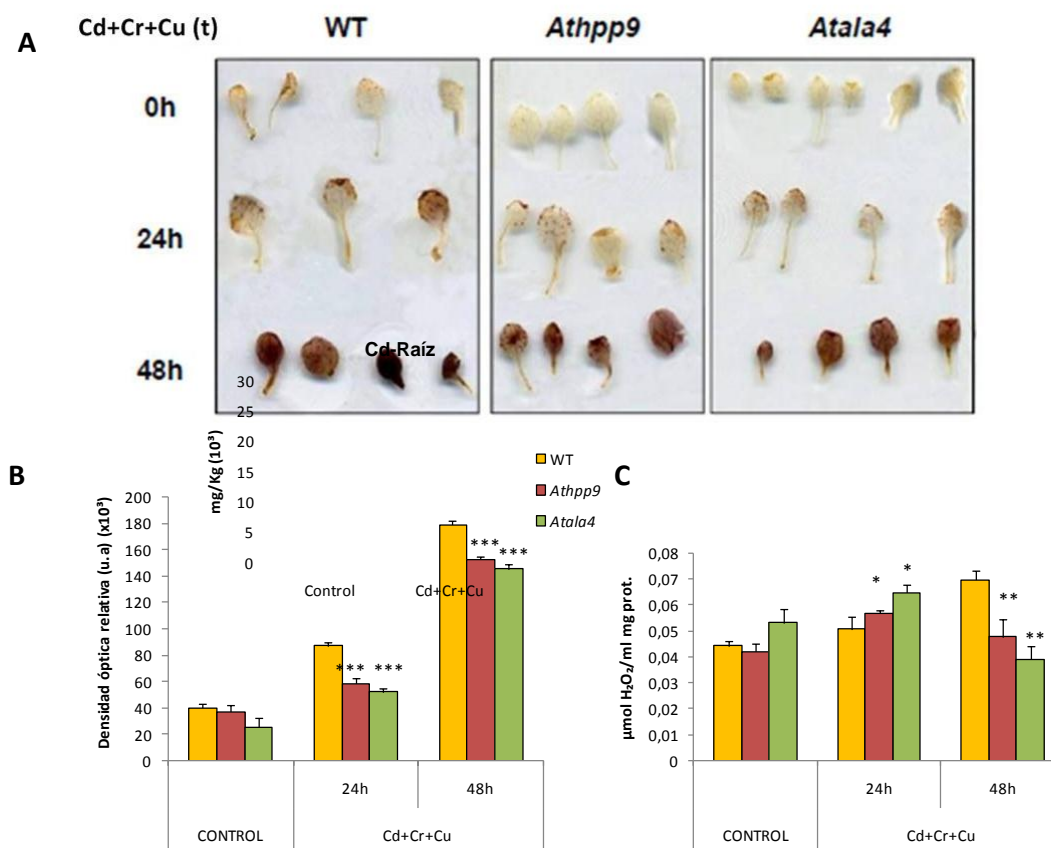


Figura 4.20. Metabolismo oxidativo de los mutantes *Athpp9* y *Atala4* en respuesta a metales pesados. Tinción con DAB para visualizar la producción de H_2O_2 después de 24 y 48 h de crecimiento con la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu) en condiciones hidropónicas (A). Densidad relativa de la tinción con DAB medida con Image J (B) y actividad catalasa (C). Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al WT ($P < 0,05$: *; $P < 0,01$: **; $P < 0,001$: ***) de acuerdo con la prueba T de Student.

4.4.4 Captación y translocación de metales pesados en los mutantes *Athpp9* y *Atala4*

Para determinar la capacidad de los mutantes *Athpp9* y *Atala4* de captación y translocación de metales, se procedió al análisis de los mismos mediante ICP. Para obtener suficiente material para el análisis, se cultivaron plantas WT y de los mutantes *Athpp9* y *Atala4* en condiciones de hidroponía durante tres semanas y después se añadió la mezcla de metales durante 24 h. Se observó que la captación y translocación de metales pesados se encuentra alterada en ambos mutantes con respecto al WT. Así, se obtuvo una mayor acumulación de metales pesados (Cd, Cr y Cu) en las raíces de ambos mutantes (Figura 4.21). En relación a la translocación de metales, en *Atala4* fue superior que en WT: 2,1, 2,0 y 1,4 veces para Cd, Cr y Cu, respectivamente, como se observa en la Tabla

4.10. Mientras que en *Athpp9* la translocación fue inferior que en el WT, 2,5, 2,1 y 3,6 veces para Cd, Cu y Cr, respectivamente (Tabla 4.10). Este factor podría ser importante para explicar el fenotipo previamente observado en estos mutantes.

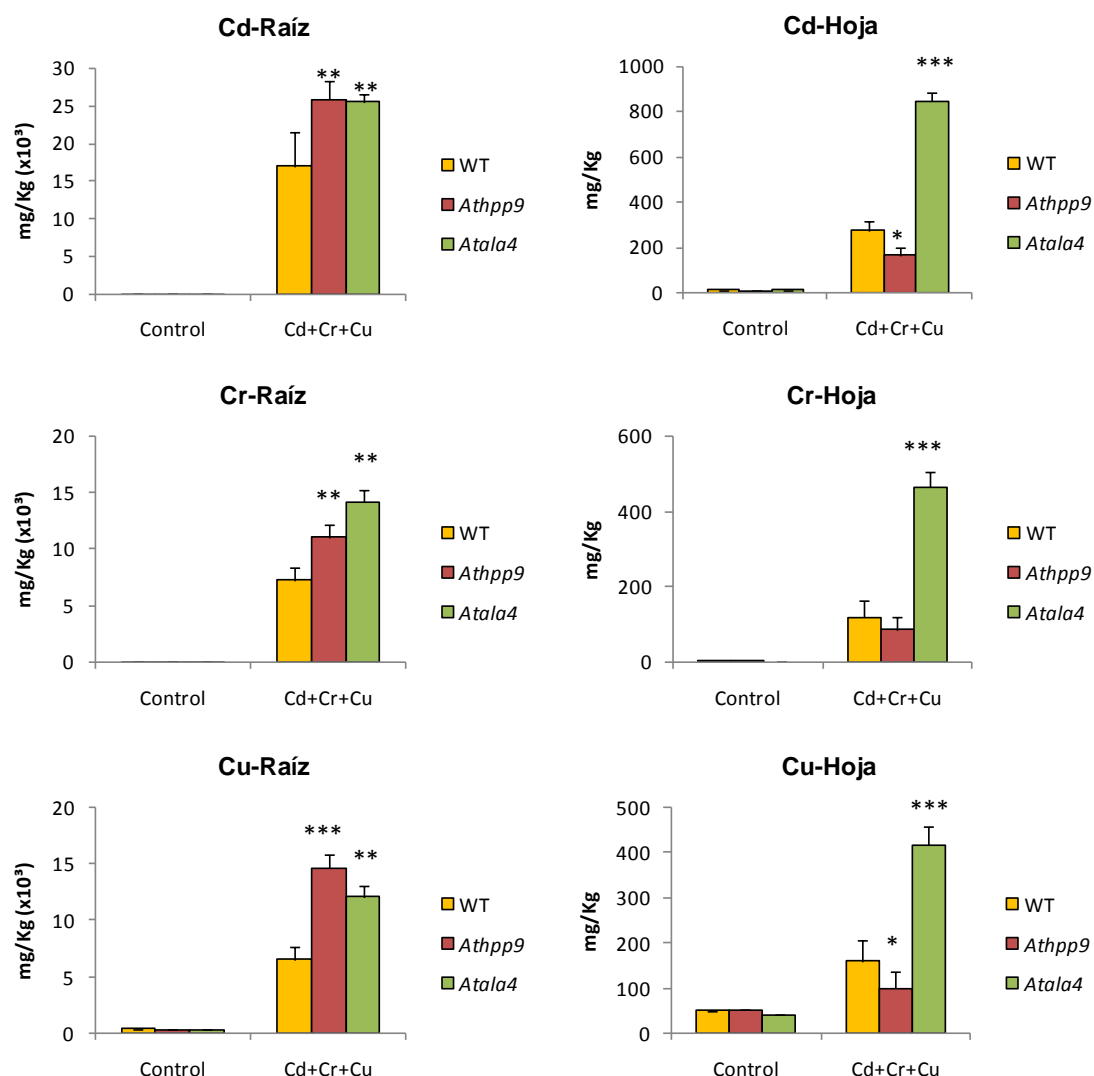


Figura 4.21. Análisis mediante ICP del contenido de Cd, Cr y Cu en raíces y hojas de los mutantes *Athpp9* y *Atala4* y en WT. Las plantas se cultivaron en condiciones de hidroponía durante tres semanas y después se añadió la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu) durante 24 h. Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al WT (P < 0,05: *; P < 0,01: **; P < 0,001: ***) de acuerdo con la prueba T de Student.

Tabla 4.10. Porcentaje de translocación de cadmio (Cd), cobre (Cu) y cromo (Cr) de raíces a la parte aérea en plantas *Athpp9* y *Atala4* y WT de 21 días expuestas durante 1 día a Cd 50 μ M, Cu 50 μ M y Cr 100 μ M. Los datos son media de dos repeticiones independientes \pm SD. Los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

	Metales	Cd+Cr+Cu		
		WT	<i>Athpp9</i>	<i>Atala4</i>
%Translocación	Cd	1,61 \pm 0,20a	0,63 \pm 0,09b	3,32 \pm 0,23c
	Cr	1,63 \pm 0,28a	0,77 \pm 0,10b	3,28 \pm 0,31c
	Cu	2,44 \pm 0,32a	0,68 \pm 0,11b	3,47 \pm 0,12c

Es importante destacar que la translocación de Fe en *Athpp9* fue 10,9 veces superior que en plantas WT en condiciones control; sin embargo, fue 23 veces inferior que en WT en condiciones de tratamiento con metales, como se indica en la Tabla 4.11. La translocación de Mn y Zn de ambos mutantes fue inferior a la del WT en condiciones control y la del Fe en la mezcla de metales (Tabla 4.11).

Tabla 4.11. Efecto del tratamiento con la mezcla de metales pesados durante 1 día sobre el contenido de Fe, Mn y Zn (mg/Kg) de hojas y raíces y el % de translocación en WT, *Athpp9* y *Atala4*. Los datos son media de dos repeticiones independientes \pm SD. Los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

MICRONUTRIENTES		Control			Cd+Cr+Cu		
		WT	<i>Athpp9</i>	<i>Atala4</i>	WT	<i>Athpp9</i>	<i>Atala4</i>
Hoja	Fe (mg/Kg)	309.0 \pm 32.1a	1352.9 \pm 56.4b	137.0 \pm 23.1c	2720.6 \pm 200.1d	93.9 \pm 24.2c	517.3 \pm 90.1e
	Mn (mg/Kg)	453.4 \pm 43.2a	518.8 \pm 20.3a	347.2 \pm 21.5b	322.3 \pm 58.3b	286.1 \pm 60.5c	290.8 \pm 6.6c
	Zn (mg/Kg)	240.8 \pm 19.4a	218.9 \pm 21.9a	192.0 \pm 18.9ac	158.9 \pm 6.3b	176.1 \pm 22.3c	204.8 \pm 5.6ac
Raíz	Fe (mg/Kg)	17096.8 \pm 101.5a	6882.7 \pm 89.9b	22028.6 \pm 980.7c	8947.9 \pm 950.2d	7128.4 \pm 860.1bd	10122.7 \pm 1000.2e
	Mn (mg/Kg)	3532.3 \pm 148.3a	10548.1 \pm 521.2b	4890.0 \pm 150.4c	1282.8 \pm 7.4d	1584.5 \pm 839d	1428.5 \pm 578d
	Zn (mg/Kg)	436.5 \pm 52.1a	1501.2 \pm 67.9b	892.6 \pm 47.9c	405.5 \pm 66.4a	768.2 \pm 149.2c	519.1 \pm 9.7d
Hoja+Raíz	Fe (mg/g)	17,41 \pm 0,02a	8,24 \pm 0,79a	22,17 \pm 1,95b	11,67 \pm 1,92a	7,22 \pm 5,62a	10,64 \pm 4,98a
	Mn (mg/g)	3,98 \pm 0,01a	11,07 \pm 2,75c	5,24 \pm 3,10b	1,06 \pm 0,52a	0,87 \pm 1,30a	1,72 \pm 1,13a
	Zn (mg/g)	0,68 \pm 0,01a	1,72 \pm 0,20c	1,08 \pm 0,28b	0,56 \pm 0,10d	0,94 \pm 0,09b	0,72 \pm 0,05a
% Translocación	Fe	1,73 \pm 0,05a	19,83 \pm 0,10b	0,64 \pm 0,01a	34,95 \pm 14,55c	1,42 \pm 0,20a	4,95 \pm 0,28a
	Mn	12,84 \pm 0,004a	4,94 \pm 0,01c	7,16 \pm 0,04b	25,14 \pm 2,70d	20,87 \pm 4,82d	23,16 \pm 6,17d
	Zn	57,84 \pm 1,54a	14,53 \pm 0,03b	21,29 \pm 0,12c	39,73 \pm 2,90d	23,13 \pm 0,93c	39,48 \pm 1,05d

Además, el mutante *Athpp9* acumulaba los macronutrientes en las raíces en condiciones control, especialmente con un aumento en el contenido de Ca, K, S y P de aproximadamente 1,5, 2,5, 2,7 y 4,0 veces respecto al contenido en WT (Tabla 4.12). Sin embargo, el Mg es una excepción, y la acumulación en el mutante *Athpp9* es casi un tercio inferior que la observada en las plantas WT. En presencia de la mezcla de metales pesados se acumulaba más K, S y P en las raíces de *Athpp9* (Tabla 4.12), por el contrario, no se

encontraron diferencias en las raíces del mutante *Atala4*, salvo un aumento en el contenido de P en condiciones control y la translocación a las hojas fue casi tres veces superior que en las plantas WT (Tabla 4.12). La translocación del Mg en condiciones de estrés también se vio alterada en ambos mutantes (Tabla 4.12).

Tabla 4.12. Efecto del tratamiento con la mezcla de metales pesados durante 1 día sobre el contenido de macronutrientes (g/100g) en hojas y raíces y el % de translocación de plantas WT, *Athpp9* y *Atala4*. Los datos son media de dos repeticiones independientes \pm SD. Los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

MACRONUTRIENTES	Control			Cd+Cr+Cu			
	WT	<i>Athpp9</i>	<i>Atala4</i>	WT	<i>Athpp9</i>	<i>Atala4</i>	
Hoja	Ca (g/100g)	3.68 \pm 0.07a	3.44 \pm 0.05a	3.29 \pm 0.04a	2.71 \pm 0.08b	3.39 \pm 0.05a	3.49 \pm 0.5a
	K (g/100g)	3.33 \pm 0.03a	3.04 \pm 0.04b	3.12 \pm 0.06b	2.63 \pm 0.04c	2.96 \pm 0.03d	3.05 \pm 0.44b
	Mg (g/100g)	0.68 \pm 0.05a	0.74 \pm 0.04a	0.49 \pm 0.04b	1.03 \pm 0.2c	0.53 \pm 0.02b	0.64 \pm 0.1a
	S (g/100g)	1.07 \pm 0.08a	0.99 \pm 0.03a	0.99 \pm 0.09a	0.80 \pm 0.06b	0.96 \pm 0.01a	1.10 \pm 0.18a
	P (g/100g)	0.73 \pm 0.01a	0.62 \pm 0.02b	0.55 \pm 0.01c	0.47 \pm 0.02d	0.53 \pm 0.02c	0.62 \pm 0.09bc
Raíz	Ca (g/100g)	2.34 \pm 0.21a	3.64 \pm 0.22b	2.41 \pm 0.18a	1.51 \pm 0.2c	1.31 \pm 0.19c	0.96 \pm 0.16d
	K (g/100g)	1.32 \pm 0.16a	3.26 \pm 0.18b	1.27 \pm 0.12a	1.77 \pm 0.3a	2.47 \pm 0.45c	2.04 \pm 0.16c
	Mg (g/100g)	3.51 \pm 0.09a	1.17 \pm 0.12b	3.71 \pm 0.2a	1.65 \pm 0.4b	1.18 \pm 0.43b	2.07 \pm 1.01c
	S (g/100g)	0.37 \pm 0.02a	1.00 \pm 0.02b	0.43 \pm 0.02ac	0.54 \pm 0.1c	0.79 \pm 0.05d	0.53 \pm 0.05c
	P (g/100g)	0.60 \pm 0.01a	2.41 \pm 0.06b	1.29 \pm 0.03c	0.71 \pm 0.1a	1.31 \pm 0.2c	0.89 \pm 0.06d
Hoja+Raíz	Ca (g/100g)	6,02 \pm 0,14a	7,08 \pm 0,14b	5,70 \pm 0,11c	4,225 \pm 0,13d	4,702 \pm 0,11d	4,449 \pm 0,30d
	K (g/100g)	4,65 \pm 0,10a	6,30 \pm 0,11c	4,39 \pm 0,09a	4,408 \pm 0,30a	5,43 \pm 0,24b	5,09 \pm 0,13ab
	Mg (g/100g)	4,18 \pm 0,07a	1,91 \pm 0,08b	4,20 \pm 0,03a	2,674 \pm 0,25b	1,71 \pm 0,22b	2,707 \pm 0,06b
	S (g/100g)	1,44 \pm 0,05a	1,99 \pm 0,03d	1,41 \pm 0,06ab	1,342 \pm 0,06a	1,755 \pm 0,03cd	1,624 \pm 0,07bc
	P (g/100g)	1,33 \pm 0,01a	3,03 \pm 0,04d	1,84 \pm 0,02b	1,18 \pm 0,05c	1,844 \pm 0,12b	1,515 \pm 0,04a
% Translocación	Ca	157,26 \pm 1,68a	94,72 \pm 1,69a	136,51 \pm 3,52a	179,80 \pm 17,87ab	258,93 \pm 18,09b	364,89 \pm 68,01c
	K	252,31 \pm 2,51a	93,25 \pm 0,77b	245,67 \pm 4,11a	148,75 \pm 29,62d	119,84 \pm 12,53bc	149,51 \pm 5,59cd
	Mg	19,27 \pm 0,47a	63,75 \pm 2,14d	13,22 \pm 0,03a	62,16 \pm 1,99d	44,43 \pm 12,45cd	30,89 \pm 8,08bc
	S	285,73 \pm 0,72a	98,73 \pm 2,87b	230,49 \pm 5,31d	149,44 \pm 8,63c	121,59 \pm 3,83bc	208,74 \pm 30,96d
	P	120,75 \pm 10,43a	25,63 \pm 1,58b	42,456 \pm 1,63b	65,73 \pm 3,36c	40,55 \pm 3,27b	70,03 \pm 8,85c

4.4.5 Análisis de la expresión de *HPP9* y *ALA4* en respuesta a metales

En plantas crecidas en condiciones de hidroponía y tratadas con la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu) y solo con cadmio 50 μ M, se analizó la expresión de *HPP9* y *ALA4* mediante qRT-PCR en WT. En ambas condiciones de estrés, se observó una inducción de *HPP9* muy temprana en las raíces (Figura 4.22A), aunque no se observó expresión en las hojas. En el tratamiento con la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu), el *HPP9* se inducía significativamente después de 30 min de tratamiento, mientras que se reprimía después de 24 y 48h (Figura 4.22A). La inducción de *HPP9* por Cd fue superior a las 3h de tratamiento y después se redujo hasta alcanzar valores similares a las condiciones control (Figura 4.22A). *ALA4* se inducía sin embargo después de un largo periodo de tiempo de tratamiento con la mezcla de metales (24 y 48h) y el tratamiento con Cd (24h y 5d) en

hojas (Figura 4.22C). No se encontraron diferencias significativas en la expresión de *ALA4* en las raíces (Figura 4.22B).

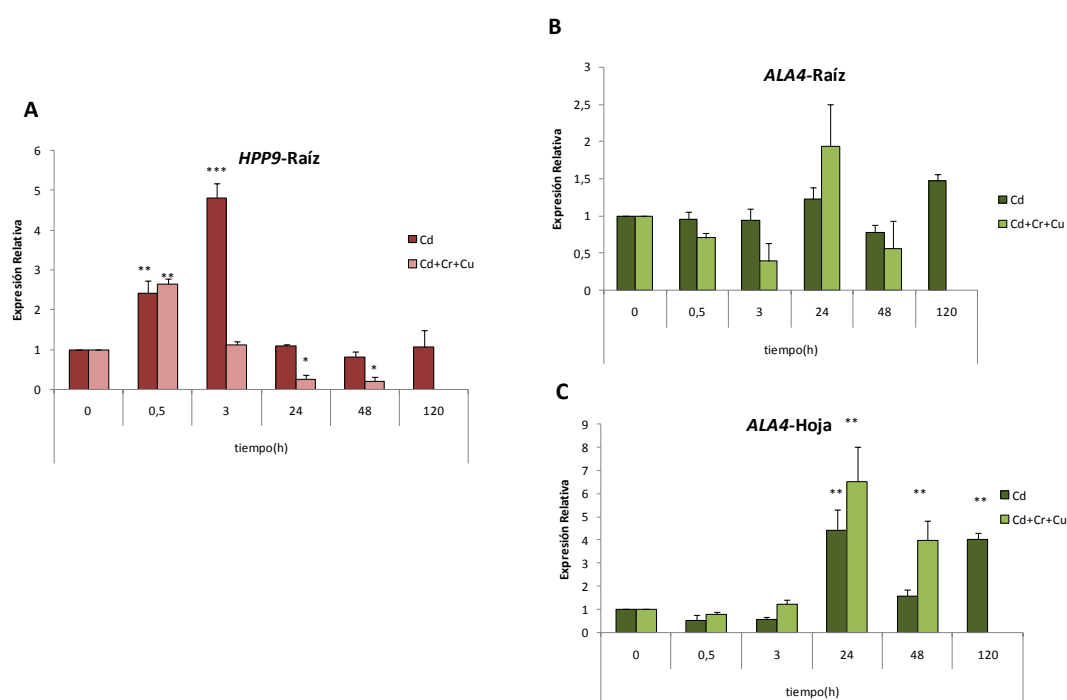


Figura 4.22. Expresión de *HPP9* y *ALA4* en respuesta a metales. Expresión relativa vs no tratado (0 h) mediante qRT-PCR de los genes *HPP9* en raíz (A) y *ALA4* en raíces y hojas (B y C) de WT crecidas en hidroponía en condiciones de estrés debido a la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu) y Cd durante 30 min, 3, 24, 48 y 120 h de tratamiento. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al WT 0 h (P < 0,05: *; P < 0,01: **; P < 0,001: ***) de acuerdo con la prueba T de Student.

4.4.6 Respuesta de *Athpp9* y *Atala4* a extractos de suelos enmendados

En los suelos de las zonas mineras la supervivencia y el crecimiento de las plantas están limitados en gran medida por el pH extremo, la alta conductividad eléctrica y la toxicidad debida a los elementos tóxicos que contienen esos suelos. Así, con el fin de validar los resultados obtenidos, se analizaron los parámetros de crecimiento y estrés de los mutantes *Athpp9* y *Atala4* en una solución procedente del suelo de la mina de Riotinto con dos enmiendas diferentes, según se ha indicado en materiales y métodos (Apartado 3.2.4), utilizando: 1) compost y 2) cenizas. La germinación se adelantaba en ambos mutantes respecto al WT y las diferencias fueron significativas para *Athpp9* en las dos enmiendas empleadas (Figura 4. 23A y B). La longitud de la raíz fue también superior para los mutantes *Athpp9* y la diferencia fue significativa para la enmienda 1, mientras que la longitud de la raíz para el mutante *Atala4* fue significativamente inferior para

ambas enmiendas (Figura 4. 23). Se podría decir por tanto que ambos mutantes conservan el fenotipo observado en la selección, fundamentalmente en la enmienda 1 (Figura 4.23).

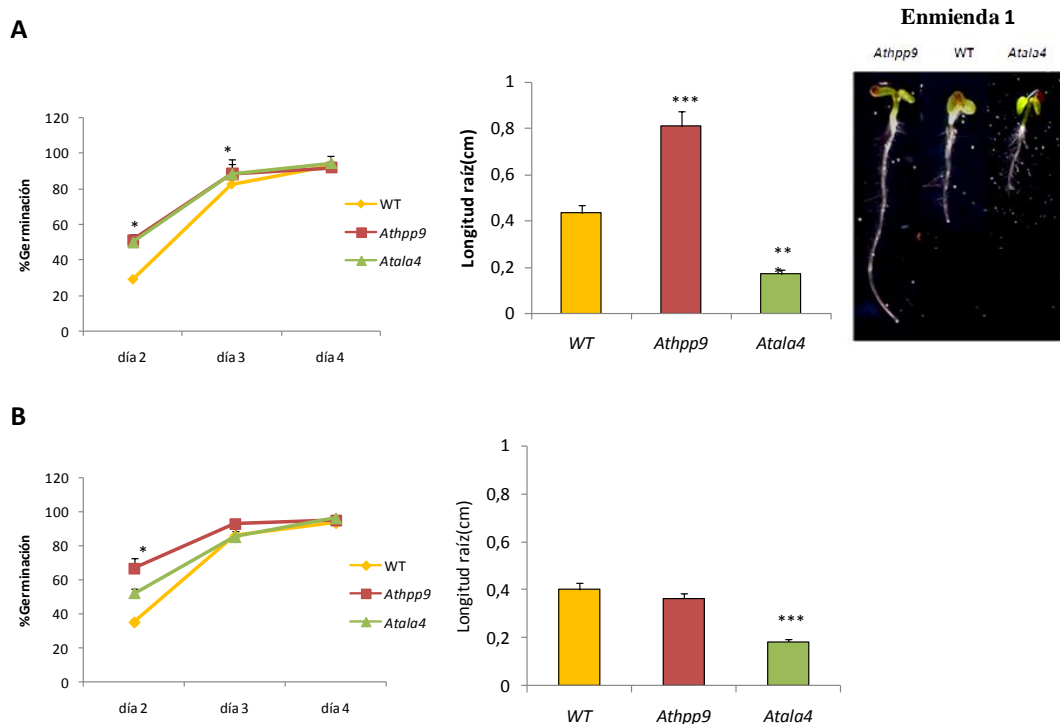


Figura 4.23. Estudio de fenotipo de *Athpp9* y *Atala4* en extractos de suelos enmendados. Análisis de germinación, longitud de la raíz de los mutantes *Athpp9* y *Atala4* y el WT crecidos en el extracto de suelo de la mina de Riotinto modificados con compost (A) y cenizas (B). Fenotipo observado para los mutantes *Athpp9* y *Atala4* y el WT crecidos en el medio con la enmienda 1 durante 7 días. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al WT ($p < 0,05$: *; $p < 0,01$: **; $p < 0,001$: ***) de acuerdo con la prueba T de Student.

Además se analizó la peroxidación lipídica después de 5 días creciendo en el suelo con la enmienda 1. Ambos mutantes mostraban una reducción de la peroxidación lipídica (Figura 4.24) en consonancia con la menor producción de H_2O_2 observada en respuesta al tratamiento con la mezcla de metales respecto del WT (Figura 4.20).

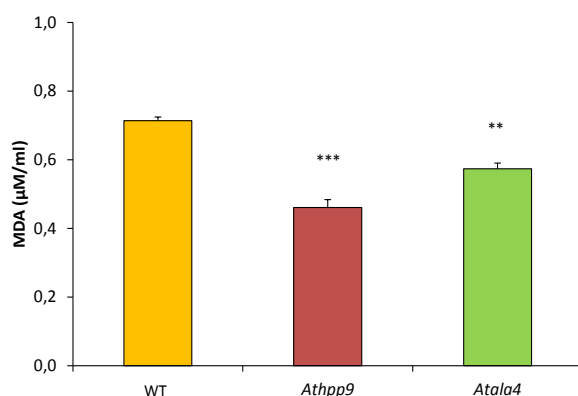


Figura 4.24. Peroxidación lipídica en *Athpp9* y *Atala4* crecidas en las enmiendas. Peroxidación lipídica medida como el contenido de malondialdehído (MDA) de los mutantes *Athpp9* y *Atala4* y del WT después de cinco días de crecimiento en la enmienda del suelo con compost. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al WT ($P < 0,05$: *; $P < 0,01$: **; $P < 0,001$: ***) de acuerdo con la prueba T de Student.

4.5 Estudio de los transportadores KUP

4.5.1 Estudio de expresión “in silico” de KUP8

La línea *Atkup8* fue seleccionada como resistente en la selección a partir de la colección de líneas mutantes empleada en este trabajo. Presenta una inserción de T-DNA en el gen *KUP8*, que pertenece a la familia de transportadores KT/KUP/HAK, que está involucrada en el transporte y translocación de iones K^+/H^+ en la membrana plasmática y en la vacuola, por lo que están relacionados en gran medida con la homeostasis y la regulación osmótica por K^+ (Senn y col., 2001). En plantas, los transportadores KT/KUP/HAK desempeñan un papel clave en la fisiología vegetal como la adquisición de K^+ , la adaptación al estrés abiótico y los procesos de desarrollo mediante la regulación de la distribución de auxinas.

Inicialmente se realizó un estudio de expresión “in silico” mediante la búsqueda de información en las bases de datos eFP-Browser (<http://bar.utoronto.ca/>; Winter y col., 2007) y Genevestigator (<https://genevestigator.com/gv/>; Figura 4.25). Se observó que la mayor expresión registrada en *Arabidopsis thaliana* para el gen *KUP8* se daba en las hojas caulinares, raíz y sépalos (Figura 4.25A), así como en el periciclo, en el floema y las células meristemáticas (Figura 4.25B). También se ha descrito expresión en la epidermis de la parte inferior del tallo (Figura 4.25E) y durante el desarrollo de la semilla, concretamente en la chalaza, lo que podría estar relacionado con los primeros nutrientes (Figura 4.25C). En cuanto a la respuesta a diferentes tipos de estrés, se ha descrito la inducción en toda la raíz en deficiencia de fósforo, a tiempos cortos (6 h) (Figura 4.25D). En cuanto a su regulación por estrés abiótico, se ha descrito una inducción en la planta completa a partir del 2º y 3º día de luz constante de 60 μ E.

También se ha descrito una inducción del *KUP8* durante la iniciación del crecimiento de raíces laterales en ausencia de auxinas (Figura 4.26), lo que sugeriría una implicación en la regulación de este gen durante la división de las células del periciclo del xilema, involucradas en dar lugar a un nuevo primordio de la raíz lateral.

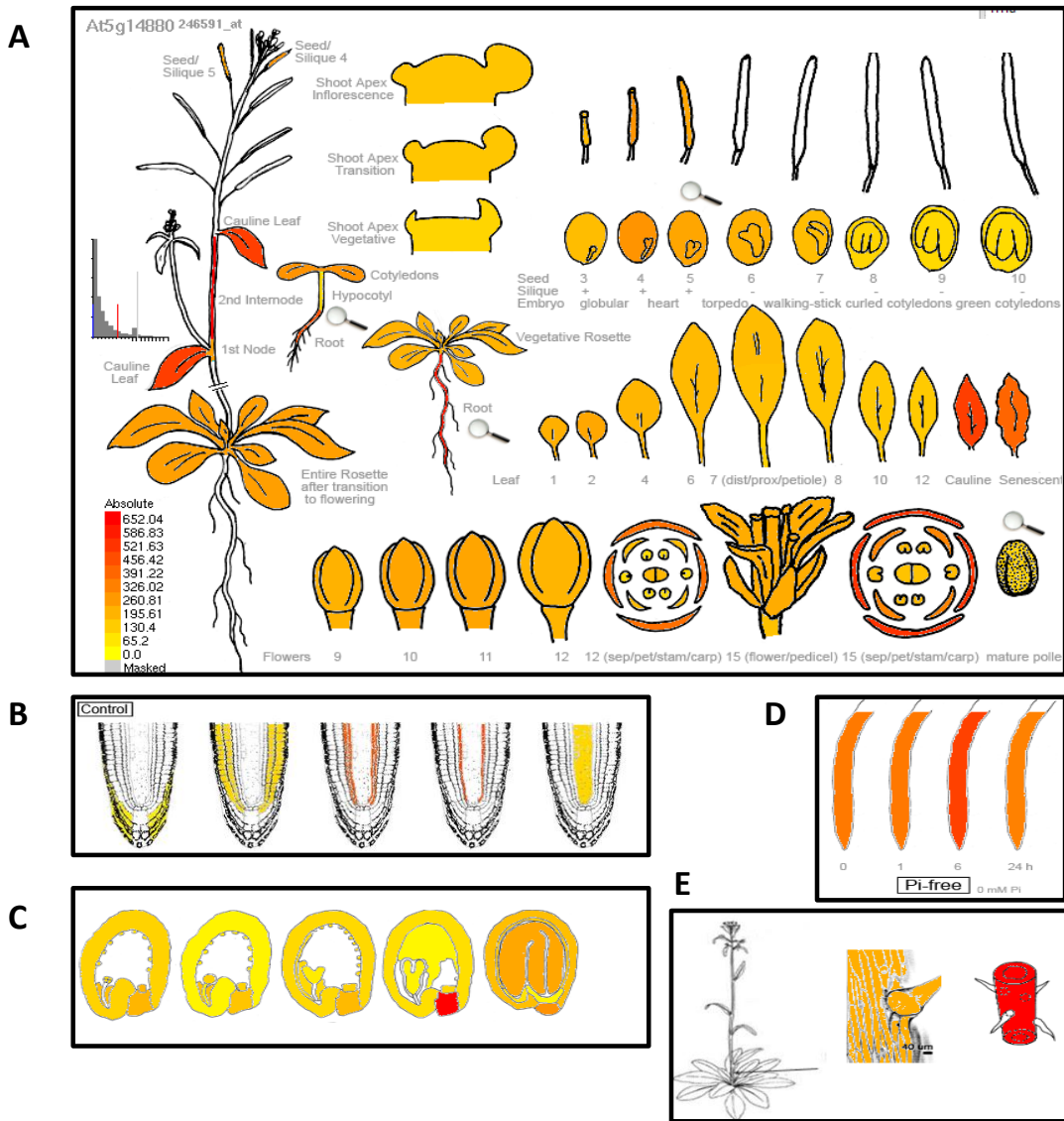


Figura 4.25. Datos de expresión de *KUP8* disponibles en <http://bar.utoronto.ca>. Expresión de *KUP8* en las distintas partes de la planta (A), en el xilema y floema (B), en el desarrollo de la semilla (C), en la epidermis de la parte inferior del tallo (E) y en toda la raíz por falta de fósforo (D).

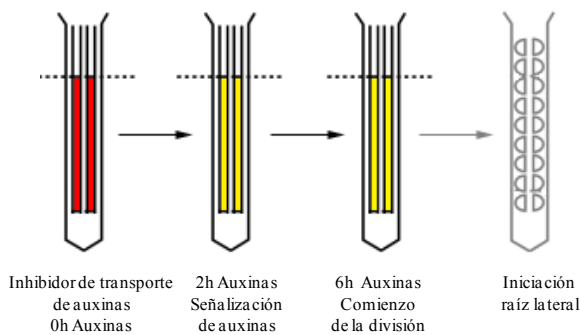


Figura 4.26. Expresión de *KUP8* en experimentos con auxinas durante el desarrollo de raíces laterales. Datos disponibles en <http://bar.utoronto.ca>.

Además, se ha estudiado la inducción que se produce en *KUP8* en tratamientos con inhibidores de hormonas de crecimiento como la giberelina y las auxinas.

4.5.2 Homocigosis de *Atkup8* y fenotipo frente a la mezcla de metales

La línea mutante *Atkup8* (SALK_041357C) presenta una inserción de T-DNA en el segundo exón del locus At5g14880 (*KUP8*). Las plantas fueron genotipadas mediante PCR teniendo en cuenta la posición y orientación del inserto, tal y como se indica en la Figura 4.27(A y C). Se emplearon oligonucleótidos específicos del gen *KUP8* (LP y RP) y el oligonucleótido LBB1.3, específico del T-DNA. Sus secuencias se describen en la Tabla 3.10 de esta memoria. Se comprobó que se amplificaba la región LP/LBB1.3 y no la región LP/RP confirmando así la homocigosis de la línea mutante (Figura 4.27B).

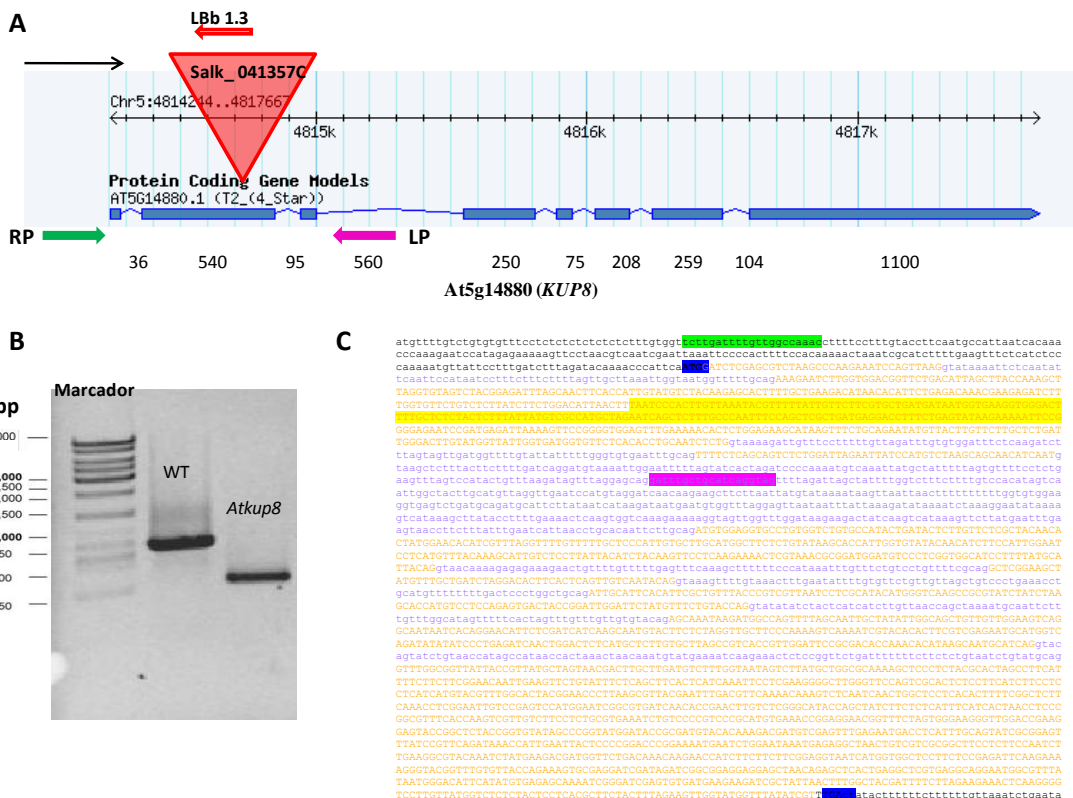


Figura 4.27. Localización de la inserción de T-DNA en el gen At5g14880 (*KUP8*) en la línea SALK_041357C y los oligonucleótidos empleados, RP en verde, LP en rosa y LBB 1.3 en rojo (A) y genotipado mediante PCR de las plantas mutantes *Atkup8* y el silvestre (WT) (B). Los amplicones teñidos con bromuro de etidio se muestran usando los oligos LP, RP y LBB1.3 descritos en la Tabla 3.10. Secuencia de nucleótidos de *KUP8*, en amarillo se presenta la región bloqueada por el inserto T-DNA SALK_041357C y la posición de ambos oligonucleótidos (C).

Las plántulas crecieron en placa vertical conteniendo el medio con la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu). En estas condiciones, *Atkup8* mostraba una longitud de raíz mayor con respecto a las plántulas WT después de 7 días de crecimiento (Figura 4.28 A y B). Se confirmó así el fenotipo ya observado en el proceso de selección de estas líneas en respuesta a la mezcla de metales. Además, se realizó el estudio de expresión mediante RT-PCR semicuantitativa en las plántulas WT después de 7 días de crecimiento en placa de cultivo conteniendo la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu), respecto al medio control, observándose una inducción del gen *KUP8* significativa en el WT mientras que en el mutante *Atkup8* no se observó expresión en ningún caso (Figura 4.28C).

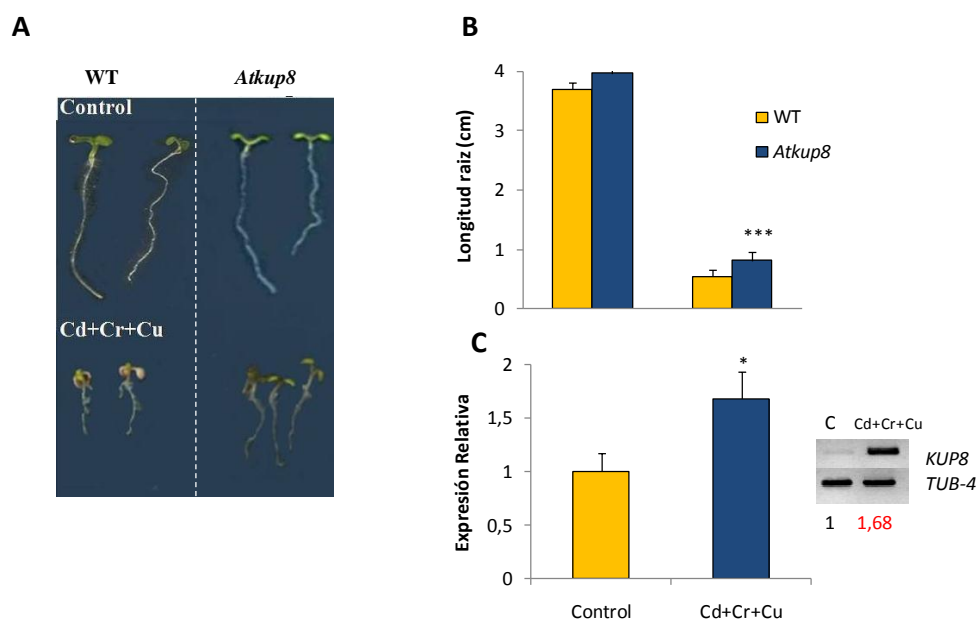


Figura 4.28. Fenotipo (A) y longitud de la raíz (B) del mutante *Atkup8* y del WT después de 7 días de crecimiento en el medio control y con la mezcla de metales. Expresión relativa mediante RT-PCR semicuantitativa de *KUP8* en plántulas de WT de 7 días, en condiciones de estrés debido a la mezcla de los metales (C). Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$: *; $p < 0,01$: **; $p < 0,001$: ***) de acuerdo con la prueba T de Student.

4.5.3 Estudio de homologías entre proteínas KUP

Se construyó un árbol comparando las secuencias aminoacídicas de las proteínas KUP de *Arabidopsis thaliana* deducidas del cDNA de cada uno de ellas (Figura 4.29). De este modo se pudieron obtener algunas conclusiones sobre la similitud funcional que cabría esperar entre las proteínas KUP.

Según este árbol de homologías, el primer grupo lo constituyen las proteínas KUP1, KUP2, KUP6 y KUP8, estando más próximos KUP1 y KUP2 y la proteína KUP8

presentaba una secuencia de aminoácidos con mayor homología a la del KUP6. Un segundo grupo estaba compuesto por KUP3 y KUP4. El tercer grupo lo forman KUP9, KUP10 y KUP11; y el cuarto grupo representaría las proteínas KUP12, KUP5 y KUP7. Finalmente, en el quinto aparecía una sola proteína, HAK5 (Figura 4.29).

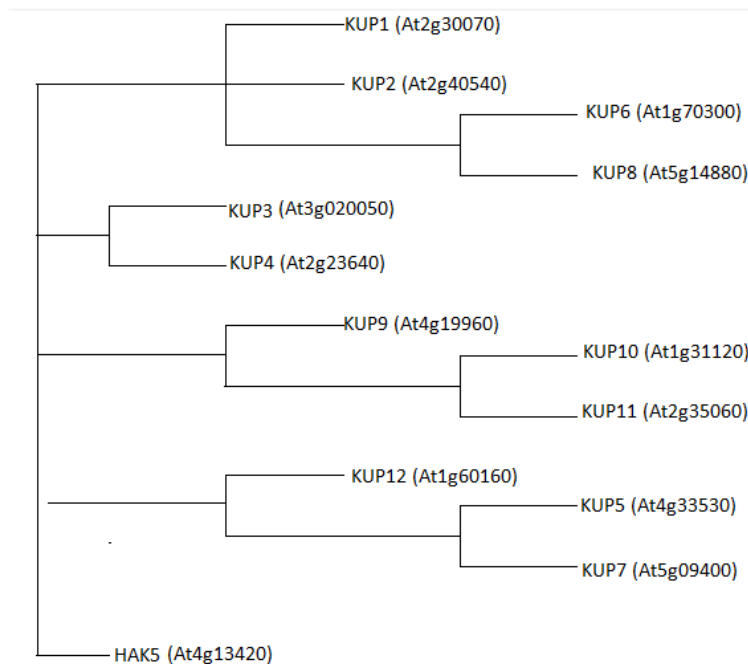


Figura 4.29. Árbol de homología entre las secuencias aminoacídicas de las proteínas KUP de *Arabidopsis thaliana*, según el programa “Vector NTI”.

4.5.4 Expresión de la familia KUP en plántulas

Se realizó un estudio mediante RT-PCR semicuantitativa de la expresión de todos los miembros de la familia KUP tanto en el genotipo WT como en *Atkup8*, en plántulas crecidas durante 7 días en placa de cultivo conteniendo la mezcla de metales. Este estudio mostró una inducción de los genes *KUP5*, *KUP6*, *KUP8* y *KUP11* en WT (Figura 4.30A) que no se observó en el mutante en condiciones de estrés por la mezcla de metales. En cambio, en el genotipo *Atkup8* se observó una inducción de *KUP1*, *KUP9*, *KUP10* y *KUP11*, detectándose la mayor inducción en *KUP1*. Este resultado podría sugerir que el transportador KUP1 podría estar relacionado con el fenotipo observado en el mutante *Atkup8* (Figura 4.30B).

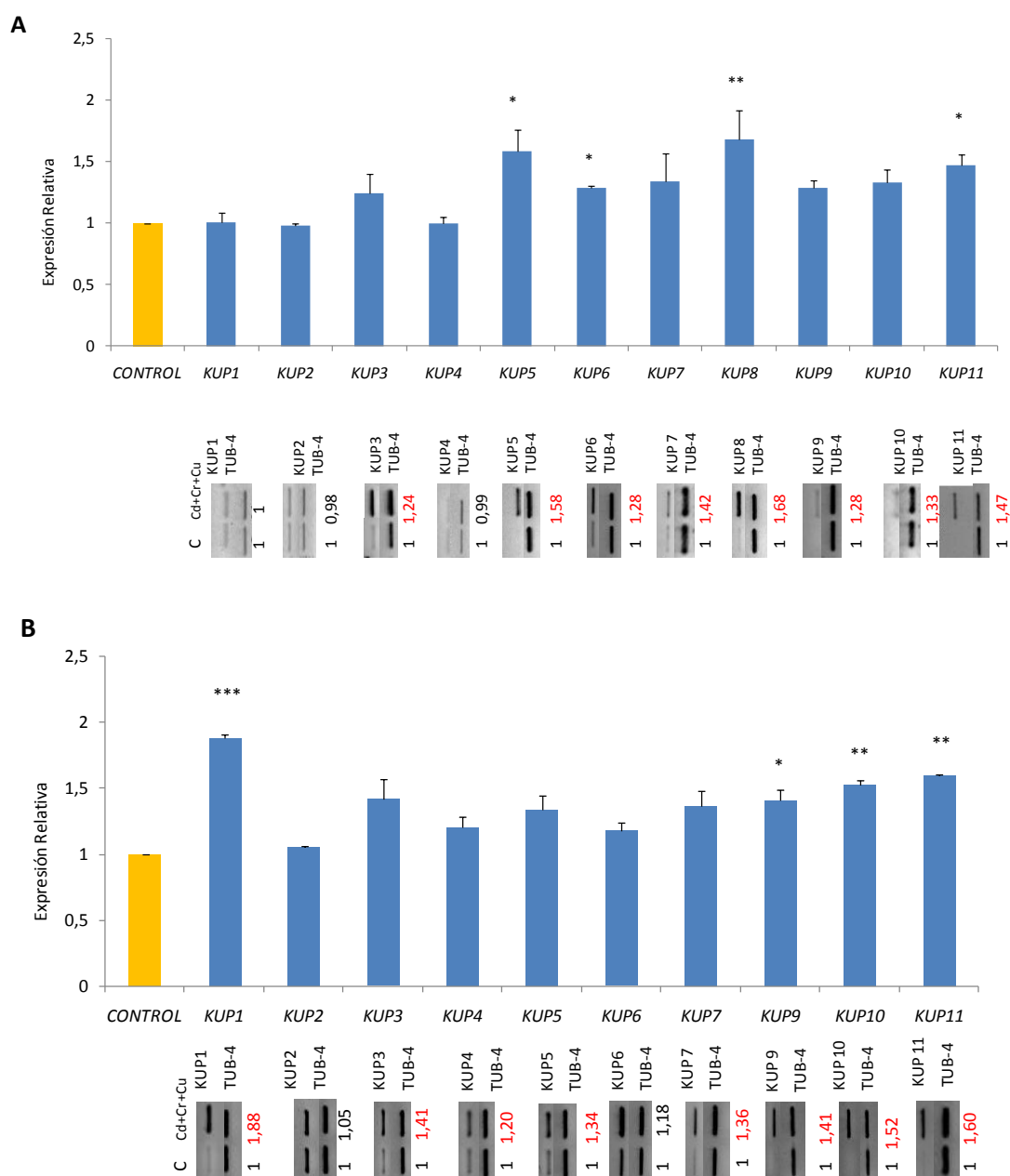


Figura 4.30. Expresión de la familia de genes *KUP* mediante RT-PCR semicuantitativa en el WT (A) y el mutante *Atkup8* (B) en respuesta al tratamiento con la mezcla de metales. Los datos representan la media ± error estándar de al menos dos experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control ($p < 0,05$: *; $p < 0,01$: **; $p < 0,001$: ***) de acuerdo con la prueba T de Student.

4.5.5 Estudio de expresión “in silico” de KUP1

Según los resultados anteriores, el transportador KUP1 podría estar relacionado con el fenotipo observado en el mutante *Atkup8* y por ello se estudió esta línea en mayor profundidad. La línea *Atkup1* presenta una inserción de T-DNA en el gen *KUP1*. El estudio de expresión “in silico” mediante la búsqueda de información en las bases de datos, eFP-Browser (<http://bar.utoronto.ca/>; Winter y col., 2007) y Genevestigator

(<https://genevestigator.com/gv/>) reveló que la mayor expresión registrada en *Arabidopsis thaliana* para el gen *KUPI* se daba en el desarrollo de la semilla (Figura 4.31A y C) así como en el periciclo, en el floema y las células meristemáticas (Figura 4.31B). También se observó expresión en la epidermis de la parte superior del tallo y en menor medida de la parte inferior (Figura 4.31D).

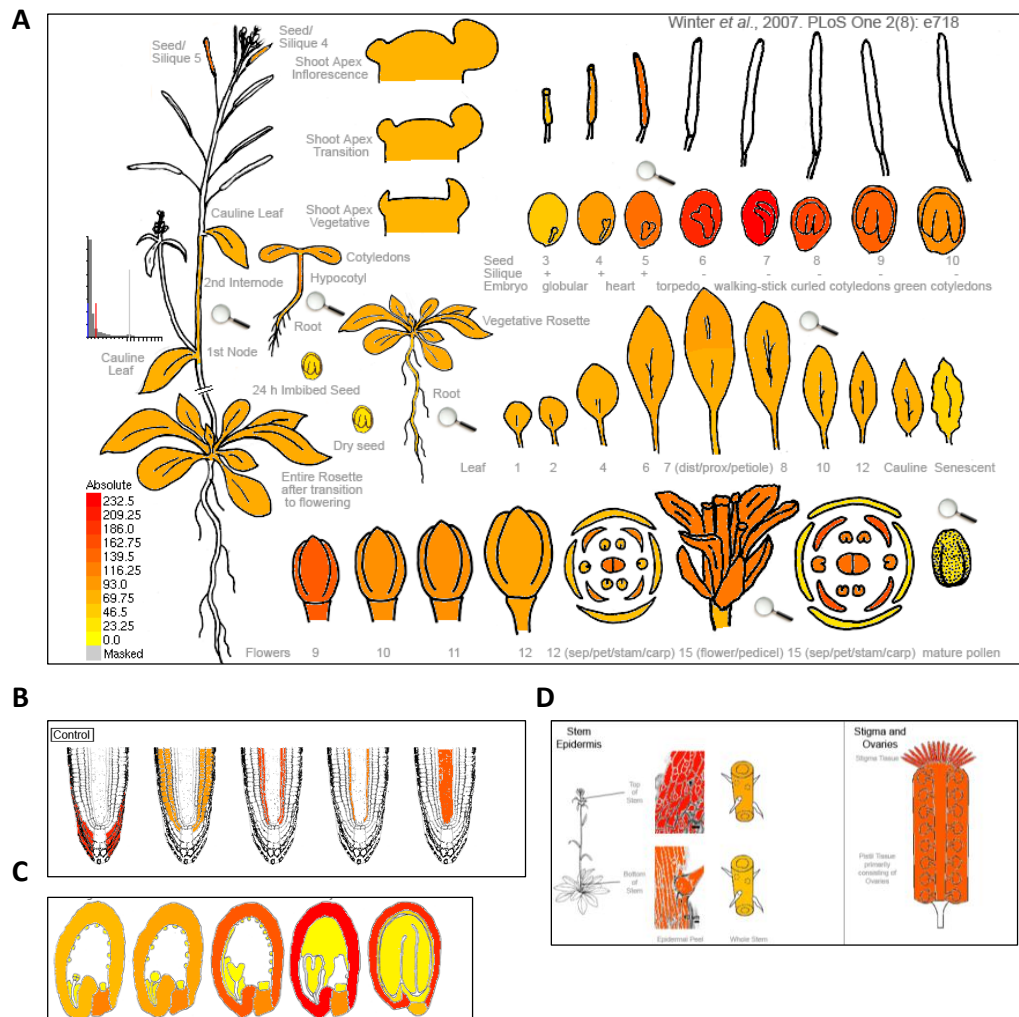


Figura 4.31. Datos de expresión de *KUPI* disponibles en <http://bar.utoronto.ca>. Expresión de *KUPI* en las distintas partes de la planta (A), en el xilema y floema (B), en el desarrollo de la semilla (C), en la epidermis de la parte superior e inferior del tallo (D).

Además, se observó una inducción del *KUPI* durante la iniciación del crecimiento de raíces laterales en ausencia de auxinas (Figura 4.32).

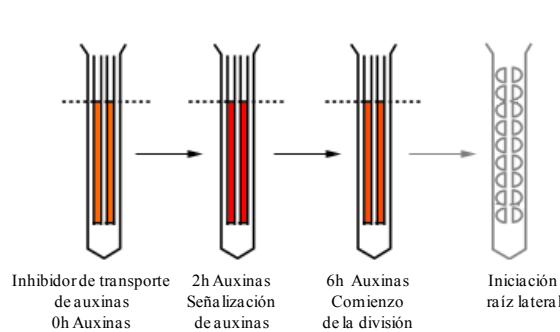


Figura 4.32. Expresión de *KUP1* en experimentos con auxinas durante el desarrollo de raíces laterales. Disponible en <http://bar.utoronto.ca>

4.5.6 Homocigosis de *Atkup1* y fenotipo frente a la mezcla de metales

La línea mutante *Atkup1* (SALK_051343C) presenta una inserción de T-DNA en el primer exón del locus At2g30070 (*KUP1*). Las plantas fueron genotipadas mediante PCR teniendo en cuenta la posición y orientación del inserto, tal y como se indica en la Figura 4.33 (A y C). Se emplearon oligonucleótidos específicos del gen *KUP1* (LP y RP) y el oligonucleótido LBB1.3 específico del T-DNA. Sus secuencias se describen en la Tabla 3.10 de esta memoria. Se comprobó que se amplificaba la región LP/LBB1.3 en la región LP/RP confirmando así la homocigosis de la línea mutante (Figura 4.33B).

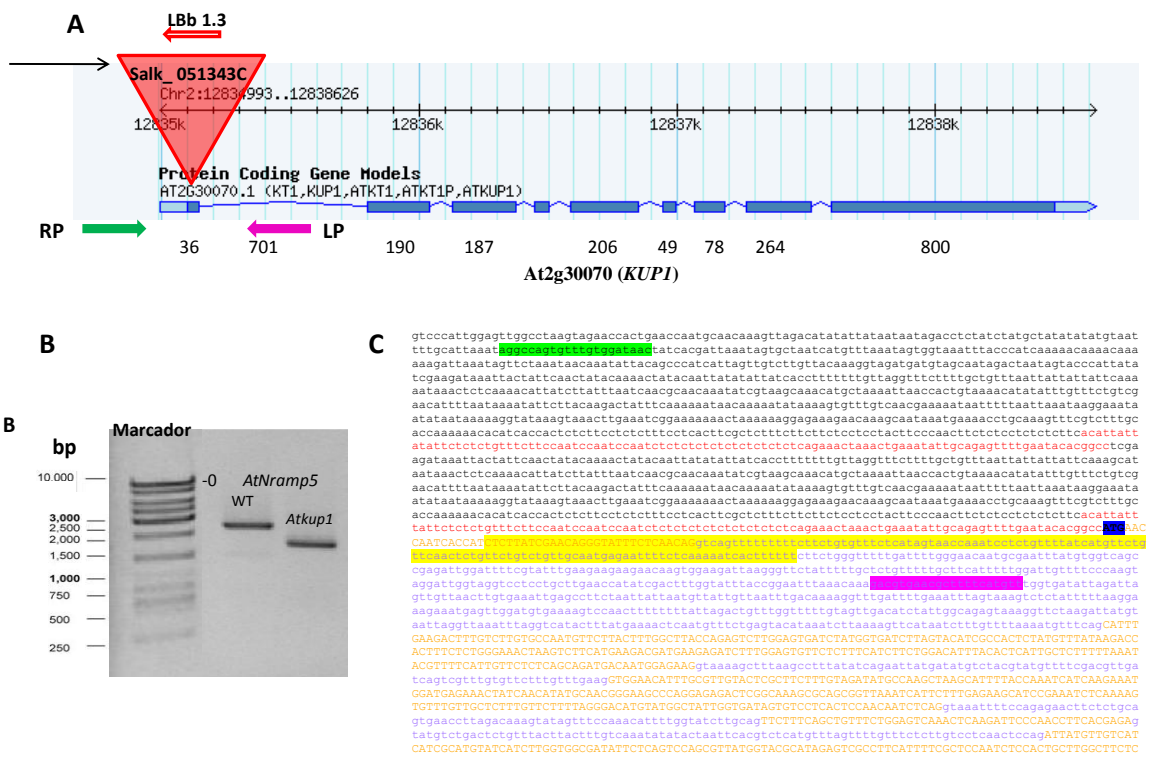


Figura 4.33. Localización de la inserción de T-DNA en el gen At2g30070 (*KUP1*) en la línea SALK_051343C y los oligonucleótidos empleados, RP en verde, LP en rosa y LBB 1.3 en rojo (A) y genotipado mediante PCR de las plantas mutantes *Atkup1* y el WT (B). Los amplicones teñidos con bromuro de etidio se muestran usando los oligos LP, RP y LBB1.3 descritos en la Tabla 3.10. Secuencia de nucleótidos de *KUP1* identificando la región bloqueada por el inserto de T-DNA y la posición de ambos oligonucleótidos (C).

Las plántulas de *Atkup1* crecidas en placa conteniendo el medio con la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu) no mostraron un fenotipo resistente, respecto a las plántulas WT después de 7 días de crecimiento (Figura 4.34 A y B). Además, se realizó el estudio de expresión mediante RT-PCR semicuantitativa en las plántulas WT después de 7 días de crecimiento en placa y no se observó inducción del gen *KUPI* (Figura 4.34C).

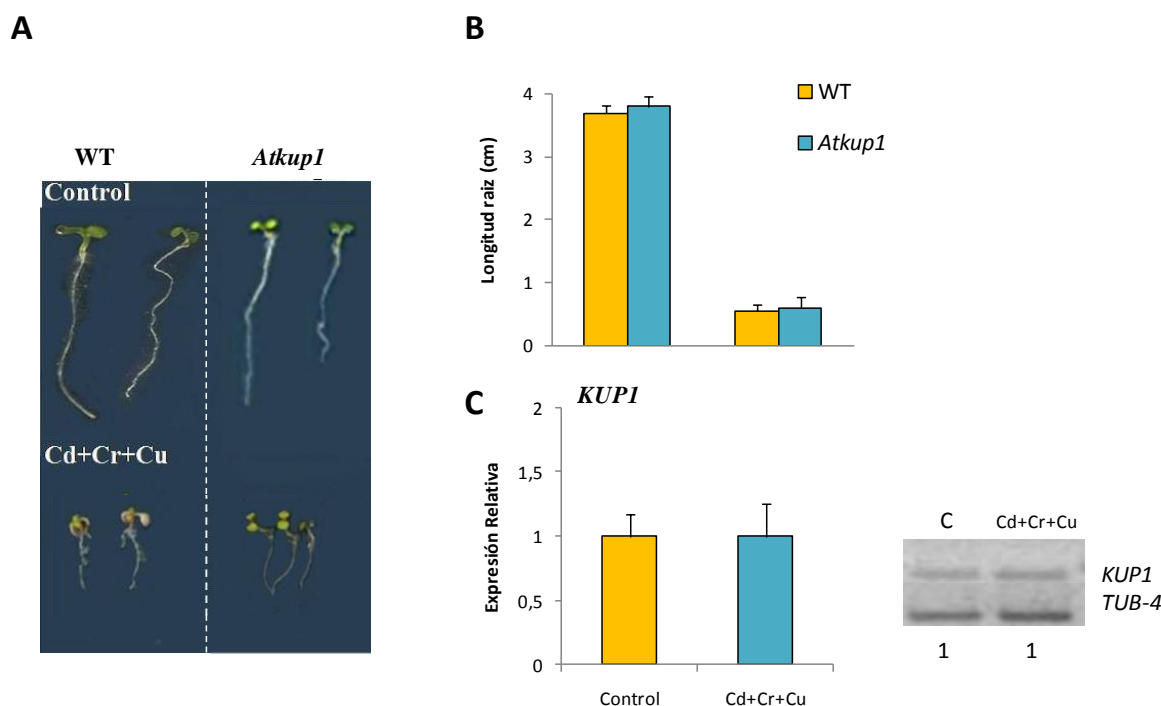


Figura 4.34. Fenotipo (A) y longitud de la raíz (B) del mutante *Atkup1* respecto de WT después de 7 días de crecimiento en el medio control y con la mezcla de metales. Expresión relativa mediante RT-PCR semicuantitativa de *KUPI* en plántulas de 7 días de WT, en condiciones de estrés debido a la mezcla de los metales (C). Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones.

4.5.7 Respuesta de *Atkup8* y *Atkup1* frente a diferentes metales por separado

Para determinar si la resistencia a la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu) mostrada por los mutantes se establecía frente al conjunto de metales o específicamente frente a alguno de ellos, se realizó el estudio en plántulas crecidas en placas de cultivo con los distintos metales por separado.

Germinación

Los datos mostraron un incremento en el índice de germinación de ambos mutantes respecto al genotipo silvestre en todos los medios estudiados (Figura 4.35). En todos los casos, el índice de germinación en los primeros días fue superior para ambos mutantes, excepto para el *Atkup1* con Cu, aunque el genotipo silvestre llegó a los mismos valores de germinación en el cuarto día, donde el 100% de las semillas germinaron en todos los casos estudiados (Figura 4.35).

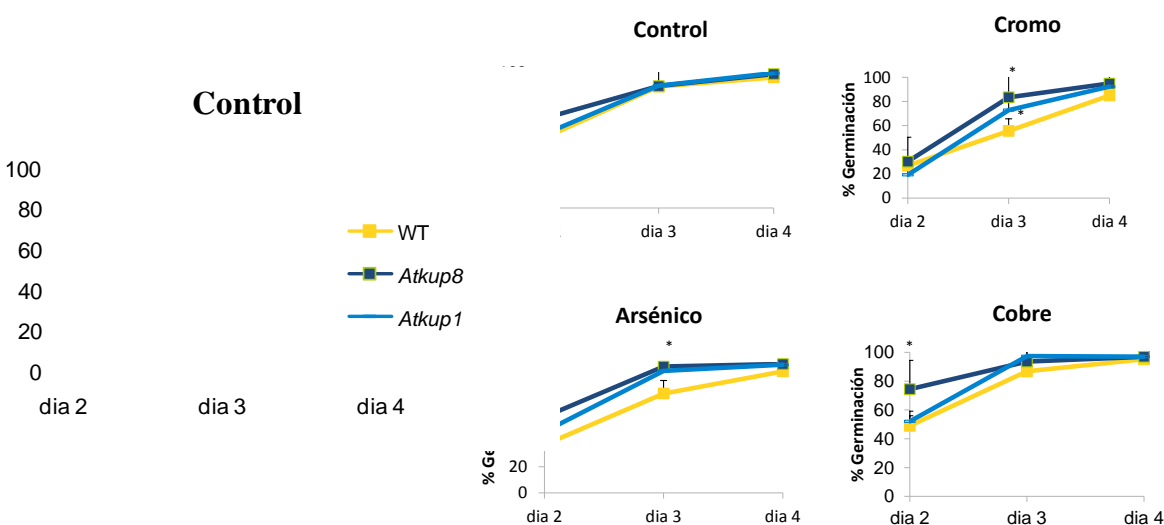


Figura 4.35. Porcentaje de germinación de *Atkup8*, *Atkup1* y WT en medio Hoagland con las diferentes concentraciones de metales: As 30 μ M, Cr 100 μ M, Cu 25 μ M. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del WT ($p < 0,05$; *) de acuerdo con la prueba T de Student.

Peso fresco y longitud de raíces

Se analizó el peso fresco de ambos genotipos respecto del WT en los diferentes medios de cultivo. Se observó que el peso de las plántulas era similar al de WT en condiciones control. El peso fresco del *Atkup8* fue superior de manera significativa en el tratamiento con Cr; al igual que en el *Atkup1* (Figura 4.36). En cuanto al desarrollo radicular, *Atkup8* parecía desarrollarse más que el WT en el medio con As pero curiosamente no se registraron diferencias en el medio con Cr; mientras que *Atkup1* se comportó de manera similar al WT.

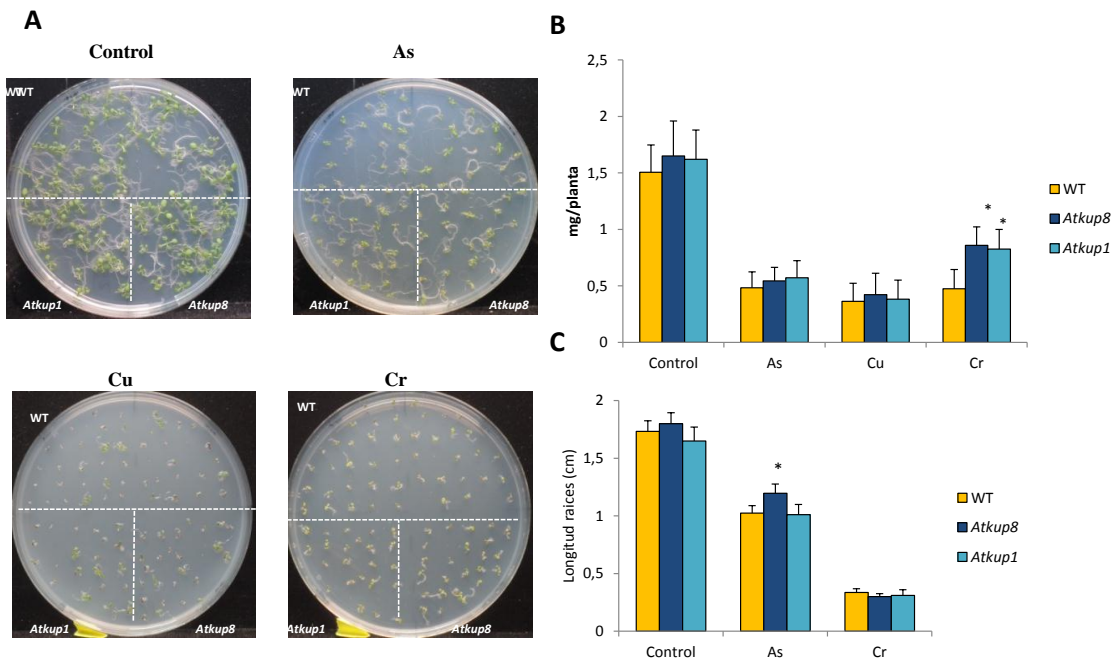


Figura 4.36. Imagen representativa del crecimiento de plántulas de *Atkup8*, *Atkup1* y WT (A), peso fresco (B) y longitud de raíz (C) crecidas en placas durante 7 días en medio Hoagland y los distintos metales: As 30 μ M, Cr 100 μ M, Cu 25 μ M. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del WT ($p < 0,05$: *), de acuerdo con la prueba T de Student.

Hojas verdaderas

La tasa de aparición de hojas verdaderas demostró un comportamiento de resistencia del *Atkup8* en el medio con Cu en los primeros días, pero para el *Atkup1* no se encontraron diferencias significativas respecto del WT en ninguno de los casos estudiados (Figura 4.37).

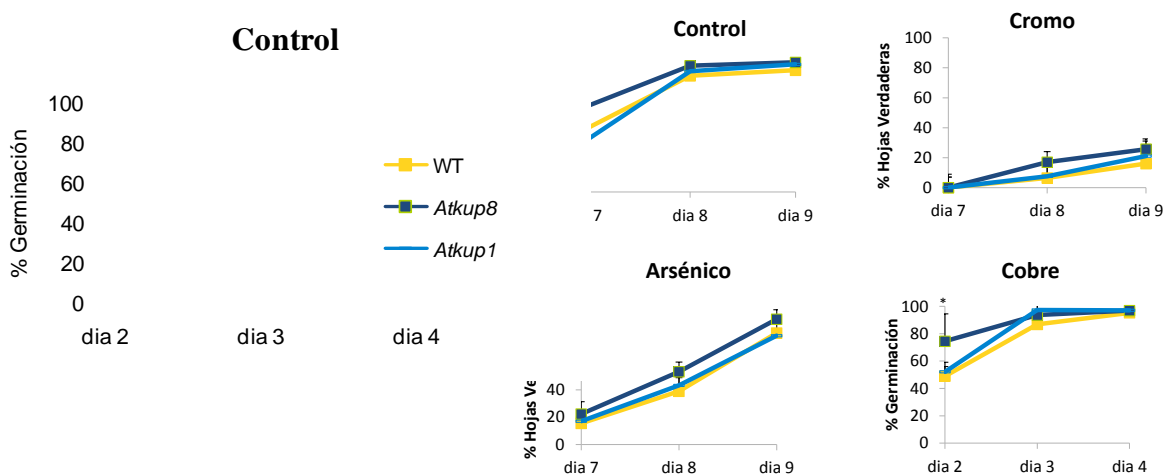


Figura 4.37. Tasa de aparición de hojas verdaderas en plantas *Atkup8*, *Atkup1* y WT crecidas en medio Hoagland con los distintos metales; As 30 μ M, Cr 100 μ M, Cu 25 μ M. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del WT ($p < 0,05$: *) de acuerdo con la prueba T de Student.

4.5.8 Respuesta de plántulas de *Atkup1kup8* frente a la mezcla de metales y el cadmio

A partir de *Atkup8* y *Atkup1* se generó el doble mutante mediante fecundación dirigida como se indica en el apartado 3.1.2 de esta memoria, con el objetivo de estudiar si este doble mutante revertía el fenotipo y el comportamiento observado en *Atkup8*; y de esta manera comprobar el papel de estos transportadores en la respuesta de la planta al estrés por metales y al cadmio.

Con el fin de caracterizar el doble mutante, se realizó el estudio en placa tanto en medio Hoagland con la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu) como con cadmio 50 μ M. A partir de esas condiciones de estrés se analizó la tolerancia de los mutantes midiendo su longitud de raíz, el porcentaje de germinación y hojas verdaderas y el peso fresco por planta para los distintos genotipos.

Germinación y tasa de hojas verdaderas

El doble mutante *Atkup1kup8* y la línea *Atkup8*, presentaron una tasa de germinación superior al WT en ambos tratamientos siendo significativo el caso de *Atkup1kup8* para el tratamiento con Cd. La línea *Atkup1* no presentó diferencias significativas respecto del WT, como se había observado anteriormente (Figura 4.38A). En relación a la aparición de hojas verdaderas, se observó una aparición anticipada de éstas en el doble mutante *Atkup1kup8* y en *Atkup8* en condiciones control y también en ambos tratamientos, aunque en el caso del cadmio, las hojas verdaderas no llegaban a desarrollarse en todas las plántulas (Figura 4.38B), llegando a alcanzar tan solo el 40% de desarrollo. La línea *Atkup1* en el tratamiento con la mezcla de metales presentó una tasa de aparición de hojas verdaderas significativamente inferior a la del WT (Figura 4.38B).

Longitud de raíz y peso fresco

Las plantas de *Atkup1* sembradas en Cd 50 μ M presentaron una disminución en la longitud de raíz de un 95% aproximadamente, por ello, para poder observar mejor las diferencias entre líneas también se sembraron en un medio preparado con la mitad de la concentración de cadmio (25 μ M; Figura 4.39). Las líneas *Atkup1kup8* y *Atkup8* mostraron un patrón similar entre ellas y significativamente mayor al WT, tanto en el tratamiento con la mezcla de metales como con el cadmio, pero no se observaron

diferencias de *Atkup1* con respecto al WT en ninguno de los tratamientos. El doble mutante es además significativamente mayor al WT también en condiciones control (Figura 4.38D).

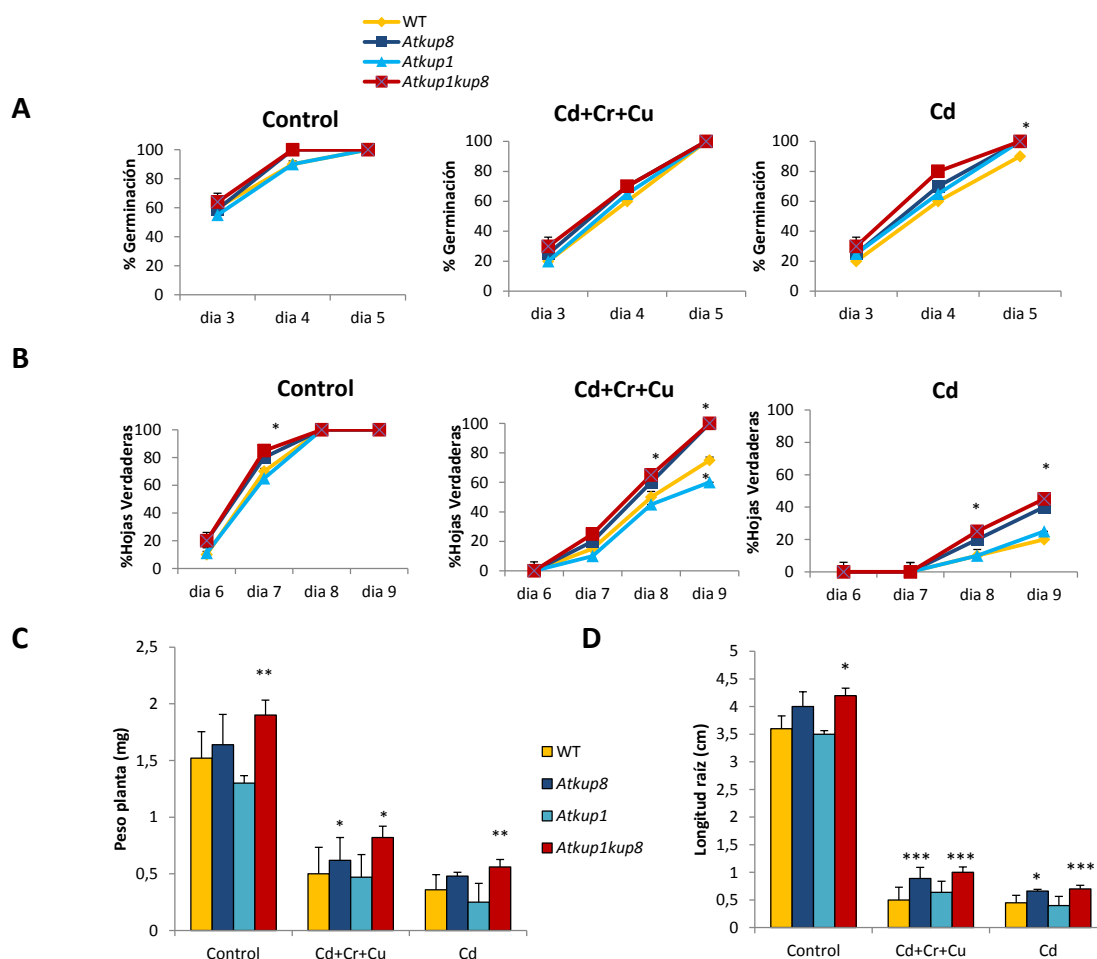


Figura 4.38. Porcentaje de germinación (A), tasa de aparición de hojas verdaderas (B), peso fresco (mg/planta) (C) y longitud de la raíz principal (D) en plántulas de *Atkup8*, *Atkup1*, *Atkup1kup8* y de WT cultivadas en medio Hoagland control, la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu) y en Cd 25 μ M. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al WT ($p < 0,05$: *; $p < 0,01$: **; $p < 0,001$: ***), de acuerdo con la prueba T de Student.

Las plántulas de *A. thaliana* desarrolladas en el medio conteniendo la mezcla de metales presentaron una disminución del peso fresco entre un 50 y un 70% y las plántulas crecidas en Cd entorno a un 60 y un 80 % en comparación al control. Las líneas *Atkup1kup8* y *Atkup8* presentaron un peso fresco superior al WT, mientras que el mutante *Atkup1* no mostraba diferencias significativas respecto al genotipo silvestre en ninguno de los tratamientos (Figura 4.38C).

En la Figura 4.39 se muestra el fenotipo de las distintas líneas mutantes en condiciones control, el tratamiento con la mezcla de metales y el tratamiento con Cd.

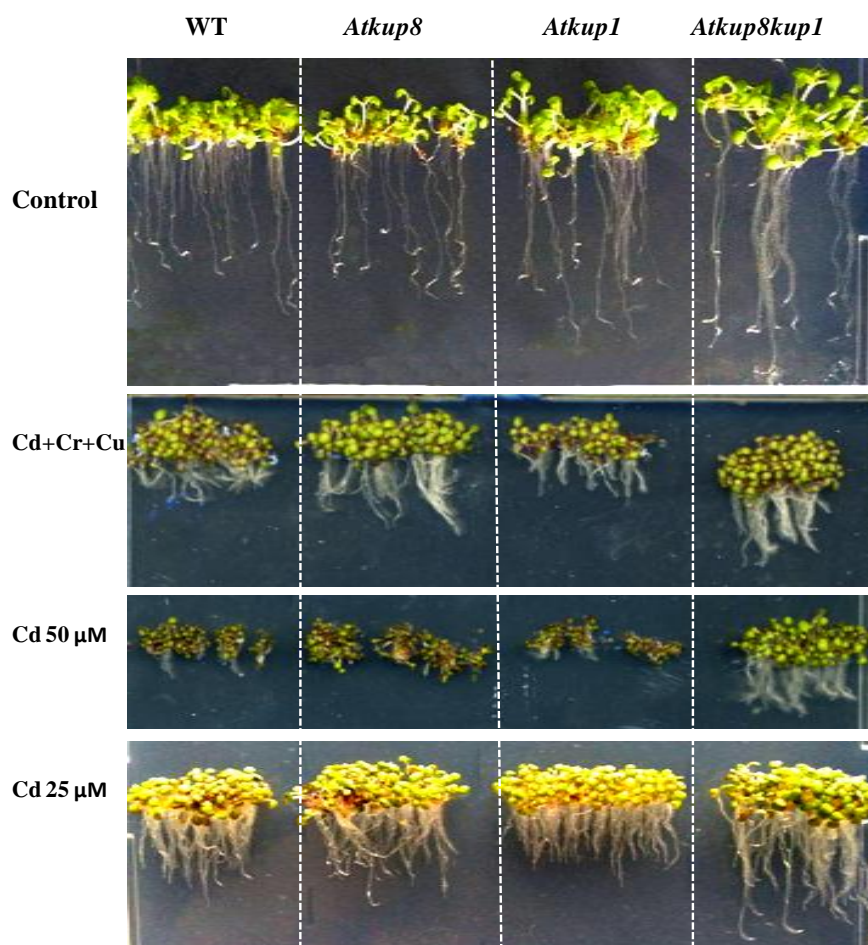


Figura 4.39. Imagen representativa del crecimiento de las plántulas de 7 días en control y los tratamientos con la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu), Cd 50 μ M y Cd 25 μ M.

4.5.9 Caracterización fenotípica en tierra y en cultivo hidropónico de *Atkup8*, *Atkup1* y *Atkup1kup8*

Número de hojas de roseta, número de silicuas y área foliar

La caracterización en tierra y en cultivo hidropónico permitió observar el fenotipo de los mutantes en etapas de crecimiento más tardías en condiciones control. Las semillas se sembraron en tierra y se obtuvieron datos del número de hojas de roseta y el área foliar de plantas de 21 días de crecimiento y de 38 días de desarrollo para la medida del número de silicuas. Todos los mutantes presentaron un área foliar y un número de hojas de roseta superior respecto al genotipo silvestre, siendo más claras estas diferencias para los mutantes *Atkup8* y *Atkup1kup8* (Figura 4.40A, B y C). En el número de silicuas se

observó una mayor producción para *Atkup8* y *Atkup1kup8* pero para *Atkup1* fue significativamente inferior, en comparación con el genotipo silvestre (Figura 4.40D). En relación a los resultados obtenidos parecía existir un crecimiento, desarrollo y productividad mayor en los mutantes *Atkup8* y *Atkup1kup8* en la etapa adulta, pues en condiciones de crecimiento óptimas y en ausencia de metales, presentaban un desarrollo superior al genotipo silvestre (Figura 4.40E).

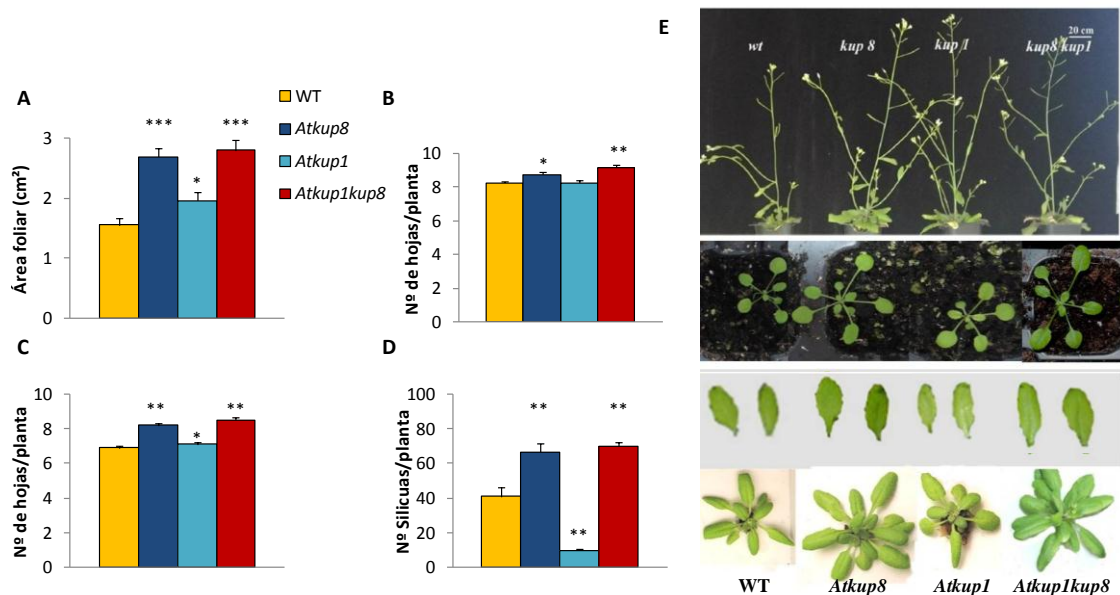


Figura 4.40. Área foliar (A), hojas en roseta de plantas crecidas en hidroponía (B) y en tierra (C) durante 21 días y producción de silicuas (D), de plantas crecidas en tierra durante 38 días. Fenotipo en tierra y en cultivo hidropónico (E). Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del WT ($p < 0,05$: *; $p < 0,01$: **; $p < 0,001$: ***) de acuerdo con la prueba T de Student.

4.5.10 Respuesta de plantas adultas frente a la mezcla de metales

4.5.10.1 Crecimiento de *Atkup8* y *Atkup1* en cultivo hidropónico

Se estudió el peso fresco como parámetro de crecimiento de los mutantes respecto del WT. Para ello, las plantas crecieron en cultivo hidropónico durante 21 días y posteriormente se adicionó la mezcla de metales durante 24 horas. El mutante *Atkup8* mostró un comportamiento asociable a un fenotipo resistente en términos de peso fresco de la parte aérea y raíz, si bien, ya era ligeramente mayor en la parte aérea en condiciones control. Sin embargo, *Atkup1* no presentó diferencias respecto del WT en la parte aérea pero sí en la raíz (Figura 4.41).

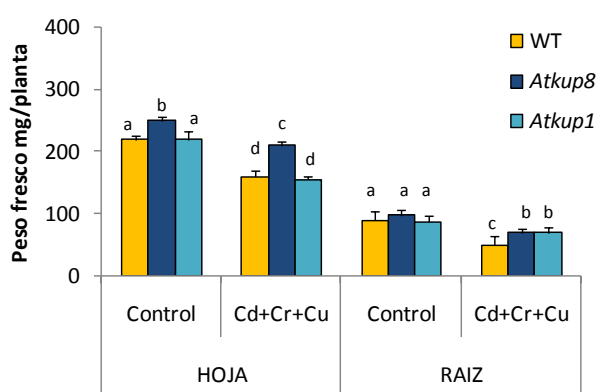


Figura 4.41. Peso fresco de plantas *Atkup8*, *Atkup1* y WT crecidas en cultivo hidropónico y 24 h de tratamiento posterior en la mezcla de metales. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

4.5.10.2 Análisis del contenido de metales de *Atkup8* y *Atkup1*

Se analizó el contenido de los metales en las raíces y en la parte aérea de las plantas *Atkup8*, *Atkup1* y WT crecidas en cultivo hidropónico y posteriormente tratadas durante 24 horas con la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu). Además, se calculó el contenido total de cada metal y los porcentajes de translocación de la raíz a la parte aérea. En cuanto a los resultados obtenidos de contenido total de Cd en hojas y raíces, se observó una disminución significativa en el mutante *Atkup1* respecto del WT y *Atkup8* presentó una ligera disminución en la translocación de Cd (Figura 4.42, Tabla 4.13). Para el Cr y el Cu no se observaron diferencias ni en hoja ni en raíz.

Tabla 4.13. Porcentaje de translocación de cadmio (Cd), cobre (Cu) y cromo (Cr) de raíces a la parte aérea de plantas *Atkup8*, *Atkup1* y WT de 21 días expuestas durante 1 día a Cd 50 μ M, Cu 50 μ M y Cr 100 μ M. Los datos son media de dos repeticiones independientes \pm SD. Los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

METALES	Cd+Cr+Cu			
	WT	<i>Atkup8</i>	<i>Atkup1</i>	
Hoja+Raiz	Cd (mg/Kg)	637,06 \pm 97,8 a	625,84 \pm 69,4 a	513,4 \pm 46,2 b
	Cr (mg/Kg)	1703,10 \pm 171 a	1695,97 \pm 155 a	1780,8 \pm 65,1 a
	Cu (mg/Kg)	1026,56 \pm 111 a	1090,80 \pm 102 a	1145,7 \pm 105 a
%Translocación	Cd	23,87 \pm 4,78 a	20,80 \pm 3,33 b	25,26 \pm 2,68 a
	Cr	5,55 \pm 0,47 a	4,70 \pm 0,86 a	5,43 \pm 0,59 a
	Cu	8,97 \pm 1,52 a	7,64 \pm 0,51 a	7,60 \pm 1,11 a

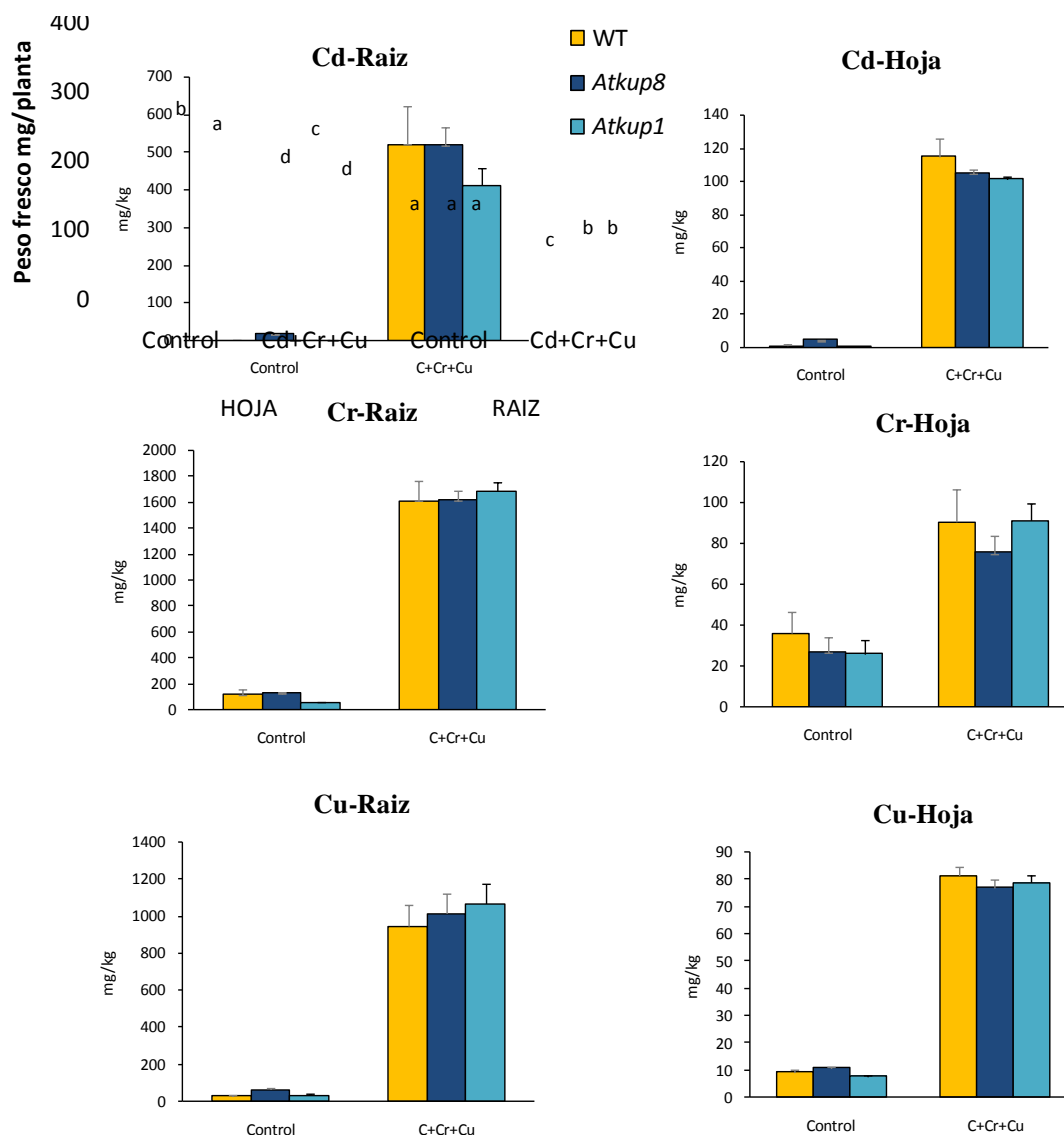


Figura 4.42. Análisis mediante ICP del contenido de Cd, Cr y Cu en hojas y raíces de los mutantes *Atkup8*, *Atkup1* y en plantas WT. Las plantas se cultivaron en condiciones de hidroponía durante tres semanas y después se añadió la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu) durante 24 h. Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los datos no presentan diferencias significativas entre ellos.

Los resultados obtenidos del contenido de micronutrientes en condiciones normales y de tratamiento con la mezcla de metales, sugieren que no hay diferencias en la captación de Fe por parte de la raíz en ambos mutantes respecto del WT en condiciones normales, y también fue muy similar en el tratamiento con la mezcla de metales, aunque se observó una disminución en el contenido en hoja en *Atkup8* y por tanto, en la traslocación de Fe de la raíz a la parte aérea (Tabla 4.14). La captación de Mn de ambos

mutantes en la mezcla de metales fue inferior, pero el contenido en hoja para *Atkup1* fue superior al de WT, mientras que en *Atkup8* fue inferior, por lo que la traslocación de este metal se vio alterada en ambos mutantes.

Tabla 4.14. Efecto del tratamiento con metales pesados durante 1 día sobre el contenido de Fe, Mn y Zn (mg/Kg) de hojas y raíces y el % de translocación en *Atkup8*, *Atkup1* y WT. Los datos son media de dos repeticiones independientes \pm SD. Los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

MICRONUTRIENTES	Control			Cd+Cr+Cu			
	WT	<i>Atkup8</i>	<i>Atkup1</i>	WT	<i>Atkup8</i>	<i>Atkup1</i>	
Hoja	Fe (mg/g)	2,966 \pm 0,96 a	2,127 \pm 0,69 a	2,14 \pm 0,57 a	3,67 \pm 1,53 a	2,66 \pm 1,22 a	4,3973 \pm 1,03 a
	Mn (mg/Kg)	384,92 \pm 41,5 a	378,08 \pm 39,7 a	362,22 \pm 24,9 a	401,81 \pm 88,9 a	329,86 \pm 49,7 a	445,75 \pm 66,7 b
	Zn (mg/Kg)	90,50 \pm 3,36 a	93,56 \pm 1,59 a	93,05 \pm 2,55 a	87,69 \pm 1,93 b	84,82 \pm 0,78 b	89,024 \pm 1,43 b
Raíz	Fe (mg/g)	12,24 \pm 2,56 a	11,17 \pm 1,86 a	8,0698 \pm 0,45 a	31,42 \pm 1,26 b	29,48 \pm 2,23 b	30,722 \pm 4,09 b
	Mn (mg/Kg)	601,18 \pm 171 a	429,80 \pm 71,3 b	343,46 \pm 10,9 b	686,85 \pm 179 a	436,60 \pm 36,7 b	563,56 \pm 117 b
	Zn (mg/Kg)	234,33 \pm 8,49 a	232,14 \pm 24,3 a	252,46 \pm 9,43 b	58,58 \pm 4,17 c	54,40 \pm 11,2 c	48,449 \pm 8,86 c
Hoja+Raíz	Fe (mg/g)	14,14 \pm 2,80 a	13,30 \pm 1,21 a	10,71 \pm 0,21 a	35,10 \pm 2,62 b	32,15 \pm 3,37 b	35,119 \pm 4,96 b
	Mn (mg/Kg)	916,55 \pm 190 a	807,88 \pm 57,0 a,b	716,26 \pm 20,1 b	1088,66 \pm 103 b	766,46 \pm 53,3 a	1009,3 \pm 115 a,b
	Zn (mg/Kg)	324,97 \pm 11,5 a	325,69 \pm 25,1 a,b	367,56 \pm 10,9 b	146,27 \pm 5,13 c	139,21 \pm 11,0 c	137,47 \pm 8,51 c
%Translocación	Fe	28,87 \pm 11,8 a	22,72 \pm 9,83 b	26,007 \pm 8,68 a	11,44 \pm 4,37 c	8,57 \pm 3,28 c	14,033 \pm 2,46 c
	Mn	83,81 \pm 18,1 a	97,95 \pm 28,1 a	102,85 \pm 9,74 a	78,19 \pm 40,2 a	77,31 \pm 15,5 a	87,935 \pm 27,0 a
	Zn	38,61 \pm 0,72 a	41,24 \pm 3,99 a	33,952 \pm 1,07 a	151,09 \pm 10,2 b	168,19 \pm 27,0 b	195,34 \pm 32,3 b

Respecto al contenido de macronutrientes, cabe destacar que el contenido de K en raíz fue superior en ambos mutantes en condiciones control, aunque no de forma significativa en *Atkup1*, pero en el tratamiento se vio disminuida, y en mayor medida en *Atkup1*. La translocación en ambos mutantes fue inferior en condiciones control aunque no de forma significativa, pero superior en el tratamiento, especialmente en *Atkup1* (Tabla 4.15).

La captación de Ca por parte de la raíz de ambos mutantes fue inferior a la del WT en condiciones control y en el tratamiento, aunque no se observaron diferencias en el contenido en hoja, salvo en *Atkup8*, donde el contenido fue inferior con el tratamiento. Por tanto, la translocación de Ca en ambos mutantes fue superior respecto del WT tanto en condiciones control como en la mezcla de metales (Tabla 4.15).

Tabla 4.15. Efecto del tratamiento con mezcla de metales pesados durante 1 día sobre el contenido de macronutrientes (g/100g) en hojas y raíces y el % de translocación en plantas WT, *Atkup8*, *Atkup1*. Los datos son media de dos repeticiones independientes \pm SD. Los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

MACRONUTRIENTES		Control			Cd+Cr+Cu		
		WT	<i>Atkup8</i>	<i>Atkup1</i>	WT	<i>Atkup8</i>	<i>Atkup1</i>
Hoja	Ca (g/100g)	4,66 \pm 0,24 a	4,55 \pm 0,14 a	4,44 \pm 0,13 a,b	4,15 \pm 0,32 a,b	3,80 \pm 0,17 b	4,55 \pm 0,42 a
	K (g/100g)	2,52 \pm 0,05 a	2,71 \pm 0,06 a	2,62 \pm 0,03 a	3,14 \pm 0,16 b	3,35 \pm 0,10 b	3,11 \pm 0,09 b
	Mg (g/100g)	1,00 \pm 0,11 a	0,89 \pm 0,08 a	0,89 \pm 0,04 a	1,03 \pm 0,16 a,b	0,89 \pm 0,11 a	1,11 \pm 0,12 a
	S (g/100g)	0,88 \pm 0,05 a	0,95 \pm 0,00 a,b	0,92 \pm 0,02 a,b	0,83 \pm 0,04 a	0,82 \pm 0,01 a	0,81 \pm 0,03 a
	P (g/100g)	0,84 \pm 0,04 a	0,84 \pm 0,02 a	0,85 \pm 0,03 a	0,66 \pm 0,09 b	0,67 \pm 0,03 b	0,65 \pm 0,06 b
Raíz	Ca (g/100g)	2,95 \pm 0,80 a	2,18 \pm 0,36 a	1,59 \pm 0,08 b	3,46 \pm 0,87 c	2,28 \pm 0,19 a	2,97 \pm 0,57 a
	K (g/100g)	4,41 \pm 0,43 a	6,23 \pm 0,67 b	5,24 \pm 0,14 a	0,52 \pm 0,01 c	0,56 \pm 0,20 a,b	0,32 \pm 0,06 c
	Mg (g/100g)	1,12 \pm 0,31 a	0,81 \pm 0,14 a	0,59 \pm 0,03 b	1,33 \pm 0,36 c	0,82 \pm 0,07 a	1,05 \pm 0,22 a
	S (g/100g)	1,09 \pm 0,05 a	1,17 \pm 0,07 a,b	1,26 \pm 0,03 b	0,35 \pm 0,03 c	0,37 \pm 0,04 c	0,34 \pm 0,02 c
	P (g/100g)	0,82 \pm 0,04 a	0,87 \pm 0,05 a,b	0,93 \pm 0,01 a,b	0,93 \pm 0,10 a,b	1,00 \pm 0,08 a,b	1,06 \pm 0,07 b
Hoja+Raíz	Ca (g/100g)	7,24 \pm 0,92 a	6,74 \pm 0,25 a	6,08 \pm 0,11 a	7,61 \pm 0,56 a	6,08 \pm 0,18 a	7,52 \pm 0,52 a
	K (g/100g)	7,10 \pm 0,42 a	8,94 \pm 0,67 b	7,71 \pm 0,15 a	3,66 \pm 0,16 c	3,91 \pm 0,20 c	3,43 \pm 0,13 c
	Mg (g/100g)	1,97 \pm 0,36 a	1,70 \pm 0,09 a	1,49 \pm 0,03 b	2,37 \pm 0,21 c	1,71 \pm 0,11 a	2,16 \pm 0,25 b,c
	S (g/100g)	1,99 \pm 0,05 a	2,11 \pm 0,07 a,b	2,18 \pm 0,03 b	1,17 \pm 0,02 c	1,19 \pm 0,03 c	1,15 \pm 0,04 c
	P (g/100g)	1,67 \pm 0,03 a	1,71 \pm 0,04 a	1,80 \pm 0,03 b	1,59 \pm 0,05 a	1,66 \pm 0,08 a	1,71 \pm 0,06 a
%Translocación	Ca	210,39 \pm 43,5 a	230,15 \pm 58,6 a,b	271,60 \pm 19,2 c	144,79 \pm 58,6 b	170,10 \pm 18,3 a,b	166,01 \pm 39,0 a,b
	K	56,23 \pm 6,57 a	44,63 \pm 4,43 a	51,56 \pm 1,47 a	607,19 \pm 4,43 b	740,34 \pm 185 b	1058,85 \pm 225 c
	Mg	118,71 \pm 24,5 a	124,74 \pm 39,2 a	149,21 \pm 13,5 a	101,64 \pm 39,2 a	110,43 \pm 20,3 a	114,66 \pm 29,1 a
	S	100,84 \pm 8,56 a	96,90 \pm 6,32 a,b	89,99 \pm 3,93 a,b,c	74,27 \pm 6,32 b,c,d	67,88 \pm 6,57 c,d	61,81 \pm 8,45 d
	P	80,18 \pm 7,38 a	81,87 \pm 5,13 a	73,62 \pm 3,16 a	243,45 \pm 5,13 b	227,49 \pm 23,4 b	238,08 \pm 8,66 b

4.5.10.3 Estudio de expresión de *KUP8* en hoja y en raíz

Se determinó mediante RT-PCR semicuantitativa el patrón de expresión de *KUP8*, tanto de la parte aérea como en la raíz de plantas WT de 21 días de crecimiento en hidroponía en plantas tratadas con la mezcla de metales, a diferentes tiempos.

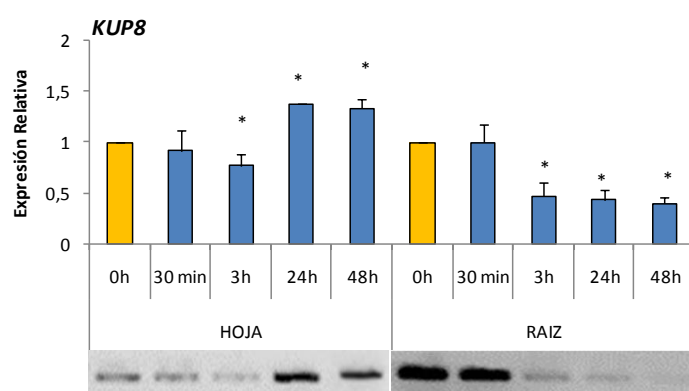


Figura 4.43. Expresión mediante RT-PCR semicuantitativa de *KUP8* en hoja y raíz a diferentes tiempos de tratamiento con la mezcla de metales. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos dos experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$), de acuerdo con la prueba T de Student.

La expresión del *KUP8* mostró un patrón opuesto en hoja y raíz. En la parte aérea se observó una reducción a las 3h y una inducción a las 24 y 48 h; en cambio, en la raíz se observó inhibición a las 3, 24 y 48h con el tratamiento con la mezcla de metales (Figura 4.43).

4.5.10.4 Estudio de parámetros oxidativos

Para determinar si la inserción en *Atkup8* interfiere en la respuesta antioxidante de la planta frente a los metales, se determinaron las actividades catalasa y glicolato oxidasa, así como la peroxidación de lípidos y la producción de H_2O_2 . Las plantas crecieron durante 21 días en sistema hidropónico y posteriormente se añadió la mezcla de metales. Los resultados obtenidos de peroxidación lipídica mostraron un menor daño con respecto al WT a las 48 h de tratamiento (Figura 4.44A). En cuanto a la producción de H_2O_2 no hay cambios significativos entre el mutante y el WT (Figura 4.44B), aunque la actividad GOX a las 48 h fue ligeramente superior en el mutante e inferior a las 24 h (Figura 4.44C). Por otro lado, la actividad catalasa no mostró cambios entre genotipos a tiempos largos aunque a tiempos cortos se comportó de forma opuesta (Figura 4.44D).

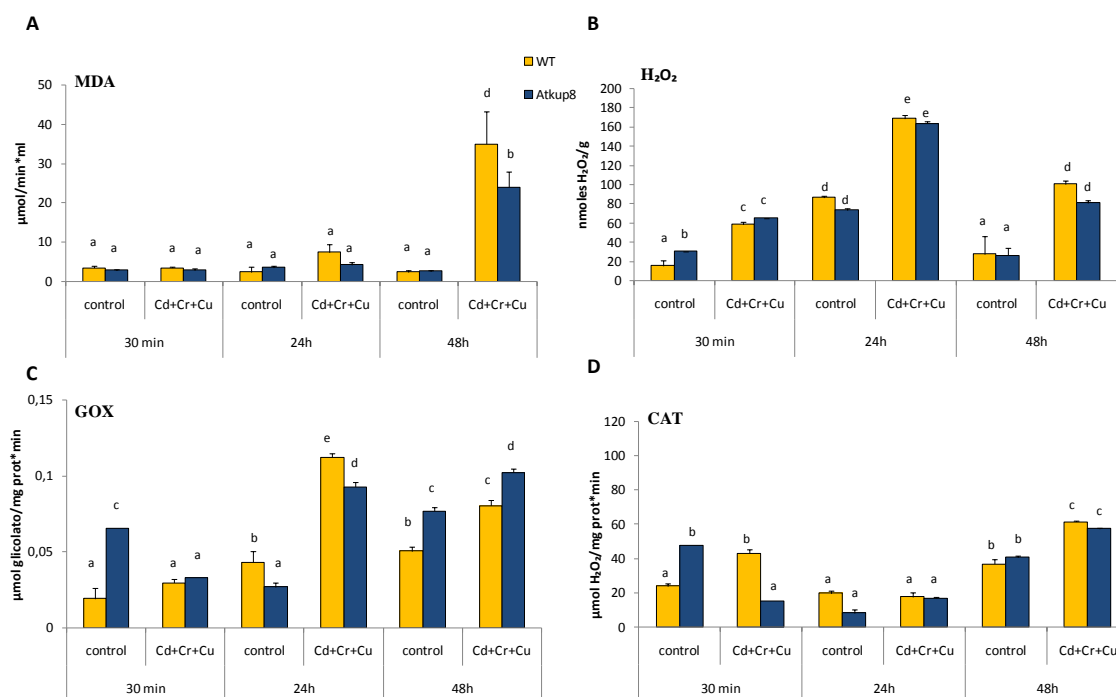


Figura 4.44. Metabolismo oxidativo en respuesta a metales en *Atkup8* y WT. Peroxidación lipídica (A), producción de H_2O_2 (B), actividades glicolato oxidasa (C) y catalasa (D) en plantas *Atkup8* y WT crecidas en cultivo hidropónico con el tratamiento con la mezcla de metales durante 30 min, 24 y 48 h. Los datos son media de tres repeticiones independientes \pm SD. Los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

4.5.11 Respuesta de plantas adultas frente al cadmio

Se estudió el efecto del cadmio sobre la raíz y la parte aérea a nivel de crecimiento, así como a nivel bioquímico, mediante el análisis de parámetros de estrés oxidativo. Además, se analizó el efecto del Cd en la captación, acumulación y translocación de metales, macro y micronutrientes.

4.5.11.1 Crecimiento de *Atkup8* en cultivo hidropónico

Las plantas crecieron en cultivo hidropónico durante 21 días y posteriormente se adicionó el cadmio 50 μM durante 24 horas. El cadmio inducía una reducción del peso fresco tanto de la parte aérea como de la raíz en plantas WT, mientras que en el mutante estas diferencias no eran significativas en la raíz (Figura 4.45).

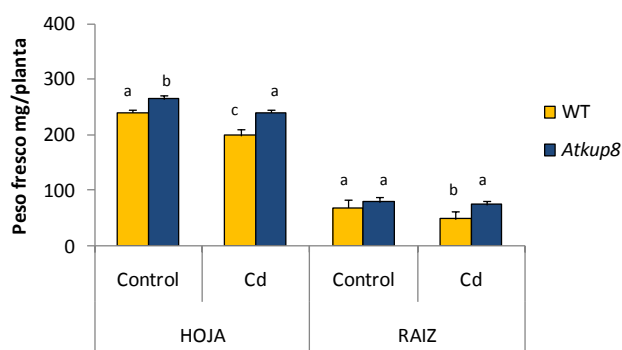


Figura 4.45. Peso fresco de plantas *Atkup8* y WT crecidas en cultivo hidropónico y posterior tratamiento con Cd 50 μM durante 24 h. Los datos son media de dos repeticiones independientes \pm SD. Los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

4.5.11.2 Análisis del contenido de metales

Se analizó el contenido de los metales en las raíces y en la parte aérea de las plantas de *Atkup8* y WT crecidas en cultivo hidropónico y posteriormente tratadas durante 24 horas con Cd 50 μM . Además se calculó el contenido total de cada metal y los porcentajes de translocación de la raíz a la parte aérea. En los datos obtenidos, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de cadmio ni en hoja ni en raíz (Figura 4.46) ni tampoco en el porcentaje de translocación (Tabla 4.16).

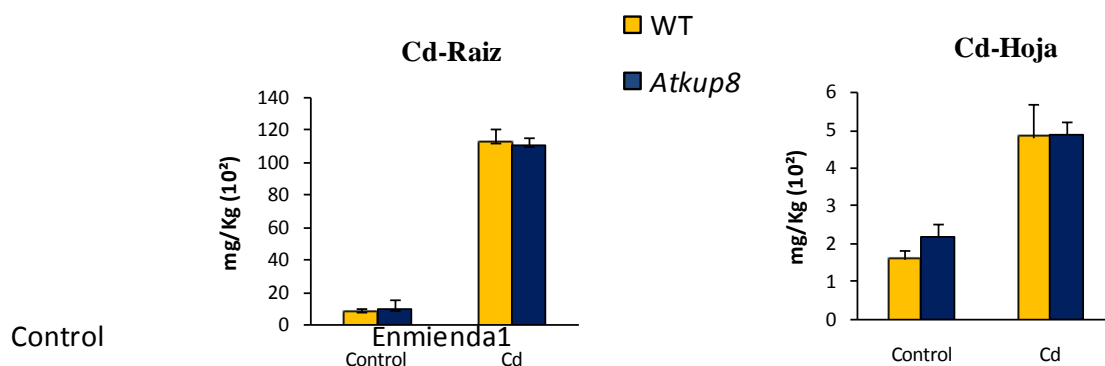


Figura 4.46. Análisis mediante ICP del contenido de Cd en hojas y raíces del mutante *Atkup8* y del WT. Las plantas se cultivaron en condiciones de hidroponía durante tres semanas y después se añadió Cd 50 μM durante 24 h. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos dos experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los datos no presentan diferencias significativas entre ellos.

Tabla 4.16. Porcentaje de translocación de cadmio (Cd) de raíces a la parte aérea de plantas *Atkup8* y WT de 21 días expuestas durante 1 día a Cd 50 μ M. Los datos son media de dos repeticiones independientes \pm SD. Los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

	METALES	Cd	
		WT	<i>Atkup8</i>
Hoja+Raíz	Cd (mg/Kg)	11761 \pm 783 a	11584,88 \pm 467 a
%Translocación	Cd	4,33 \pm 0,4 a	4,44 \pm 0,46 a

En cuanto a los resultados obtenidos del contenido de micronutrientes en condiciones normales y de tratamiento con Cd, no pareció haber diferencias en la captación de Fe y Mn por parte de la raíz respecto del WT en condiciones normales, y también fue muy similar en el tratamiento con Cd, pero se observó una disminución en el contenido de ambos metales en hoja para *Atkup8* en condiciones control y un incremento en el tratamiento con Cd. Por tanto, la traslocación de Fe y Mn de la raíz a la parte aérea fue inferior en condiciones control pero superior en el tratamiento respecto del WT (Tabla 4.17).

Tabla 4.17. Efecto del tratamiento con Cd 50 μ M durante 1 día sobre el contenido de Fe, Mn y Zn (mg/Kg) de hojas y raíces y el % de translocación de WT y *Atkup8*. Los datos son media de dos repeticiones independientes \pm SD. Los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan

MICRONUTRIENTES		Control		Cd	
		WT	<i>Atkup8</i>	WT	<i>Atkup8</i>
Hoja	Fe (mg/g)	2,041 \pm 0,49 a	1,096 \pm 0,06 b	0,49 \pm 0,07 c	1,05 \pm 0,35 b
	Mn (mg/Kg)	488,11 \pm 34,7 a	349,91 \pm 17,7 b	298,78 \pm 12,6 b	345,88 \pm 27,8 b
	Zn (mg/Kg)	116,35 \pm 5,23 a	99,53 \pm 1,71 b	85,91 \pm 5,01 b	91,32 \pm 3,40 b
Raíz	Fe (mg/g)	12,72 \pm 2,90 a	10,59 \pm 1,05 a,b	7,12 \pm 0,68 b	7,52 \pm 0,39 a,b
	Mn (mg/Kg)	916,22 \pm 231 a	1151,99 \pm 161 a	795,18 \pm 25,3 a	824,20 \pm 45,7 a
	Zn (mg/Kg)	387,87 \pm 38,0 a	369,78 \pm 10,4 a	404,60 \pm 17,1 a	366,04 \pm 10,0 a
Hoja+Raíz	Fe (mg/g)	14,76 \pm 2,84 a	11,69 \pm 1,00 a,b	7,61 \pm 0,68 b	8,57 \pm 0,42 b
	Mn (mg/Kg)	1404,33 \pm 234 a	1501,90 \pm 145 a	1093,96 \pm 15,1 a	1170,08 \pm 46,8 a
	Zn (mg/Kg)	504,22 \pm 37,6 a	469,32 \pm 9,01 a	490,51 \pm 12,3 a	457,36 \pm 11,4 a
%Translocación	Fe	16,04 \pm 0,06 a	10,63 \pm 1,44 b	6,99 \pm 1,2 c	14,23 \pm 4,74 a
	Mn	53,27 \pm 10,1 a	31,92 \pm 5,61 b	37,74 \pm 2,63 b	42,33 \pm 4,44 b
	Zn	30,58 \pm 3,17 a	26,98 \pm 1,20 a,b	21,41 \pm 2,06 b	24,97 \pm 1,00 a,b

Respecto al contenido de macronutrientes, cabe destacar que la captación de Ca disminuía ligeramente con el tratamiento y además fue inferior para *Atkup8* en comparación con el WT en condiciones control, aunque en el % de translocación no se observaron diferencias significativas (Tabla 4.18). El contenido en hoja y raíz de S, también disminuyó con el tratamiento tanto para *Atkup8* como para WT y el % de

translocación de *Atkup8* fue significativamente superior respecto del WT en el tratamiento con metales (Tabla 4.18).

Tabla 4.18. Efecto del tratamiento con Cd 50 μ M durante 1 día sobre el contenido de macronutrientes (g/100g) en hojas y raíces y el % de translocación de plantas WT y *Atkup8*. Los datos son media de dos repeticiones independientes \pm SD. Los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

MACRONUTRIENTES	Control		Cd		
	WT	<i>Atkup8</i>	WT	<i>Atkup8</i>	
Hoja	Ca (g/100g)	4,98 \pm 0,10 a	4,42 \pm 0,21 b	3,79 \pm 0,12 c	4,08 \pm 0,05 b,c
	K (g/100g)	3,05 \pm 0,03 a	3,07 \pm 0,08 a	2,77 \pm 0,09 b	2,93 \pm 0,05 a,b
	Mg (g/100g)	0,93 \pm 0,06 a	0,82 \pm 0,04 a,b	0,65 \pm 0,02 c	0,74 \pm 0,03 b,c
	S (g/100g)	1,12 \pm 0,02 a	1,12 \pm 0,05 a	1,04 \pm 0,03 b	1,16 \pm 0,01 a,b
	P (g/100g)	0,81 \pm 0,02 a	0,80 \pm 0,03 a	0,72 \pm 0,03 b	0,76 \pm 0,00 a,b
Raíz	Ca (g/100g)	2,63 \pm 0,64 a	2,01 \pm 0,41 a	1,66 \pm 0,08 a	1,77 \pm 0,13 a
	K (g/100g)	6,01 \pm 0,44 a	6,10 \pm 0,38 a	5,84 \pm 0,22 a	5,78 \pm 0,11 a
	Mg (g/100g)	0,97 \pm 0,24 a	0,73 \pm 0,14 a	0,55 \pm 0,03 a	0,58 \pm 0,04 a
	S (g/100g)	1,59 \pm 0,09 a	1,52 \pm 0,07 a,b	1,34 \pm 0,03 b,c	1,27 \pm 0,02 c
	P (g/100g)	0,94 \pm 0,06 a	1,01 \pm 0,08 a	1,11 \pm 0,02 a	1,05 \pm 0,02 a
Hoja+Raíz	Ca (g/100g)	7,61 \pm 0,72 a	6,42 \pm 0,60 a,b	5,46 \pm 0,12 b	5,86 \pm 0,09 b
	K (g/100g)	9,06 \pm 0,43 a	9,17 \pm 0,45 a	8,61 \pm 0,32 a	8,71 \pm 0,15 a
	Mg (g/100g)	1,90 \pm 0,25 a	1,55 \pm 0,17 a,b	1,21 \pm 0,04 b	1,32 \pm 0,03 b
	S (g/100g)	2,71 \pm 0,08 a	2,64 \pm 0,09 a,b	2,38 \pm 0,06 c	2,43 \pm 0,04 b,c
	P (g/100g)	1,75 \pm 0,05 a	1,80 \pm 0,07 a	1,84 \pm 0,04 a	1,81 \pm 0,02 a
%Translocación	Ca	216,07 \pm 55,4 a	235,61 \pm 37,4 a	229,18 \pm 14,7 a	233,23 \pm 17,7 a
	K	51,27 \pm 3,81 a	50,68 \pm 2,01 a	47,50 \pm 0,40 a	50,70 \pm 0,59 a
	Mg	109,50 \pm 26,8 a	118,16 \pm 18,2 a	118,15 \pm 6,22 a	130,41 \pm 13,0 a
	S	71,42 \pm 4,32 a	73,78 \pm 4,36 a	77,94 \pm 0,38 a	90,89 \pm 0,39 b
	P	87,91 \pm 7,14 a	80,30 \pm 7,71 a,b	64,71 \pm 2,03 b	72,13 \pm 1,53 a,b

4.5.11.3 Estudio de expresión de *KUP8* en hoja y raíz

Se determinaron los patrones de expresión de *KUP8* a diferentes tiempos de tratamiento con cadmio 50 μ M tanto en la parte aérea como en raíz mediante RT-PCR semicuantitativa (Figura 4.47).

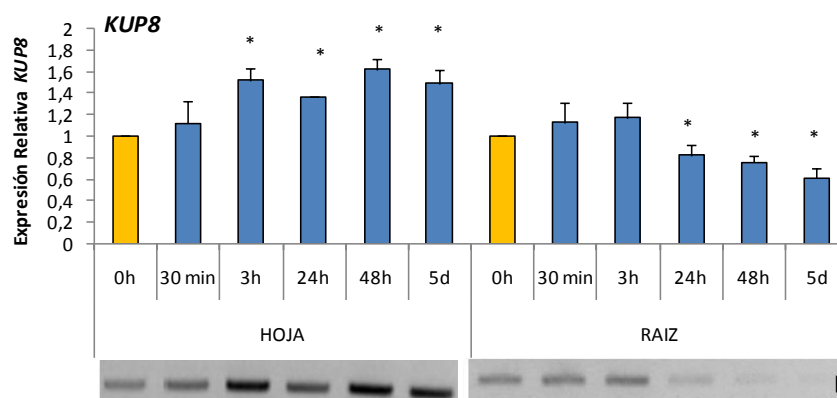


Figura 4.47. Expresión relativa mediante RT-PCR semicuantitativa del gen *KUP8* en hoja y raíz de plantas WT crecidas en hidroponía y un posterior tratamiento con Cd 50 μ M durante 30 min, 3, 24 y 48 h y 5 días. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos dos experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de las 0 h ($p < 0,05$), de acuerdo con la prueba T de Student.

Se observó una inducción del gen en hojas a partir de las 3h y hasta los 5 días analizados. En la raíz sin embargo, se observó el patrón contrario, produciéndose una inhibición de *KUP8* a lo largo del tratamiento, siendo significativa a partir de las 24 h de tratamiento.

4.5.11.4 Estudio de parámetros oxidativos

Como marcadores de estrés oxidativo se determinaron la tasa de peroxidación lipídica, la actividad catalasa y la producción de H_2O_2 en plantas crecidas en cultivo hidropónico durante 21 días y un posterior tratamiento con cadmio 50 μM durante 24 y 72 horas. En los resultados obtenidos se apreció una reducción en la peroxidación lipídica diferencias significativa en el mutante *Atkup1kup8* a las 24 h y 72 h de exposición con Cd respecto al genotipo silvestre (Figura 4.48A). Además, se calculó la acumulación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como consecuencia del tratamiento, mediante la tinción de DAB, donde la precipitación de esta molécula da como resultado una coloración marrón. En la Figura 4.48 (C y D) se muestra el aumento de H_2O_2 con el tratamiento a las 24 horas, y la acumulación se localiza principalmente en la nerviación de la hoja. Todas las líneas mutantes parecían presentar una menor acumulación de H_2O_2 , aunque las diferencias no eran significativas (Figura 4.48C).

Por último, se midió la actividad catalasa (Figura 4.48B) y el genotipo silvestre mostró un aumento de la actividad catalasa en respuesta al Cd a las 72h de tratamiento, mientras que para las líneas mutantes no se observó este incremento. La respuesta del doble mutante al cadmio fue más rápida, ya que a las 24 horas de tratamiento la actividad era mucho mayor que en los otros genotipos estudiados.

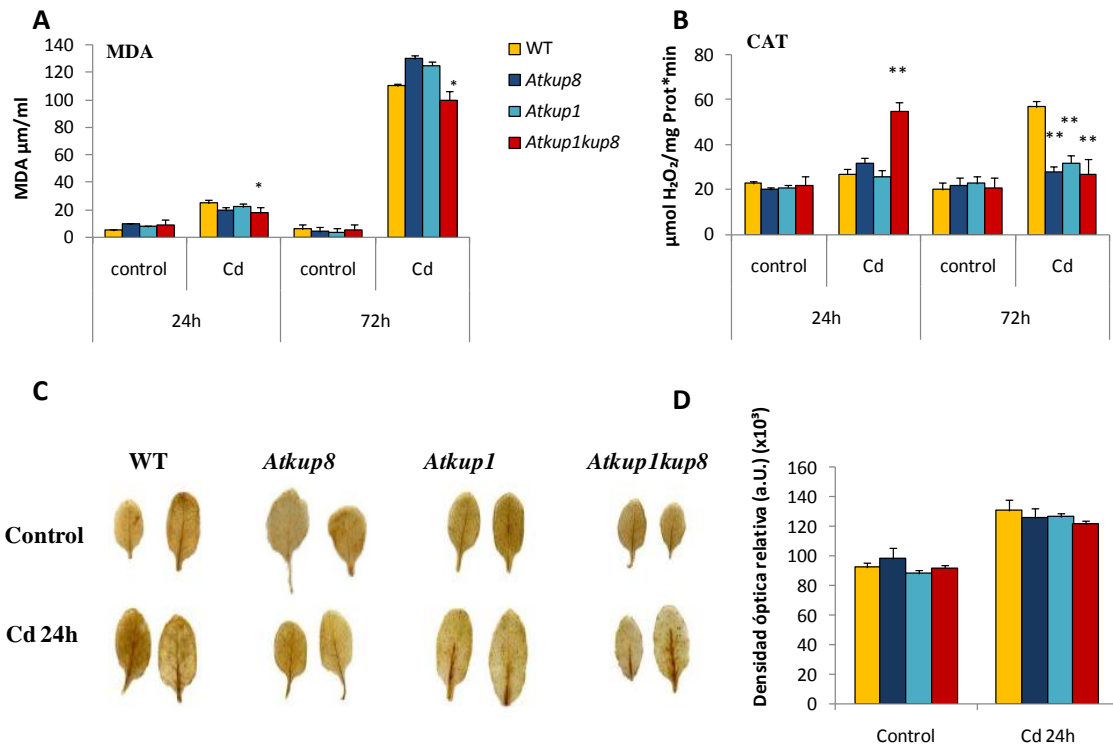


Figura 4.48. Metabolismo oxidativo de los kup en respuesta a Cd. Peroxidación lipídica (A), actividad catalasa (B), producción de H_2O_2 (C) y densidad óptica relativa de la tinción con DAB medida con Image J (D), en plantas *Atkup8*, *Atkup1*, *Atkup1kup8* y WT crecidas en cultivo hidropónico con el tratamiento con Cd $50 \mu\text{M}$ durante 24 y 72 h. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al WT a las 0 h ($p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***) de acuerdo con la prueba T de Student.

4.5.11.5 Expresión de KUP8 en los mutantes *Atrboh C*, *Atrboh D* y *Atrboh F*

Para analizar si la regulación del *KUP8* era dependiente de ROS, se determinó el patrón de expresión del mismo a las 24 horas de tratamiento con cadmio mediante qRT-PCR, tanto en genotipo WT como en los mutantes *Atrboh C*, *Atrboh D* y *Atrboh F* en raíz. Como se ha descrito previamente, estas líneas son deficientes en NADPH oxidasa C, D y F, respectivamente.

Los resultados mostraron una inhibición significativa de la expresión del gen *KUP8* en raíz a las 24 horas de tratamiento, como ya se había observado anteriormente. Todos los genotipos mostraron una inhibición por el tratamiento con Cd, excepto el D, por lo que la regulación del *KUP8* por ROS podría ser dependiente de esta isoforma (Figura 4.49). Hay que destacar también la mayor reducción de la expresión en RBOHC en respuesta al Cd, con respecto al WT.

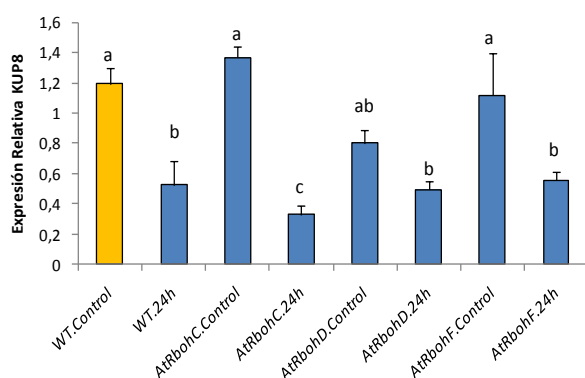


Figura 4.49. Expresión relativa de *KUP8* en raíz mediante qRT-PCR en los genotipos *Atrboh C*, *Atrboh D*, *Atrboh F* y WT en condiciones control y de estrés por el tratamiento con cadmio 50 μ M durante 24 horas. La media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes cada uno con tres repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

4.5.11.6 Resumen de la respuesta de *Atkup8* en tratamiento con la mezcla de metales vs Cd

Según los resultados obtenidos, la respuesta de *KUP8* difería dependiendo del tipo de tratamiento, por ello, se elaboró una tabla resumen (Tabla 4.19) con los parámetros estudiados y los resultados más destacados para *KUP8*, tanto en el tratamiento con la mezcla de metales como en el tratamiento con Cd.

Tabla 4.19. Parámetros estudiados en *Atkup8* en los tratamientos con Cd y la mezcla de metales.

Parámetro		Tratamiento	
		Cd+Cr+Cu	Cd
Estudio en plántula			
Fenotipo		Resistencia <i>Atkup8</i> > WT	Resistencia <i>Atkup8</i> > WT
Expresión KUP8		Inducción	-----
Tasa de germinación		<i>Atkup8</i> = WT	<i>Atkup8</i> = WT
Tasa de hojas verdaderas		<i>Atkup8</i> = WT	<i>Atkup8</i> = WT
Longitud raíz		<i>Atkup8</i> > WT	<i>Atkup8</i> > WT
Peso fresco		<i>Atkup8</i> > WT	<i>Atkup8</i> = WT
Estudio en planta adulta			
Fenotipo	Peso fresco raíz	<i>Atkup8</i> > WT	<i>Atkup8</i> > WT
	Peso fresco hoja	<i>Atkup8</i> > WT	<i>Atkup8</i> > WT
Contenido Metales	Cd, Cr, Cu	Translocación Cd: <i>Atkup8</i> < WT	<i>Atkup8</i> = WT
	Micronutrientes	Translocación Fe Control: <i>Atkup8</i> < WT	Translocación Fe Control: <i>Atkup8</i> < WT Cd: <i>Atkup8</i> > WT
		Captación Mn Control: <i>Atkup8</i> < WT Cd: <i>Atkup8</i> < WT	-----
		Translocación Mn Control: <i>Atkup8</i> > WT	Translocación Mn Control: <i>Atkup8</i> < WT Cd: <i>Atkup8</i> > WT
Macronutrientes	Translocación Ca Control: <i>Atkup8</i> > WT Cd: <i>Atkup8</i> > WT	-----	
Expresión KUP8	Raíz	Inhibición 3, 24 y 48 h	Inhibición 48 h y 5d
	Hoja	Inducción 24 y 48h	Inducción 3, 24 y 48h y 5d
Parámetros oxidativos	Peroxidación lipídica	<i>Atkup8</i> < WT (48h)	<i>Atkup8</i> < WT (72 h)
	H₂O₂	<i>Atkup8</i> = WT	<i>Atkup8</i> = WT
	Actividad GOX	<i>Atkup8</i> > WT (48 h) <i>Atkup8</i> < WT (24 h)	<i>Atkup8</i> = WT
	Actividad CAT	<i>Atkup8</i> < WT (30')	<i>Atkup8</i> < WT (72 h)

4.5.12 Respuesta de *Atkup8*, *Atkup1* y *Atkup1kup8* en condiciones alteradas de manganeso

Los resultados del contenido de micro y macronutrientes obtenidos mediante ICP, sugirieron que el transportador de *Arabidopsis thaliana* KUP8 podría tener una función en el transporte de hierro y de manganeso y que, por lo tanto, podría estar implicado en la translocación de los mismos de la raíz a la parte aérea. Basándonos en estos resultados previos se estudió la respuesta de *Atkup8*, *Atkup1* y *Atkup1kup8*, a concentraciones diferentes de Fe y Mn. Se estudió la tasa de germinación, la aparición de las hojas verdaderas, el peso fresco de la planta completa así como la longitud de las raíces desarrolladas. Para ello las plántulas se cultivaron durante 7 o 10 días en placas Petri conteniendo el medio MS con las diferentes concentraciones o la ausencia de manganeso.

Germinación

En cuanto a los efectos del manganeso sobre la germinación, se pudo observar que el porcentaje de semillas germinadas el primer día sin Mn, fue ligeramente superior en el mutante *Atkup1kup8*, respecto del genotipo silvestre. La línea *Atkup1* fue la que más tiempo tardó en germinar, tanto para altas concentraciones como en ausencia de Mn, aunque no de manera significativa. Tras 5 días, este porcentaje fue prácticamente igual en todas las líneas y tratamientos estudiados, salvo cuando se aplicaron concentraciones de 400 μ M de Mn, en los que la línea *Atkup1* parecía tener su capacidad de germinación reducida (Figura 4.50).

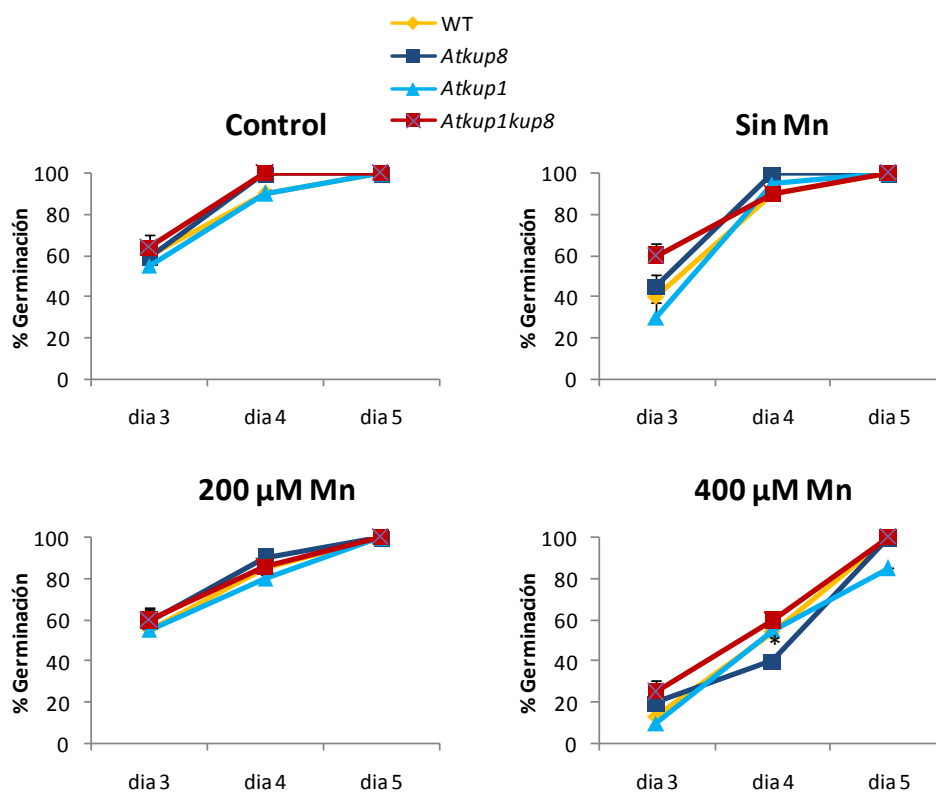


Figura 4.50. Porcentaje de germinación de *Atkup8*, *Atkup1*, *Atkup1kup8* respecto de WT en MS conteniendo: 0, 200 y 400 μM de Mn. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al WT ($p < 0,05$:*) de acuerdo con la prueba T de Student.

Hojas verdaderas

En el estudio de la tasa de aparición de las hojas verdaderas, los porcentajes más altos correspondieron a los mutantes *Atkup1kup8* y *Atkup8*, siendo significativos estos valores en ausencia de Mn y los más bajos a *Atkup1* tanto en ausencia como en exceso de Mn, respecto del WT. A la concentración más elevada de Mn (400 μM) todas las líneas presentaron un porcentaje de hojas verdaderas bastante reducido llegando escasamente a un 20%, por lo que el manganeso afectó al desarrollo de la plántula, aun así, la línea *Atkup1kup8* parecía menos afectada (Figura 4.51).

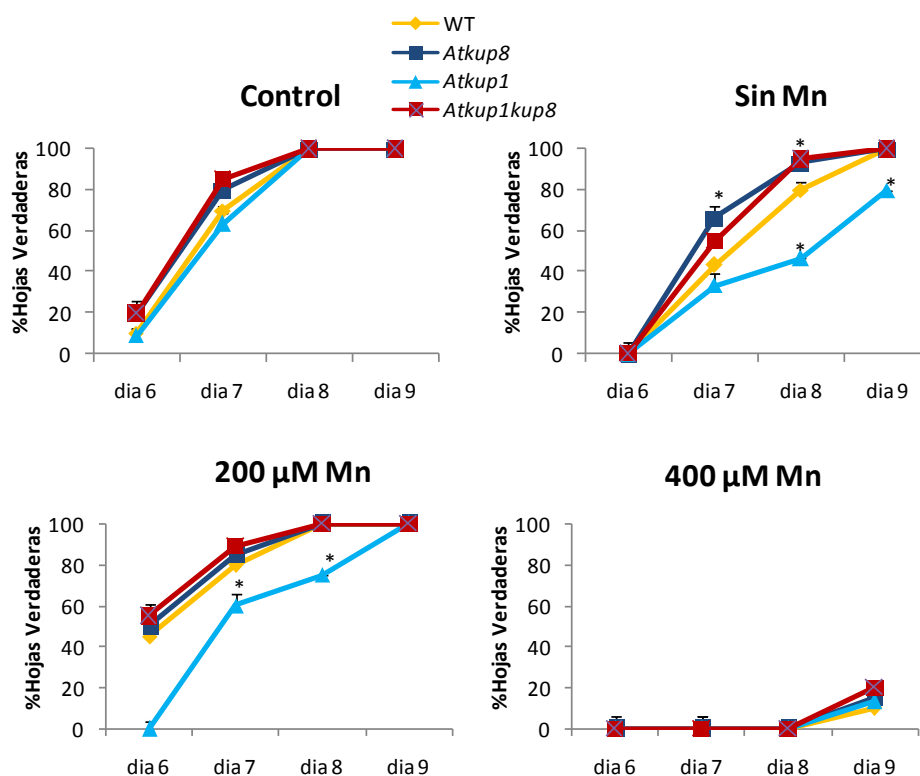


Figura 4.51. Tasa de aparición de hojas verdaderas en plántulas de *Atkup8*, *Atkup1*, *Atkup1kup8* respecto de WT cultivadas en MS conteniendo: 0, 200 y 400 μM de Mn. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del WT ($p < 0,05$: *) de acuerdo con la prueba T de Student.

Peso fresco

La biomasa en condiciones control fue superior en el doble mutante. Éste presentó un peso superior en todos los casos respecto del resto de líneas estudiadas excepto para la concentración más elevada de Mn, donde se redujo considerablemente. *Atkup8* no presentó diferencias significativas con respecto al WT en ninguno de los tratamientos, excepto a 200 μM , donde fue significativamente mayor. La línea *Atkup1* fue significativamente inferior en peso en ausencia de Mn. (Figura 4.52).

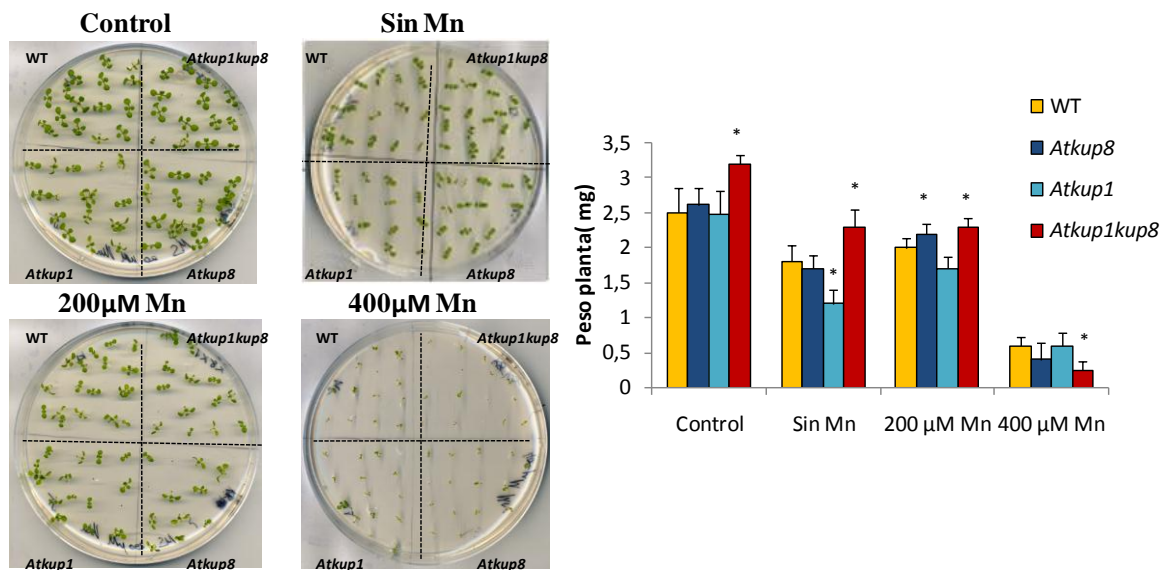


Figura 4.52. Peso fresco de las plántulas *Atkup8*, *Atkup1*, *Atkup1kup8* y WT tras 10 días de crecimiento en MS conteniendo: 0, 200 y 400 μM de Mn. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del WT ($p < 0,05$: *) de acuerdo con la prueba T de Student.

Longitud de raíces

En la Figura 4.53 se aprecia la toxicidad del Mn a la concentración de 400 μM , ya que la longitud de raíces se vio significativamente disminuida. Se observó que las plántulas del mutante *Atkup1kup8* presentaban las raíces más largas que el resto de líneas estudiadas en todos los tratamientos, excepto para 400 μM de Mn. En el mutante *Atkup1* ocurría lo contrario, ya que sus raíces presentaron una longitud significativamente inferior al WT en todos los tratamientos. La línea *Atkup8* no presentó diferencias significativas en ninguno de los tratamientos respecto del WT. La falta de Mn produjo una disminución del número de raíces secundarias y la raíz principal aparecía más debilitada en todas las plántulas (Figura 4.53).

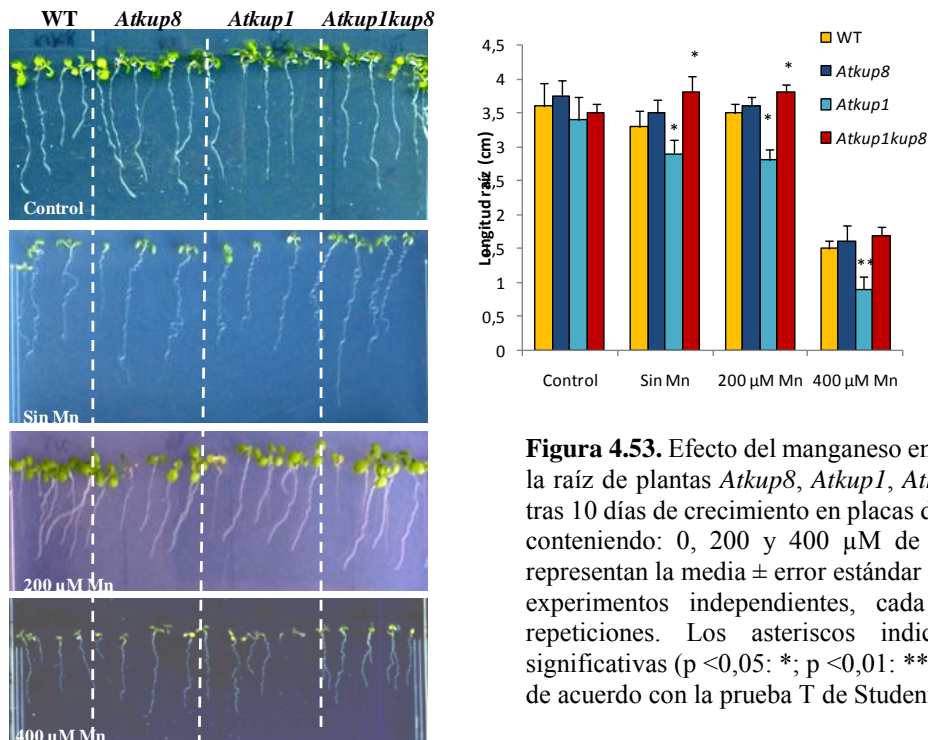


Figura 4.53. Efecto del manganeso en el desarrollo de la raíz de plantas *Atkup8*, *Atkup1*, *Atkup1kup8* y WT tras 10 días de crecimiento en placas de cultivo en MS conteniendo: 0, 200 y 400 µM de Mn. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$: *; $p < 0,01$: **; $p < 0,001$: ***) de acuerdo con la prueba T de Student.

4.5.13 Respuesta de *Atkup8*, *Atkup1* y *Atkup1kup8* en condiciones alteradas de hierro

En este estudio se comparó la influencia del hierro en el genotipo silvestre y en los mutantes *Atkup8*, *Atkup1* y *Atkup1kup8*, estudiando tanto la tasa de germinación como de aparición de las hojas verdaderas, el peso fresco de la planta completa así como la longitud de las raíces desarrolladas. Las plántulas se cultivaron durante 7 o 10 días de crecimiento en placas Petri conteniendo el medio Hoagland con exceso o ausencia de hierro.

Germinación y hojas verdaderas

La línea *Atkup1* se mostró más sensible tanto en ausencia como en exceso de Fe, ya que tanto el % de germinación como la aparición de hojas verdaderas fue menor a la de las otras líneas estudiadas. No se observaron grandes diferencias entre las líneas *Atkup8* y *Atkup1kup8* y el WT (Figura 4.54).

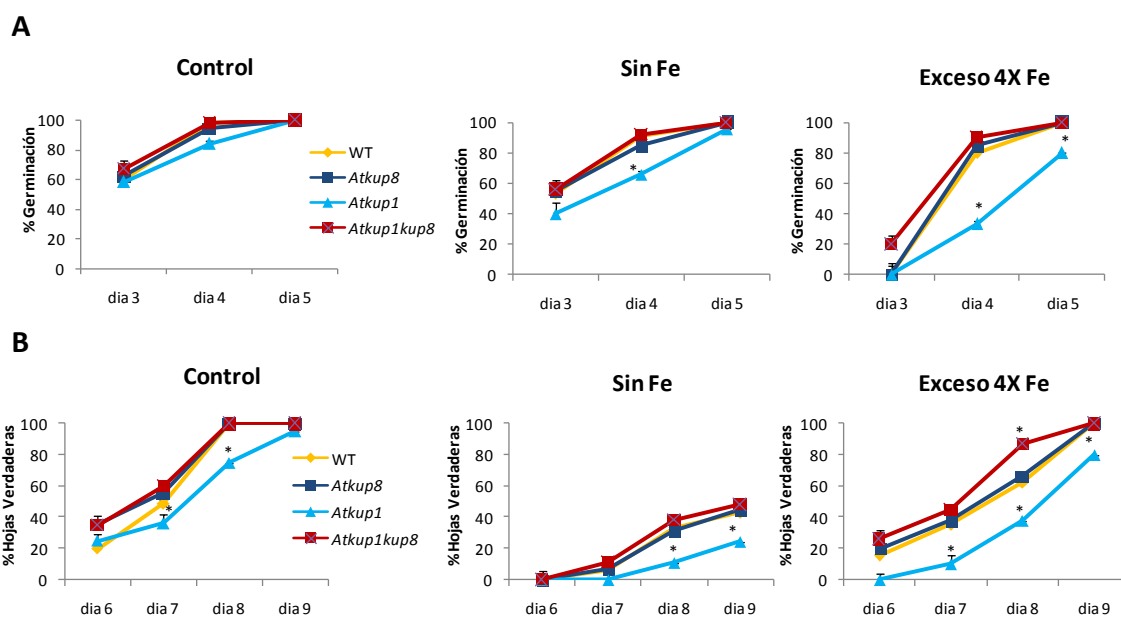


Figura 4.54. Porcentaje de germinación (A) y tasa de aparición de hojas verdaderas (B) de *Atkup8*, *Atkup1* y *Atkup1kup8* respecto de WT en medio Hoagland control, exceso 4x y ausencia de hierro. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$; *) de acuerdo con la prueba T de Student.

Medida de peso fresco

Se observó que la biomasa estaba afectada en los mutantes según los distintos tratamientos. A concentraciones tóxicas como es el caso 4x Fe, los mutantes *Atkup8* y *Atkup1kup8* fueron superiores en peso respecto del WT, mientras que el mutante *Atkup1* fue inferior tanto en ausencia como en exceso de Fe, e incluso en condiciones control (Figura 4.55).

Longitud de raíces

El comportamiento de las líneas en cuanto a la longitud de sus raíces es muy similar a los datos obtenidos de peso fresco, las raíces de *Atkup1kup8* fueron superiores al WT en todos los casos, al contrario que para *Atkup1*. Para *Atkup8* no se observaron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos (Figura 4.56).

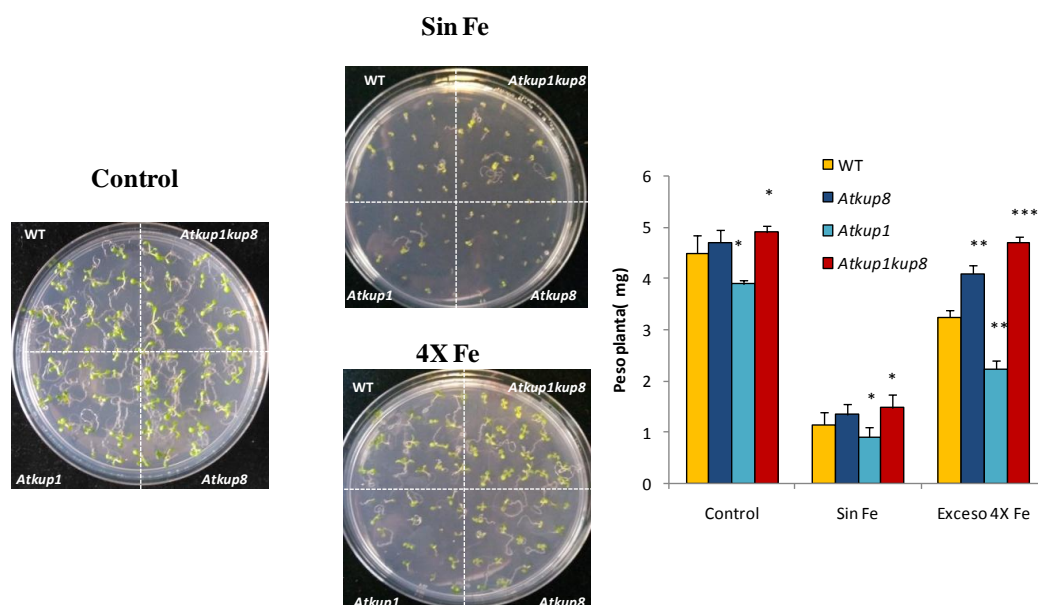


Figura 4.55. Peso fresco en las plántulas de *Atkup8*, *Atkup1*, *Atkup1kup8* y WT de 10 días de crecimiento en placas de cultivo conteniendo Hoagland control, exceso 4x y ausencia de hierro. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del WT ($p < 0,05$: *; $p < 0,01$: **; $p < 0,001$: ***) de acuerdo con la prueba T de Student.

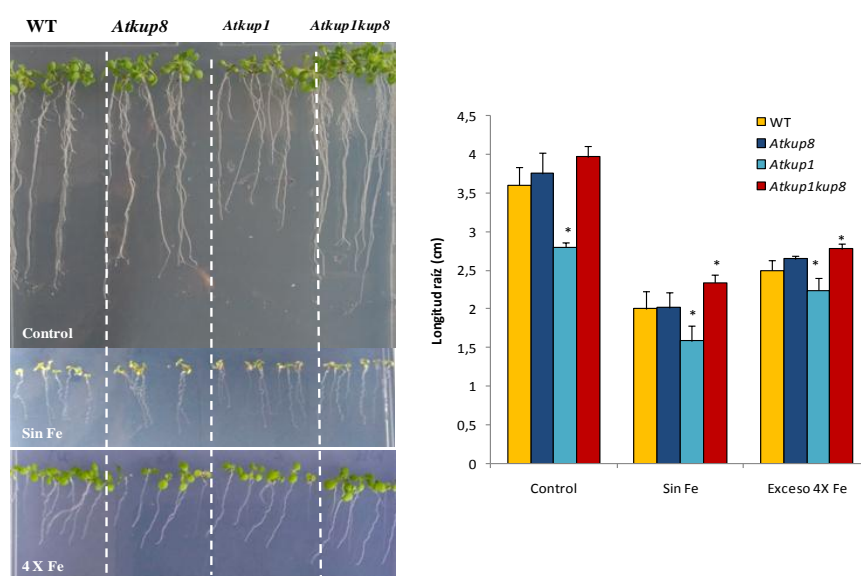


Figura 4.56. Efecto del hierro en el desarrollo de la raíz de plantas de *Atkup8*, *Atkup1*, *Atkup1kup8* y WT. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del WT ($p < 0,05$: *) de acuerdo con la prueba T de Student.

4.6 Estudio del transportador NRAMP5

4.6.1 Estudio de expresión “in silico”

Se realizó un estudio más detallado de la línea *Atnramp5* previamente seleccionada como resistente frente a la mezcla de metales pesados. Esta línea *Atnramp5* presenta una inserción de T-DNA en el gen *NRAMP5*. Pertenece a la familia de las proteínas NRAMP, que como se ha descrito anteriormente, están asociadas a la resistencia natural de los macrófagos y a la homeostasis de metales. Con el fin de conocer la información disponible sobre el gen *NRAMP5*, se realizó un estudio de expresión “in silico” mediante la búsqueda de información en bases de datos, concretamente en eFP-Browser (<http://bar.utoronto.ca/>; Winter y col., 2007) y Genevestigator (<https://genevestigator.com/gv/>) se presenta en la Figura 4.57 y Figura 4.58.

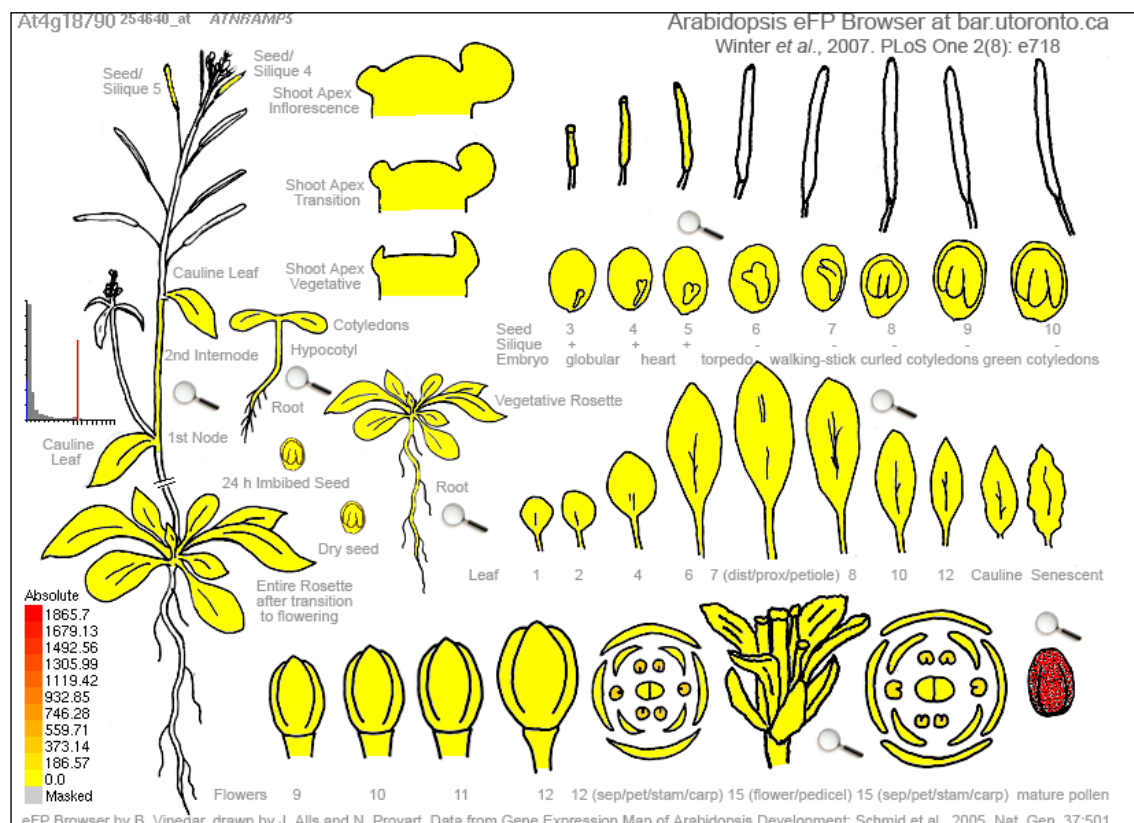


Figura 4.57. Datos de expresión de *NRAMP5* en las distintas partes de la planta, disponibles en <http://bar.utoronto.ca> y <https://genevestigator.com/gv/>.

La mayor expresión del gen *NRAMP5* en *Arabidopsis thaliana* se daba en el polen, en concreto en el polen maduro (Figura 4.58 A). Según estas mismas bases de datos, el *NRAMP5* se inhibe por ácido abscísico (ABA) en las células guarda de los estomas y también en células in vitro (Figura 4.58 B, C y D). Esta represión podría estar regulada

por ROS puesto que al añadir un secuestrador de ROS como la dimetil tiourea (DMTU), se recupera la expresión de *NRAMP5* incluso en presencia de ABA (Figura 4.58 D).

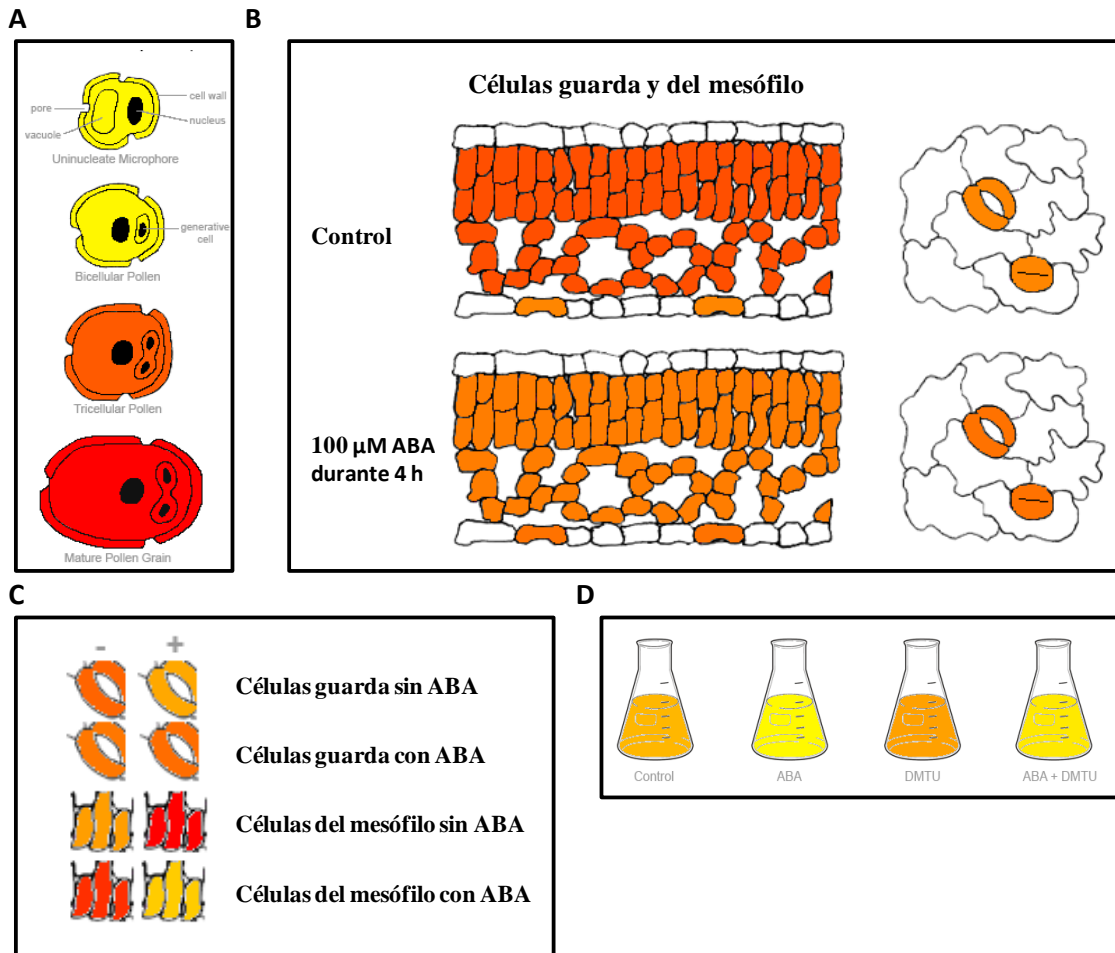


Figura 4.58. Expresión de *NRAMP5* en las diferentes fases de desarrollo del polen (A). Expresión de *NRAMP5* en las células guarda y del mesófilo, en experimentos con ABA (B, C y D). Datos disponibles en <http://bar.utoronto.ca> y <https://genevestigator.com/gv/>.

4.6.2 Estudio de homología entre proteínas NRAMP

Tomando como referencia los árboles de homología entre secuencias proteicas de NRAMP, disponibles en la bibliografía, se construyó un árbol comparando estas proteínas de *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* (Figura 4.59 A) y otro árbol comparando sólo las proteínas NRAMP de *Arabidopsis thaliana* entre sí (Figura 4.59 B). De este modo se pudieron obtener algunas conclusiones sobre la similitud funcional que cabría esperar entre las proteínas de ambos organismos.

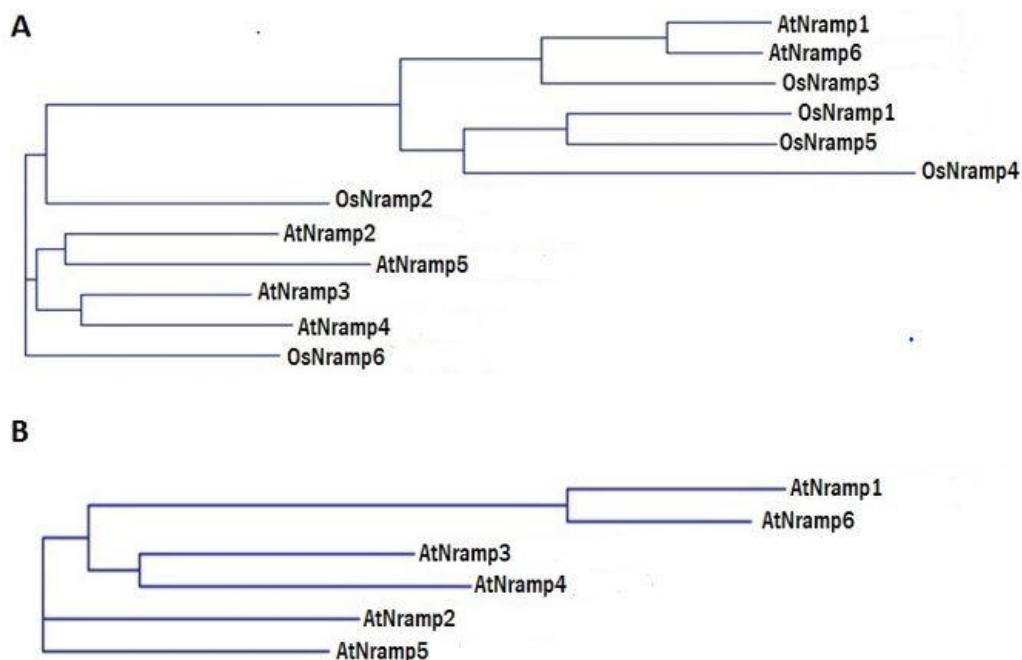


Figura 4.59. Árbol de homología entre las secuencias aminoacídicas de las proteínas NRAMP. (A) De *Arabidopsis thaliana* (At) y *Oryza sativa* (Os) y (B) solo de *Arabidopsis thaliana* (At). Construido con el programa “Vector NTI”.

Según desveló este árbol de homologías, la proteína AtNRAMP5 presenta una secuencia de aminoácidos próxima a la de AtNRAMP2 y a las de AtNRAMP4 y 3 vacuolares y en menor medida a NRAMP6 de arroz (Figura 4.59 A). En cambio, no presentaba una homología alta con OsNRAMP5. Respecto a los NRAMP de *Arabidopsis*, se observó una alta homología entre AtNRAMP4 y AtNRAMP3, así como entre AtNRAMP1 y AtNRAMP6 (Figura 4.59 B), como ya se ha descrito anteriormente (Lanquar y col., 2005; Cailliatte y col., 2009).

4.6.3 Caracterización fenotípica de *Atnramp5*

Número de hojas de roseta, de silicuas y área foliar

Para la caracterización fenotípica, se cuantificó el número de hojas de roseta, el número de silicuas y la superficie foliar en plantas adultas de 21 días crecidas en cultivo hidropónico y en tierra. Este experimento nos permitió observar, que en una etapa adulta,

el mutante en condiciones de crecimiento óptimas, presentó un ligero aumento, aunque significativo, del número de hojas y silicuas respecto al silvestre (Figura 4.60 A, B, C y E). Además, se ha observado una mayor área foliar en el mutante crecido en tierra, en comparación con el WT en las mismas condiciones (Figura 4.60 D).

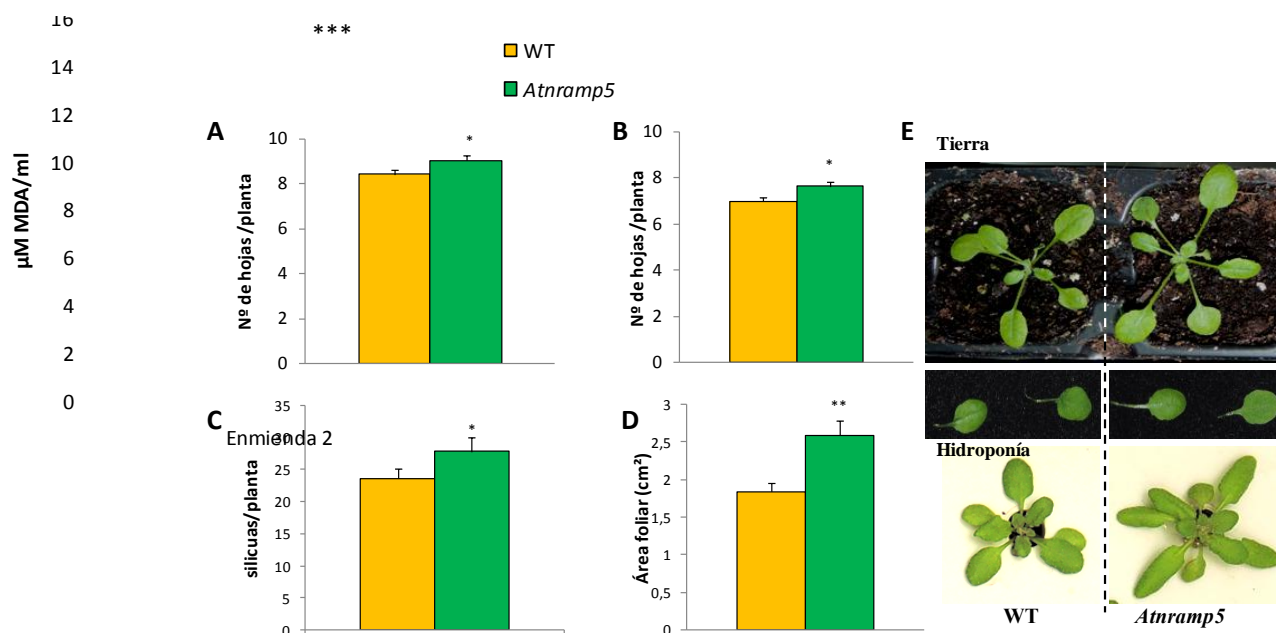


Figura 4.60. Estudio del número de hojas de roseta en plantas crecidas en hidroponía (A) y en tierra (B) durante 21 días, producción de silicuas (C) y área foliar (D), de plantas crecidas en tierra durante 21 días. Fenotipo en tierra y en cultivo hidropónico (E). Los datos representan la media ± error estándar de tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al WT ($p < 0,001 = ***$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,05 = *$), de acuerdo con la prueba T de Student.

4.6.4 Homocigosis de *Atnramp5*

La línea mutante *Atnramp5* (SALK_109028C) presenta una inserción de T-DNA en el primer exón del locus At4g18790 (*NRAMP5*) y fue seleccionada como línea resistente de la colección de líneas de *Arabidopsis* (NASC ID: N27941) empleada en este trabajo. Las plantas fueron genotipadas mediante PCR teniendo en cuenta la posición y orientación del inserto tal y como se indica en la Figura 4.61(A y C). Se emplearon oligonucleótidos específicos del gen *NRAMP5* (LP y RP) y el oligonucleótido LBb1.3 específico para el T-DNA (Tabla 3.10). Se comprobó que se amplificaba la región LP/LBb1.3 y no la región LP/RP confirmando así la homocigosis de la línea mutante (Figura 4.61B). Con los protocolos al uso, no se detectó la expresión del gen (partiendo

de 1 µl de RNA y 1µl de cDNA) ni en WT ni en el mutante en condiciones control, coincidiendo con lo descrito en Geneinvestigator.

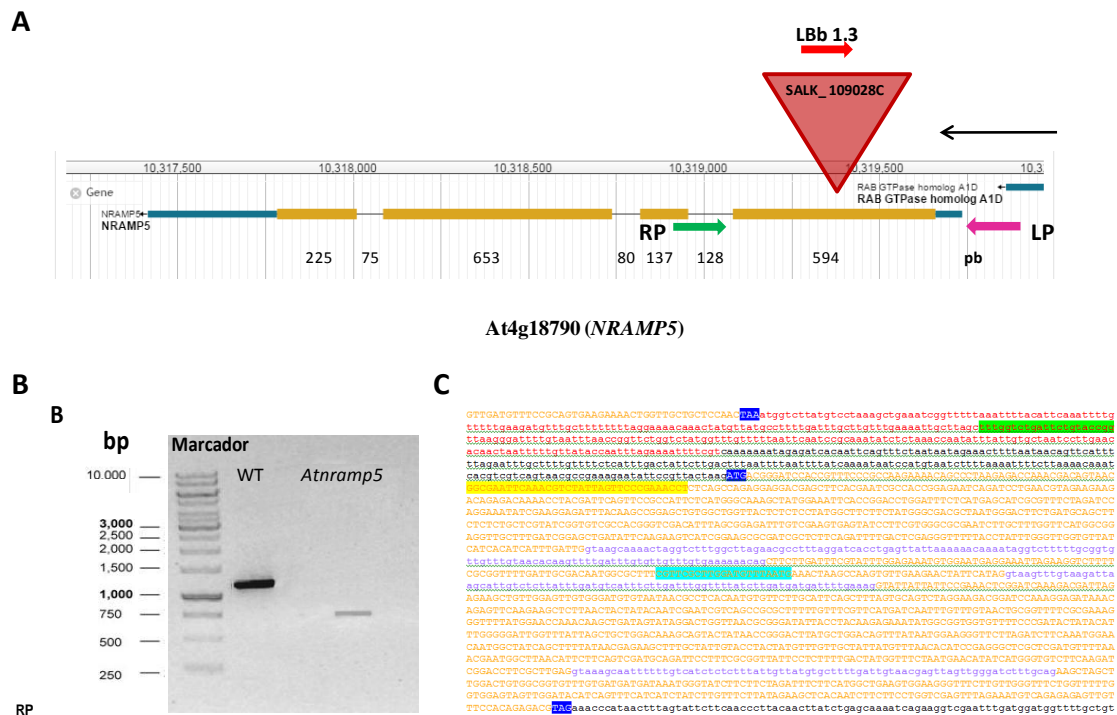


Figura 4.61. Localización de la inserción de T-DNA en el gen At4g18790 (*NRAMP5*) en la línea SALK_109028C y los oligonucleótidos empleados, RP en verde, LP en rosa y LBb 1.3 en rojo (A) y genotipado mediante PCR de las plantas mutantes *Atnramp5* y el silvestre (B). Los amplicones teñidos con bromuro de etidio se muestran usando los oligos LP, RP y LBb1.3 descritos en la Tabla 3.10. Secuencia de nucleótidos del *NRAMP5* identificando la región bloqueada por el inserto de T-DNA en amarillo y la posición de ambos oligonucleótidos (LP y RP); C).

4.6.5 Respuesta de *Atnramp5* frente a la mezcla de metales

Con el fin de profundizar en el estudio de las funciones de este transportador, se realizó un análisis más detallado del mutante *Atnramp5* en respuesta a la mezcla de metales pesados (Cd+Cr+Cu), estudiando diferentes parámetros fisiológicos, expresión de *NRAMP5*, contenido de metales en sus tejidos y parámetros oxidativos.

4.6.5.1 Fenotipo de plántulas de *Atnramp5* frente a la mezcla de metales y análisis de expresión de *NRAMP5*

Para confirmar el fenotipo ya observado en el proceso de selección de estas líneas en respuesta a la mezcla de metales, se crecieron las plántulas en placa conteniendo el medio con la mezcla de metales, mostrando *Atnramp5* una longitud de raíz mayor con respecto a las plántulas WT, después de 7 días de crecimiento (Figura 4.62A y B).

Además, se realizó el estudio de expresión del gen *NRAMP5*, mediante PCR semicuantitativa y no se observó expresión ni en las plántulas del mutante *Atnramp5* ni en WT después de 7 días de crecimiento en placa de cultivo en condiciones normales ni conteniendo la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu).

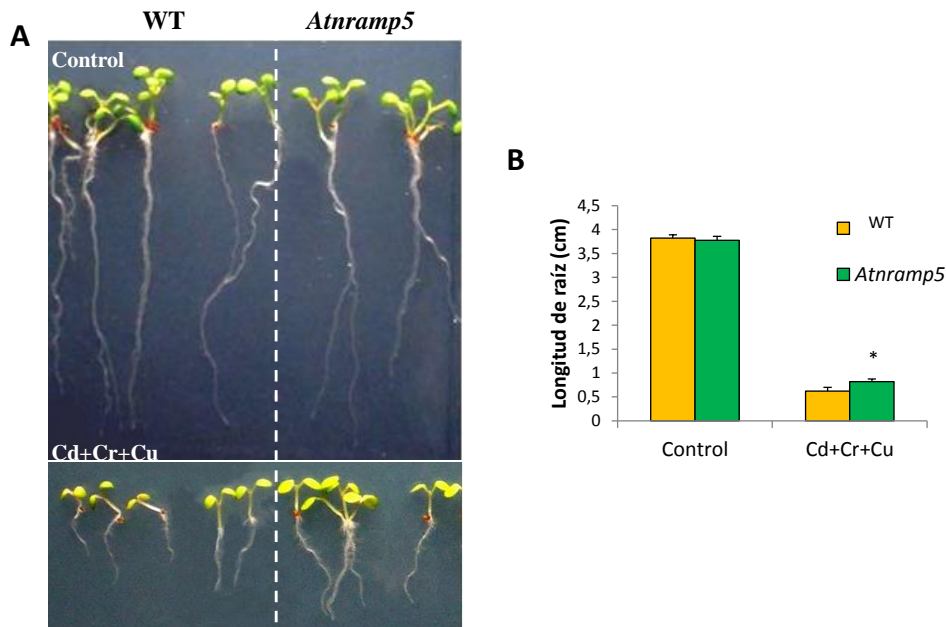


Figura 4.62. Fenotipo (A) y longitud de la raíz (B) del mutante *Atnramp5* respecto al WT después de 7 días de crecimiento en el medio control y con la mezcla de metales. Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al WT ($p < 0,05$), de acuerdo con la prueba T de Student.

4.6.5.2 Expresión de la familia NRAMP en plántulas

Se realizó también un estudio mediante RT-PCR semicuantitativa de la expresión de todos los miembros de la familia *NRAMP* tanto en el WT como en el *Atnramp5*, en plántulas crecidas durante 7 días en placa de cultivo conteniendo la mezcla de metales. Este estudio mostró una inducción en el *NRAMP6* en el WT (Figura 4.63A) que no se produjo en el mutante (Figura 4.63B). Sin embargo, se observó una inducción del *NRAMP1* y *NRAMP4* en el mutante pero no en WT.

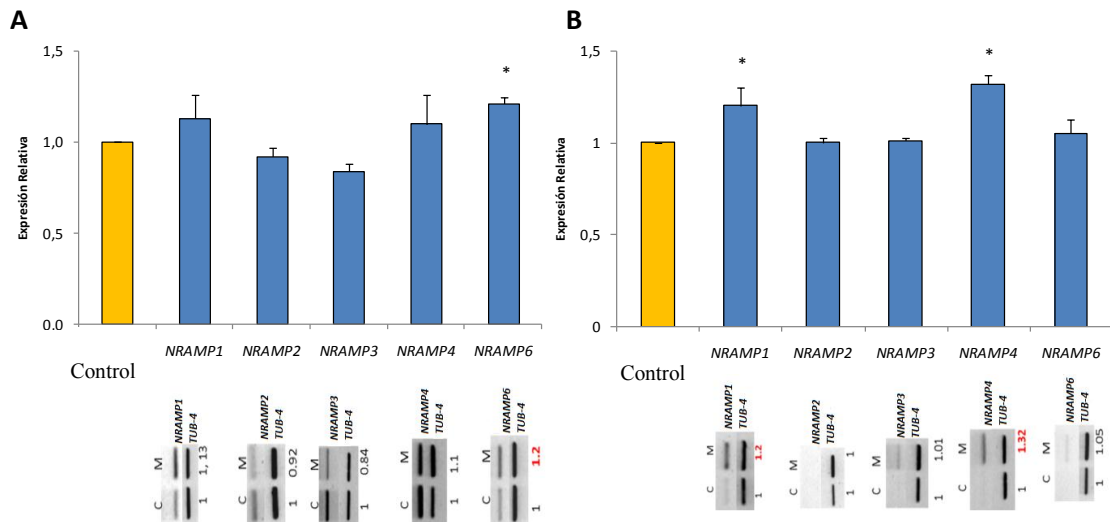


Figura 4.63. Expresión de la familia *NRAMP* mediante RT-PCR semicuantitativa en las líneas silvestre WT (A) y *Atnramp5* (B) a los 7 días de la germinación en control (C) y la mezcla de metales (M). Los gráficos representan la expresión de los *NRAMP* en la mezcla de metales (M). Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de la expresión de cada gen en condiciones control, que se ha considerado = 1 ($p < 0,05 = *$), de acuerdo con la prueba T de Student.

Curiosamente, en condiciones control apenas se expresaban los genes de la familia *NRAMP* en el mutante *Atnramp5* con respecto al WT (Figura 4.63), por ello, se realizó un estudio mediante qRT-PCR de la expresión de todos los miembros de la familia *NRAMP* en plántulas sin tratar de *Atnramp5* respecto del WT, que se considera=1, observándose una reducción significativa de *NRAMP3* y *NRAMP4* (Figura 4.64).

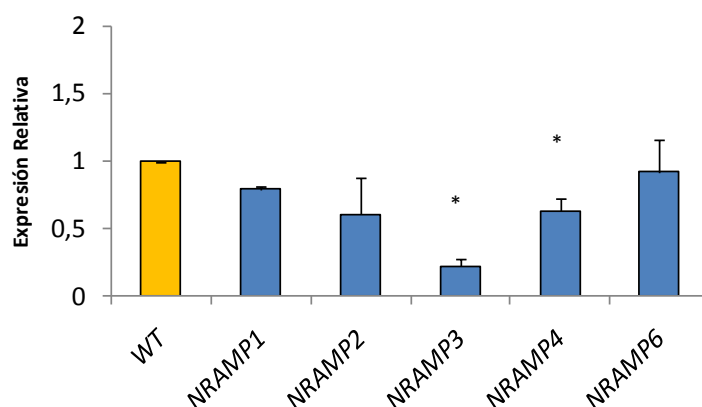


Figura 4.64. Expresión de la familia *NRAMP* mediante qRT-PCR en el mutante *Atnramp5* respecto al WT, en condiciones control. Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al WT ($p < 0,05 = *$), de acuerdo con la prueba T de Student.

4.6.5.3 Crecimiento de *Atnramp5* en cultivo hidropónico

Se analizó el peso fresco como parámetro de crecimiento del mutante *Atnramp5* respecto del WT. Para ello, las plantas crecieron en cultivo hidropónico durante 21 días y posteriormente se adicionó la mezcla de metales durante 24 horas. Se observó una reducción del peso fresco debida al tratamiento, siendo más acusada en el caso de *Atnramp5* (Figura 4.65).

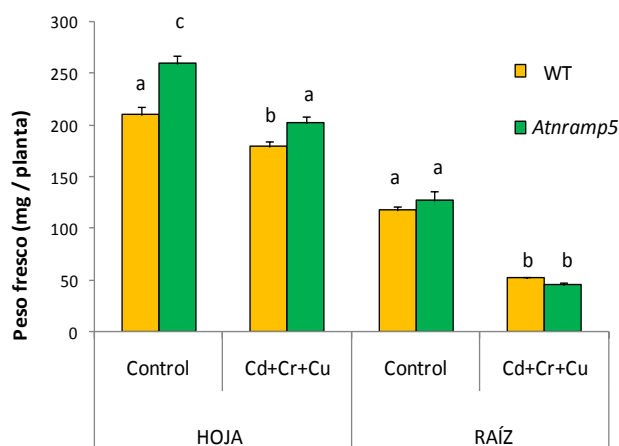


Figura 4.65. Estudio de peso fresco de plantas crecidas en cultivo hidropónico y 24 h de tratamiento posterior en la mezcla de metales. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Para realizar la estadística se han comparado por un lado los datos de raíz y por otro lado los de hoja. Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas ($P < 0,05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

4.6.5.4 Análisis del contenido de metales

Se analizó el contenido de los metales, macro y micronutrientes en las raíces y en la parte aérea de las plantas crecidas en cultivo hidropónico y posteriormente tratadas durante 24 horas con la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu). Además se calculó el contenido total de cada metal y los porcentajes de translocación de la raíz a la parte aérea.

En cuanto al contenido de los metales Cd, Cr y Cu, en la parte aérea y raíces, no se observaron diferencias significativas (Figura 4.66), aunque parece haber una ligera disminución en la translocación de Cd y Cr a la parte aérea en el mutante, aunque no significativa (Tabla 4.20).

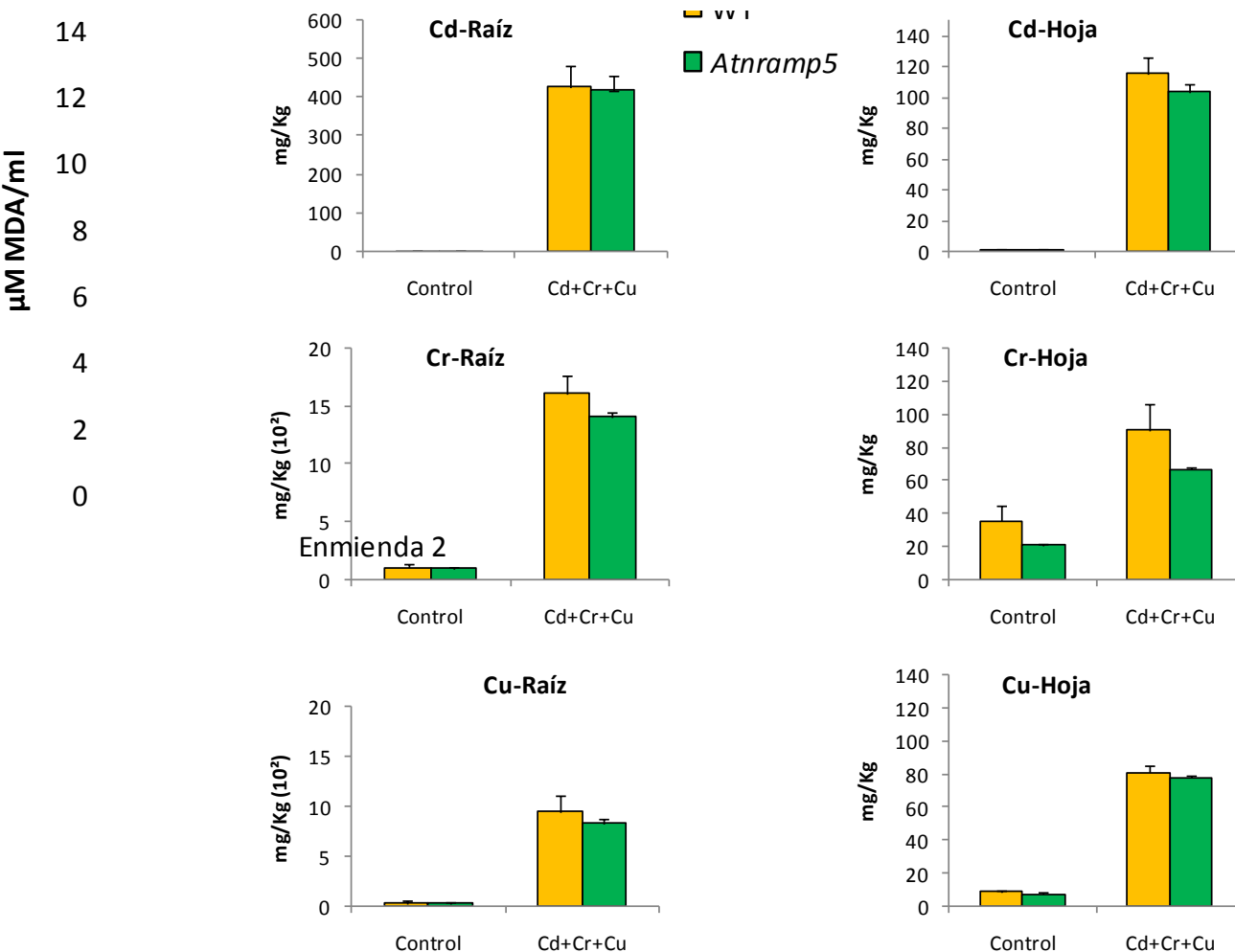


Figura 4.66. Análisis mediante ICP del contenido en Cd, Cr y Cu en hojas y raíces del mutante *Atnramp5* y en WT. Las plantas se cultivaron en condiciones de hidroponía durante tres semanas y después se añadió la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu) durante 24 h. Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. No se encontraron diferencias significativas.

Tabla 4.20. Contenido total y % de translocación de Cd, Cr y Cu en hojas y raíces, en el mutante *Atnramp5* y en plantas WT. Los mutantes se cultivaron en condiciones hidropónicas durante tres semanas y después se añadió la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu) durante 24 h. Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes \pm SD, cada uno con tres repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas ($P < 0,05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

		Cd+Cr+Cu	
METALES		WT	<i>Atnramp5</i>
Hoja+Raíz	Cd (mg/Kg)	550,11 \pm 156,38a	520,96 \pm 47,44a
	Cr (mg/Kg)	1703,09 \pm 171,29a	1472,06 \pm 71,77a
	Cu (mg/Kg)	1026,55 \pm 111,18a	906,91 \pm 57,58a
%Translocación	Cd	28,61 \pm 0,97a	25,59 \pm 3,54a
	Cr	5,54 \pm 0,47a	4,75 \pm 0,29a
	Cu	8,96 \pm 1,5a	9,48 \pm 0,60a

En cuanto a los resultados obtenidos del contenido de micronutrientes en condiciones normales y de tratamiento con la mezcla de metales, se observó una disminución en la traslocación de Fe y Mn de la raíz a la parte aérea en el mutante (Tabla 4.21). La captación de Fe por parte de la raíz era ligeramente superior en el mutante aunque no de manera significativa. En condiciones control, la captación de Mn fue significativamente superior en el mutante y ligeramente inferior en el tratamiento, pero no de forma significativa.

Tabla 4.21. Análisis mediante ICP de los micronutrientes (Fe, Mn y Zn) en parte aérea y raíces, en el mutante *Atnramp5* y en WT. Las plantas se cultivaron en condiciones de hidroponía durante tres semanas y después se añadió la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu) durante 24 h. Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes \pm SD, cada uno con tres repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

MICRONUTRIENTES	Control		Cd+Cr+Cu		
	WT	<i>Atnramp5</i>	WT	<i>Atnramp5</i>	
Hoja	Fe (mg/g)	2,96 \pm 0,83 a	1,71 \pm 0,45 b	3,68 \pm 1,53 c	2,14 \pm 0,41 b
	Mn (mg/Kg)	384,92 \pm 35,95 a	324,96 \pm 18,34 b	401,81 \pm 88,88 a	306,01 \pm 21,77 c
	Zn (mg/Kg)	90,50 \pm 2,91 a	90,07 \pm 2,04 a	87,69 \pm 1,93 a	83,18 \pm 2,48 a
Raíz	Fe (mg/g)	11,17 \pm 2,22 a	12,85 \pm 1,03 a	31,42 \pm 1,26 b	33,94 \pm 3,60 b
	Mn (mg/Kg)	385,54 \pm 29,48 a	541,81 \pm 42,34 b	686,85 \pm 179,49 c	659,72 \pm 100,37 c
	Zn (mg/Kg)	234,47 \pm 7,35 a	257,58 \pm 22,43 a	58,58 \pm 4,17 b	55,99 \pm 3,08 b
Hoja+Raíz	Fe (mg/g)	14,14 \pm 2,40 a	14,56 \pm 1,32 a	35,09 \pm 2,27 b	36,08 \pm 3,10 b
	Mn (mg/Kg)	770,40 \pm 9,84 a	86,77 \pm 49,88 a	1088,6 \pm 89,52 b	965,73 \pm 218,97 b
	Zn (mg/Kg)	324,97 \pm 9,90 a	347,65 \pm 24,65 a	146,27 \pm 4,44 b	139,17 \pm 4,80 b
%Translocación	Fe	26,55 \pm 0,01 a	13,31 \pm 3,19 b	11,69 \pm 0,18 b	6,32 \pm 0,13 c
	Mn	99,84 \pm 9,59 a	59,97 \pm 4,75 b	58,50 \pm 3,39 b	46,38 \pm 2,56 b
	Zn	38,59 \pm 0,62 a	34,97 \pm 2,28 a	149,69 \pm 11,38 b	148,55 \pm 8,59 b

Respecto al contenido de macronutrientes, cabe destacar que el contenido total de K era significativamente superior en el mutante *Atnramp5* respecto del WT, al igual que la translocación de K, en cambio, la traslocación de Mg era significativamente inferior respecto del WT durante el tratamiento (Tabla 4.22).

Tabla 4.22. Análisis mediante ICP de los macronutrientes en hojas y raíces del mutante *Atnramp5* y en WT. Las plantas se cultivaron en condiciones de hidroponía durante tres semanas y después se añadió la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu) durante 24 h. Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes \pm SD, cada uno con tres repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas ($P < 0,05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

MACRONUTRIENTES	Control		Cd+Cr+Cu		
	WT	<i>Atnramp5</i>	WT	<i>Atnramp5</i>	
Hoja	Ca (g/100g)	4,66 \pm 0,21 a	4,35 \pm 0,15 a	4,15 \pm 0,32 a	3,81 \pm 0,15 a
	K (g/100g)	2,51 \pm 0,04 a	3,91 \pm 0,05 b	3,14 \pm 0,16 ab	4,72 \pm 0,07 b
	Mg (g/100g)	1,00 \pm 0,09 a	0,81 \pm 0,05 b	1,03 \pm 0,16 a	0,83 \pm 0,65 b
	S(g/100g)	0,88 \pm 0,05 a	0,86 \pm 0,04 a	0,83 \pm 0,04 a	0,78 \pm 0,02 a
	P (g/100g)	0,84 \pm 0,03 a	0,81 \pm 0,04 a	0,66 \pm 0,09 b	0,70 \pm 0,03 b
Raíz	Ca (g/100g)	2,58 \pm 0,69 a	2,63 \pm 0,21 a	3,46 \pm 0,87 b	3,91 \pm 0,59 b
	K (g/100g)	4,59 \pm 0,37 a	4,57 \pm 0,15 a	0,52 \pm 0,01 b	0,49 \pm 0,04 b
	Mg (g/100g)	0,98 \pm 0,26 a	0,96 \pm 0,77 a	1,33 \pm 0,36 b	1,47 \pm 0,25 b
	S(g/100g)	1,11 \pm 0,04 a	1,13 \pm 0,04 a	0,35 \pm 0,03 b	0,31 \pm 0,01 b
	P (g/100g)	0,84 \pm 0,03 a	0,83 \pm 0,02 a	0,93 \pm 0,1 b	0,84 \pm 0,01 a
Hoja+Raíz	Ca (g/100g)	7,24 \pm 0,79 a	6,98 \pm 0,22 a	7,61 \pm 0,48 a	7,72 \pm 0,42 a
	K (g/100g)	7,10 \pm 0,36 a	8,48 \pm 0,16 b	3,66 \pm 0,13 c	5,20 \pm 0,07 d
	Mg (g/100g)	1,98 \pm 0,31 a	1,77 \pm 0,11 a	2,36 \pm 0,18 a	2,29 \pm 0,19 a
	S(g/100g)	1,99 \pm 0,02 a	1,98 \pm 0,08 a	1,17 \pm 0,02 b	1,09 \pm 0,02 b
	P (g/100g)	1,67 \pm 0,04 a	1,64 \pm 0,04 a	1,59 \pm 0,02 b	1,54 \pm 0,03 b
%Translocación	Ca	210,38 \pm 37,6 a	169,23 \pm 15,83 a	144,78 \pm 44,50 a	102,93 \pm 15,52 a
	K	56,23 \pm 5,68 a	85,67 \pm 2,94 b	607,19 \pm 29,37 c	985,07 \pm 75,5 d
	Mg	118,71 \pm 21,25 a	85,99 \pm 5,65 a	101,64 \pm 40,65 a	60,76 \pm 10,88 b
	S	100,84 \pm 6,40 a	98,48 \pm 1,96 a	74,26 \pm 24,28 b	83,21 \pm 8,60 b
	P	80,18 \pm 7,40 a	76,25 \pm 5,33 a	243,45 \pm 13,40 b	249,72 \pm 3,18 b

4.6.5.5 Estudio de parámetros oxidativos

Para determinar si la inserción de T-DNA en *Atnramp5* interfiere en la respuesta antioxidante de la planta frente a los metales, se determinó la actividad catalasa y glicolato oxidasa, así como la peroxidación de lípidos y la producción de H₂O₂. Las plantas crecieron durante 21 días en sistema hidropónico y posteriormente se adicionó la mezcla de metales.

Los resultados obtenidos de peroxidación lipídica para el tratamiento con la mezcla de metales solo mostraron una reducción significativa de los daños a lípidos entre el mutante y el WT a las 48 horas (Figura 4.67A). Sin embargo, el mutante presentó una mayor producción de H₂O₂ respecto del WT de forma significativa a las 48 h (Figura 4.67B). La actividad GOX (Figura 4.67C) coincidía con los datos de peróxido observados en el mutante, lo que sugiere que la GOX podría ser una fuente importante de ROS, especialmente en el mutante *Atnramp5* (Figura 4.67B). Respecto a la actividad CAT, se

encontraba en niveles muy inferiores a los registrados en WT en todos los tiempos de tratamiento (Figura 4.67D) y se reducía considerablemente en el mutante a los 30 min y en un 50% a las 48 h, lo que podría contribuir al incremento de H₂O₂ observado en *Atnramp5*, especialmente a las 48h de tratamiento (Figura 4.67B). Este dato contrasta con la reducción de la peroxidación lipídica observada en *Atnramp5*, lo que sugeriría que otros antioxidantes pueden contribuir a la defensa frente al daño oxidativo en *Atnramp5*.

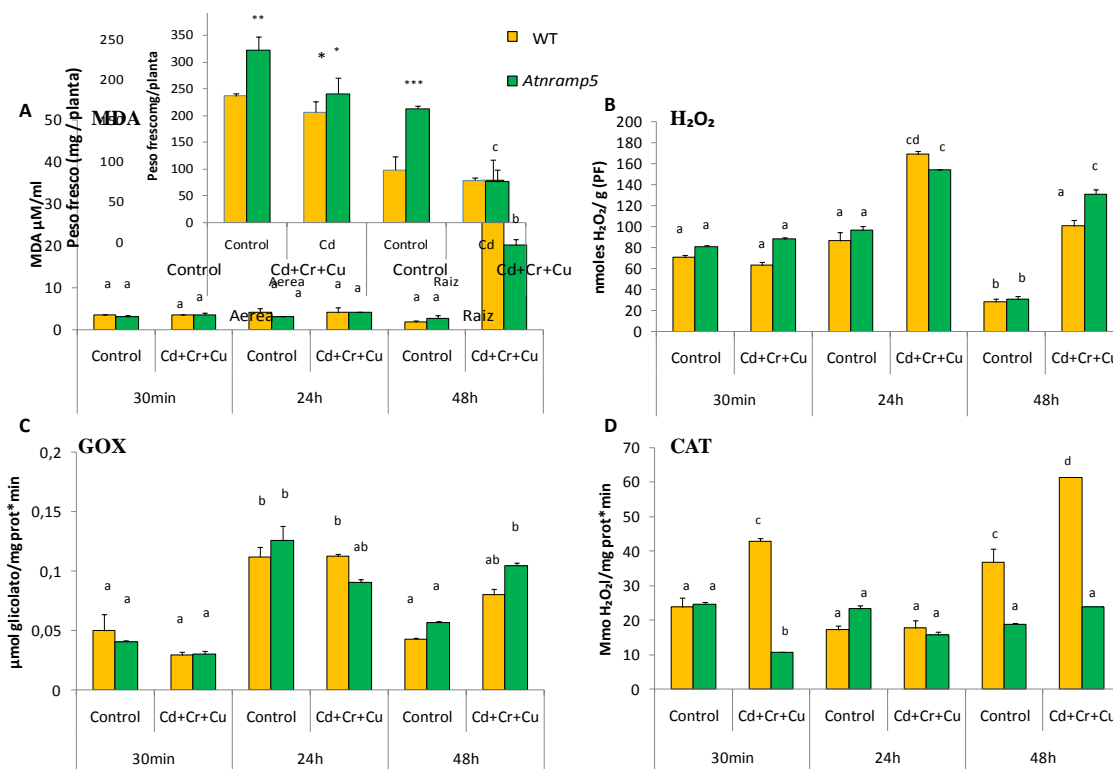


Figura 4.67. Metabolismo oxidativo en plantas WT y *Atnramp5* en respuesta a la mezcla de metales. Peroxidación lipídica (A), producción de H₂O₂ (B), actividad glicolato oxidasa (C) y actividad catalasa (D) en plantas de *Atnramp5* y WT crecidas en cultivo hidropónico con el tratamiento con la mezcla de metales durante 30 min, 24 y 48 h. Los datos representan la media ± error estándar de tres experimentos independientes ± SD, cada uno con tres repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas (P < 0,05) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

4.6.6 Respuesta de *Atnramp5* frente a diferentes metales por separado

Para determinar si la resistencia a la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu) mostrada por el mutante *Atnramp5*, se establecía frente al conjunto de metales o específicamente frente a alguno de ellos, se realizó el estudio en plántulas crecidas en placas de cultivo con los distintos metales por separado.

Germinación

Los datos no mostraron diferencias significativas en la germinación final del mutante con respecto al WT. Con arsénico, sin embargo, el mutante germinó antes y en mayor porcentaje que el silvestre (Figura 4.68). En el resto de los medios, la presencia de metales no pareció tener una gran influencia sobre la germinación. Sin embargo, cabe destacar la inferioridad en el porcentaje de germinación de *Atnramp5* en el medio con Cr respecto del WT en el 3º día. En el caso del Cu, el índice en los inicios de la germinación fue superior para *Atnramp5*, aunque en el silvestre volvió a ser igual en los días posteriores (Figura 4.68).

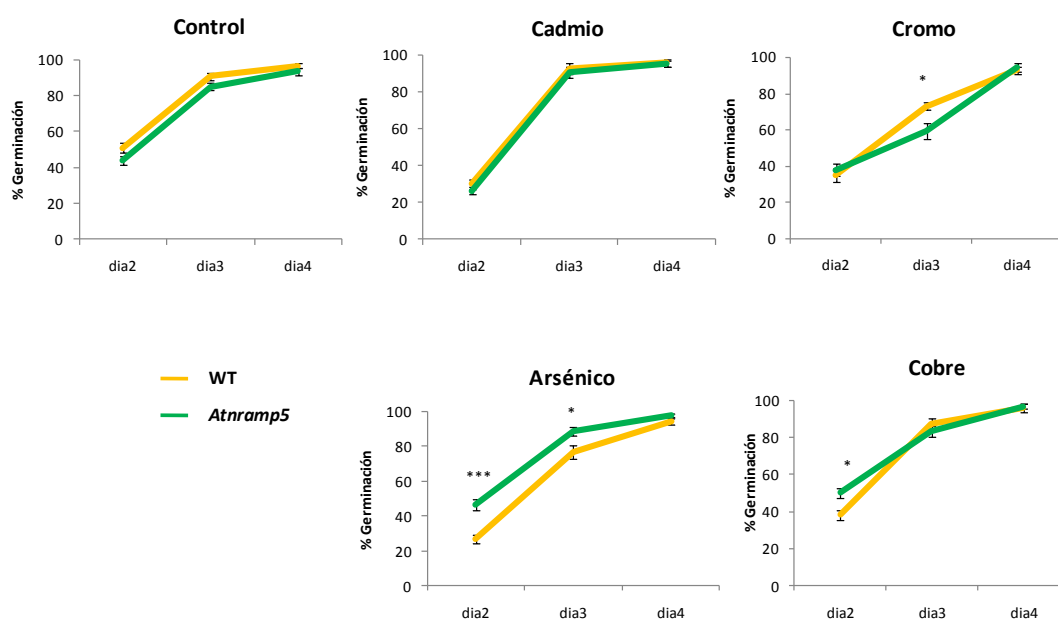
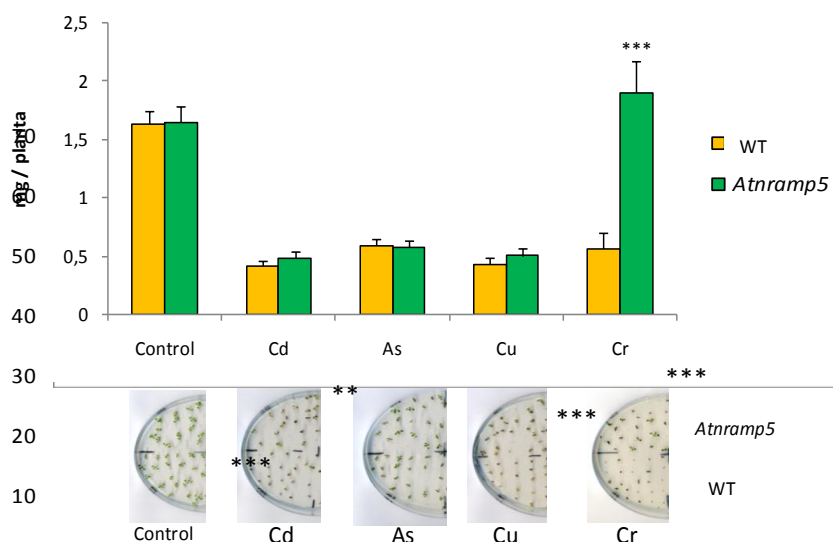


Figura 4.68. Porcentaje de germinación de *Atnramp5* y del WT en medio Hoagland 0.5x con las diferentes concentraciones de metales: Cd 50 μ M, As 30 μ M, Cr 100 μ M, Cu 25 μ M. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al WT (p < 0,001 = ***; p < 0,01 = **; p < 0,05 = *), de acuerdo con la prueba T de Student.

Peso fresco

Se analizó el peso fresco del mutante *Atnramp5* y del WT en los diferentes medios de cultivo. No se observaron diferencias significativas excepto en el caso del medio con Cr, en el que el mutante *Atnramp5* alcanzó un peso fresco superior al de WT (Figura 4.69). También pudo observarse un ligero incremento en el peso fresco, en el caso del Cd y Cu con respecto al silvestre, aunque no de forma significativa.

Resultados



Hojas verdaderas

La tasa de aparición de hojas verdaderas demostró un comportamiento de resistencia del *Atnramp5* en todos los medios excepto en el caso del arsénico, donde las plántulas mutantes desarrollaron un menor porcentaje de hojas verdaderas de forma significativa (Figura 4.70). En los medios preparados con Cd, Cu o Cr, se observó una reducción en el número de hojas verdaderas por planta que fue notablemente más pronunciada en el caso del silvestre (Figura 4.70).

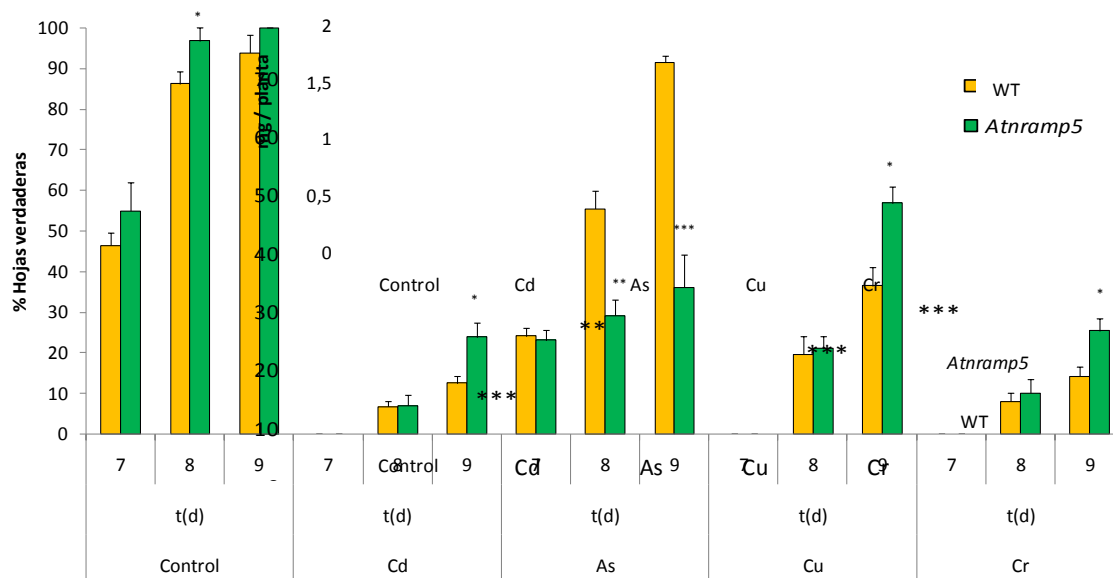


Figura 4.70. Tasa de aparición de hojas verdaderas en plantas *Atnramp5* y WT crecidas en placas en horizontal en medio Hoagland 0,5x con los distintos metales: Cd 50 μ M, As 30 μ M, Cr 100 μ M, Cu 25 μ M. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al WT ($p < 0,001 = ***$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,05 = *$), de acuerdo con la prueba T de Student.

Longitud de raíces

En cuanto al desarrollo radicular en las placas con los distintos metales se observó, que con todos los metales ensayados (Cd/Cr/As) el mutante *Atnramp5* presentaba un mayor desarrollo de su sistema radicular, con respecto al WT. A la concentración de Cu establecida no fue posible medir la longitud de raíz de las plántulas (Figura 4.71).

En lo que respecta al medio con arsénico, cabe destacar, que pese a producirse un menor desarrollo en la parte aérea (Figura 4.70), el desarrollo radicular fue significativamente superior que en las plantas WT (Figura 4.71). Hay que tener en cuenta que la respuesta de las plantas al medio, difiere según el crecimiento sea en horizontal o vertical.

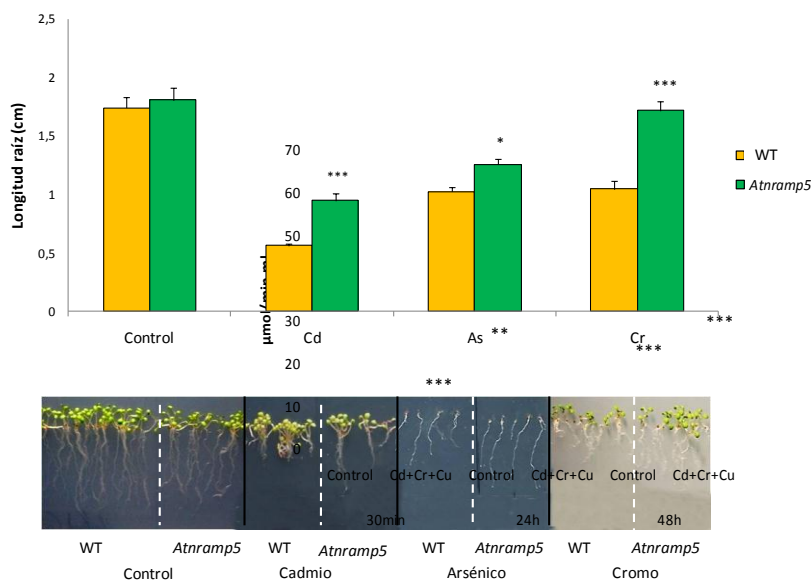


Figura 4.71. Longitud de raíz de plantas *Atnramp5* y WT crecidas en medio Hoagland con los distintos tratamientos: Cd 50 μM, As 30 μM, Cr 100 μM. Los datos representan la media ± error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,001 = ***$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,05 = *$), de acuerdo con la prueba T de Student.

4.6.7 Respuesta de *Atnramp5* frente al cadmio

Para ampliar el conocimiento de la respuesta de *Atnramp5* frente al cadmio, se realizaron estudios de fenotipo, expresión de *NRAMP5*, contenido de metales y análisis de parámetros oxidativos.

4.6.7.1 Fenotipo de plántulas de *Atnramp5* frente al cadmio y análisis de expresión de *NRAMP5*

Como se había observado anteriormente, las plántulas *Atnramp5* mostraron una longitud de raíz mayor con respecto a las plántulas WT después de 7 días de crecimiento con Cd 50 μM. La llegada de un anticuerpo frente a *NRAMP5* a pocas semanas de la

entrega de esta memoria nos permitió detectar la proteína en raíces de planta adulta tanto en WT como en el mutante, lo que nos llevó a forzar las condiciones del análisis de expresión partiendo de más de 1 µg de RNA y utilizando 2 µl de éste para la PCR. Esto nos permitió detectar una inducción del gen en el WT en respuesta a Cd, si bien los niveles de expresión respecto a la TUB son bajos. Además nos permitió detectar que el mutante *Atnramp5* expresaba el gen ya en condiciones control y la inducción por Cd era mucho mayor. Estos resultados sugieren que el mutante puede ser un sobreexpresor, sin embargo, habrá que determinar si la inserción está localizada antes del ATG y no después como estaba descrito o si está localizada donde está descrito y está afectando, no a la expresión de la proteína sino a su secuencia (Figura 4.72).

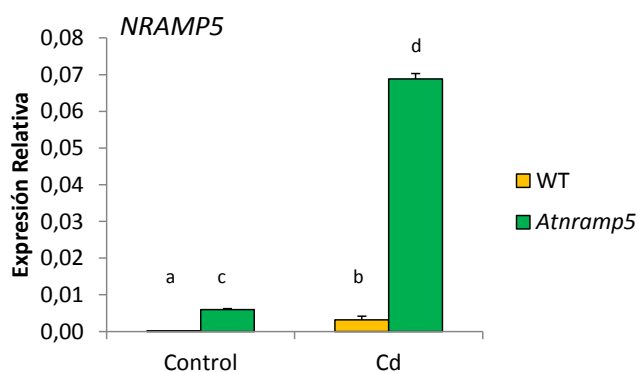


Figura 4.72. Expresión relativa mediante qRT-PCR de *NRAMP5* en plántulas WT y *Atnramp5*. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos dos experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas ($P < 0,05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

4.6.7.2 Acumulación de cadmio en los tejidos de la plántula

Para analizar la localización celular del cadmio en plántulas de *A. thaliana*, tanto del mutante *Atnramp5* como del WT, se empleó la tinción histoquímica basada en el método de la ditizona. Este compuesto forma un complejo con los iones de Cd y se observa en forma de precipitado marrón (Balestri y col., 2014). Las plántulas se cultivaron en el medio Hoagland durante 10 días y se sometieron a un tratamiento con cadmio 50 µM durante 24 horas. Posteriormente, se tiñeron con ditizona tanto las plántulas de *A. thaliana* tratadas, como las no tratadas con Cd (Figura 4.73). Aunque no se observaron diferencias en la cantidad de acúmulos de cadmio entre el mutante y el *Atnramp5*, este estudio permitió localizar acúmulos de cadmio en los diferentes tejidos de las plántulas expuestas al tratamiento. Los complejos Cd-ditizona fueron visibles en toda la raíz principal (Figura 4.73B y C), raíces secundarias laterales (Figura 4.73 G) y pelos radicales (Figura 4.73B y H). Se observó una fuerte acumulación de cadmio en los cotiledones y haces vasculares (Figura 4.73D y E) y en menor cantidad en las primeras hojas verdaderas

(Figura 4.73F). En algunas células de la raíz o en los pelos radicales, se observaron complejos de Cd-ditizona en las vacuolas (Figura 4.73G y H). Además, se observaron complejos más grandes en los espacios intercelulares.

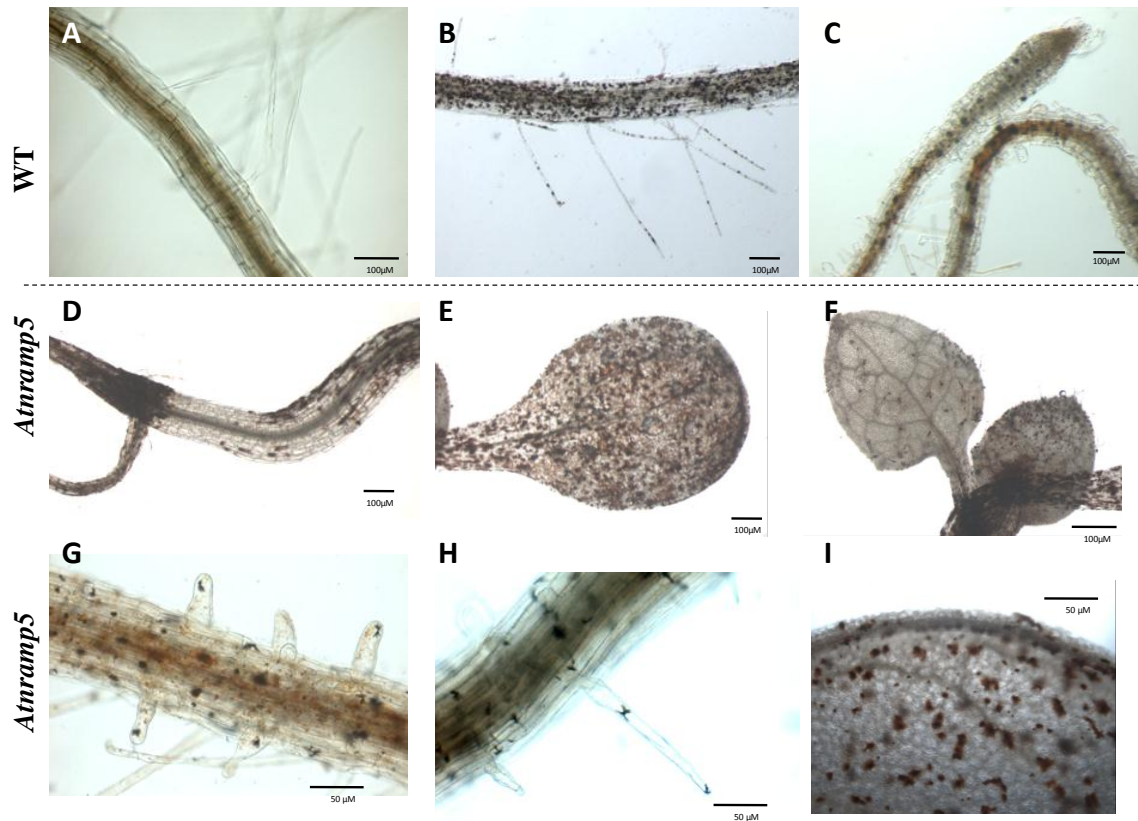


Figura 4.73. Tinción de Cd con ditizona en diferentes tejidos de plántulas de *A. thaliana*, WT y *Atnramp5* tratadas con Cd 50 μ M durante 24 h: raíz principal (B, C, D) raíces secundarias (G), pelos radicales (B, H), cotiledones (E), hojas verdaderas (F, I) y plántulas control (A). Cada barra representa 100 μ m en las dos primeras filas y 50 μ m en la fila de abajo.

4.6.7.3 Crecimiento de *Atnramp5* en cultivo hidropónico con Cd

Para cuantificar el efecto del cadmio en el crecimiento, se determinó el peso fresco de plantas crecidas en cultivo hidropónico (Figura 4.74). El mutante *Atnramp5* mostraba un mayor desarrollo de su parte aérea respecto del WT, tanto en condiciones control como en el tratamiento con cadmio 50 μ M, en cambio, sus raíces se mostraron similares a las del WT.

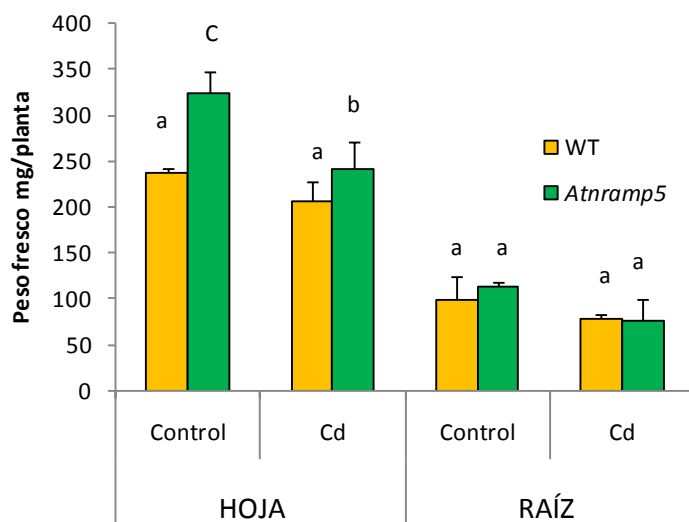


Figura 4.74. Estudios de peso fresco de plantas *Atnramp5* y WT. Estudios de peso fresco de plantas *Atnramp5* y WT crecidas en cultivo hidropónico y 24 de tratamiento en Cd 50 μ M. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, con tres repeticiones. Para realizar la estadística se han comparado por un lado los datos de raíz y por otro lado los de hoja. Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas ($P < 0,05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

4.6.7.4 Análisis del contenido de metales

Se determinó el contenido de los metales en las raíces y la parte aérea de las plantas crecidas en cultivo hidropónico y posteriormente tratadas durante 24 horas con Cd 50 μ M. Además, se calculó el contenido total de cada metal y los porcentajes de translocación.

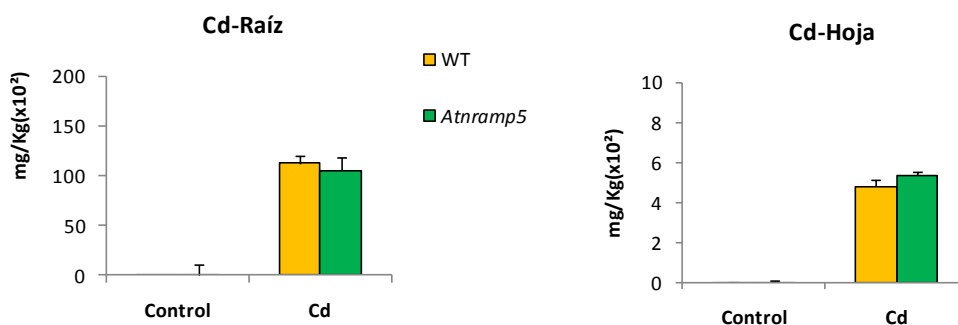


Figura 4.75. Análisis mediante ICP de Cd en hojas y raíces del mutante *Atnramp5* y en plantas WT. Los mutantes se cultivaron en condiciones de hidroponía durante tres semanas y después se añadió Cd 50 μ M durante 24 h. Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. No se encontraron diferencias significativas.

Tabla 4.23. Porcentaje de translocación y contenido total de Cd en plantas de *Atnramp5* y WT de 21 días expuestas durante 1 día a Cd 50 μ M. Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes \pm SD, cada uno con tres repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas ($P < 0,05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

		Cd	
		WT	<i>Atnramp5</i>
Hoja+Raíz	Cd (mg/Kg)	11761,28 \pm 783,37a	11043,19 \pm 630,8a
%Translocación	Cd	4,33 \pm 0,39a	5,13 \pm 0,38a

En los datos obtenidos, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de Cd ni en hoja ni en raíz (Figura 4.75), ni tampoco en el porcentaje de translocación (Tabla 4.23). Sin embargo, es interesante destacar que la translocación de Fe en el tratamiento con Cd fue superior en *Atnramp5* respecto del WT, al contrario que en condiciones control, donde fue significativamente inferior, al igual que el contenido en Fe en hoja (Tabla 4.24).

Tabla 4.24. Efecto del tratamiento de Cd 50 μ M durante 24 h sobre el contenido de Fe, Mn y Zn en hojas y raíces, el contenido total de los mismos y el % de translocación en el mutante *Atnramp5* y el WT. Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes \pm SD, cada uno con tres repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas ($P < 0,05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

		Control		Cd	
MICRONUTRIENTES		WT	<i>Atnramp5</i>	WT	<i>Atnramp5</i>
Hoja	Fe (mg/g)	2,04 \pm 0,49 a	0,89 \pm 0,35 b	0,49 \pm 0,07 b	0,74 \pm 0,18 b
	Mn (mg/Kg)	488,11 \pm 34,70 a	340,61 \pm 42,69 b	298,78 \pm 12,60 b	298,28 \pm 22,75 b
	Zn (mg/Kg)	116,35 \pm 5,23 a	93,12 \pm 4,87 b	85,91 \pm 5,01 b	81,98 \pm 4,19 b
Raíz	Fe (mg/g)	12,72 \pm 2,90 a	10,25 \pm 0,35 a	7,12 \pm 0,68 a	7,01 \pm 0,22 a
	Mn (mg/Kg)	916,22 \pm 231,44 a	965,66 \pm 227,35 a	795,18 \pm 25,33 b	835,63 \pm 37,67 a
	Zn (mg/Kg)	387,87 \pm 37,99 a	347,55 \pm 10,47 a	404,60 \pm 17,13 a	374,48 \pm 13,16 a
Hoja+Raíz	Fe (mg/g)	14,76 \pm 2,84 a	11,12 \pm 0,55 ab	7,61 \pm 2,60 b	7,75 \pm 0,39 b
	Mn (mg/Kg)	1404,33 \pm 234,26 a	1306,26 \pm 190,90 a	1093,95 \pm 15,08 a	1133,91 \pm 21,50 a
	Zn (mg/Kg)	504,22 \pm 37,6 a	440,67 \pm 5,61 a	490,51 \pm 12,34 a	456,46 \pm 9,36 a
%Translocación	Fe	16,04 \pm 0,06 a	8,56 \pm 0,002 b	6,84 \pm 0,001 b	10,54 \pm 0,026 ab
	Mn	53,27 \pm 10,10 a	35,27 \pm 12,21 a	37,57 \pm 2,63 a	35,69 \pm 4,02 a
	Zn	29,99 \pm 3,83 a	26,79 \pm 2,23 ab	21,23 \pm 2,06 b	21,89 \pm 1,80 b

En cuanto al análisis de macronutrientes no se encontraron diferencias significativas, excepto una alteración en el % de translocación de K, que era superior en el mutante *Atnramp5* respecto del WT, tanto en condiciones control como en el tratamiento con Cd (Tabla 4.25).

Tabla 4.25. Efecto del tratamiento de Cd 50 μ M durante 24 h sobre el contenido de macronutrientes (g/100g) en hojas y raíces, el contenido total de los mismos y el % de translocación de WT y *Atnramp5*. Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes \pm SD, cada uno con tres repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas ($P < 0,05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

MACRONUTRIENTES	Control		Cd		
	WT	<i>Atnramp5</i>	WT	<i>Atnramp5</i>	
Hoja	Ca (g/100g)	4,98 \pm 0,10 a	4,41 \pm 0,16 b	3,79 \pm 0,12 c	3,68 \pm 0,18 c
	K (g/100g)	3,05 \pm 0,03 a	4,26 \pm 0,23 b	2,77 \pm 0,09 a	4,02 \pm 0,41 b
	Mg (g/100g)	0,93 \pm 0,06 a	0,80 \pm 0,06 ab	0,54 \pm 0,02 b	0,66 \pm 0,04 b
	S(g/100g)	1,12 \pm 0,02 a	1,07 \pm 0,01 ab	1,04 \pm 0,03 b	1,05 \pm 0,02 b
	P (g/100g)	0,81 \pm 0,02 a	0,79 \pm 0,02 ab	0,72 \pm 0,03 b	0,72 \pm 0,03 b
Raíz	Ca (g/100g)	2,63 \pm 0,64 a	2,28 \pm 14 a	1,66 \pm 0,08 b	1,62 \pm 0,07 b
	K (g/100g)	6,01 \pm 0,44 a	5,48 \pm 0,13 a	5,84 \pm 0,22 a	5,38 \pm 0,52 a
	Mg (g/100g)	0,97 \pm 0,24 a	0,80 \pm 0,05 a	0,55 \pm 0,03 b	0,52 \pm 0,02 b
	S(g/100g)	1,59 \pm 0,09 a	1,39 \pm 0,07 ab	1,34 \pm 0,03 b	1,21 \pm 0,06 b
	P (g/100g)	0,94 \pm 0,06 a	0,88 \pm 0,03 a	1,11 \pm 0,02 b	1,01 \pm 0,04 ab
Hoja+Raíz	Ca (g/100g)	7,61 \pm 0,72 a	6,68 \pm 0,13 ab	5,45 \pm 0,12 bc	5,29 \pm 0,24 c
	K (g/100g)	9,06 \pm 0,43 a	9,74 \pm 0,16 a	8,60 \pm 0,32 a	9,39 \pm 0,42 a
	Mg (g/100g)	1,90 \pm 0,25 a	1,59 \pm 0,05 ab	1,20 \pm 0,05 b	1,17 \pm 0,06 b
	S(g/100g)	2,71 \pm 0,06 a	2,45 \pm 0,03 b	2,37 \pm 0,04 b	2,25 \pm 0,04 b
	P (g/100g)	1,75 \pm 0,08 a	1,66 \pm 0,06 b	1,83 \pm 0,06 b	1,73 \pm 0,02 ab
%Translocación	Ca	162,80 \pm 21,56 a	173,47 \pm 17,82 a	229,18 \pm 14,67 a	227,21 \pm 3,36 a
	K	54,99 \pm 1,11 a	84,50 \pm 5,60 b	47,49 \pm 0,40 a	76,48 \pm 9,71 b
	Mg	86,11 \pm 18,55 a	89,09 \pm 13,05 a	118,15 \pm 6,22 b	127,56 \pm 2,83 b
	S	94,66 \pm 3,31 a	90,11 \pm 3,18 a	77,94 \pm 0,38 b	87,39 \pm 5,94 b
	P	75,74 \pm 0,23 a	84,58 \pm 4,33 a	64,71 \pm 2,03 b	71,49 \pm 5,20 b

4.6.7.5 Estudio de parámetros oxidativos

Para determinar la respuesta de *Atnramp5* frente al estrés oxidativo producido por el tratamiento con Cd, las plantas se cultivaron en sistema hidropónico durante 21 días y se trataron posteriormente con cadmio a diferentes tiempos: 24 h, 48 h y 5 días. El mutante *Atnramp5* presentó una menor peroxidación lipídica mostrando un estrés oxidativo y un daño en sus membranas significativamente inferior al WT (Figura 4.76A). Además, se observó una menor producción de H₂O₂ que en el WT en respuesta al tratamiento. La producción de H₂O₂ en el WT aumentó a partir de las 48 h, en cambio, en el mutante la producción se incrementó a las 24 h, pero a tiempos superiores descendía hasta los mismos niveles del control no tratado (Figura 4.76B). La actividad GOX fue siempre inferior a la del WT, observándose un ligero incremento en respuesta al tratamiento a las 24 y 48 h, aunque no significativo (Figura 4.76C). La menor producción de peróxido coincidió con la menor peroxidación lipídica registrada en *Atnramp5*. Por otra parte, tanto

en condiciones control como en el tratamiento con Cd, la actividad catalasa (Figura 4.76D) del mutante fue siempre inferior a la del WT. Además, los resultados obtenidos para la actividad GOX del mutante, tanto en control como en tratamiento (Figura 4.76C), coinciden con la menor producción de peróxido (Figura 4.76A) y la menor peroxidación lipídica de *Atnramp5* (Figura 4.76A).

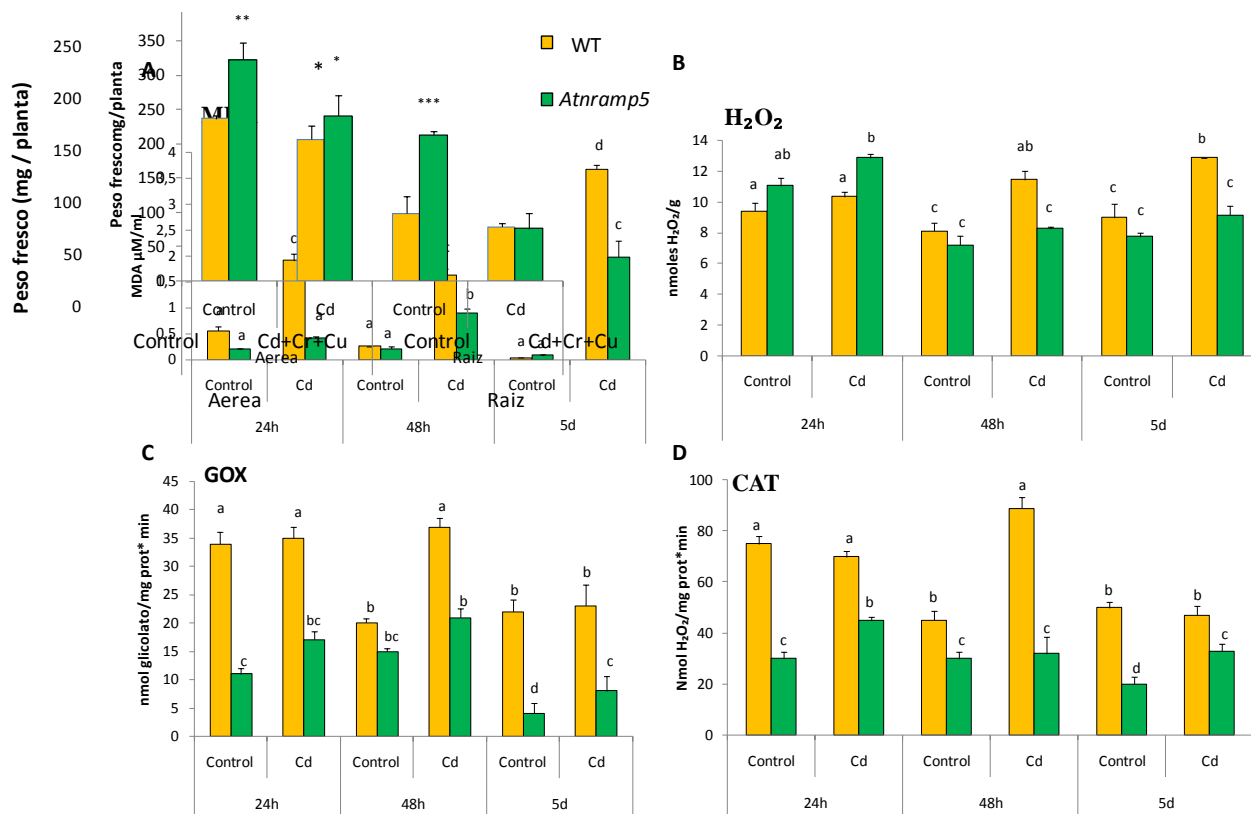


Figura 4.76. Metabolismo oxidativo en plantas WT y *Atnramp5* en respuesta al Cd. Peroxidación lipídica (A), producción de H₂O₂ (B), actividad glicolato oxidasa (C) y actividad catalasa (D) en plantas de *Atnramp5* y WT crecidas en cultivo hidropónico con el tratamiento con cadmio 50 µM durante 24 h, 48 h y 5 días. Los datos representan la media ± error estándar de tres experimentos independientes ± SD, cada uno con tres repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas (P < 0,05) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

Contenido de catalasa y análisis de expresión

La menor actividad CAT observada en el mutante, tanto en el tratamiento con la mezcla de metales (Figura 4.67D) como en el tratamiento con cadmio (Figura 4.76D) nos llevó a estudiar esta enzima en mayor profundidad. Se analizó mediante Western-blot la cantidad de proteína catalasa presente en los extractos de hoja de *Atnramp5* y WT a diferentes tiempos del tratamiento con Cd 50 µM. Se pudo observar como el contenido de catalasa en WT se incrementó a las 24 horas ligeramente pero se mantuvo

prácticamente constante a los diferentes tiempos de tratamiento con cadmio; mientras que en el mutante *Atnramp5*, que partía de un estado inicial con una cantidad ligeramente superior de catalasa respecto del WT, que aumentó significativamente a lo largo del tiempo hasta triplicarse a los 5 días de tratamiento (Figura 4.77A).

Se determinó mediante qRT-PCR, el patrón de expresión de *CAT-2*, el gen mayoritario para esta proteína y se observó una inhibición a las 24 horas de tratamiento y una fuerte inducción a los 5 días en WT. Curiosamente, en el mutante *Atnramp5* se produjo el patrón inverso, una fuerte inducción a las 24 horas que fue disminuyendo a lo largo del tratamiento hasta producirse una inhibición a los 5 días (Figura 4.77B).

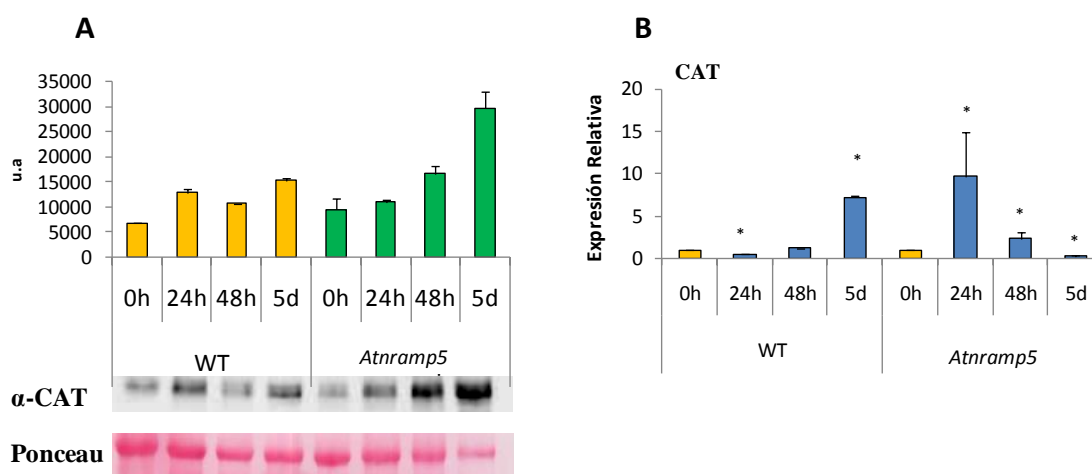


Figura 4.77. Contenido en catalasa en hojas de *Atnramp5* y WT, a diferentes tiempos de tratamiento con Cd mediante Western (A). Estudio de expresión mediante qRT-PCR en hojas (B) a diferentes tiempos de tratamiento con cadmio en WT y *Atnramp5*. Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a las 0 h ($p < 0,05 = *$), de acuerdo con la prueba T de Student.

4.6.7.6 Localización de la expresión de *NRAMP5* mediante GUS

Para localizar la expresión del transportador NRAMP5 se emplearon las líneas transgénicas pNRAMP5::GUS, 1.1 y 2.1. Estas dos líneas tienen 500 pb del promotor de *NRAMP5* y presentan el gen marcador GUS (β -Glucuronidasa). Dichas líneas fueron cedidas por el Prof. Sébastien Thomine del “Institute for Integrative Biology of the Cell” (CNRS, París).

Análisis del patrón de expresión en raíz de las líneas pNRAMP5: GUS

Se realizó un estudio mediante PCR semicuantitativa de la expresión de *NRAMP5* en las líneas transgénicas pNRAMP5::GUS, líneas 1.1 y 2.1 en hoja y en raíz del WT (Ws) bajo el tratamiento con cadmio 50 μ M. Por ello, las plantas crecieron en cultivo hidropónico y se sometieron a un posterior tratamiento con Cd 50 μ M durante 24 y 48 horas para el estudio de expresión en raíz. Se observó que en estas líneas si se detectaba la expresión del gen en condiciones normales y además, existía una inducción de *NRAMP5* en la raíz de ambas líneas tanto a las 24 como a las 48 h de tratamiento (Figura 4.78).

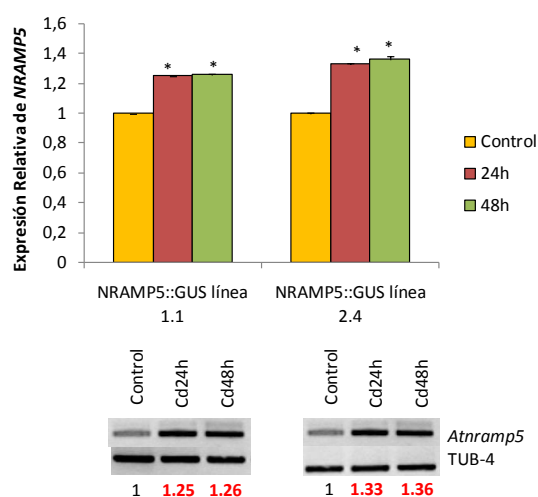


Figura 4.78. Expresión relativa de *NRAMP5* en raíz mediante RT-PCR semicuantitativa en pNRAMP5::GUS, líneas 1.1 y 2.4 en condiciones control y de estrés por el tratamiento con cadmio 50 μ M durante 24 y 48 horas. Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05 = *$), de acuerdo con la prueba T de Student.

Localización de la expresión mediante tinción GUS

Posteriormente, se llevó a cabo un análisis más detallado del patrón de expresión del gen *NRAMP5* a través de la tinción histoquímica en el tejido de raíz de las plantas transgénicas pNRAMP5::GUS, utilizando X-gluc y su observación posterior en el microscopio óptico. No se observó tinción en las líneas pNRAMP5::GUS (Figura 4.79B y C) respecto de las plantas empleadas como control positivo, que expresan la FBPasa citosólica, cedidas por el grupo de la Dra. M. Saharawy (EEZ, CSIC) (Figura 4.79A), por lo que no se pudo localizar la expresión de *NRAMP5* mediante esta técnica. Por ello, se procedió a realizar otro tipo de análisis con el fin de localizar la proteína.

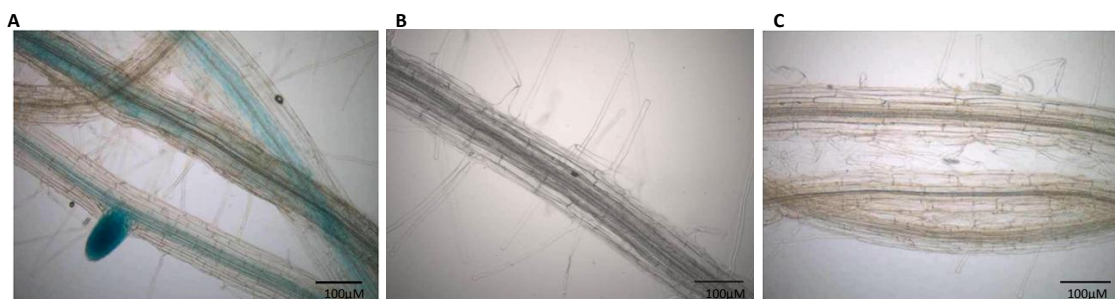


Figura 4.79. Tinción histoquímica mediante X-gluc (GUS) de las plantas control positivo, que expresan la FBPassa citosólica (A), la línea pNRAMP5::GUS 1.1 (B) y la línea pNRAMP5::GUS 2.1 (C).

4.6.7.7 Localización de NRAMP5 mediante GFP

El estudio de la localización del transportador NRAMP5 se realizó empleando las líneas transgénicas *NRAMP5::NRAMP5:GFP* 3.2 y 8.3. Estas dos líneas complementan a un mutante *Atnramp5* en fondo Ws y bajo su propio promotor (500 pdb) y están unidas a GFP (“green fluorescent protein”). Esta proteína emite fluorescencia en la zona verde del espectro visible, lo que permitió visualizar la expresión de dicho gen mediante microscopía de barrido láser confocal (CLSM).

Análisis del patrón de expresión en hoja y raíz en las líneas *NRAMP5::NRAMP5:GFP*

Al igual que ocurre en las líneas GUS, en estas líneas también se observa una expresión del gen NRAMP5 en condiciones control y además se detectó un inducción del mismo en raíz a 24 y 48 h después del tratamiento con Cd y a los 30 minutos en hoja; tiempos que se utilizaron para la detección de la GFP (Figura 4.80).

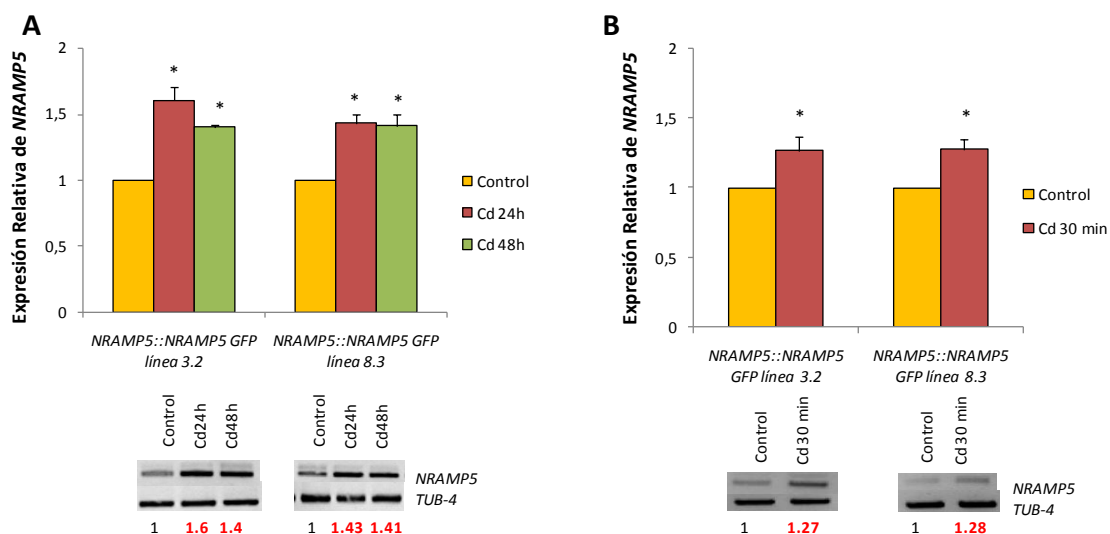


Figura 4.80. Expresión relativa de *NRAMP5* en raíz (A) y en hoja (B) mediante RT-PCR semicuantitativa en los mutantes *NRAMP5::NRAMP5:GFP*, líneas 3.2 y 8.3 en condiciones control y de estrés por el tratamiento con cadmio 50 μ M durante 24 y 48 horas para el análisis en raíz y durante 30 minutos para el análisis en hoja. Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05 = *$), de acuerdo con la prueba T de Student.

Localización del transportador NRAMP5-GFP mediante microscopia de barrido laser confocal

El estudio se realizó a las 24 y 48 h después del tratamiento con Cd coincidiendo con la inducción en la expresión de *NRAMP5* (Figura 4.80). Para localizar el NRAMP5 se empleó tejido de raíz y se visualizó la fluorescencia de la GFP mediante un microscopio láser confocal (CLSM).

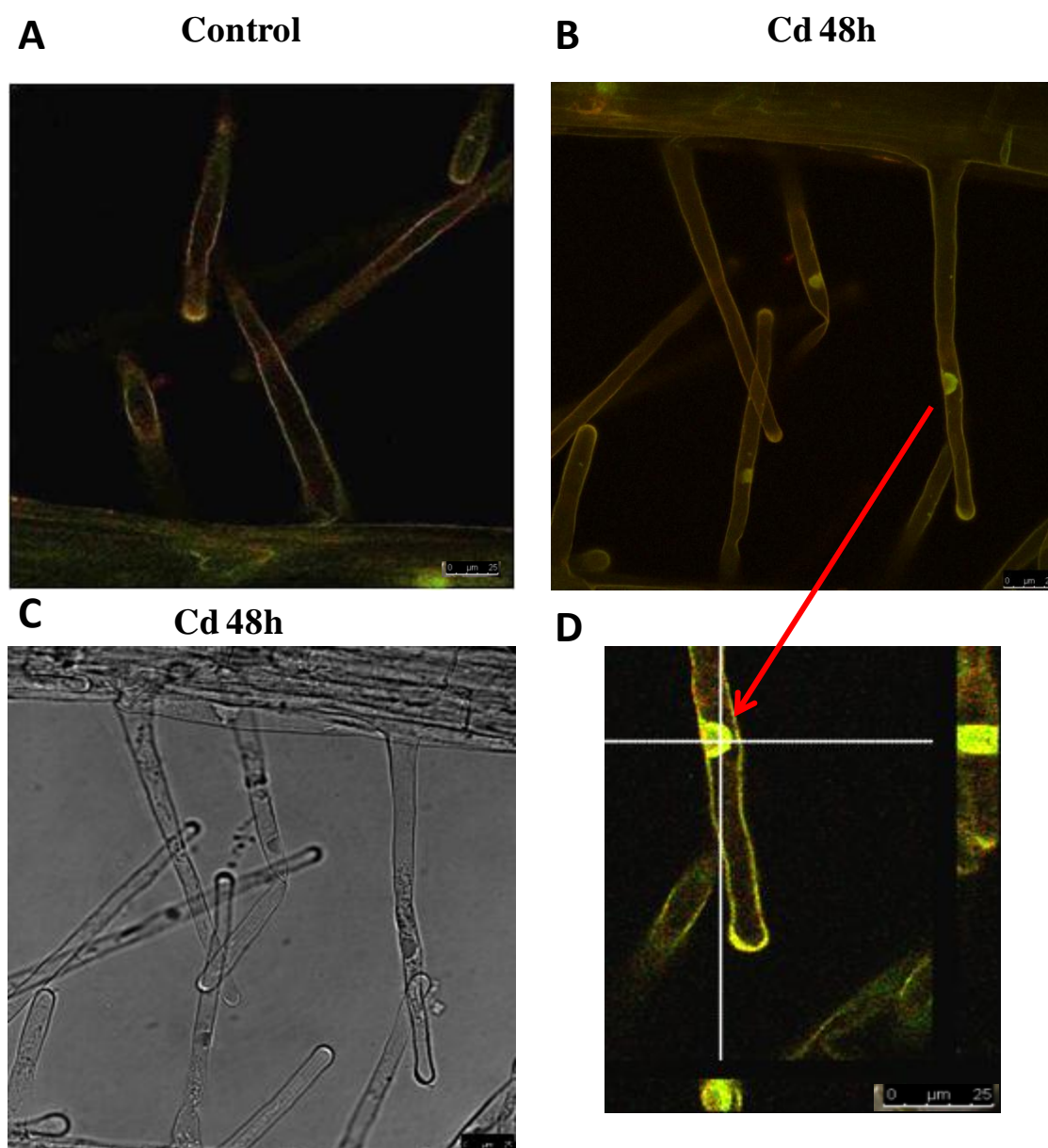


Figura 4.81. Visualización de GFP en raíces tratadas con Cd 50 μ M durante 48 horas. Las imágenes corresponden a reconstrucciones tridimensionales de la superposición de 8 imágenes, obtenidas por escaneado de secciones de 1 μ m de grosor obtenidas en el microscopio láser confocal. En WT (A), en el mutante *NRAMP5::NRAMP5:GFP* línea 8.3 (B), con luz transmitida (C) y proyección ortogonal (D).

De esta forma se localizó la fluorescencia verde asociada al NRAMP en pelos radicales, concretamente en vesículas (Figura 4.81A, B, C y D). Mediante análisis confocal en Z y una proyección ortogonal, se observó fundamentalmente en la membrana de las vesículas. También se observó fluorescencia verde asociada a haces vasculares, sin embargo, esta fluorescencia también se observaba en WT, por lo que no parecía ser específica de la GFP.

Ensayo de inmunohistoquímica de GFP-NRAMP y revelado con diaminobencidina (DAB)

Con el fin de confirmar la localización de la expresión de NRAMP5 obtenida anteriormente mediante la observación de fluorescencia debido a la señal GFP, se realizó un ensayo de inmunohistoquímica con el anticuerpo frente a la GFP, con un posterior revelado con diaminobencidina (DAB) y la observación directa en un microscopio óptico de luz transmitida. El ensayo se realizó en cortes de tejido de raíz de 60 μm de sección previamente preparados como se describe en el apartado 3.12.4 de este trabajo. Como se muestra en la Figura 4.82, se observaron precipitados de color marrón debido al revelado con DAB en algunas de las vesículas de los pelos radicales de las plantas que fueron sometidas al tratamiento con cadmio, mientras que en las plantas control no se observó ningún precipitado. De esta manera se confirmó la localización de la expresión de NRAMP5 en las vesículas de los pelos radicales. Para corroborar si también se localizaba el transportador NRAMP5 en los haces vasculares de la raíz principal se utilizó la misma técnica y como se muestra en la Figura 4.83, se observó precipitado marrón tanto en las plantas mutantes tratadas con cadmio como en las plantas WT sin tratamiento, no pudiéndose confirmar la expresión del NRAMP5 en el xilema. Probablemente la coloración oscura en esta zona de la raíz se deba al alto contenido de H_2O_2 en estos tejidos, que puede reaccionar con el DAB.

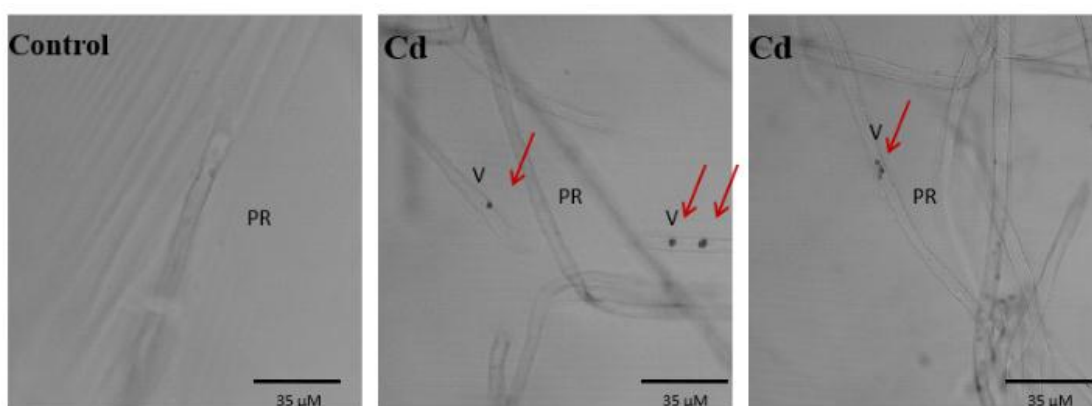


Figura 4.82. Inmunohistoquímica para la localización de GFP con revelado DAB. Visualización de precipitado marrón debido al DAB en raíces de *NRAMP5::NRAMP5:GFP* línea 8.3 tratadas con CdCl_2 50 μM (Cd) durante 48 horas y sin tratar (Control). Las imágenes fueron obtenidas en microscopio óptico de luz transmitida y muestran la localización de NRAMP5 en las vesículas (V) de los pelos radicales (PR).

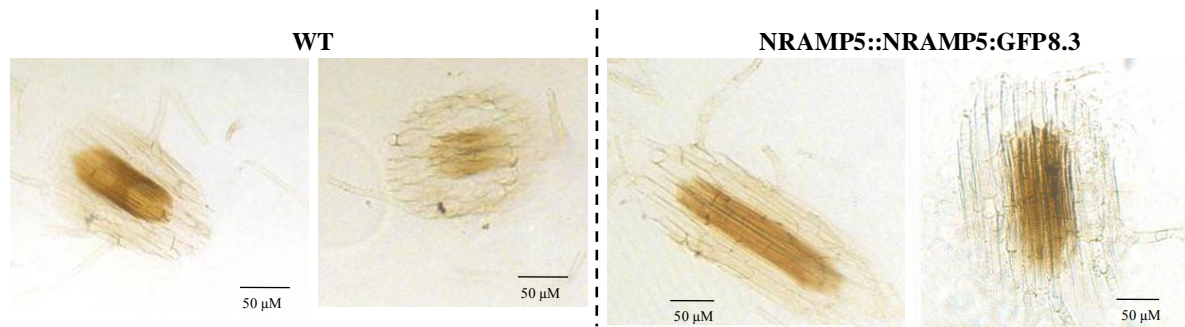


Figura 4.83. Inmunohistoquímica para la localización de GFP en haces vasculares. Visualización de precipitado marrón debido a la oxidación del DAB en haces vasculares de la línea *NRAMP5::NRAMP5:GFP* y WT tratadas con CdCl_2 50 μM (Cd) durante 48 horas. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio óptico de luz transmitida.

Para determinar la localización de NRAMP5 en vesículas y no en el núcleo, se realizó una tinción con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol), un intercalante del DNA, utilizado como marcador de núcleos. Se observó en el microscopio de fluorescencia, registrando su emisión a 480 nm y se confirmó que la GFP no se localizaba en el núcleo, sino en vesículas de menor tamaño (Figura 4.84).

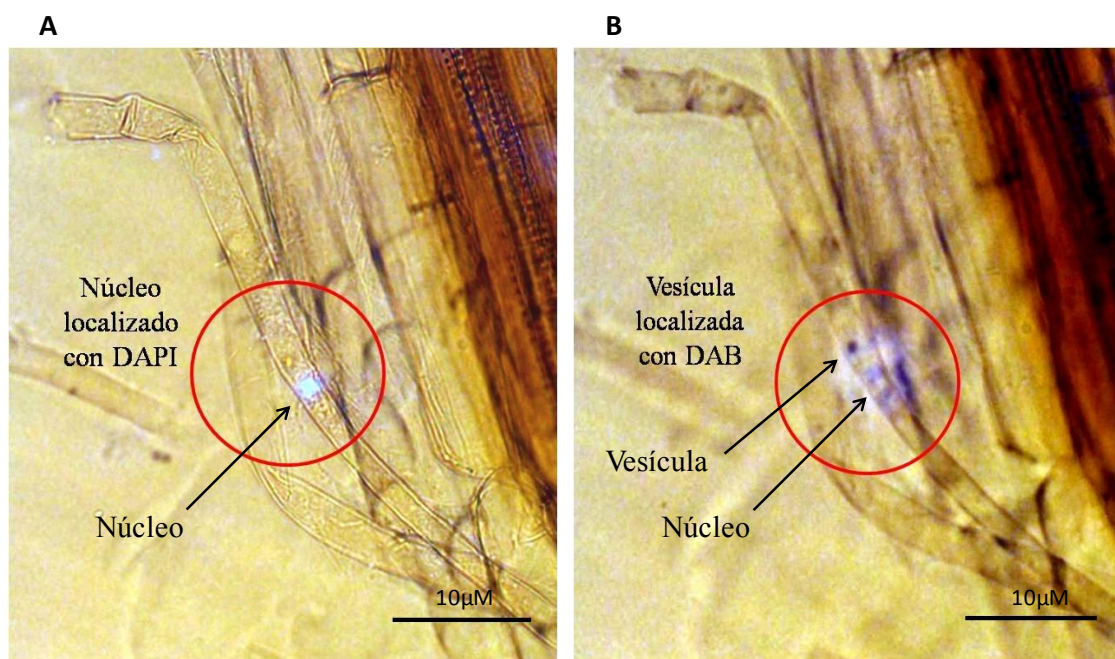


Figura 4.84. Inmunohistoquímica de GFP y visualización de núcleos. Visualización de las vesículas marcadas por el precipitado marrón debido al DAB (B) y el núcleo teñido con DAPI (A), en los pelos radicales de plantas *NRAMP5::NRAMP5:GFP* tratadas con CdCl_2 50 μM (Cd) durante 48 horas. Las imágenes fueron obtenidas en microscopio óptico con luz transmitida.

Puesto que la señal GFP observada en los estudios anteriores fue muy tenue y solo se observó en algunas vesículas de los pelos radicales del mutante *NRAMP5::NRAMP5:GFP* (línea 8.3) y además la señal en los haces vasculares observada no fue específica del mutante

en el tratamiento con cadmio sino que también se observó una señal basal en los haces vasculares de plantas WT, se intentó visualizar el NRAMP5-GFP mediante inmunohistoquímica, empleando un anticuerpo fluorescente, IgG Dylight 680. La señal GFP se observó tanto en haces vasculares del mutante como en el WT, al igual que ocurría en el caso del DAB, por lo que no se puede concluir con certeza que el transportador NRAMP5 esté localizado en haces vasculares del xilema ya que la señal obtenida se solapa con la autofluorescencia propia de los haces vasculares.

4.6.7.8 Expresión de NRAMP5 en los mutantes *Atrboh C*, *Atrboh D* y *Atrboh F*

Para determinar si la regulación del *NRAMP5* era dependiente de ROS, se determinó el patrón de expresión de *NRAMP5* en raíces de planta adulta después de 24 horas de tratamiento con cadmio mediante qRT-PCR, como se ha descrito anteriormente (Apartado 4.6.7.1), tanto en WT como en *Atrboh C*, *Atrboh D* y *Atrboh F* en raíz, con respecto al WT sin tratar. Las líneas mutantes *AtrbohC*, *AtrbohD* y *AtrbohF*, son deficientes en NADPH oxidasa C, D y F respectivamente. Los resultados mostraron una inducción significativa en raíces de WT a las 24 horas de tratamiento. En los mutantes *Atrboh D* y *C* se observó una inducción significativa a las 24 horas de tratamiento con cadmio, si bien, esta inducción era menor a la observada en el WT. Por otro lado, no se observó una inducción significativa en el mutante *Atrboh F* en comparación con el WT (Figura 4.85).

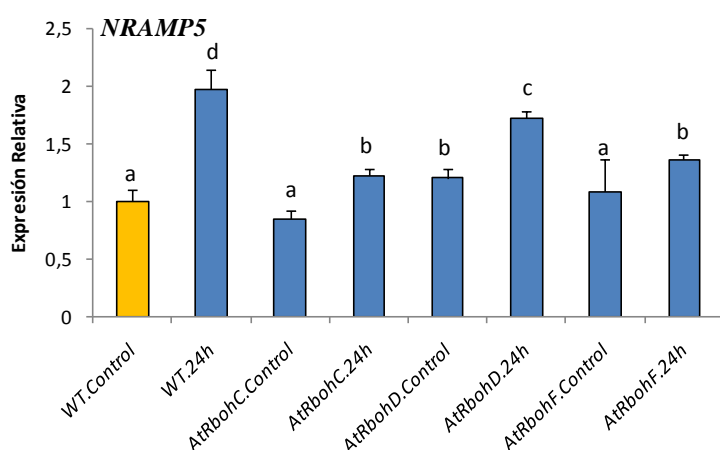


Figura 4.85. Expresión relativa de *NRAMP5* en raíz mediante qRT-PCR en los mutantes *Atrboh C*, *Atrboh D*, *Atrboh F* y WT en condiciones control y de estrés por el tratamiento con cadmio 50 μ M durante 24 horas. Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes. Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas ($P < 0,05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

4.6.7.9 Resumen de la respuesta de *Atnramp5* en tratamiento con la mezcla de metales vs Cd

Según los resultados obtenidos, la respuesta de NRAMP5 difería dependiendo del tipo de tratamiento; por ello, se elaboró una tabla resumen con los parámetros estudiados y los resultados más destacados para este transportador, tanto en el tratamiento con la mezcla de metales como en el tratamiento con Cd (Tabla 4.26).

Tabla 4.26. Parámetros estudiados y su respuesta para NRAMP5 en ambos tratamientos.

Parámetro		Tratamiento	
		Cd+Cr+Cu	Cd
Estudio en plántula			
Fenotipo		Resistencia <i>Atnram5</i> > WT	Resistencia <i>Atnram5</i> > WT
Expresión NRAMP5		-----	Inducción
Estudio en planta adulta			
Fenotipo	Peso fresco raíz	<i>Atnramp5</i> = WT	<i>Atnramp5</i> = WT
	Peso fresco hoja	<i>Atnramp5</i> > WT	<i>Atnramp5</i> > WT
Contenido Metales	Cd, Cr, Cu	<i>Atnramp5</i> = WT	<i>Atnramp5</i> = WT
	Micronutrientes	Translocación Fe Control: <i>Atnramp5</i> <<WT	Translocación Fe Control: <i>Atnramp5</i> <WT; Cd: <i>Atnramp5</i> >WT
		Captación Mn Control: <i>Atnramp5</i> >WT	Captación Mn Cd: <i>Atnramp5</i> >WT
	Macronutrientes	Translocación Mn Control: <i>Atnramp5</i> <WT	-----
		Translocación K Metales: <i>Atnramp5</i> >>WT	Translocación K Control: <i>Atnramp5</i> >WT Cd: <i>Atnramp5</i> >WT
Translocación Mg Metales: <i>Atnramp5</i> <<WT	-----		
Expresión NRAMP5	Raíz	-----	Inducción 24 y 48h
	Hoja	-----	Inducción 30 min
Parámetros oxidativos	Peroxidación lipídica	<i>Atnramp5</i> <WT (48h)	<i>Atnramp5</i> <WT (24, 48h y 5d)
	H₂O₂	<i>Atnramp5</i> >WT (48h)	<i>Atnramp5</i> <WT (48h, 5d) <i>Atnramp5</i> >WT (24h)
	Actividad GOX	<i>Atnramp5</i> >WT (48h)	<i>Atnramp5</i> <WT (24, 48h y 5d)
	Actividad CAT	<i>Atnramp5</i> <<WT (30', 48h)	<i>Atnramp5</i> <<WT (24, 48h y 5d)

4.6.8 Estudio de NRAMP5 en condiciones alteradas de manganeso

Los resultados del contenido de micro y macronutrientes obtenidos mediante ICP, sugirieron que el transportador de *Arabidopsis thaliana* NRAMP5 podría tener una función en el transporte de hierro y de manganeso y que, podría estar implicado en la translocación de estos elementos de la raíz a la parte aérea.

Basándonos en estos resultados previos se estudió la respuesta del transportador NRAMP5, a diferentes concentraciones de Mn, en las diferentes líneas disponibles de NRAMP5.

4.6.8.1 Estudio fenotípico en plántulas

En este estudio se comparó la influencia del manganeso en el silvestre y en los mutantes de *NRAMP5*. Se estudió tanto la tasa de germinación como de aparición de las hojas verdaderas, el peso fresco de la planta completa así como la longitud de las raíces desarrolladas. Para ello las plántulas se cultivaron durante 7 o 10 días en placas Petri conteniendo el medio MS con diferentes concentraciones o ausencia de manganeso.

Germinación

En cuanto a los efectos del manganeso sobre la germinación, no se observaron diferencias significativas entre el mutante *Atnramp5* y el WT. Las líneas sobreexpresoras *NRAMP5::NRAMP5:GFP*, (3.2 y 8.3) sin embargo, fueron las que más tiempo tardaron en germinar, tanto para altas concentraciones como en ausencia de manganeso. Tras 5 días, este porcentaje fue prácticamente igual en todas las líneas y tratamientos estudiados salvo con 400 μ M de Mn, en el que las líneas sobreexpresoras parecían tener su capacidad de germinación reducida (Figura 4.86).

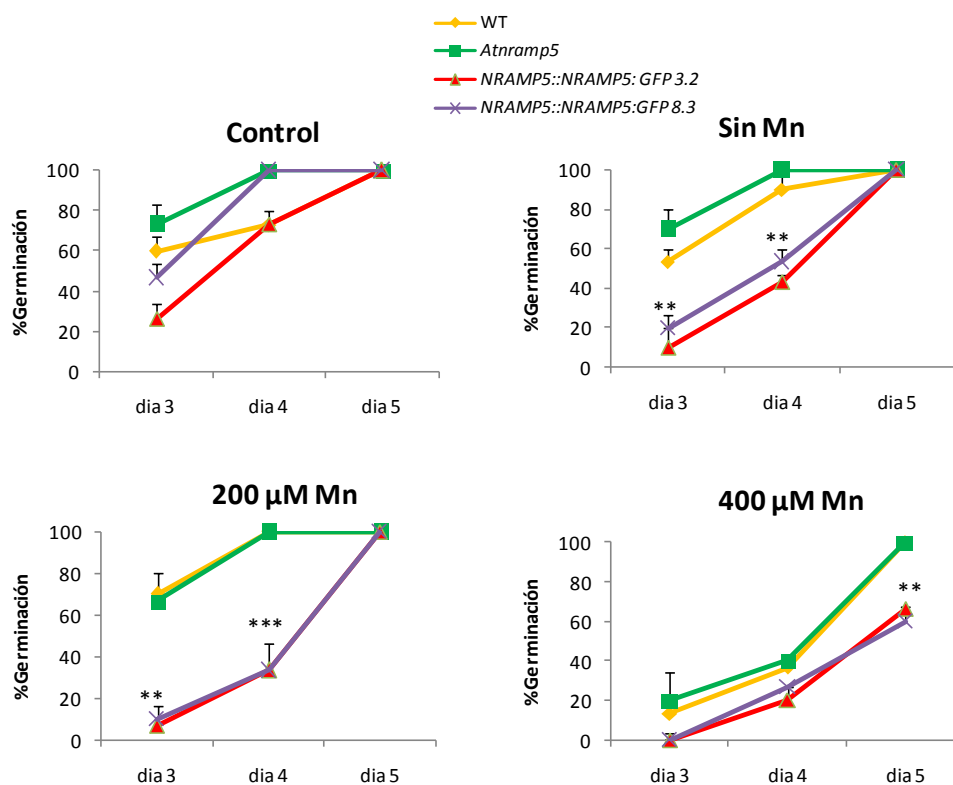


Figura 4.86. Porcentaje de germinación de *Atnramp5* y *NRAMP5::NRAMP5:GFP* líneas 3.2 y 8.3 respecto al WT en medio MS con diferentes concentraciones de Mn: 0, 200 μ M y 400 μ M. Los datos representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al WT ($p < 0,001 = ***$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,05 = *$), de acuerdo con la prueba T de Student.

Hojas verdaderas

En el estudio de la tasa de aparición de las hojas verdaderas, los porcentajes más altos correspondieron al mutante *Atnramp5*, lo que implicó que estas hojas aparecían antes en dicho mutante que en el resto de las líneas estudiadas, mostrando más diferencia con las líneas *NRAMP5::NRAMP5:GFP*. No obstante, estos valores se reducían con la concentración más elevada de Mn (400 μ M) en todas las líneas, llegando escasamente a un 20% (Figura 4.87).

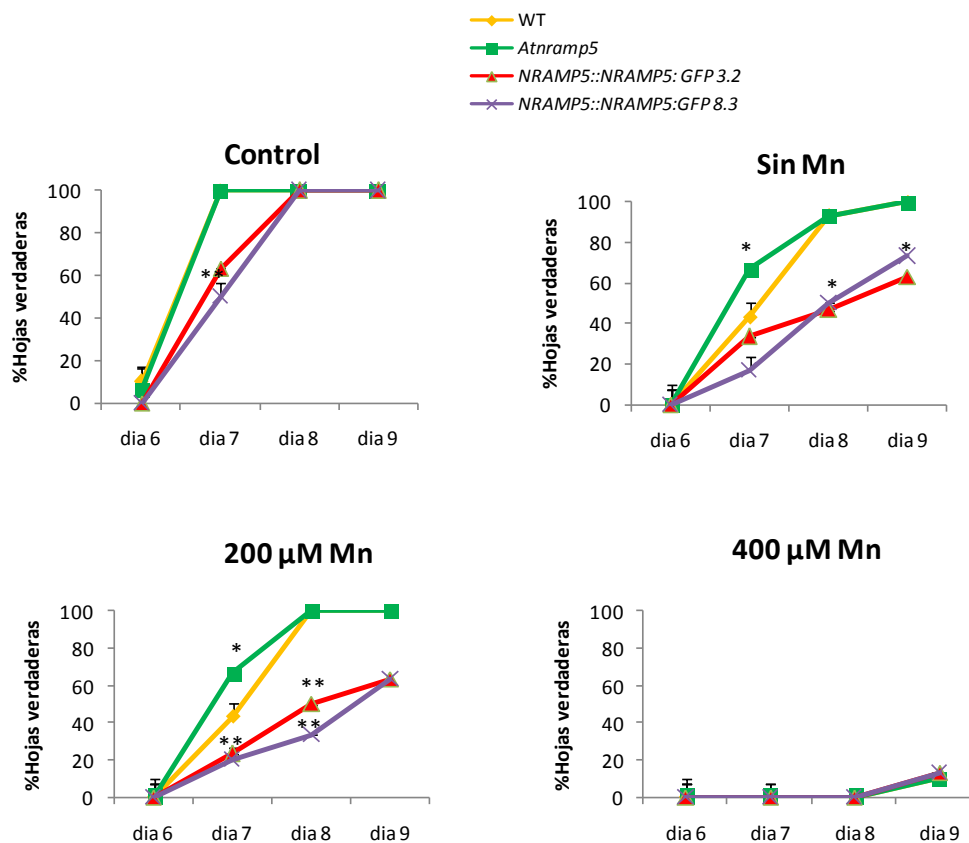


Figura 4.87. Tasa de aparición de hojas verdaderas en plántulas de *Atnramp5* y *NRAMP5::NRAMP5:GFP* líneas 3.2 y 8.3 respecto de WT cultivadas en medio MS con diferentes concentraciones de Mn: 0, 200 μM y 400 μM . Los datos representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al WT ($p < 0,001 = ***$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,05 = *$), de acuerdo con la prueba T de Student.

Medida de peso fresco

El mutante *Atnramp5* presentaba un peso fresco de la plántula superior que el resto de las líneas estudiadas con las concentraciones más altas de Mn. La línea *NRAMP5::NRAMP5:GFP 8.3* presentó diferencias significativas con respecto al WT, siendo el peso fresco de las plántulas significativamente inferior, salvo en la condición de 200 μM de Mn (Figura 4.88).

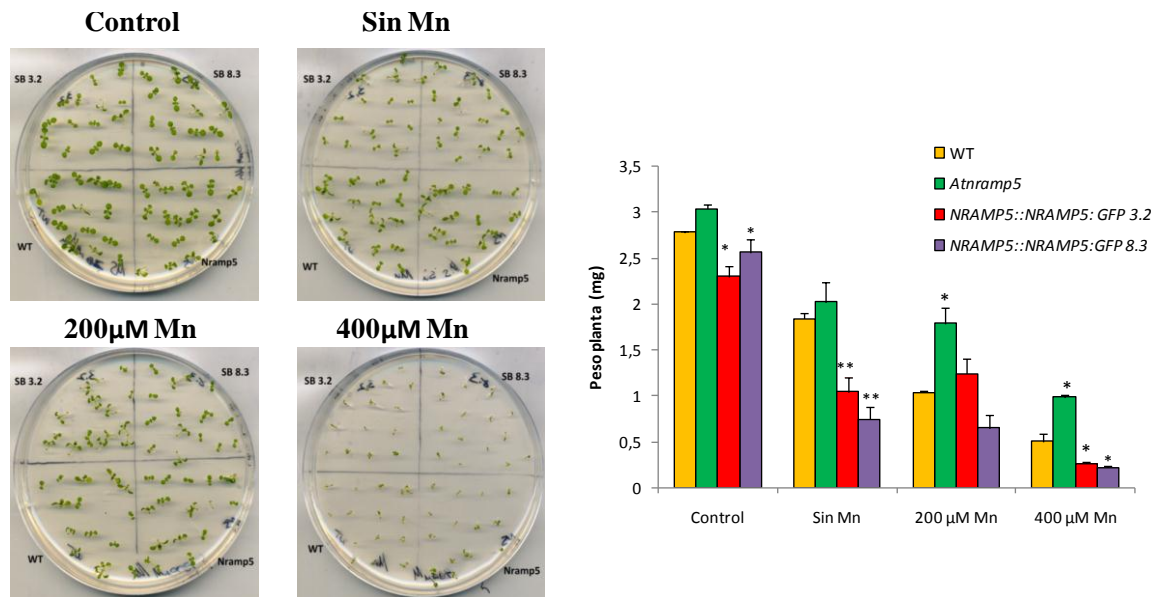


Figura 4.88. Peso fresco de las plántulas de *Atramp5*, *NRAMP5::NRAMP5:GFP* líneas 3.2 y 8.3 y WT de 10 días de crecimiento en placas de cultivo con diferentes concentraciones de Mn: 0, 200 μ M y 400 μ M. Los datos representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al WT ($p < 0,001 = ***$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,05 = *$), de acuerdo con la prueba T de Student.

Longitud de raíces

Las plántulas del mutante *Atramp5* presentaban una longitud de las raíces mayor que el resto de líneas estudiadas en el caso del medio preparado sin Mn. La línea *NRAMP5::NRAMP5:GFP 3.2* presentó raíces significativamente más cortas en el medio control y con 400 μ M. La línea *NRAMP5::NRAMP5:GFP 8.3*, sin embargo, no presentó, en este caso, diferencias significativas con respecto al WT (Figura 4.89). Las raíces de las líneas *NRAMP5::NRAMP5:GFP* mostraban un fenotipo de raíz rizada cuando se crecían en el medio con exceso de manganeso 200 μ M, que no se observó en *Atramp5* ni en WT (Figura 4.89).

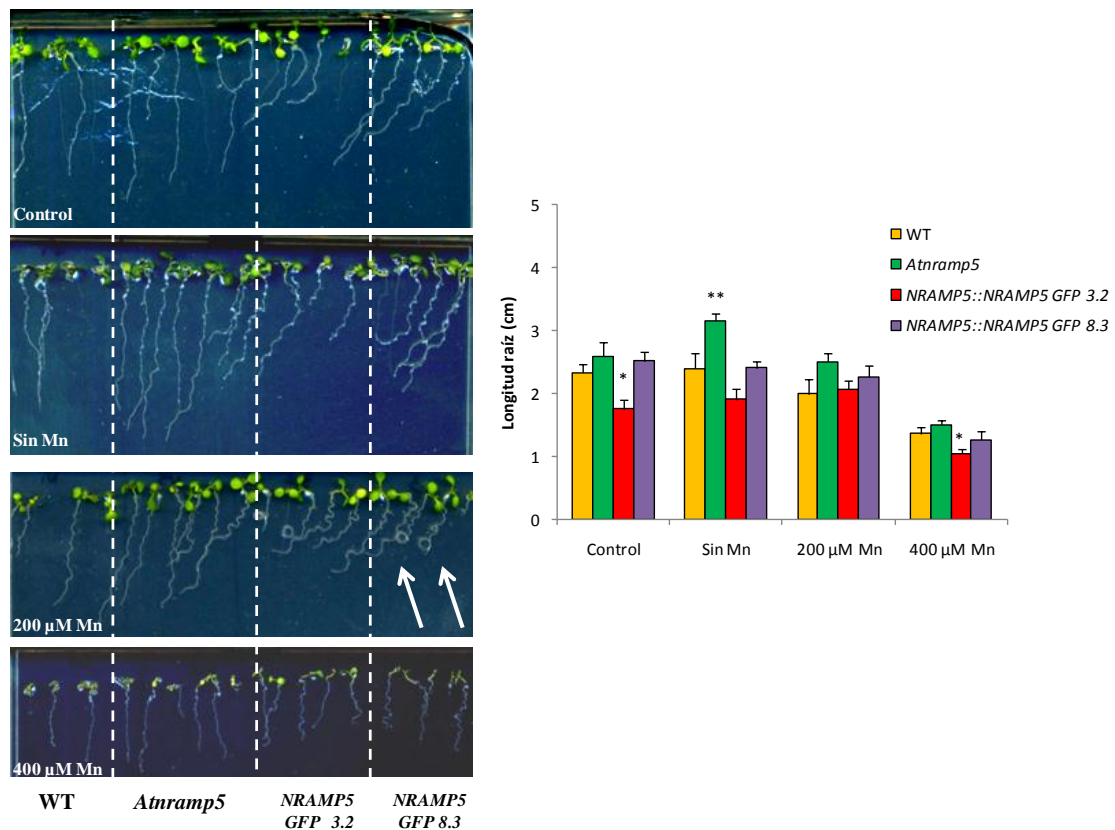


Figura 4.89. Efecto del manganeso en el desarrollo de la raíz de plantas *Atramp5*, *NRAMP5::NRAMP5:GFP* líneas 3.2 y 8.3 y WT tras 10 días de crecimiento en placas con MS conteniendo 0, 200 y 400 μM de Mn. Las flechas indican las raíces rizadas. Los datos representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,001 = ***$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,05 = *$), de acuerdo con la prueba T de Student.

4.6.8.2 Expresión de *NRAMP5* en plántulas

Se determinó el patrón de expresión de *NRAMP5* mediante qRT-PCR, en condiciones similares a las descritas en el apartado 4.6.7.1 en plántulas de WT y *NRAMP5::NRAMP5:GFP* línea 8.3 después de 7 días de crecimiento en placa de cultivo conteniendo diferentes concentraciones de manganeso (Figura 4.90) y se observó una inducción de *NRAMP5* significativo para el medio preparado con exceso de manganeso 200 μM ; en cambio, el *NRAMP5::NRAMP5:GFP* (8.3) presentaba una expresión basal en condiciones control respecto del WT control, que se reducía en el resto de condiciones.

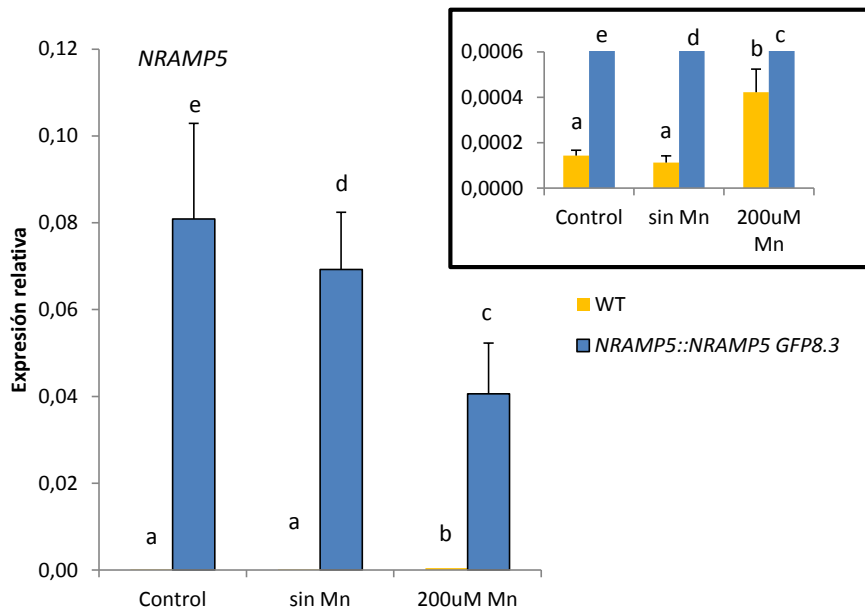


Figura 4.90. Expresión relativa (vs *TUB*) mediante RT-PCR de *NRAMP5* en plántulas de 7 días de WT y *NRAMP5::NRAMP5:GFP* (8.3) crecidas en medios con diferentes concentraciones de Mn. En el recuadro se presenta una ampliación del eje de ordenadas. Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas respecto del WT Control ($P < 0,05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

4.6.9 Estudio de *NRAMP5* en condiciones alteradas de hierro

En este estudio se procedió de la misma manera que en el estudio anterior, comparando la influencia del hierro en el silvestre y en los mutantes del gen de *NRAMP5*, tanto a nivel de fenotipo, como en respuesta a parámetros oxidativos, así como el patrón de expresión de *NRAMP5* en las diferentes concentraciones de hierro y su posible localización.

4.6.9.1 Estudio fenotípico en plántula

En este estudio se comparó la influencia del hierro en el silvestre y en los mutantes del gen de *NRAMP5*. Se estudió tanto la tasa de germinación como de aparición de las hojas verdaderas, el peso fresco de la planta completa así como la longitud de las raíces desarrolladas. Para ello las plántulas se cultivaron durante 7 o 10 días de crecimiento en placas Petri conteniendo el medio Hoagland 0.25x con exceso o ausencia de hierro.

Germinación

En cuanto a los efectos del hierro en la germinación, se pudo observar que el porcentaje de semillas germinadas en el medio sin Fe era ligeramente inferior en el

Atnramp5 que en el silvestre, en cambio se observó un comportamiento igual al del WT tanto en exceso de Fe como en condiciones control. Las líneas sobreexpresoras *NRAMP5::NRAMP5:GFP* 3.2 y 8.3, son las que más tiempo tardaron en germinar tanto en condiciones control como en exceso y ausencia de hierro (Figura 4.91).

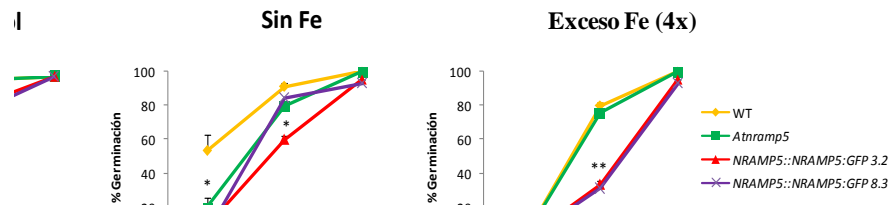


Figura 4.91. Porcentaje de germinación de *Atnramp5* y *NRAMP5::NRAMP5:GFP* líneas 3.2 y 8.3 respecto de WT en medio Hoagland control, exceso de hierro (4x) y ausencia de hierro. Los datos representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al WT ($p < 0,001 = ***$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,05 = *$), de acuerdo con la prueba T de Student.

Hojas verdaderas

La tasa de aparición de las hojas verdaderas en el mutante *Atnramp5* era mayor en condiciones control en los primeros días, lo que indica que las hojas se desarrollan antes que en el WT, en cambio la falta y el exceso de hierro disminuían esta tasa hasta igualarse con el WT. La aparición de hojas verdaderas en las líneas *NRAMP5::NRAMP5:GFP* se retrasaban en todos los medios estudiados (Figura 4.92).

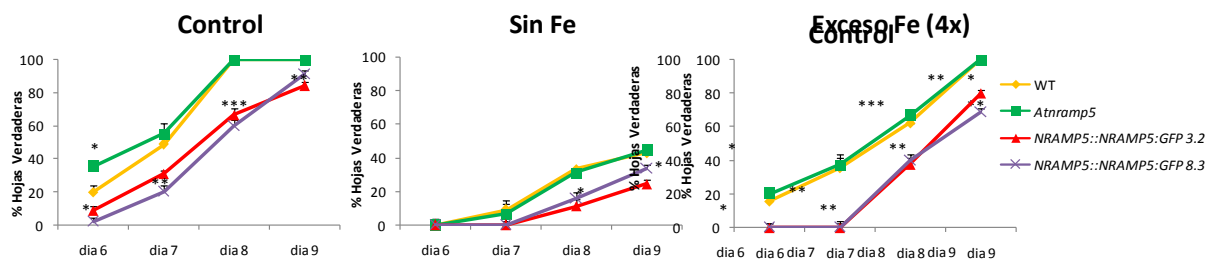


Figura 4.92. Tasa de aparición de hojas verdaderas en plántulas de *Atnramp5* y *NRAMP5::NRAMP5:GFP* líneas 3.2 y 8.3 respecto de WT cultivadas en medio Hoagland control, exceso de hierro 4x y ausencia de hierro. Los datos representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al WT ($p < 0,001 = ***$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,05 = *$), de acuerdo con la prueba T de Student.

Medida de peso fresco

El mutante *Atnramp5* presentó un peso inferior que el WT, tanto en exceso como en ausencia de hierro. Las líneas *NRAMP5::NRAMP5:GFP* presentaron diferencias significativas con respecto al WT, siendo el peso de las plántulas inferior en todos los medios analizados (Figura 4.93).

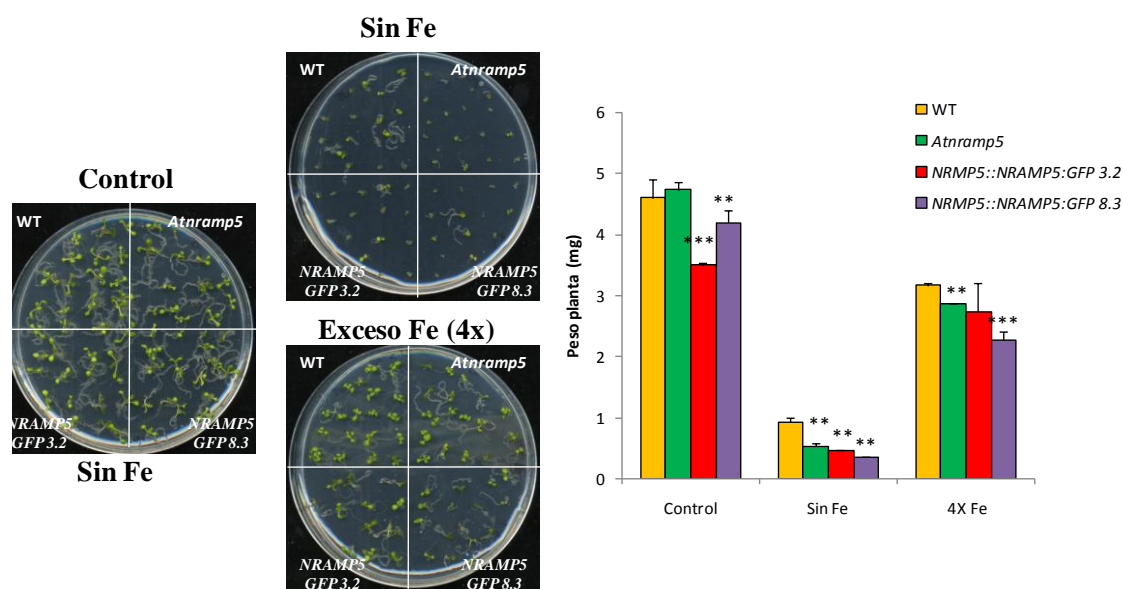


Figura 4.93. Peso fresco de las plántulas de *Atnramp5*, *NRAMP5::NRAMP5:GFP* líneas 3.2 y 8.3 y WT de 10 días de crecimiento en placas de cultivo en medio Hoagland 0.25x control, exceso de hierro (4x) y ausencia de hierro. Los datos representan la media ± error estándar de tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al WT ($p < 0,001 = ***$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,05 = *$), de acuerdo con la prueba T de Student.

Longitud de raíces

Curiosamente, en ausencia de hierro, tanto el mutante *Atnramp5* como las líneas *NRAMP5::NRAMP5:GFP* mostraron una reducción significativa en la longitud de sus raíces con respecto al WT. En el medio con exceso de hierro, el mutante *Atnramp5* no presentó cambios con respecto al WT, en cambio las líneas *NRAMP5::NRAMP5:GFP* mostraron una reducción significativa en la longitud de sus raíces, si bien, el fenotipo no es tan drástico como en ausencia de Fe (Figura 4.94).

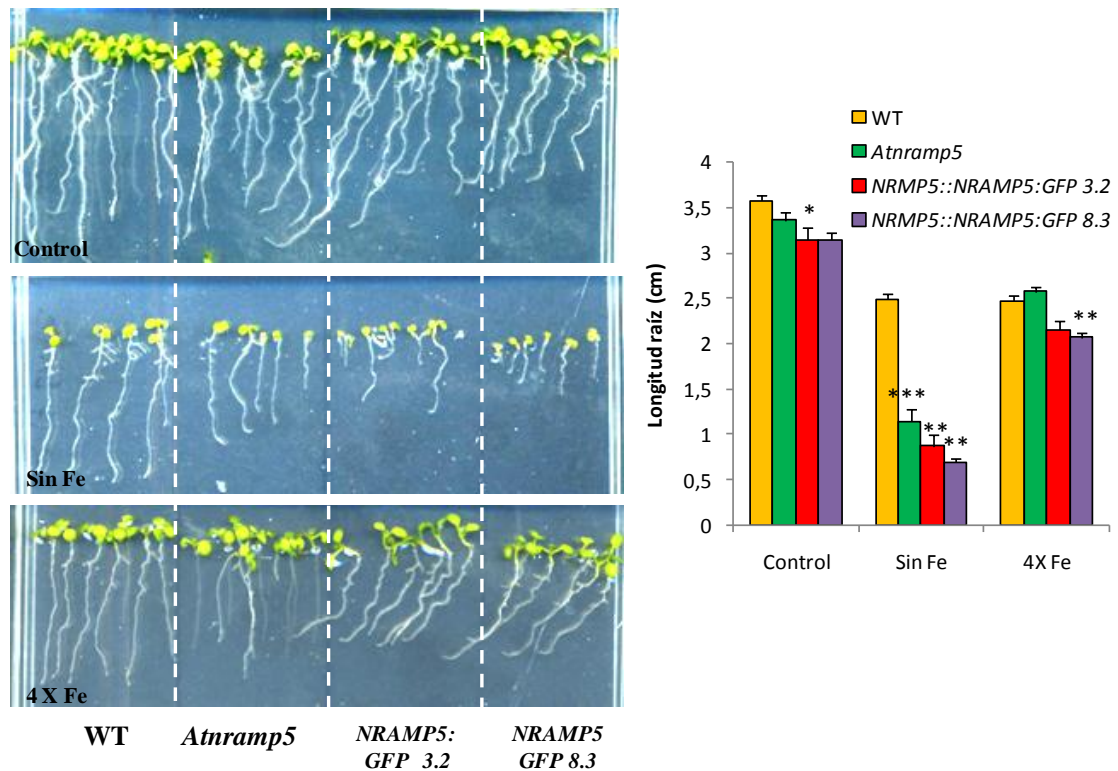


Figura 4.94. Efecto del hierro en el desarrollo de la raíz de plantas *Atnramp5*, *NRAMP5::NRAMP5:GFP*. Efecto del hierro en el desarrollo de la raíz de plantas *Atnramp5*, *NRAMP5::NRAMP5:GFP* líneas 3.2 y 8.3 y WT tras 10 días de crecimiento en placas de cultivo en ausencia de hierro y una concentración elevada de este metal. Los datos representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al WT ($p < 0,001 = ***$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,05 = *$), de acuerdo con la prueba T de Student.

4.6.9.2 Expresión de *NRAMP5* en plántulas

El análisis de la expresión de *NRAMP5* en plántulas de 7 días crecidas con diferentes concentraciones de hierro, mostró una inducción significativa en el WT en ausencia de hierro. En el *NRAMP5::NRAMP5:GFP* 8.3, que ya presenta una expresión basal mayor que el WT, ésta, se reducía en ambos tratamientos (Figura 4.95).

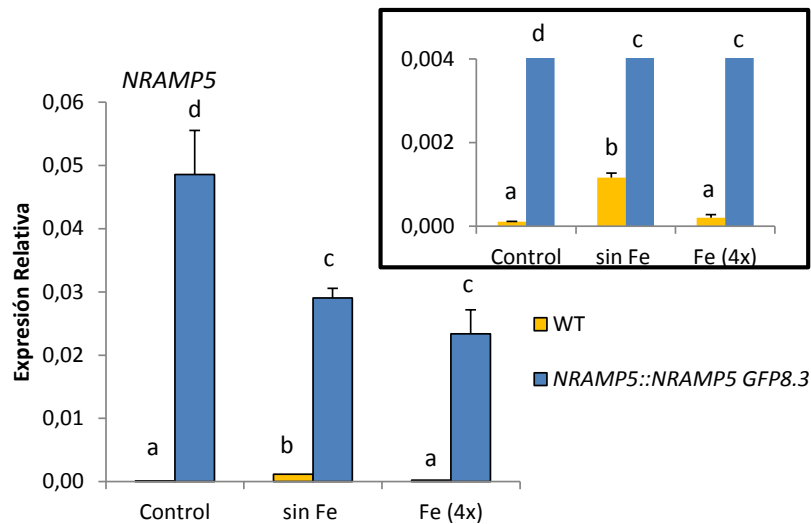


Figura 4.95. Expresión relativa (vs *TUB*) mediante RT-PCR de *NRAMP5* en plántulas de 7 días de WT crecidas en medios con diferentes concentraciones de hierro. En el recuadro se presenta una ampliación del eje de ordenadas. Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas respecto del WT Control ($P < 0,05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan.

4.6.9.3 Detección de acúmulos de hierro mediante tinción Perls

Para localizar y cuantificar la acumulación de hierro en los diferentes tejidos se empleó la tinción Perls (azul de Prusia), esta tinción consiste en la oxidación de la ferrocianida a ferricianida por el Fe, produciendo precipitados de color azul. Inicialmente se llevó a cabo en plántulas de 7 días, donde se localizó en diferentes tejidos y en las vacuolas de los pelos radicales, al igual que la acumulación del cadmio anteriormente estudiada (Figura 4.96).

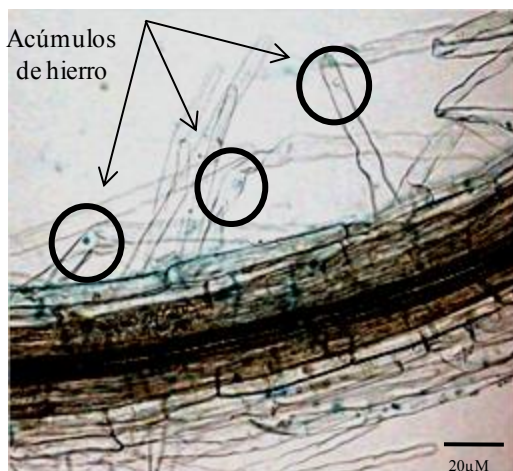


Figura 4.96. Localización de acúmulos de hierro en raíces de plántulas WT de 7 días mediante histoquímica de Perls (precipitado azul). Las flechas indican acúmulos en los pelos radicales.

En plantas adultas crecidas en cultivo hidropónico y con un tratamiento de 1 semana en ausencia de hierro, se observó que la acumulación de hierro en hoja era significativamente inferior en el mutante *Atnramp5*, tanto en condiciones control como en ausencia de hierro (Figura 4.97). En cambio, el mutante *NRAMP5::NRAMP5:GFP 8.3* no presentó diferencias significativas en el medio control aunque si se vio afectado en ausencia de hierro, donde se observó una acumulación inferior en los tejidos de la hoja en comparación con el WT.

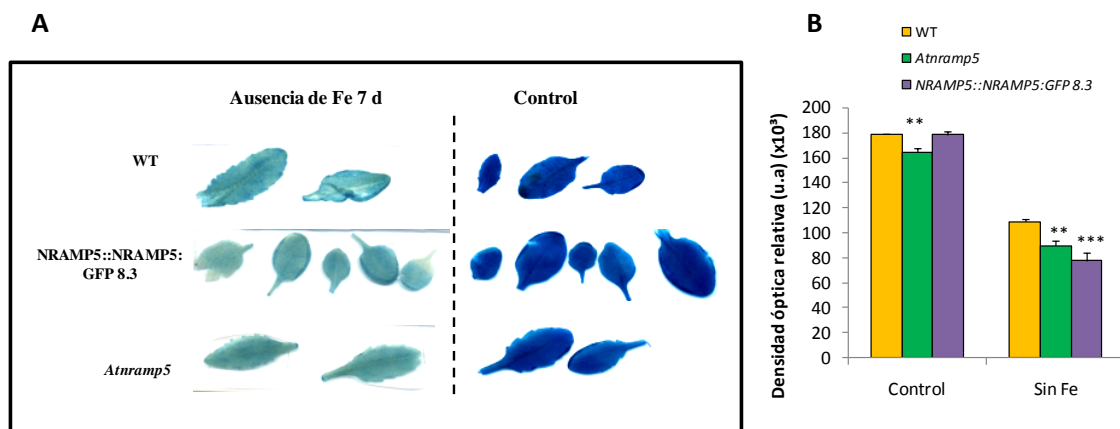


Figura 4.97. Tinción histoquímica de hierro (Perls) en hojas. Acúmulos de hierro en hojas de plantas *Atnramp5*, *NRAMP5::NRAMP5:GFP 8.3* y WT (A) y cuantificación de la densidad óptica relativa de la intensidad de color (B). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al WT ($p < 0,001 = ***$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,05 = *$), de acuerdo con la prueba T de Student.

En raíces también se observaron los precipitados de hierro, más concretamente en el xilema y en el interior de las vesículas de algunos pelos radicales. Se apreció un menor número de acúmulos de hierro en el mutante *Atnramp5*, pero no se observaron diferencias en *NRAMP5::NRAMP5:GFP 8.3* respecto del WT (Figura 4.98).

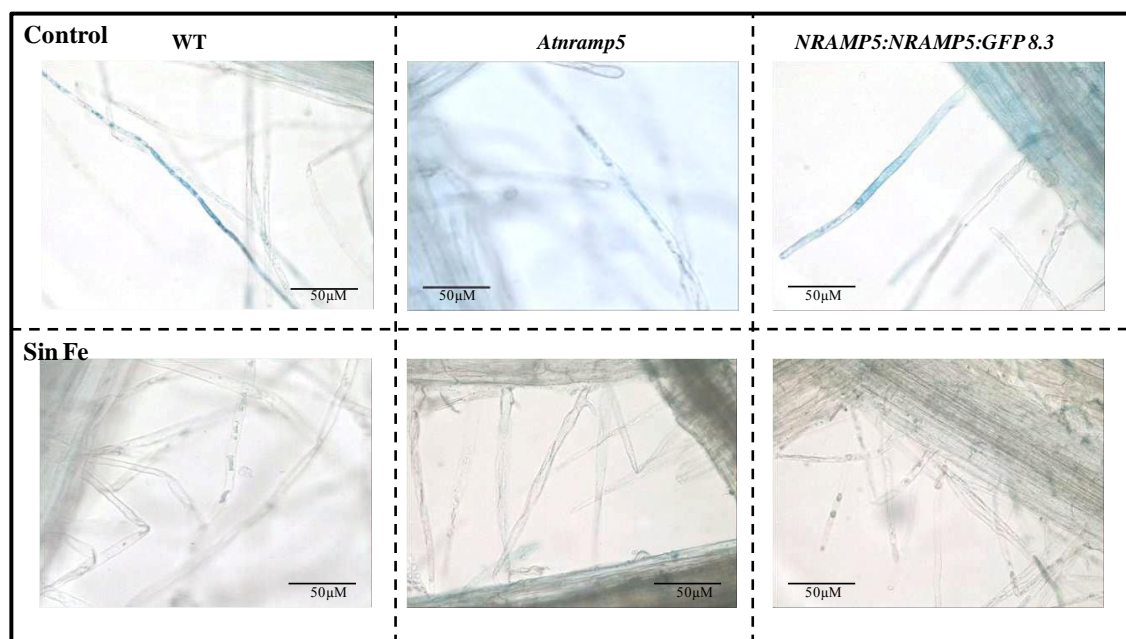


Figura 4.98. Localización de acúmulos de hierro mediante histoquímica de Perls, en el interior de los pelos radicales de las plantas *Atnramp5*, *NRAMP5::NRAMP5:GFP 8.3* y WT crecidas en hidroponía en control y en tratamiento de 1 semana en ausencia de hierro.

4.6.10 Respuesta de *Atnramp5* en suelos enmendados

Se analizaron los parámetros de crecimiento y estrés oxidativo en el mutante *Atnramp5* en un medio preparado a partir del extracto original de la mina de Riotinto y dos medios preparados a partir del suelo original con dos enmiendas. La Enmienda 1: compost y Enmienda 2: cenizas, según se especifica en el apartado 3.2.5 de esta memoria.

Germinación

Prácticamente no se encontraron diferencias en la germinación en los suelos enmendados entre ambas líneas, aunque el mutante *Atnramp5* germinó ligeramente mejor en la enmienda 2, que en la enmienda 1 (Figura 4.99A y B).

Longitud de raíces

Se analizó la longitud de raíces a los 7 días de crecimiento de las plántulas. El mutante *Atnramp5* presentó un desarrollo radicular inferior que el WT en la Enmienda 1, mientras que en la enmienda 2, el crecimiento de la raíz era muy similar al del WT (Figura 4.99C).

Peso fresco

Se analizó el peso fresco de las plántulas de 7 días de crecimiento del mutante *Atnramp5* respecto del WT en los medios de cultivo, tanto con la enmienda 1 como con la enmienda 2. Los resultados obtenidos corroboraron el efecto favorable de la enmienda 2 sobre el mutante, siendo su peso fresco significativamente superior al del WT, mientras que en la enmienda 1 el peso era inferior al del silvestre, aunque las diferencias en este caso no fueron significativas (Figura 4.99D).

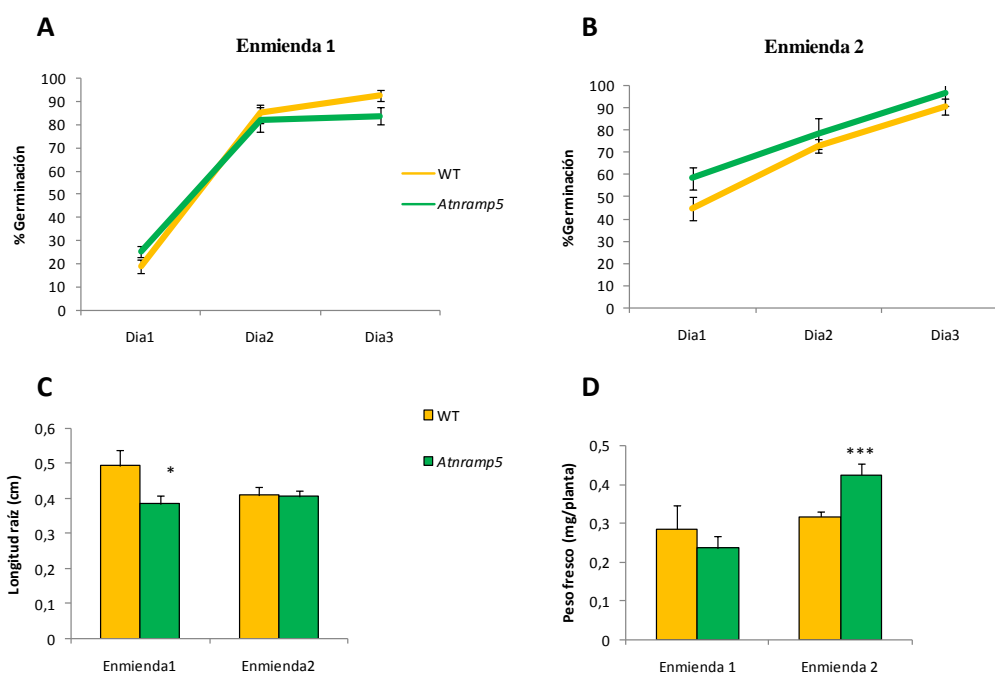


Figura 4.99. Porcentaje de germinación en el medio preparado con la enmienda 1(A), enmienda 2 (B), longitud de raíz (C) y peso fresco (D) de plántulas *Atnramp5* y WT crecidas en placa de cultivo durante 7 días en los diferentes medios. Los datos representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,001 = ***$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,05 = *$), de acuerdo con la prueba T de Student.

5 Discusión

La contaminación por metales pesados debido al desarrollo industrial es uno de los problemas ambientales más graves a los que nos enfrentamos hoy en día. La fitorremediación, puede ser una alternativa sostenible y de bajo coste para la rehabilitación de suelos contaminados. Sin embargo, para el desarrollo de mecanismos eficientes de fitorremediación se requiere un conocimiento más profundo de los genes involucrados en los mecanismos de respuesta a los metales pesados, concretamente los implicados en la tolerancia e hiperacumulación, para así generar plantas que mejoren su capacidad de captación, transporte y acumulación de metales (Cherian y Oliveira, 2005; Pilon-Smits, 2005; Hassan, Z.; Aarts, 2011). La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha en este tema, se han llevado a cabo con un solo gen y con un solo metal, pero en términos de fitorremediación, probablemente sea necesario para una mayor comprensión, un estudio de la tolerancia a una mezcla de metales pesados similares en presencia y concentración a los suelos originales contaminados, lo que implica una estrategia multigénica. Es por ello, que en este trabajo se han utilizado como referencia los suelos de dos zonas mineras, hoy en día abandonadas, de Riotinto (Huelva) y Alquife (Granada), situadas en la región de Andalucía. La acumulación de materiales de desecho, debido al desarrollo de la minería produjo una seria degradación y una pérdida de la cubierta vegetal, por ello, ambos suelos están degradados y son incapaces de sostener la agricultura o la vegetación natural, debido a su bajo contenido en materia orgánica (menos del 1%) y su alto contenido de metales pesados, como el Cd, Cu, Pb, Cr y Ni (Mingorance y col., 2007; Rossini Oliva y col., 2009). Para llevar a cabo la primera parte de este trabajo, se seleccionó un medio que contenía tres metales pesados en base a las concentraciones y condiciones presentes en estos suelos. De los dos suelos analizados se seleccionó finalmente una mezcla de metales basada en el suelo de Alquife en el que el crecimiento de las plantas era más favorable. Para conseguir que las plantas crecieran en estos suelos fue necesario reducir gradualmente la concentración de los metales pesados en los medios utilizados hasta llegar a un medio de cultivo que contenía 50, 50 y 100 μM de Cd, Cu y Cr, respectivamente; o lo que es lo mismo, 100, 50 y 66 % respectivamente del suelo original y con un pH básico (pH 8.0).

Después de la elección del medio se realizó una selección a partir de una colección de 6.867 líneas mutantes homocigotas de *Arabidopsis* con una inserción de T-DNA confirmadas, para llevar a cabo la selección de mutantes con diferente tolerancia a metales pesados. De esta forma, se obtuvieron 74 líneas más resistentes y 46 líneas más sensibles

al medio que el WT. La categorización funcional de estas líneas seleccionadas en nuestro trabajo, ha permitido identificar miembros de diferentes familias de proteínas, incluyendo proteínas relacionadas con el estrés, procesos redox, proteínas reguladoras de, de señalización, enzimas y proteínas relacionadas con la transcripción, etc; lo que sugiere que la resistencia al estrés por metales pesados implica prácticamente todos los procesos fisiológicos en la planta. De hecho, los estudios proteómicos y transcriptómicos realizados en los últimos años tanto a gran como a pequeña escala muestran que los genes implicados en la respuesta a los metales se clasifican en diferentes grupos metabólicos como procesos fotosintéticos, transducción de señales y regulación transcripcional, defensa frente a ROS y reparación de daños oxidativos, transporte de metales, metabolismo de la pared celular etc. (Herbette y col., 2006; Ogawa y col., 2009; Küpper y Yresen, 2016).

5.1 Metabolismo de proteínas y señalización en la tolerancia de plantas a metales pesados

En estas dos categorías encontramos 16 genes asociados al metabolismo general, de los cuales 13 pertenecen a los seleccionados como resistentes que se incluyen más concretamente dentro de las categorías de metabolismo de la pared celular, metabolismo de lípidos, metabolismo de polisacáridos, fermentación, ácidos tricarbónicos (TCA), ascorbato-glutation y metabolismo de aminoácidos. Entre los genes sensibles, 3 están asociados al metabolismo de polisacáridos, al ciclo de la pentosa-fosfato y al metabolismo de lípidos. En la clasificación según la función celular encontramos 101 genes, de los cuales 60 se corresponden con los seleccionados como resistentes y se relacionan con funciones de síntesis de DNA, el transporte de vesículas, el estrés biótico, regulación de la transcripción, síntesis de proteínas, hormonas, desarrollo, regulación, modificación y degradación de proteínas, enzimas, homeostasis redox y transporte. En cambio, los 41 genes sensibles incluidos en esta clasificación, a diferencia de los resistentes, se asocian a funciones de DNA, organización celular, estrés abiótico y síntesis del RNA, entre otros.

Además del control transcripcional, diversos mecanismos post-transcripcionales regulan las respuestas de las plantas al estrés producido por los metales pesados (Smeets y col., 2009). Los procesos de fosforilación / desfosforilación están implicados en la respuesta de las plantas al estrés por metales pesados. Así, la inducción de proteínas quinasas

activadas por mitógenos (MAPK) es un mecanismo común en diferentes especies de plantas y tejidos en respuesta a este estrés por metales (Suzuki y col., 2002a), lo que demuestra que estos mecanismos post-transcripcionales son importantes en los procesos de señalización después del tratamiento con metales que conducen a la supervivencia de la planta o a su muerte. Al menos cuatro de los mutantes seleccionados como sensibles, mostraron alteraciones en las proteínas relacionadas con quinasas y fosfatasas y la degradación vía ubiquitina de proteínas que implica el complejo SCF. Este complejo está formado por el conjunto de proteínas F-BOX que forman la ligasa ubiquitina E3 (E3-SCF-FBOX) que promueve la degradación de sustratos en el proteasoma 26S. Esta actividad parece desempeñar un papel central en la regulación de la señalización y la adaptación de las plantas al estrés (Iglesias y col., 2013). Otras proteínas que regulan la señalización son los factores de transcripción (TFs) de diferentes familias como MYB (proteína de mieloblastosis), DREB (factor de respuesta a la deshidratación), WRKY (que contienen la secuencia aminoacídica WRKYGQK), bZip (cremalleras de leucina), ERF (factores de respuesta a etileno) y AP2 (subfamilia de los ERF), que se inducen por el estrés producido por metales pesados (Weber y col., 2004). Un estudio llevado a cabo en tomate reveló que la regulación de la homeostasis redox mediada por el glutatión proporcionaba tolerancia al estrés por cadmio al inducir factores de transcripción tales como ERF1, ERF2 y MYB1 y R2R3-MYB (Hasan y col., 2016). Otro estudio llevado a cabo en *Limonium bicolor* sugería que el factor de transcripción LbDREB podría aumentar la tolerancia al cobre mediante la regulación de una serie de genes relacionados con el estrés, incluyendo la superóxido dismutasa (Cu,Zn-SOD), las peroxidasas o las proteínas de transferencia lipídica (Ban y col., 2011). En *Tamarix hispida* la sobreexpresión de la subunidad c de V-ATPasa (ThVHAc1), regulada por un factor de transcripción tipo WRKY, mejoraba la tolerancia al Cd (Yang y col., 2016). En nuestro estudio se encontraron 14 mutantes con una inserción de T-DNA en un factor de transcripción que presentaban una tolerancia diferente en comparación con las plantas WT. Es especialmente relevante la familia MYB en los mutantes seleccionados como resistentes, ya que un tercio de estos mutantes pertenecían a esta familia. En un estudio en *Arabidopsis*, los genes que codificaban factores de transcripción MYB se encontraban inhibidos y esto confería una tolerancia al estrés por As (Fu y col., 2014).

5.2 Proteínas relacionadas con el transporte en la tolerancia a metales pesados: *HPP9* y *ALA4*.

La categoría de transporte estaba más representada en los mutantes resistentes (7%) con respecto a los sensibles (4%). Hay que destacar que el efecto del metal pesado y la respuesta de la planta están en gran medida relacionados con las proteínas transportadoras, ya que los metales pesados utilizan estas proteínas como canales de entrada en la planta. Las células vegetales contienen un gran número de proteínas transportadoras que se expresan diferencialmente dependiendo de las circunstancias y el tipo celular (Fuji y col., 2009). Además, se ha demostrado que dependiendo de las condiciones ambientales, la distribución intracelular de algunos transportadores puede variar estando altamente regulada, no sólo a nivel transcripcional, sino también mediante mecanismos reguladores postraduccionales para mantener la homeostasis de los nutrientes (Fuji y col., 2009). Esta complejidad demuestra la capacidad de las plantas para regular rigurosamente el nivel de transportadores de iones, especialmente en un ambiente contaminado con metales pesados que utilizan transportadores de cationes y de macronutrientes para entrar en la planta, afectando así la absorción y distribución de los nutrientes en las mismas (Clemens, 2006). Como se ha mencionado anteriormente, el 10% de los mutantes encontrados con una sensibilidad diferente a los metales pesados estaban relacionados con el transporte. Entre estos mutantes se han seleccionado dos proteínas relacionadas con el transporte: la proteína *HPP9*, de tipo metalochaperona y la proteína *ALA4*, que es una bomba de iones ATPasa de tipo P (Abreu-Neto y col., 2013; Axelsen y Palmgren, 2001). Ambos transportadores fueron estudiados en mayor profundidad para descifrar su posible función en la respuesta de la planta al estrés por metales pesados. La capacidad de transporte de estas bombas no se ha caracterizado pero es interesante que en levaduras deficientes en el gen *DRS2*, que codifica un miembro de un subgrupo de ATPasa tipo P muestra sensibilidad a Zn^{2+} y Co^{2+} (Siegmund y col., 1998).

Es escaso el conocimiento sobre la familia de metalochaperonas *HPP*, incluyendo *HPP9* que forma parte del grupo VII, cuyos siete miembros se encuentran dentro de un tándem en el cromosoma 5 (Tehseen y col., 2010).

Como indicadores de tolerancia a metales se han estudiado parámetros asociados al crecimiento radicular (Prasad y col., 1994; Peralta y col., 2001), el estrés oxidativo y el contenido de nutrientes (Ortega-Villasante y col., 2007; Yadav, 2010). En varios estudios llevados a cabo en diferentes especies de plantas como soja, álamo, sauce, pimiento o guisante se ha utilizado el desarrollo de la raíz y de la parte aérea como indicadores de la tolerancia a Cd en plantas adultas (Sandalio y col., 2001; Nihei y col., 2005; Dos Santos Utmazian y col., 2007; Shiyab y col., 2009) y se han descrito correlaciones entre el desarrollo de la parte aérea y la tolerancia a metales (Cd, Cu) (Hakmaoui y col., 2012; Sabreen y Sugiyama, 2008; León y col., 2002). Nuestros resultados en planta adulta, mostraron la inducción de *HPP9* en respuesta a la mezcla de metales pesados y a Cd solo en las raíces a tiempos cortos, lo que sugeriría un papel importante de esta proteína en la respuesta temprana de la planta al estrés. Además, la translocación de metales desde las raíces a las hojas se vio alterada en los mutantes, por lo que *HPP9* podría estar implicado en este transporte, no solo de Cd, Cr y Cu, sino afectando también la translocación de Fe y Zn, tanto en condiciones control como en el estrés producido por la mezcla de metales. La translocación de macronutrientes también se alteró en este mutante, puesto que la translocación de P fue menor en condiciones control y la de Mg fue mayor que en el WT. Sin embargo, serían necesarios análisis adicionales para determinar la especificidad de la proteína *HPP9*.

Parte de la toxicidad por metales pesados se debe al estrés oxidativo que provoca daños a membranas, proteínas y ácidos nucleicos (Sandalio y col.; 2009), controlar estos daños es un factor determinante en la tolerancia de las plantas a los metales pesados (Demidchik y col., 1997). Curiosamente la producción de H_2O_2 en el mutante *Athpp9* fue inferior que la del WT y la actividad catalasa era superior a las 24 h en respuesta a los metales, aunque se reducía a las 48 h. La reducción de la translocación de los metales pesados en los mutantes *Athpp9* en comparación con las plantas WT podría ser una de las razones para aumentar la resistencia al estrés por metales ya que los tejidos fotosintéticos son más susceptibles a la toxicidad por metales (Kabata-Pendias, 2011). La limitación de la acumulación de metales en la parte aérea justificaría además la reducción de daños oxidativos en estos tejidos y el fenotipo asociado a este mutante.

La proteína ALA4 es una bomba de iones ATPasa de tipo P, perteneciente a una familia de bombas de membrana que impulsan la translocación de sustratos dependiente

de ATP, fosforilándose durante el proceso de transporte. En este estudio, hemos demostrado que el mutante *Atala4* era más sensible que las plantas WT al estrés por metales pesados y que tanto el tratamiento con Cd como con la mezcla de metales inducía significativamente la expresión de *ALA4* en hoja después de 24 h de ambos tratamientos. Aunque se ha propuesto que *ALA4* puede estar involucrado en el transporte de fosfolípidos (Axelsen y Palmgren, 1998), nuestros resultados sugieren que esta proteína puede estar involucrada directa o indirectamente en el transporte o translocación de metales pesados. De hecho, el mutante *Atala4* acumulaba más metales pesados que el WT, no sólo en las raíces, sino principalmente en las hojas. El comportamiento en términos de estrés oxidativo fue muy similar al *Athpp9*, con una menor producción de H₂O₂ en respuesta a los metales con respecto al WT, lo que sugeriría que no es la alteración del metabolismo oxidativo el factor responsable de su mayor sensibilidad y posiblemente sí su mayor acumulación de metales pesados en la parte aérea. También estaba afectada la captación y translocación de Fe y Mn en este mutante y al igual que para HPP9 serían necesarios análisis adicionales del transportador *ALA4* para determinar su especificidad y localización, que ayudaría a entender su función en la respuesta de la planta a los metales pesados.

La aplicación de enmiendas en los suelos contaminados es un paso necesario para mejorar sus condiciones físico-químicas, lo que conduce a un aumento en la germinación y crecimiento de las plantas, ya que las semillas rara vez germinan en el suelo original contaminado (Sevilla-Perea y col, 2016). Se analizaron los parámetros de crecimiento y de estrés oxidativo en plantas crecidas con los metales en presencia de extractos de suelos contaminados modificados con las enmiendas para verificar la validez de la selección de mutantes realizada y para analizar el posible empleo de los mismos en los suelos originales. La validación de los resultados en los suelos originales constituiría la confirmación definitiva de la tolerancia de los mutantes seleccionados. El extracto del suelo se modificó con dos enmiendas anteriormente utilizadas para los suelos de Riotinto (Sevilla-Perea y Mingorance, 2015; Sevilla-Perea y col., 2016). Estas enmiendas estaban preparadas a base de compost de lodos de aguas residuales urbanas (SVC, enmienda 1) y de las cenizas de la combustión de biomasa (BA, enmienda 2). Ambas pueden afectar al pH, la conductividad eléctrica (CE) y la capacidad de extracción de elementos tóxicos como Al, Fe, Mn, Cu, Pb, Zn y As, de los suelos contaminados de las aéreas mineras de estudio (Peña y col., 2015). En estudios realizados sobre las características y propiedades

físico-químicas de estos suelos con ambas enmiendas se demostró un aumento significativo del pH y la CE, al tiempo que se redujo la capacidad de extracción de los metales pesados del suelo. Es importante señalar que ambos mutantes analizados en nuestro trabajo conservaron el fenotipo observado en la selección cuando crecían en un extracto de suelo original de la mina de Riotinto tratado con las dos enmiendas. El mutante *Athpp9* mostró un aumento en la tasa de germinación y la longitud de la raíz en comparación con el WT, especialmente con la enmienda 1, mientras que *Atala4* fue más sensible en ambos casos. Además, los parámetros oxidativos analizados en las plantas con la enmienda 1 mostraron que en ambos mutantes se reducía la peroxidación lipídica en consonancia con una menor producción de H₂O₂ observada en respuesta al tratamiento con la mezcla de metales respecto del WT. Estos resultados apoyan los obtenidos en la selección con el medio de la mezcla de metales, por lo que los genes HPP9 y ALA4 podrían ser buenos candidatos para usar en fitorremediación, al influir directamente tanto en la entrada a la planta como en la translocación de la raíz a la parte aérea de los metales pesados.

5.3 Función de los transportadores KUP8 y KUP1 en la resistencia frente a metales pesados

La línea *Atkup8*, que presenta una inserción de T-DNA en el gen *KUP8*, fue seleccionada como resistente frente a la mezcla de metales pesados que se llevó a cabo a partir de la colección de líneas mutantes empleada en este trabajo. Por ello, se caracterizó esta línea en mayor profundidad para determinar su función en respuesta a metales pesados y posible empleo con fines de fitorremediación. La línea *Atkup1*, con una inserción de T-DNA en el gen *KUP1*, que se inducía en la línea *Atkup8* en respuesta a metales, también se caracterizó de forma similar, así como el doble mutante *Atkup8 Atkup1*, si bien éste se obtuvo prácticamente al final del desarrollo de este trabajo.

KUP8 Y KUP1* en plántulas de *Arabidopsis

Los mutantes *Atkup8* (Col-0) se seleccionaron como resistentes a metales por el mayor desarrollo de las raíces en respuesta a la mezcla de metales, con respecto al WT. La familia KUP en *Arabidopsis* es amplia, con 13 genes y según el árbol de homología

de las secuencias aminoacídicas de las diferentes proteínas KUP realizado en este trabajo y en otras publicaciones (Nieves-Cordones y col., 2016a) hay otra proteína con alta homología, la KUP6 y otras dos que también podrían tener una función similar por homología, la KUP2 y la KUP1. A pesar de ello, el fenotipo de crecimiento de raíz observado en el mutante *Atkup8* respecto del WT, representaba uno de los mayores ratios entre los mutantes seleccionados. En el análisis de expresión de los genes de la familia KUP en plántulas WT germinadas y crecidas durante 7d en el medio con la mezcla de metales se observó una inducción no sólo del *KUP8*, sino también del *KUP5*, *KUP6* y *KUP11*, mientras que en el mutante *Atkup8* se indujeron el *KUP9*, *KUP10*, *KUP11* y en mayor medida el *KUP1*, por lo que se decidió analizar también la respuesta del mutante *Atkup1* a los metales y generar una línea doble mutante para determinar si el fenotipo observado en el *Atkup8* era dependiente, al menos en parte, de esta inducción. Los datos disponibles en las bases de datos, demuestran que ambos genes co-expresarían en el xilema y el floema. Sin embargo, no se observaron diferencias de crecimiento en el mutante *Atkup1* con respecto al WT en respuesta a metales pesados. El transportador *KUP1* ha sido previamente caracterizado como un transportador dual, tanto de alta como de baja afinidad de potasio (Kim y col., 1998; Fu y Luan, 1998) y hasta donde conocemos ni este ni ningún otro miembro de la familia KUP ha sido relacionado con el transporte de metales pesados. De hecho, el transportador KUP8 también se ha caracterizado recientemente en respuesta a estrés osmótico, si bien el mutante simple *Atkup8* no presentaba un fenotipo muy fuerte y éste sólo se observó en el triple mutante *Atkup268* (Osakabe y col., 2013), lo que da una idea de la posible redundancia funcional de los transportadores de potasio presentes en la planta.

En respuesta a los metales pesados por separado, fundamentalmente en respuesta a Cd y Cr, el mutante *Atkup8* crecía mejor, mientras que el *Atkup1* se comportaba de manera similar al WT, excepto en el peso de la planta en respuesta a Cr. Curiosamente, el doble mutante *Atkup1kup8* mantenía e incluso incrementaba ligeramente el fenotipo de *Atkup8* en respuesta tanto a la mezcla de metales como al Cd sólo, y en condiciones control era significativamente mayor que el WT. En cultivos de plántulas en medio Hoagland 0,25x (con concentraciones reducidas de nutrientes, incluyendo el Fe) y con niveles alterados de Fe y Mn, el mutante *Atkup1* era bastante más sensible, incluso en las condiciones control. De hecho el fenotipo fue similar tanto en condiciones de falta de hierro como con exceso del mismo, lo que sugiere que no parece ser éste el nutriente determinante del fenotipo. Probablemente el factor limitante sea una baja concentración

de K en el medio ya que, como se ha demostrado anteriormente, KUP1 es un transportador tanto de alta como de baja afinidad de K (Fu y col., 1998), si bien no se le ha atribuido un papel fisiológico concreto (Senn y col., 2001). La localización de ambos transportadores ayudaría a explicar la recuperación del fenotipo de *Atkup1* con el doble *Atkup8 kup1*. Una posible hipótesis podría ser que el KUP1 estuviera implicado en la salida de K desde la vacuola y el KUP8 regulara la entrada del mismo en la vacuola, similar a como sucede con los transportadores NRAMP3, NRAMP4 y VIT1 (“vacuolar iron transporter”; Mary y col., 2015).

***KUP8 Y KUP1* en planta adulta**

En la caracterización realizada en este trabajo en plantas adultas de los mutantes simples *Atkup8*, *Atkup1* y el doble mutante *Atkup8 kup1*, en tierra se observó un incremento del tamaño y número de las hojas tanto en *Atkup8* como en el doble mutante, y en menor medida en el *Atkup1*. Se ha descrito que mutantes afectados en diferentes genes de la familia KUP, el 2, 6 y 8 inducen la expansión celular dirigida por un incremento en el turgor de las células provocado por alteraciones en la salida de K en las mismas (Elumalai y col., 2002; Osakabe y col., 2013), lo que podría explicar el aumento del tamaño de las hojas en los mutantes *Atkup*. Los datos de expresión disponibles en las bases de datos sugieren una expresión de los genes *KUP1* y *KUP8* en los primeros estadios de la silicua. Sin embargo, el fenotipo observado en ambos mutantes era opuesto con una mayor producción de silicuas en el mutante *Atkup8* (que se conservó también en el doble), mientras que en el mutante *Atkup1* había una drástica reducción de las mismas. No obstante, no hemos encontrado datos en la literatura que relacionen la producción de silicuas con una función específica de los transportadores KUP. Si está descrito que los KUP están relacionados con la iniciación de la formación de raíces secundarias y posterior crecimiento, también relacionado con una reducción del turgor de las células y el eflujo de potasio (Sano y col., 2009; Osakabe y col., 2013). La función de KUP8 y KUP1 en cualquier caso parece ser opuesta.

En el cultivo hidropónico en respuesta a la mezcla de metales se observó un menor daño en cuanto a la reducción del crecimiento en los mutantes *Atkup8*, con respecto al WT, mientras que los *Atkup1* se comportaban de forma similar al WT, sobre todo en la parte aérea, aunque en la raíz la reducción de tamaño también era menor. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que los mutantes *Atkup8* eran ya más grandes en condiciones

control, como se ha mencionado anteriormente. Se ha descrito que KUP8 podría inhibir la expansión celular en un mecanismo dependiente de auxinas (Osakabe y col., 2013) y posiblemente, la ausencia de éste podría estar relacionado con la menor reducción del tamaño en las plantas *Atkup8* con respuesta a metales. En general, ni la entrada ni la translocación de metales o macronutrientes ni los parámetros relacionados con el metabolismo oxidativo parecen ser responsables de la mayor resistencia de los mutantes *Atkup8*. Si bien, la translocación de Fe en el *Atkup8* era inferior con respecto al WT en condiciones control, estas diferencias, no obstante, no eran significativas en el tratamiento con metales. Además, el contenido de potasio en la raíz tampoco parece ser una razón, ya que si bien se ve bastante afectado en el tratamiento con metales (reduciéndose unas 10 veces con respecto a las condiciones control), quizás por una menor entrada en la raíz y una mayor translocación a la hoja (ya que ésta se incrementa más de diez veces), los resultados eran similares en WT y el mutante *Atkup8*. En el mutante *Atkup1*, sin embargo, la translocación de K en el tratamiento con metales aumentaba casi dos veces más que en el WT, reduciéndose aún más el contenido de K en la raíz. Sin embargo, sí se observó una regulación diferencial del KUP8 en WT, ya que se inhibía su expresión en la raíz a partir de las 3h de tratamiento con la mezcla de metales, mientras que en la parte aérea se inducía a partir de las 24h de tratamiento. Estos resultados podrían sugerir una función en el almacenamiento subcelular del K en raíz y en la entrada de potasio en la hoja. Se ha descrito recientemente que el KUP podría estar relacionado con la salida de K desde la raíz a la parte aérea (Osakabe y col., 2013). Esta regulación era similar a la observada en el tratamiento con Cd. Por otro lado, la inhibición de la expresión de KUP8 en raíz parece estar regulada por la RBOHD, ya que en este mutante las diferencias observadas en la expresión del KUP8 no eran significativas. No se han encontrado datos en la literatura que relacionen la especies de oxígeno reactivo con los transportadores KUP aunque sí se ha descrito que la activación de KUP6 responde a un mecanismo de señalización en el que están implicados el ABA y la kinasa SnRK2 (Osakabe y col., 2013). Por otro lado, se sabe que cambios en la concentración citosólica de K es un denominador común en respuestas de adaptación a distintos tipos de estrés, que tienen en común la producción de ROS, tales como estrés salino o déficit de nitratos o fosfatos (Shabala y col., 2016). Incluso se ha propuesto que el K podría intervenir en los mecanismos de señalización dependientes de ROS (García-Mata y col., 2010).

En el tratamiento con Cd el fenotipo del mutante *Atkup8* es similar al del tratamiento con metales, la reducción del crecimiento en la parte aérea es menor que en el WT y la raíz no se reduce con el tratamiento. En este caso, la entrada de K no se ve tan reducida como en el tratamiento con la mezcla de metales, y se observaron concentraciones del mismo similares tanto en hoja como en raíz en el mutante con respecto al WT. Por otro lado, también se observó una reducción de la translocación de Fe en el mutante en condiciones control, que se duplicó, sin embargo con el tratamiento. Estos resultados sugieren que la translocación de Fe podría estar relacionada directa o indirectamente con este transportador. Finalmente, parece interesante que en todos los mutantes la actividad CAT esté reducida a las 72 horas de tratamiento con Cd, si bien en el doble mutante prácticamente se triplica a las 24h y a pesar de que no hay cambios globales en la producción de H₂O₂, los daños a membranas observados se redujeron en el doble mutante. Esta es una prueba de la existencia de una relación entre el K y el metabolismo de ROS, si bien los mecanismos que lo regulan no han sido establecidos. Tan solo se ha descrito que en plantas de *Arabidopsis* la inducción del HAK5 en respuesta a niveles bajos de K está regulada por ROS procedentes de RBOHs y etileno (Jung y col., 2009). Aunque no se ha establecido una relación directa con los KUPs, si se ha descrito que la deficiencia de RBOHs C, D o F afecta diferencialmente la incorporación y translocación de K en plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés por As (Gupta y col., 2013) y Cd (Gupta y col., 2017), siendo la RBOHF directamente responsable de la regulación de la translocación del K a la parte aérea (Gupta y col., 2017). Estos resultados sugieren que distintas fuentes de ROS pueden regular a nivel transcripcional o postraduccional la incorporación y translocación de K en plantas.

En las plantas, el potasio se absorbe por la epidermis y los pelos radicales, y después es transportado al xilema a través de numerosas capas de células radiculares para posteriormente, translocarlo hacia el tallo. Este proceso requiere numerosos canales y transportadores de K que hace que haya un flujo de la epidermis al xilema (Han y col., 2016; Nieves-Cordones y col., 2016b). De hecho, la homeostasis del K en las células parece estar controlada por un balance entre la entrada y la salida del mismo que responde a variaciones en la concentración externa (Szczerba y col., 2009) y la entrada y salida depende de un equilibrio bioquímico (Ivashikina y col, 2001), como se ha observado para otros nutrientes (Crawford, 1998; Narang y col, 2000; Segonzac y col., 2007). Probablemente, haya cambios en la homeostasis del K en los mutantes *Atkup8* y *Atkup1*

que no se han podido detectar. Por ello la localización subcelular exacta y la actividad de estos transportadores y otros relacionados con el transporte de K, ayudaría a esclarecer su posible función en la respuesta de la planta al exceso de metales. Otro aspecto a analizar en mayor profundidad sería la posible relación del transportador KUP8 en la reducción del crecimiento celular producido en la planta en respuesta a los metales en el que podría tener una función importante aún por determinar.

5.4 Función del transportador NRAMP5 en la resistencia frente a metales pesados

La línea *Atnramp5*, descrita con una inserción de T-DNA en el gen *NRAMP5*, fue seleccionada como resistente frente a la mezcla de metales pesados realizada en la primera parte de este trabajo. Se analizó su respuesta estudiando diferentes parámetros frente a diferentes metales con el fin de profundizar sobre su posible función transportadora en respuesta a metales y por tanto, su posible uso con fines de fitorremediación.

El mutante se genotipó y no amplificaba la región de unas 1200 pdb donde estaba descrita la localización de la inserción de T-DNA (a unas 150 pdb después del ATG) como corresponde a una línea homocigota. El gen *NRAMP5* en ninguno de los medios en los que lo hemos estudiado se expresa en condiciones normales o de estrés y en nuestras manos no se ha detectado por RT-PCR semicuantitativa o cuantitativa con protocolos al uso, por lo que no se pudo determinar inicialmente de qué forma estaba afectada la presencia de la proteína NRAMP5 en el mutante. A pocas semana de la finalización de esta memoria se recibió un anticuerpo específico frente a la proteína cedido por el Prof. Thomine (CNRS) y se pudo realizar un Western-blot en el que se observó la presencia de la misma en el mutante, lo que llevó a forzar las condiciones de RT-PCR (partiendo de una mayor cantidad de RNA inicial y cDNA) para detectar la expresión del gen. Esto, nos permitió determinar que el mutante sobre-expresa el gen con respecto al WT. Si bien los niveles de expresión son bajos con respecto a la tubulina, estos resultados sugieren que el mutante podría ser un sobre-expresor y no un “knockout” como sería de esperar. Una posibilidad es que la inserción de T-DNA podría estar localizada antes del ATG y no después, como está descrito y estar afectando a alguna región reguladora del gen, que parece ser está reprimido en condiciones normales. Para comprobar esto, se secuenciará la región amplificada desde el cebador del inserto hasta uno de los extremos del gen para

determinar la localización exacta del mismo. Por otro lado, cabe la posibilidad de que el inserto esté localizado donde estaba descrito y que la proteína que se está expresando no sea funcional debido a que la inserción podría afectar a la secuencia de aminoácidos de la proteína por lo que también sería necesario secuenciar el producto completo de PCR en el mutante para comprobar esta posibilidad. No obstante, se ha mantenido el nombre *Atnramp5* para el mutante hasta determinar una posibilidad u otra.

NRAMP5 en plántulas de Arabidopsis

Los mutantes *Atnramp5* (Col-0) mostraron una longitud de raíz mayor con respecto a las plántulas WT después de 7 días de crecimiento en el medio con la mezcla de metales pesados. Si bien, aunque el fenotipo no era muy acusado, sí era significativo. Un fenotipo similar se observó con los metales por separado, especialmente con Cr y Cd. Es de destacar, que la alteración del NRAMP5 de lugar a un fenotipo observable, si tenemos en cuenta la existencia de otros tres genes homólogos de NRAMP, según los datos obtenidos en el árbol de homologías en este trabajo y en estudios anteriores (NRAMP2, NRAMP3 y NRAMP4; Thomine et al., 2000). Este hecho podría sugerir la existencia de una redundancia funcional entre estos genes, especialmente los transportadores NRAMP3 y NRAMP4, que están bien caracterizados como transportadores de Fe, Mn y Cd. De hecho, los mutantes *Atnramp3* presentan también un incremento moderado en la resistencia a Cd, respecto del WT (Thomine et al., 2000), mientras que el fenotipo del doble mutante *Atnramp3 nramp4* es mucho más pronunciado (Agorio et al., 2017). La sobre-expresión de *NRAMP3* con un promotor 35S sin embargo, lleva a una mayor sensibilidad de las plántulas al Cd (Thomine et al., 2000). Hay que tener en cuenta que en el mutante *Atnrmap5* está reducida la expresión de los transportadores *NRAMP3* y *NRAMP4*, al menos en condiciones control.

Debido a que los transportadores caracterizados de la familia NRAMP, tanto en plantas como en otros organismos como levaduras o mamíferos, están relacionados con el transporte de metales esenciales como el Fe o el Mn (Thomine et al., 2000; Cailliatte et al., 2010; Supek et al., 1996; Gunshin et al., 1997; Fleming et al., 1998) y que los resultados de ICP en planta adulta obtenidos en este trabajo mostraban una posible alteración en la translocación de Fe y Mn en el mutante, también estudiamos el fenotipo del mismo en respuesta a diferentes concentraciones de Fe y Mn. El fenotipo con

diferentes concentraciones de Mn o en ausencia de este metal no era muy claro, ya que si bien el peso fresco era mayor en el mutante *Atnramp5* con exceso de Mn, la longitud de la raíz era mayor en ausencia del mismo, con respecto al WT, si bien, las líneas Ws complementadas presentaban un fenotipo similar al WT referido a la longitud de raíz, aunque su peso fresco era inferior al del WT. El incremento de la longitud de la raíz en ausencia de Mn podría ser un mecanismo de respuesta de la planta para incrementar la superficie de absorción de Mn, tal y como se ha descrito en deficiencia de nutrientes en distintas especies vegetales (Giehl y Wiven, 2014). Sin embargo, el fenotipo en respuesta a diferentes concentraciones de Fe parece ser más consistente, ya que tanto la germinación, como la longitud de raíz en el mutante *Atnramp5* eran inferiores en ausencia de Fe, lo que sugiere que este genotipo es más sensible que el WT en estas condiciones. Las líneas que complementan al *Atnramp5* (Ws), se comportaban de manera similar al *Atnramp5* en este caso, si bien ya eran más pequeñas en las condiciones control. Curiosamente, tanto en el medio MS, en el que se ha estudiado el efecto del Mn, como en el medio Hoagland 0,25x (con menos nutrientes), en el que se ha estudiado el efecto del Fe, hemos observado un retraso en la germinación y aparición de hojas verdaderas en las dos líneas que complementan el *Atnramp5* (Ws). Habría que destacar que si bien en estas líneas, el gen introducido está bajo su propio promotor, hemos observado una expresión basal del gen *NRAMP5* incluso en condiciones control, lo que no sucede en el WT en fondo Col-0. Puesto que este gen parece estar muy regulado, ya que se induce sólo en determinadas condiciones, esta expresión basal podría estar afectando al desarrollo de la semilla y primeros estadios de la plántula; aunque no se puede descartar que las diferencias observadas sean debidas al fondo genético de las líneas. Habrá que comprobar si existen diferencias de expresión entre los fondos Ws y Col-0, si bien no se han descrito diferencias de expresión entre los diferentes ecotipos recogidos en el mundo y analizados según la página de la Universidad de Toronto, BAR (<http://bar.utoronto.ca/eplant/>; World eFP Viewer). Inicialmente, en respuesta a la combinación de metales y al Cd solo, no se observaron diferencias de fenotipo entre los fondos Ws y Col-0; sin embargo, estudios posteriores serán necesarios para determinar si también es así en medios con diferentes concentraciones de Fe y Mn. Así como el análisis del mutante *Atnramp5* en fondo Ws.

Un fenotipo similar al de *Atnramp5*, se ha observado en el doble mutante *Atnramp3 nramp4*, con un retraso en el desarrollo de los cotiledones y crecimiento de la raíz en los primeros 4 días de crecimiento, que se recupera a los seis días (Lanquar et al., 2005). De

hecho, se ha demostrado que estos dos transportadores median la movilización de Fe desde la vacuola durante la germinación de la semilla y su función es esencial en los primeros dos días, antes de que se induzca la expresión de IRT1, ya que los mutantes *irt1* sí son capaces de generar los cotiledones aunque presenten un fenotipo clorótico (Vert et al., 2002; Colangelo and Guerinot, 2004). Habría que hacer un estudio más específico con los mutantes *Atnramp5* (Col-0) y las líneas knockout en fondo *Ws* y sus complementadas durante el desarrollo de la semilla, maduración y germinación del embrión de *Arabidopsis* para ver si efectivamente tiene una función importante en estos procesos. Hay que tener en cuenta que en este trabajo no hemos conseguido colonias de *E. coli* que expresen el gen *NRAMP5* sin mutaciones. Datos del laboratorio del Prof. Thomine aportan similares resultados, lo que podría indicar que la expresión de este gen en la bacteria es perjudicial para la misma.

La información disponible en las bases de datos sobre el gen *NRAMP5* (<http://bbc.botany.utoronto.ca/>) reveló que éste se expresaba básicamente en el polen maduro y no se encontró inducción en los diferentes tipos de estrés que se describen. En este trabajo, como se ha descrito anteriormente, no se ha observado expresión en condiciones normales y sólo se ha observado una inducción del gen *NRAMP5* en respuesta a Cd, cuando se ha partido de una mayor cantidad de RNA y cDNA. Además, se observó una inducción del gen en condiciones de falta de hierro y exceso de manganeso. La inducción de *NRAMP5* observada en respuesta a Cd y exceso de Mn podría ser una consecuencia directa o indirecta de la falta de Fe y por tanto, el Fe podría ser el factor principal en la regulación de este transportador, ya que no se observaron cambios por deficiencia de Mn. Otros genes de la familia como el *NRAMP1*, *NRAMP3* y *NRAMP4* se inducen por falta de hierro en el medio (Curie et al., 2000; Thomine et al., 2000; Thomine 2003), mientras que el *NRAMP2* parece que se reprime en estas condiciones (Curie et al., 2000). Además, tanto el *NRAMP3* como el *NRAMP4* se inducen con el tratamiento con Cd y el estrés oxidativo (Molins et al., 2013). Por otro lado, aunque algunos miembros de la familia NRAMP en levaduras, *Clamidomonas* o bacterias se inducen por deficiencia de Mn (Portnoy et al., 2000; Patzer and Hantke, 2001; Allen et al., 2007), en planta adulta no se ha observado un incremento de las proteínas NRAMP3 y NRAMP4 en respuesta a la deficiencia en Mn, aunque parece que participan en la movilización de este elemento desde la vacuola (Lanquar et al., 2010). Por tanto, aunque *NRAMP5* no se induzca por deficiencia de Mn, no podemos descartar que participe en la

movilización de este metal, ya que la translocación del mismo también se ve afectada en planta adulta. Tampoco podemos descartar una regulación postranscripcional de la proteína, como se ha demostrado para otros transportadores (Connolly et al., 2002). *NRAMP1* sin embargo, sí se induce en raíces de plantas crecidas con deficiencia de Mn. De hecho, *NRAMP1* se ha demostrado que es un transportador de alta afinidad de Mn (Cailliatte et al., 2010), aunque también puede transportar Fe (Thomine et al., 2000; Agorio et al., 2017).

En plántulas WT germinadas y crecidas 7d en la mezcla de metales, además del *NRAMP5*, se observó también una inducción del *NRAMP6*. En plantas que sobreexpresan este gen se ha observado una mayor sensibilidad al Cd mientras que el mutante nulo *nramp6* era más tolerante al mismo (Cailliatte et al., 2009). Este transportador podría estar relacionado con la movilización o distribución de Cd dentro de la célula ya que tiene una localización en endo-membranas tipo vesicular (Cailliatte et al., 2009). Los mutantes *nramp6* sin embargo, no presentan un fenotipo diferente al WT en presencia o ausencia de otros metales como Fe, Cu, Mn o Zn. Este resultado, no obstante, no descarta que *NRAMP6* pudiera transportar alguno de estos metales, ya que el transporte de Cd al no ser un metal esencial comparte transportadores con estos metales. La ausencia de fenotipo en el *nramp6* podría estar relacionada con una redundancia funcional y sólo un doble o triple mutante podría dar algún fenotipo observable (Cailliatte et al., 2009). En el *Atnramp5* sin embargo, se observa una inducción del *NRAMP1* y el *NRAMP4*. Esta inducción podría estar relacionada con una mayor deficiencia de Fe y Mn en el mutante en el proceso de germinación y desarrollo en presencia de altas concentraciones de metales pesados, ya que como se ha mencionado anteriormente, el *NRAMP1* es un transportador de alta afinidad de Mn y también puede transportar Fe (Cailliatte et al., 2010), y el *NRAMP4* es un transportador que moviliza Fe desde la vacuola, y en menor medida, Mn (Lanquar et al., 2005). Curiosamente, en el mutante *Atnramp5* se observó una reducción en la expresión de todos los miembros de la familia *NRAMP* respecto del WT en condiciones normales, especialmente de *NRAMP3* y *NRAMP4*, a excepción del *NRAMP6*, según el análisis de RT-PCR cuantitativa. Estos datos sugieren que el *NRAMP5*, directa o indirectamente, regula la expresión de estos transportadores, que a su vez controlan la salida de Fe fundamentalmente desde la vacuola. Este resultado podría sugerir la existencia de una coordinación en la regulación de estos transportadores (*NRAMP3*, *NARMP4* y *NRAMP5*) y de hecho, parte del

fenotipo observado en el mutante *Atnramp5* podría deberse a esta regulación de *NRAMP3* y *NRAMP4*. Se ha descrito que la ausencia de dos transportadores relacionados con la salida de Fe del cloroplasto (“Yellow Stripe Like”) YSL4 y YSL6, inhiben significativamente la expresión de *NRAMP3* y *NRAMP4* en *Arabidopsis*, aunque se desconoce el mecanismo de regulación (Divol et al., 2013).

NRAMP5 en planta adulta

Las plantas adultas del mutante *Atnramp5* independientemente del medio en el que se cultiven son ligeramente más grandes que las plantas WT. Son escasos los datos disponibles sobre el fenotipo en planta adulta de los mutantes de la familia NRAMP pero en condiciones normales de crecimiento, tanto el doble mutante *Atnramp3 nramp4* como los simples *Atnramp6* y *Atnramp1* se comportan de manera similar al WT (Lanquar et al., 2010; Cailliate et al., 2009; Cailliate et al., 2010). Cabe destacar el mayor número de silicuas observado en el mutante *Atnramp5*, que podría estar relacionado con la localización de este transportador en polen, según las bases de datos consultadas. Sin embargo, la fertilidad de las semillas no ha sido estudiada.

En lo que respecta al peso fresco, el mutante *Atnramp5* parece ser más sensible al tratamiento con metales en cultivo hidropónico, sobre todo la parte aérea. La inhibición del crecimiento de la raíz es uno de los primeros síntomas de la fitotoxicidad de los metales pesados, y en particular del Cd (Schutzendubel et al. 2001; Sandalio et al. 2001; Gallego et al. 2012). Si bien tratamientos de un día con Cd no producen esta reducción tan patente, como ya se ha observado anteriormente en cultivo hidropónico de plantas de *Arabidopsis* (Gupta et al., 2017). Sin embargo, los efectos de la mezcla de metales son más acusados acelerando la reducción del crecimiento, tanto en parte aérea como en raíces. Este efecto tóxico de los metales está asociado a estrés oxidativo, como se observa por el incremento del contenido de H₂O₂ a partir de las 24 h de tratamiento con Cd o mezcla de metales. No obstante, los daños a membrana, medidos como peroxidación lipídica se observan ya desde el primer día en respuesta a Cd y en la respuesta a la mezcla de metales no se observa hasta las 48h de tratamiento. En todos los casos sin embargo, el daño oxidativo a membranas en el mutante era ligeramente inferior que en el WT. En plántulas del doble mutante *Atnramp3 nramp4*, se ha descrito que después de una semana de tratamiento el cloroplasto parece ser el principal orgánulo afectado en el estrés por Cd,

lo que sugiere que el almacenamiento de metales en la vacuola puede ser esencial para mantener la función fotosintética, especialmente en el estrés por Cd (Molins et al., 2013).

En relación a la fuente de ROS implicada en el estrés oxidativo inducido por metales, las NADPH oxidasas (RBOHs) se han descrito como una de las principales fuentes de ROS en respuesta a metales ya que se inducen con el tratamiento de distintos metales (Remans et al., 2010; Gupta et al., 2017) siendo la RBOH C la que más contribuye a la producción de H₂O₂ en respuesta a Cd (Gupta et al., 2017). Otras fuentes de ROS relacionadas con el estrés de metales son la glicolato oxidasa peroxisomal (GOX) cuya actividad se incrementa en respuesta a Cd en diferentes especies como guisante, soja o *Arabidopsis* (Romero-Puertas et al. 2012; Pérez-Chaca et al., 2014; Gupta et al., 2017) y la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Heyno et al. 2008; Keunen et al. 2015). En este estudio se observó un incremento de la actividad GOX a las 48 h en ambos tratamientos en el WT. Una respuesta similar se observó en el mutante *Atnramp5* con la mezcla de metales, si bien, en respuesta a Cd este incremento de GOX era significativamente inferior que en el WT. La correlación observada entre la producción de H₂O₂ y la actividad GOX sugieren que la GOX podría ser una fuente importante de H₂O₂, sobre todo a tiempos largos, en ambos genotipos en respuesta a la mezcla de metales, sin embargo, en plantas *Atnramp5* tratadas con Cd no se observaron cambios ni en el acúmulo de H₂O₂ ni en la actividad GOX. Una de las principales enzimas que regulan la concentración de H₂O₂ es la catalasa (CAT), más relacionada con la desintoxicación que con la señalización, ya que presenta baja afinidad por el H₂O₂. En este trabajo se observó en el WT un incremento de esta actividad a las 48 h coincidiendo con el incremento de H₂O₂ probablemente como defensa frente al metal, tal y como se ha descrito por otros autores (Gupta et al., 2017). Sin embargo, el *Atnramp5* muestra menor actividad CAT con respecto al WT en prácticamente todas las condiciones analizadas. En los doble mutantes *Atnramp3 nramp4* se ha observado también una reducción de la actividad CAT con respecto al WT, en la parte aérea de plántulas en condiciones control, y esta reducción era aún mayor en respuesta al Cd (Molins et al., 2012). Además, mientras que la actividad CAT en raíces de plántulas *nramp3 nramp4* en condiciones control es similar al WT, en presencia de Cd, la actividad se reducía sólo en el doble mutante (Molins et al., 2012). Estos cambios, sin embargo, no se observan en el mutante *cad3-1*, que también es sensible a Cd ya que no produce la fitoquelatina sintasa 1 (PC1) pero no

está relacionado con la movilización de metales (Molins et al., 2012). En nuestras condiciones, se analizó la expresión de *CAT2* que codifica la proteína más abundante y se observó una represión inicial del gen a las 24h y una inducción posterior a los 5d en el WT, mientras que en el mutante ocurría lo contrario, se inducía a las 24h-48h y a los 5d de tratamiento se reprimía. Los cambios observados en la actividad y expresión de la CAT, no obstante no se ajustan al contenido de proteína analizado por Western. No obstante, la CAT es una enzima que está regulada post-transcripcionalmente y así, en respuesta a Cd se ha observado que se carbonila y *S*-nitrosila en plantas de guisante, afectando así a la estabilidad de la proteína y a su actividad, respectivamente (Romero-Puertas et al. 2004; Ortega-Galisteo et al. 2012). Además de la regulación postranscripcional, la disminución de la actividad catalasa en el *Atnramp5* podría deberse a la falta de Fe para el grupo hemo. En cualquier caso, el menor daño oxidativo observado en el mutante en el tratamiento con la mezcla de metales podría deberse a la inducción de otras enzimas encargadas de eliminar el exceso de H₂O₂, como la ascorbato peroxidasa y otros sistemas no enzimáticos.

Los mutantes *Atnramp5* no muestran alteraciones significativas ni en el contenido total de metales ni en la translocación de los mismos en los tratamientos analizados, salvo una ligera reducción de la translocación de Cr y Cd en los tratamientos con la mezcla de metales y una ligera inducción de la translocación de Cd en los tratamientos con este metal. De forma similar, en el doble mutante *Atnramp3 nramp4* (Molins et al., 2012) y en el simple *Atnramp6*, tampoco se han observado cambios en el contenido total de Cd con respecto al WT, en planta adulta (Cailliate et al., 2009). Por el contrario, en el mutante *cad1-3*, la translocación del Cd de raíces a la parte aérea, estaba muy reducida (Chen et al., 2006). Estos datos sugieren que más que involucrado en la entrada de estos metales a la planta, el NRAMP5 podría estar implicado en la distribución subcelular de los metales. De hecho la localización subcelular realizada en las plantas *NRAMP5::NRAMP5:GFP* tratadas con Cd durante 24-48h mostró una inducción de la proteína GFP en unas vesículas localizadas en los pelos radicales. El ensayo de inmuno-histoquímica con el anticuerpo α -GFP y un posterior revelado con DAB confirmó esta localización. Es en estas vesículas donde se localizan además acúmulos de Cd (Ditizona) y Fe (Perls), si bien la relevancia de estas acumulaciones en la raíz no ha sido establecida. La localización de los NRAMP en *Arabidopsis* varía dependiendo de su función, en el caso de NRAMP3 y NRAMP4 están localizados en la membrana de la vacuola y están involucrados en la

salida de la misma, de Fe y Mn fundamentalmente (Lanquar et al., 2005); mientras que el NRAMP1 está localizado en la membrana plasmática de los pelos radicales y está relacionado con la entrada de Mn a la raíz (Cailliate et al., 2010). Por otro lado, no se descarta la posible localización del NRAMP5 en otras partes de la planta como el tejido vascular en raíces, ya que si bien se observó una tinción con DAB mayor que el control, en esta zona también las plantas control mostraron alguna señal en este tejido ya que es una zona donde la producción de ROS es alta (Rodríguez-Serrano, 2007) y esto puede dar una señal basal al revelar con DAB. De igual forma, es una zona de alta intensidad de auto-fluorescencia, lo que dificulta determinar si la fluorescencia observada era debida a la proteína GFP o a la propia auto-fluorescencia. Hay que destacar que la localización de estos transportadores es complicada si la señal es muy débil, como se ha demostrado en el mutante *Atnramp1* complementado con su propio promotor y unido a GFP, que no permitió su localización, para ello, se necesitó un sobre-expresor constitutivo que permitió determinar su localización, no sólo en la membrana plasmática sino también en compartimentos trans-Golgi (Agorio et al., 2017). Sin embargo, la sobre-expresión constitutiva bajo un promotor 35S del *NRAMP5* no ha sido posible en este trabajo, como se ha mencionado anteriormente. Por otro lado, tampoco fue posible la localización de la expresión del gen con las líneas que expresan el promotor del NRAMP5 unidas a GUS.

Hay que destacar, que los mutantes *Atnramp5* muestran una reducción de alrededor del 50% en la translocación de Fe, y en menor medida de Mn, tanto para condiciones control como en la mezcla de metales. Estos resultados sugieren que este transportador podría estar involucrado en la translocación principalmente de Fe, bien de forma indirecta a través de algún otro transportador, bien de forma directa, aunque como se ha mencionado anteriormente en este trabajo no se ha podido determinar concluyentemente la localización del mismo en haces vasculares. Esta relación del NRAMP5 con la translocación de Fe estaría apoyada por la inducción observada en raíces de plantas WT en respuesta a Cd, a las 24 y 48h. Ya se ha descrito que los principales genes relacionados con la entrada de Fe en la planta, como son el transportador *IRT1*, parcialmente responsable de la entrada de Cd a la raíz (Clemens, 2006), la reductasa férrica *FRO2* y el factor de transcripción *FIT1* se inhiben en respuesta a Cd, posiblemente para evitar la acumulación de metales a concentraciones tóxicas (Connolly et al., 2002, 2003; Besson-Bard et al., 2009) y esto conlleva una reducción en la entrada de Fe en la planta, como se ha observado en este trabajo y en trabajos anteriores (Besson-Bard et al., 2009). También

se ha observado la inducción de *NRAMP3* y *NRAMP4* en condiciones de falta de Fe, posiblemente para inducir la movilización de este metal en estas condiciones (Thomine et al., 2000; 2003) y la sobre-expresión de *NRAMP3* inhibe la expresión del principal transportador de hierro *IRT1* y *FRO2*, lo que sugiere una interrelación entre los distintos transportadores relacionados con la entrada y distribución de Fe (Thomine et al., 2003). En respuesta a Cd la translocación de Fe en el mutante *Atnramp5* es mayor que en el WT, mientras que en condiciones control está reducida al 50%. Sería interesante analizar la expresión de los transportadores *NRAMP3* y *NRAMP4* para ver si son los responsables de este aumento en el mutante *Atnramp5*. También sería interesante analizar *OPT3*, que es un componente de la red de señalización de hierro entre las hojas y las raíces que desempeña un papel clave en la regulación de la distribución de Fe, Zn y Cd dentro de la planta (Mendoza-Cózatl et al., 2014). Por otro lado, la entrada de Fe se ve reducida en el mutante de forma similar al WT por lo que parecería que en lo que se refiere a *IRT1* y *FRO2* se comporta de manera similar al WT.

En el tratamiento con la mezcla de metales por el contrario parece haber una activación de la entrada de Fe en las raíces de las plantas, tanto en WT como en el mutante, ya que se observa un incremento de tres veces de hierro en las raíces tratadas con respecto al control. En este caso, la entrada de Cd es mucho menor que con el tratamiento sólo de Cd y de hecho, tanto Cr como Cu entran en mayor cantidad que el Cd en la raíz, por lo que en este caso la regulación de los transportadores de metales podría depender de otros factores más que del Cd y sería interesante ver si en este caso los genes relacionados con el transporte de Fe están activados. En cualquier caso, tanto en condiciones control como en el tratamiento con la mezcla de metales, en el mutante *Atnramp5* se observa una reducción de la translocación de aproximadamente el 50% con respecto al WT y sería interesante analizar otros genes de la familia relacionados con la translocación como *NRAMP3* y *NRAMP4*, para ver la posible implicación de los mismos en la menor translocación existente en el mutante.

Entre los datos obtenidos de macronutrientes, cabe destacar que el contenido total de K era significativamente superior en el mutante *Atnramp5* respecto del WT, al igual que la translocación de K, tanto en condiciones control como con los tratamientos de la mezcla de metales y de Cd sólo. Recientemente se ha descrito la regulación por OH^- de transportadores no selectivos de cationes de Ca^{2+} y K^+ en el ápice de raíces de *Arabidopsis* (Rodrigo-Moreno et al; 2013). El Fe al igual que el Cu y otros metales como el Cr, pueden

promover la producción de $\cdot\text{OH}$ con la intervención del H_2O_2 y el $\text{O}_2\cdot^-$ en reacciones tipo Fenton; de esta forma, la alteración de estos metales en nuestros estudios podría alterar la producción de $\cdot\text{OH}$ y modificar la actividad de estos canales de cationes no específicos alterando la incorporación y translocación de K^+ y Ca^{2+} . En cambio, la translocación de Mg fue significativamente inferior respecto del WT, de forma similar al Mn.

Por lo que respecta al efecto de las enmiendas en el crecimiento de plantas de *Atnramp5*, la enmienda 2, conteniendo cenizas de la combustión de biomasa, tenía un efecto positivo en la germinación y en el crecimiento de la parte aérea en medios a base de extractos de suelo de la mina de Riotinto, mientras que la enmienda 1 tenía efecto negativo. El efecto de la enmienda 2 sobre la germinación podría deberse al incremento del contenido de As en esta enmienda (Sevilla-Perea et al., 2016). Estos resultados contrastan con los obtenidos en los mutantes *Athpp9* y *Atala4*, en los que los mejores resultados se obtuvieron con la enmienda 1. Estos resultados demuestran la necesidad de estudiar enmiendas a utilizar en función del suelo contaminado y de la planta a utilizar con fines de fitorremediación.

6 Conclusiones

1. En esta memoria doctoral se han encontrado 120 mutantes de *Arabidopsis* que tienen afectados genes que podrían tener una función en la resistencia de la planta a un exceso de metales pesados. La clasificación metabólica de estos genes implica prácticamente todos los procesos fisiológicos en la planta, incluyendo proteínas relacionadas con el estrés, procesos redox, proteínas reguladoras, y metabolismo de proteínas.
2. Las proteínas HPP9 y ALA4 parecen estar involucrados en la entrada y translocación de metales pesados a la planta, y los mutantes relacionados conservan su fenotipo en ensayos con un extracto de suelo original enmendado para permitir el crecimiento vegetal, por lo que podrían ser útiles para fitorremediación.
3. El transportador KUP8 no parece afectar directamente a la entrada o translocación de metales pesados en la planta. Si bien, podría estar involucrado en la distribución subcelular de K o bien en la señalización dependiente del estrés por metales que afecta a la reducción de tamaño celular, que le proporciona un fenotipo de resistencia al mutante. El transportador KUP1 en cambio parece estar regulado fundamentalmente en respuesta a condiciones de baja concentración de nutrientes, posiblemente K y podría estar relacionado con su función de transporte de baja afinidad de este nutriente.
4. El transportador NRAMP5 parece estar involucrado en la distribución subcelular de Fe y Mn, bien de forma directa, a través del transporte relacionado con las vesículas/vacuolas de los pelos radicales; o bien de forma indirecta, a través de la posible regulación de otros transportadores como NRAMP3 y NRAMP4. Esta función podría ser importante para el aporte de Fe durante el desarrollo de la semilla, maduración, germinación del embrión y establecimiento de la plántula, especialmente en condiciones de estrés por baja disponibilidad de Fe; mientras que en planta adulta, podría estar relacionado con el suministro de Fe a proteínas que como la catalasa lo necesitan para su funcionalidad.

Bibliografía

- De Abreu-Neto, J.B., Turchetto-Zolet, A.C., de Oliveira, L.F.V., Zanettini, M.H.B., and Margis-Pinheiro, M.** (2013). Heavy metal-associated isoprenylated plant protein (HIPP): characterization of a family of proteins exclusive to plants. *FEBS J.* **280**: 1604–16.
- De Acevedo F** (2003). Toxicología do Mercurio. RiMa. Sao Paulo, Bras.: 292.
- Adriano, D.C** (1986). Trace elements in the terrestrial environments. Springer-Verlag, New York.
- Adriano D.C** (2001). Trace elements in terrestrial environments. Biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. Springer-Verlag, New York.
- Agorio, A., Giraudat, J., Bianchi, M.W., Marion, J., Espagne, C., Castaigns, L., Lelièvre, F., Curie, C., Thomine, S., and Merlot, S.** (2017). Phosphatidylinositol 3-phosphate-binding protein AtPH1 controls the localization of the metal transporter NRAMP1 in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**: E3354–E3363.
- Aguilar, J., Galán, E., Gómez, J.** (2001). Estudio de elementos traza en suelos de Andalucía. Junta de Andalucía.: 154.
- Ahn, S.J., Shin, R., and Schachtman, D.P.** (2004). Expression of KT/KUP genes in Arabidopsis and the role of root hairs in K⁺ uptake. *Plant Physiol.* **134**: 1135–45.
- Van Aken, B.** (2009). Transgenic plants for enhanced phytoremediation of toxic explosives. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**: 231–236.
- Van Aken, B.** (2008). Transgenic plants for phytoremediation: helping nature to clean up environmental pollution. *Trends Biotechnol.* **26**: 225–227.
- Alemán, F., Caballero, F., Ródenas, R., Rivero, R.M., Martínez, V., and Rubio, F.** (2014). The F130S point mutation in the Arabidopsis high-affinity K(+) transporter AtHAK5 increases K(+) over Na(+) and Cs(+) selectivity and confers Na(+) and Cs(+) tolerance to yeast under heterologous expression. *Front. Plant Sci.* **5**: 430.
- Allen, M.D., del Campo, J.A., Kropat, J., and Merchant, S.S.** (2007). FEA1, FEA2, and FRE1, encoding two homologous secreted proteins and a candidate ferrireductase, are expressed coordinately with FOX1 and FTR1 in iron-deficient *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* **6**: 1841–52.
- Alloway, B.J.** (1995). Heavy metals in soils. Chapman & Hall, London.
- Alloway, B.J. and Steinnes, E.** (1999). Anthropogenic Additions of Cadmium to Soils. In *Cadmium in Soils and Plants* (Springer Netherlands: Dordrecht), pp. 97–123.
- Alscher, R.G., Donahue, J.L., and Cramer, C.L.** (1997). Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiol. Plant.* **100**: 224–233.
- Andrés-Colás, N., Sancenón, V., Rodríguez-Navarro, S., Mayo, S., Thiele, D.J., Ecker, J.R., Puig, S., and Peñarubia, L.** (2006). The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. *Plant J.* **45**: 225–236.
- Apel, K. and Hirt, H.** (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 373–399.
- Aravind, P. and Prasad, M.N.V.** (2005). Cadmium-Zinc interactions in a hydroponic system using *Ceratophyllum demersum L.*: adaptive ecophysiology, biochemistry and molecular toxicology. *Braz. J. Plant Physiol.* [online] **vol.17**, : 3–20.
- Arazi, T., Sunkar, R., Kaplan, B., and Fromm, H.** (1999). A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants. *Plant J.* **20**: 171–82.
- Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., and Butler, J.** (1989). The antioxidant action of N-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.* **6**: 593–597.
- Asada, K.** (1984). Chloroplasts: Formation of active oxygen and its scavenging. *Methods and enzymology*, 105C. 422–429.
- Axelsen, K.B. and Palmgren, M.G.** (1998). Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.* **46**: 84–101.
- Axelsen, K.B. and Palmgren, M.G.** (2001). Inventory of the superfamily of P-type ion pumps

in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**: 696–706.

Bailey-Serres, J. and Mittler, R. (2006). The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol.* **141**: 311.

Baird C. (1999). *Environmental Chemistry*. Ed. W.H. Freeman Co.

Baker, A.J.M. and Brooks, R.R. (1989). Terrestrial Higher Plants which Hyperaccumulate Metallic Elements - A Review of their Distribution, Ecology and Phytochemistry. *Biorecovery* **1**: 81–126.

Balestri, M., Ceccarini, A., Forino, L.M.C., Zelko, I., Martinka, M., Lux, A., and Ruffini Castiglione, M. (2014). Cadmium uptake, localization and stress-induced morphogenic response in the fern *Pteris vittata*. *Planta* **239**: 1055–1064.

Ban, Q., Liu, G., and Wang, Y. (2011). A DREB gene from *Limonium bicolor* mediates molecular and physiological responses to copper stress in transgenic tobacco. *J. Plant Physiol.* **168**: 449–458.

Bañuelos, M.A., Garcíadeblas, B., Cubero, B., and Rodríguez-Navarro, A. (2002). Inventory and Functional Characterization of the HAK Potassium Transporters of Rice. *Plant Physiol.* **130**: 784–795.

Bañuelos, M.A., Klein, R.D., Alexander-Bowman, S.J., and Rodríguez-Navarro, A. (1995). A potassium transporter of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* homologous to the Kup system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. *EMBO J.* **14**: 3021–7.

Barceló, J. and Poschenrieder, C. (1990). Plant water relations as affected by heavy metal stress: A review. *J. Plant Nutr.* **13**: 1–37.

Barth, O., Vogt, S., Uhlemann, R., Zschiesche, W., and Humbeck, K. (2009). Stress induced and nuclear localized HIP26 from *Arabidopsis thaliana* interacts via its heavy metal associated domain with the drought stress related zinc finger transcription factor ATHB29. *Plant Mol. Biol.* **69**: 213–226.

Barth, O., Zschiesche, W., Siersleben, S., and Humbeck, K. (2004). Isolation of a novel barley cDNA encoding a nuclear protein involved in stress response and leaf senescence. *Plant Physiol.* **121**: 282–293.

Bassi M, Corradi MG, R.A. (1990). Effects of chromium (VI) on two fresh water plants, *Lemna minor* and *Pistia stratiotes*. *2. Biochemical and*

physiological observations. *Cytobios* **62**: 101–109.

Basta, N.T., Ryan, J.A., and Chaney, R.L. Trace element chemistry in residual-treated soil: key concepts and metal bioavailability. *J. Environ. Qual.* **34**: 49–63.

Baxter, I., Tchieu, J., Sussman, M.R., Boutry, M., Palmgren, M.G., Gribskov, M., Harper, J.F., and Axelsen, K.B. (2003). Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* **132**: 618–28.

Becerra-Castro, C., Kidd, P.S., Rodríguez-Garrido, B., Monterroso, C., Santos-Ucha, P., and Prieto-Fernández, Á. (2013). Phytoremediation of hexachlorocyclohexane (HCH)-contaminated soils using *Cytisus striatus* and bacterial inoculants in soils with distinct organic matter content. *Environ. Pollut.* **178**: 202–210.

Behmer, S.T. and Lloyd, C. M. Raubenheimer, D. Stewart-Clark, J. Knight, J. Leighton, R. S. Harper, F. A. Smith, J.A.C. (2005). Metal hyperaccumulation in plants: mechanisms of defence against insect herbivores. *Funct. Ecol.* **19**: 55–66.

Belouchi, A., Kwan, T., and Gros, P. (1997). Cloning and characterization of the OsNramp family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions. *Plant Mol. Biol.* **33**: 1085–92.

Benavides, M.P., Gallego, S.M., and Tomaro, M.L. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Brazilian J. Plant Physiol.* **17**: 21–34.

Bert V, Meerst P, Saumitou-Laprade P, Salis P, Gruber W, V.N. (2003). Genetic basis of Cd tolerance and hyperaccumulator in *Arabidopsis halleri*. *Plant Soil* **249**: 9–18.

Besson-Bard, A., Gravot, A., Richaud, P., Auroy, P., Duc, C., Gaymard, F., Taconnat, L., Renou, J.-P., Pugin, A., and Wendehenne, D. (2009). Nitric Oxide Contributes to Cadmium Toxicity in *Arabidopsis* by Promoting Cadmium Accumulation in Roots and by Up-Regulating Genes Related to Iron Uptake. *Plant Physiol.* **149**: 1302–1315.

Bienert, G.P., Thorsen, M., Schüssler, M.D., Nilsson, H.R., Wagner, A., Tamás, M.J., and Jahn, T.P. (2008). A subgroup of plant aquaporins facilitate the bi-directional diffusion of As(OH)₃ and Sb(OH)₃ across membranes. *BMC Biol.* **6**: 26.

- Bizily, S.P., Rugh, C.L., and Meagher, R.B.** (2000). Phytodetoxification of hazardous organomercurials by genetically engineered plants. *Nat. Biotechnol.* **18**: 213–217.
- Bizily, S.P., Rugh, C.L., Summers, A.O., and Meagher, R.B.** (1999). Phytoremediation of methylmercury pollution: merB expression in *Arabidopsis thaliana* confers resistance to organomercurials. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 6808–13.
- Blum WH** (1997). Cadmium uptake by higher plants. *Proc. Ext. Abstr. from Fourth Int. Conf. Biogeochem. Trace Elem.*: 109–110.
- Bonomelli, C., Bonilla, C., and Valenzuela, A.** (2003). Efecto de la fertilización fosforada sobre el contenido de cadmio en cuatro suelos de Chile (1). **38**: 1179–1186.
- Bradford MM** (1976). A rapid and sensitive Method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254.
- Buege, J.A. and Aust, S.D.** (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **52**: 302–10.
- Buendía-González, L., Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Barrera-Díaz, C.E., and Vernon-Carter, E.J.** (2010). *Prosopis laevigata* a potential chromium (VI) and cadmium (II) hyperaccumulator desert plant. *Bioresour. Technol.* **101**: 5862–7.
- Buol, S.W., Hole, F.D., and McCracken, R.J.** (1973). Soil genesis and classification (Iowa State University Press).
- Caille, N., Zhao, F.J., and McGrath, S.P.** (2004). Comparison of root absorption, translocation and tolerance of arsenic in the hyperaccumulator *Pteris vittata* and the nonhyperaccumulator *Pteris tremula*. *New Phytol.* **165**: 755–761.
- Cailliatte, R., Lapeyre, B., Briat, J.-F., Mari, S., and Curie, C.** (2009). The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity. *Biochem. J.* **422**: 217–28.
- Cailliatte, R., Schikora, A., Briat, J.F., Mari, S., and Curie, C.** (2010). High-Affinity Manganese Uptake by the Metal Transporter NRAMP1 Is Essential for Arabidopsis Growth in Low Manganese Conditions. *Plant Cell* **22**: 904–917.
- Calvo de Anta, R.** (1997). El conocimiento del suelo como principio básico de la gestión de suelos contaminados. Libro de ponencias. 50 aniversario de la Sociedad Española de la ciencia del suelo.
- Cánovas, D., Vooijs, R., Schat, H., and de Lorenzo, V.** (2004). The role of thiol species in the hypertolerance of *Aspergillus sp.* P37 to arsenic. *J. Biol. Chem.* **279**: 51234–40.
- Carbonell-Barrachina, A.A., Aarabi, M.A., DeLaune, R.D., Gambrell, R.P., and Patrick Jr., W.H.** (1998). The influence of arsenic chemical form and concentration on *Spartina patens* and *Spartina alterniflora* growth and tissue arsenic concentration. *Plant Soil* **198**: 33–43.
- Castrillo, G., Sanchez Bermejo E, de Lorenzo L, Crevillén P, Fraile Escanciano A, Paz Ares J, Leyva A.** (2013). WRKY6 transcription factor restricts arsenate uptake and transposon activation in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 2944–57.
- Catarecha, P., Segura, M.D., Franco-Zorrilla, J.M., García-Ponce, B., Lanza, M., Solano, R., Paz-Ares, J., and Leyva, A.** (2007). A mutant of the Arabidopsis phosphate transporter PHT1;1 displays enhanced arsenic accumulation. *Plant Cell* **19**: 1123–1133.
- Cellier, M., Prive, G., Belouchi, A., Kwan, T., Rodrigues, V., Chia, W., and Gros, P.** (1995). Nramp defines a family of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 10089–10093.
- Chance, B., Sies, H., and Boveris, A.** (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**: 527–605.
- Chandran, D., item Sharopova, N., item Ivashuta, S., item Gantt, J.S., and item Vandenbosch, K.** (2008). Transcriptome profiling identified novel genes associated with aluminum toxicity, resistance and tolerance in *Medicago truncatula*. *Planta* **228**: 151–166.
- Chaney, R.L.** (1984). Diagnostic practices to identify iron deficiency in higher plants. *J. Plant Nutr.* **7**: 47–67.
- Chaney R.L.** (1988). Recent progress and needed research in plant Fe nutrition. *J. Plant Nutr.* **11**: 1598–1603.
- Chen, A.** (2006). An Improved Grafting Technique for Mature Arabidopsis Plants Demonstrates Long-Distance Shoot-to-Root Transport of Phytochelatins in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **141**: 108–120.

- Chen, G., Hu, Q., Luo, L., Yang, T., Zhang, S., Hu, Y., Yu, L., and Xu, G.** (2015). Rice potassium transporter OsHAK1 is essential for maintaining potassium-mediated growth and functions in salt tolerance over low and high potassium concentration ranges. *Plant. Cell Environ.* **38**: 2747–65.
- Chen, Y., Fu, J.-W., Han, Y.-H., Rathinasabapathi, B., and Ma, L.Q.** (2016). High As exposure induced substantial arsenite efflux in As-hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Chemosphere* **144**: 2189–2194.
- Chen, Y., Wang, Y., Wu, W., Lin, Q., and Xue, S.** (2006). Impacts of chelate-assisted phytoremediation on microbial community composition in the rhizosphere of a copper accumulator and non-accumulator. *Sci. Total Environ.* **356**: 247–255.
- Cherian, S. and Oliveira, M.M.** (2005). Transgenic plants in phytoremediation: recent advances and new possibilities. *Environ. Sci. Technol.* **39**: 9377–90.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156–159.
- Chopin, E.I.B. and Alloway, B.J.** (2007). Trace element partitioning and soil particle characterisation around mining and smelting areas at Tharsis, Riotinto and Huelva, SW Spain. *Sci. Total Environ.* **373**: 488–500.
- Choudhury, S., Panda, P., Sahoo, L., and Panda, S.K.** (2013). Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signal. Behav.* **8**: e23681.
- Clabeaux, B.L., Navarro, D.A.G., Aga, D.S., Bisson, M.** (2011). Cd tolerance and accumulation in the aquatic macrophyte, *Chara australis*: potential use for charophytes in phytoremediation. *Environ* **45**: 5332–5338.
- Clemens, S.** (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**: 475–486.
- Clemens, S.** (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* **88**: 1707–1719.
- Clemens, S., Antosiewicz, D.M., Ward, J.M., Schachtman, D.P., and Schroeder, J.I.** (1998). The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 12043–12048.
- Clemens, S., Palmgren, M.G., and Krämer, U.** (2002). A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci.* **7**: 309–15.
- Cobbett, C. and Goldsbrough, P.** (2002). Phytochelatins and metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**: 159–182.
- Cohen, Fox, Garvin, and Kochian** (1998). The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiol.* **116**: 1063–72.
- Colangelo, E.P. and Guerinot, M. Lou** (2004). The Essential Basic Helix-Loop-Helix Protein FIT1 Is Required for the Iron Deficiency Response. *Plant Cell* **16**: 3400–3412.
- Colombo L.D., M.S.B. & F.A.** (1998). Soil profile distribution of heavy metals in soil atended with sewage sludge for eight years. *Agriculture.Med.Inter* **128**: 273–283.
- Connolly, E.L., Campbell, N.H., Grotz, N., Prichard, C.L., and Guerinot, M. Lou** (2003). Overexpression of the FRO2 Ferric Chelate Reductase Confers Tolerance to Growth on Low Iron and Uncovers Posttranscriptional Control. *PLANT Physiol.* **133**: 1102–1110.
- Connolly E.L., Fett JP, G.M.** (2002). Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. - PubMed - NCBI. *Plant Cell* **6**: 1347–1357.
- Corpas, F.J., Palma, J.M., Leterrier, M., del Río, L.A. and Barroso, J.B.** (2010). Nitric oxide and abiotic stress in higher plants A.A. Hayat S, Mori M, Pichtel J, ed (Weinheim, Germany).
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., Carreras, A., Quirós, M., León, A.M., Romero-Puertas, M.C., Esteban, F.J., Valderrama, R., Palma, J.M., Sandalio, L.M., Gómez, M., and del Río, L.A.** (2004). Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiol.* **136**: 2722–33.
- Crawford NM, G.A.** (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci* **3**: 389–395.
- Creissen G, Firmin J, Fryer M, K.K., Leyland N, Reynolds H, Pastori G, W., and F, Baker N, Wellburn A, M.P.** (1999). Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplast of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *Plant Cell* **11**: 1277–

1291.

Cullen, W.R., Reimer, K.J. (1989). Arsenic speciation in the environment. *Chem. Rev.* **89**: 713–764.

Cullen, J.T. and Maldonado, M.T. (2013). Biogeochemistry of cadmium and its release to the environment. *Met. Ions Life Sci.* **11**: 31–62.

Curie, C., Alonso, J., Le Jean, M., Ecker, J., and Briat, J. (2000). Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem. J* **347**: 749–755.

Curie, C. and Briat, J.-F. (2003). Iron transport and signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 183–206.

Curie, C., Cassin, G., Couch, D., Divol, F., Higuchi, K., Le Jean, M., Misson, J., Schikora, A., Czernic, P., and Mari, S. (2009). Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Ann. Bot.* **103**: 1–11.

Cuypers, A., Smeets K, Ruytinx J, Opedenakker K, Keunen E, Remans T, Vangrosbeld J. (2011). The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *J. Plant Physiol.* **168**: 309–16.

Cvjetko, P., Zovko, M., and Balen, B. (2014). Proteomics of heavy metal toxicity in plants. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* **65**: 1–18.

D. E. Salt and G. J. Wagner. (1993). Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a Cd²⁺/H⁺ antiport activity. *The Journal of biological chemistry.* (American Society for Biochemistry and Molecular Biology). **268**.12297-12302.

Danh, L.T., Truong, P., Mammucari, R., and Foster, N. (2014). A Critical Review of the Arsenic Uptake Mechanisms and Phytoremediation Potential of *Pteris vittata*. *Int. J. Phytoremediation* **16**: 429–453.

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

Dębicki, R., Banach, K., and Stepniewska, Z. (2012). Phytoremediation as a promising technology for water and soil purification: *Azolla caroliniana* Willd. As a case study (IA PAN).

Demidchik, V., Sokolik, A., and Yurin, V.

(1997). The Effect of Cu²⁺ on Ion Transport Systems of the Plant Cell Plasmalemma. *Plant Physiol.* **114**: 1313–1325.

Desideri, A. and Falconi, M. (2003). Prokaryotic Cu,Zn superoxide dismutases. *Biochem. Soc. Trans.* **31**.1322-1325.

Dhankher, O.P., Pilon-Smits, E.A, Meagher H, R.B., and Doty, S. (2011). Biotechnological approaches for phytoremediation. *Plant Biotechnol. Agric.*: **2011**: 309–328.

Dhankher, O.P., Li, Y., Rosen, B.P., Shi, J., Salt, D., Senecoff, J.F., Sashti, N.A., and Meagher, R.B. (2002). Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and γ -glutamylcysteine synthetase expression. *Nat. Biotechnol.* **20**: 1140–1145.

Divol, F., Couch, D., Conejero, G., Roschttardt, H., Mari, S., and Curie, C. (2013). The Arabidopsis YELLOW STRIPE LIKE4 and 6 Transporters Control Iron Release from the Chloroplast. doi.org **25**: 1040–1055.

Diwan H, Khan I, Ahmad A, I.M. (2008). Genotypic variation in phytoremediation potential of Indian mustard for chromium. *Env. Manag* **41**: 734–741.

Diwan H, Khan I, Ahmad A, I.M. (2010). Induction of phytochelatins and antioxidant defence system in *Brassica juncea* and *Vigna radiata* in response to chromium treatments. *Plant Growth Regul.* **67**: 97–107.

Doke, N. (1997). The Oxidative Burst: Roles in Signal Transduction and Plant Stress. *Cold Spring Harb. Monogr. Arch.* **34**.

Dubey, S., Shri, M., Misra, P., Lakhwani, D., Bag, S.K., Asif, M.H., Trivedi, P.K., Tripathi, R.D., and Chakrabarty, D. (2014). Heavy metals induce oxidative stress and genome-wide modulation in transcriptome of rice root. *Funct. Integr. Genomics* **14**: 401–417.

Duruibe, J.O., Ogwuegbu, M.O.C., and Ekwurugwu, J.N. (2007). Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *Int J Phys Sci* **2**: 112–118.

Dwivedi, S, TriPathi RD, TriPathi P, Kumar A, Dave R, Dhanker OP, Tuli R. (2010). Arsenate Exposure Affects Amino Acids, Mineral Nutrient Status and Antioxidants in Rice (*Oryza sativa* L.) Genotypes. *Environ. Sci. Technol.* **44**: 9542–9549.

Eapen, S., Singh, S., D'Souza, S.F. (2007).

- Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. *Biotechnol. Adv.* **25**: 442–451.
- Eckhardt U, Marques AM, B.T.** (2001). Two iron-regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants. *Plant Mol. Biol.* **45**: 437–446.
- Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C.** (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* **19**: 1349.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J., and Guerinot, M.L.** (1996). A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 5624–8.
- Eleftheriou, E., Adamakis, I.-D., Panteris, E., and Fatsiou, M.** (2015). Chromium-Induced Ultrastructural Changes and Oxidative Stress in Roots of *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Mol. Sci.* **16**: 15852–15871.
- Elumalai, R.P., Nagpal, P., and Reed, J.W.** (2002). A mutation in the Arabidopsis KT2/KUP2 potassium transporter gene affects shoot cell expansion. *Plant Cell* **14**: 119–31.
- Emsley J** (2011). Nature's building blocks: an AZ guide to the elements.
- Evans, K.M., Gatehouse, J.A., Lindsay, W.P., Shi, J., Tommey, A.M., and Robinson, N.J.** (1992). Expression of the pea metallothionein-like gene PsMTA in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* and analysis of trace metal ion accumulation: implications for PsMTA function. *Plant Mol. Biol.* **20**: 1019–28.
- Farooq, M.A., Islam, F., Ali, B., Najeed, U., Mao, B., Gill, R.A., Yan, G., Siddique, K.H.M., and Zhou, W.** (2016). Arsenic toxicity in plants: Cellular and molecular mechanisms of its transport and metabolism. *Environ. Exp. Bot.* **132**: 42–52.
- Fayiga, A.O. and Saha, U.K.** (2016). Arsenic hyperaccumulating fern: Implications for remediation of arsenic contaminated soils. *Geoderma* **284**: 132–143.
- Fernandes, J.C. and Henriques, F.S.** (1991). Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. *Bot. Rev.* **57**: 246–273.
- Fernando, D.R., Batianoff, G.N., Baker, A.J., and Woodrow, I.E.** (2006). In vivo localization of manganese in the hyperaccumulator *Gossia bidwillii* (Benth.) N. Snow & Guymer (Myrtaceae) by cryo-SEM/EDAX. *Plant. Cell Environ.* **29**: 1012–20.
- Finnegan, P.M. and Chen, W.** (2012). Arsenic toxicity: the effects on plant metabolism. *Front. Physiol.* **3**: 182.
- Fitz, W.J. and Wenzel, W.W.** (2002). Arsenic transformations in the soil-rhizosphere-plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. *J. Biotechnol.* **99**: 259–78.
- Fleming, M.D., Romano, M.A., Su, M.A., Garrick, L.M., Garrick, M.D., and Andrews, N.C.** (1998). Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 1148–53.
- Flores-Cáceres, M.L., Hattab, S., Hattab, S., Boussetta, H., Banni, M., and Hernández, L.E.** (2015). Specific mechanisms of tolerance to copper and cadmium are compromised by a limited concentration of glutathione in alfalfa plants. *Plant Sci.* **233**: 165–173.
- Fox, T.C. and Guerinot, M. Lou** (1998). Molecular biology of cation transport in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 669–696.
- Foyer, C.H. and Halliwell, B.** (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**: 21–25.
- Foyer, C.H. and Noctor, G.** (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell Environ.* **28**: 1056–1071.
- Frausto Da Silva J.J.R and Williams R.J.P** (2001). *The Biological Chemistry of the Elements.* (Clarendon Press: Oxford).
- Fu, H.H. and Luan, S.** (1998). AtKuP1: a dual-affinity K⁺ transporter from Arabidopsis. *Plant Cell* **10**: 63–73.
- Fu, S.-F., Chen, P.-Y., Nguyen, Q.T.T., Huang, L.-Y., Zeng, G.-R., Huang, T.-L., Lin, C.-Y., and Huang, H.-J.** (2014). Transcriptome profiling of genes and pathways associated with arsenic toxicity and tolerance in Arabidopsis. *BMC Plant Biol.* **14**: 94.
- Fuji, K., Miwa, K., and Fujiwara, T.** (2009). The intracellular transport of transporters: membrane trafficking of mineral transporters. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**: 699–704.

- G, Riedel.** (2008). Encyclopaedia of Ecology. Ecotoxicology: Copper. In Elsevier, pp. 778–783.
- Galán, E., Gómez Ariza, J.L., González, I., Fernández-Caliani, J.C., Morales, E., Giradles, I.** (2003). Heavy metal partitioning in river sediments severely polluted by acid mine drainage in the Iberian Pyrite Belt?. Applied Geochemistry. Appl. Geochemistry **18**: 409–421.
- Galán Huertos, E. and Romero Baena, A.** (2008). Contaminación de Suelos por Metales Pesados. Macla **10**: 48–60.
- Gallardo, F., Gómez L, and Cánovas FM** (2006). Árboles transgénicos. Organismos modificados genéticamente E Muñoz. (Editorial Ephemera).
- Gallego, S.M., Pena, L.B., Barcia, R. a., Azpilicueta, C.E., Iannone, M.F., Rosales, E.P., Zawoznik, M.S., Groppa, M.D., and Benavides, M.P.** (2012). Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. Environ. Exp. Bot. **83**: 33–46.
- Gangwar Savita ; Vijay Pratap Singh** (2011). Indole acetic acid differently changes growth and nitrogen metabolism in *Pisum sativum L.* seedlings under chromium (VI) phytotoxicity: Implication of oxidative stress (Elsevier Science Pub. Co).
- Gao, W., Xiao, S., Li, H.-Y., Tsao, S.-W., and Chye, M.-L.** (2009). *Arabidopsis thaliana* acyl-CoA-binding protein ACBP2 interacts with heavy-metal-binding farnesylated protein AtFP6. New Phytol. **181**: 89–102.
- Garcia-Mata, C., Wang, J., Gajdanowicz, P., Gonzalez, W., Hills, A., Donald, N., Riedelsberger, J., Amtmann, A., Dreyer, I., and Blatt, M.R.** (2010). A Minimal Cysteine Motif Required to Activate the SKOR K Channel of Arabidopsis by the Reactive Oxygen Species H₂O₂.
- García I, D.C.** (2005). Tecnología de suelos Universidad de Granada, Departamento de Edafología y Química Agrícola. 2005. Contaminación por metales pesados. Tecnología de Suelos.
- Garnier, L., Simon-plas, F., Thuleau, P., Agnel, J., Blein, J., Ranjeva, R., and Montillet, J.** (2006). Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. Plant, Cell Environ. **29**: 1956–1969.
- Geng, C.-N., Zhu, Y.-G., Tong, Y.-P., Smith, S.E., and Smith, F.A.** (2006). Arsenate (As) uptake by and distribution in two cultivars of winter wheat (*Triticum aestivum L.*). Chemosphere **62**: 608–615.
- Giehl, R.F.H. and Wirén, N. von** (2014). Focus Issue on Roots: Root Nutrient Foraging. Plant Physiol. **166**: 509.
- Gierth, M., Mäser, P., and Schroeder, J.I.** (2005). The potassium transporter AtHAK5 functions in K(+) deprivation-induced high-affinity K(+) uptake and AKT1 K(+) channel contribution to K(+) uptake kinetics in Arabidopsis roots. Plant Physiol. **137**: 1105–14.
- Gill, S.S. and Tuteja, N.** (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol. Biochem. **48**: 909–930.
- Göhre, V. and Paszkowski, U.** (2006). Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. Planta **223**: 1115–1122.
- Gomès, E., Jakobsen, M.K., Axelsen, K.B., Geisler, M., and Palmgren, M.G.** (2000). Chilling tolerance in Arabidopsis involves ALA1, a member of a new family of putative aminophospholipid translocases. Plant Cell **12**: 2441–2454.
- Gong, J.-M., Lee, D.A., and Schroeder, J.I.** (2003). Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatin and cadmium in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. **100**: 10118–10123.
- Grabov, A.** (2007). Plant KT/KUP/HAK potassium transporters: single family - multiple functions. Ann. Bot. **99**: 1035–41.
- Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Gueriot, M.L., and Eide, D.** (1998). Identification of a family of zinc transporter genes from Arabidopsis that respond to zinc deficiency. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **95**: 7220–4.
- Grun, S., Lindermayr, C., Sell, S., and Durner, J.** (2006). Nitric oxide and gene regulation in plants. J. Exp. Bot. **57**: 507–516.
- Gueriot, M.L.** (2000). The ZIP family of metal transporters. Biochim. Biophys. Acta **1465**: 190–8.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L., and Hediger, M.A.** (1997). Cloning and characterization of a

- mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **388**: 482–488.
- Gupta, D.K., Inouhe, M., Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., and Sandalio, L.M.** (2013). Oxidative stress and arsenic toxicity: Role of NADPH oxidases. *Chemosphere* **90**: 1987–1996.
- Gupta, D.K., Pena, L.B., Romero-Puertas, M.C., Hernández, A., Inouhe, M., and Sandalio, L.M.** (2017). NADPH oxidases differentially regulate ROS metabolism and nutrient uptake under cadmium toxicity. *Plant Cell Environ.* **40**: 509–526.
- Gupta, D.K. and Sandalio, L.M.** (2012). Metal toxicity in plants: perception, signaling and remediation (Springer).
- Hakmaoui, A., Pérez-Bueno, M.L., García-Fontana, B., Camejo, D., Jiménez, A., Sevilla, F., and Barón, M.** (2012). Analysis of the antioxidant response of *Nicotiana benthamiana* to infection with two strains of Pepper mild mottle virus. *J. Exp. Bot.* **63**: 5487–96.
- Halaimi, F.Z., Kellali, Y., Couderchet, M., and Semsari, S.** (2014). Comparison of biosorption and phytoremediation of cadmium and methyl parathion, a case-study with live *Lemna gibba* and *Lemna gibba* powder. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **105**: 112–120.
- Halliwell, B.** (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* **141**: 312–22.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.** (2000). Free radicals in biology and medicine (Oxford University Press).
- Hamer, D.H.** (1986). Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* **55**: 913–951.
- Han, M., Wu, W., Wu, W.-H., and Wang, Y.** (2016). Potassium Transporter KUP7 Is Involved in K(+) Acquisition and Translocation in Arabidopsis Root under K(+)-Limited Conditions. *Mol. Plant* **9**: 437–46.
- Hasan, M.K., Liu, C., Wang, F., Ahammed, G.J., Zhou, J., Xu, M.-X., Yu, J.-Q., and Xia, X.-J.** (2016). Glutathione-mediated regulation of nitric oxide, S-nitrosothiol and redox homeostasis confers cadmium tolerance by inducing transcription factors and stress response genes in tomato. *Chemosphere* **161**: 536–545.
- Hassan, Z.; Aarts, M.G.M.** (2011). Opportunities and feasibilities for biotechnological improvement of Zn, Cd or Ni tolerance and accumulation in plants. *Environ. Exp. Bot.* **72**: 53–63.
- Hassinen, V., Vallinkoski, V.-M., Issakainen, S., Tervahauta, A., Kärenlampi, S., and Servomaa, K.** (2009). Correlation of foliar MT2b expression with Cd and Zn concentrations in hybrid aspen (*Populus tremula*×*tremuloides*) grown in contaminated soil. *Environ. Pollut.* **157**: 922–930.
- Hayashi, T., Sawa, K., Kawasaki, M., Arisawa, M., Shimizu, M., and Morita, N.** Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *J. Nat. Prod.* **51**: 345–8.
- He, Q.B. & Singh, B.** (1993). Plant availability of cadmium in soil, I. Extractable cadmium in newly and long-term cultivated soils. *Acta Agric. Scand. Sect. B, Soil Plant Sci.* **43**: 134–141.
- Heeg, C., Kruse, C., Jost, R., Gutensohn, M., Ruppert, T., Wirtz, M., and Hell, R.** (2008). Analysis of the Arabidopsis O-acetylserine(thiol)lyase gene family demonstrates compartment-specific differences in the regulation of cysteine synthesis. *Plant Cell* **20**: 168–85.
- Hell, R. and Stephan, U.W.** (2003). Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* **216**: 541–51.
- Henson, M.C. and Chedrese, P.J.** (2004). Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). **229**: 383–92.
- Herbette, S. et al.** (2006). Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of Arabidopsis roots and shoots. *Biochimie* **88**: 1751–65.
- Herrera-Estrella, L.R. and Guevara-García, A.A.** (2009). Heavy Metal Adaptation. In *Encyclopedia of Life Sciences* (John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK).
- Heyno, E., Klose, C., and Krieger-Liszkay, A.** (2008). Origin of cadmium-induced reactive oxygen species production: mitochondrial electron transfer versus plasma membrane NADPH oxidase. *New Phytol.* **179**: 687–699.
- Hoagland D.R and Arnon D.J** (1953). The water-culture method for growing plants without soil :California Agricultural Experiments Station, **347**, 32 p.
- Hossain, M.A., Piyatida, P., da Silva, J.A.T., and Fujita, M.** (2012). Molecular Mechanism of

- Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. *J. Bot.* **2012**: 1–37.
- Hu, P.-J., Qiu, R.-L., Senthilkumar, P., Jiang, D., Chen, Z.-W., Tang, Y.-T., and Liu, F.-J.** (2009). Tolerance, accumulation and distribution of zinc and cadmium in hyperaccumulator *Potentilla griffithii*. *Environ. Exp. Bot.* **66**: 317–325.
- Huang, H., Yu, N., Wang, L., Gupta, D.K., He, Z., Wang, K., Zhu, Z., Yan, X., Li, T., and Yang, X.** (2011). The phytoremediation potential of bioenergy crop *Ricinus communis* for DDTs and cadmium co-contaminated soil. *Bioresour. Technol.* **102**: 11034–11038.
- Hussain Wani, S., Dixit, A.R., Maestri, E., Mosa, K.A., Saadoun, I., Kumar, K., Helmy, M., and Parkash Dhankher, O.** (2016). Potential Biotechnological Strategies for the Cleanup of Heavy Metals and Metalloids. *Plant Sci.* **7**: 303
- Iglesias, J., Trigueros, M., Rojas-Triana, M., Fernández, M., Albar, J.P., Bustos, R., Paz-Ares, J., and Rubio, V.** (2013). Proteomics identifies ubiquitin-proteasome targets and new roles for chromatin-remodeling in the Arabidopsis response to phosphate starvation. *J. Proteomics* **94**: 1–22.
- Indriolo, E., Na, G., Ellis, D., Salt, D.E., and Banks, J.A.** (2010). A Vacuolar Arsenite Transporter Necessary for Arsenic Tolerance in the Arsenic Hyperaccumulating Fern *Pteris vittata* Is Missing in Flowering Plants. *Plant Cell* **22**: 2045–2057.
- Isayenkov, S. V. and Maathuis, F.J.M.** (2008). The *Arabidopsis thaliana* aquaglyceroporin AtNIP7;1 is a pathway for arsenite uptake. *FEBS Lett.* **582**: 1625–1628.
- Ishimaru, Y., Takahashi, R., Bashir, K., Shimo, H., Senoura, T., Sugimoto, K., Ono, K., Yano, M., Ishikawa, S., Arao, T., Nakanishi, H., and Nishizawa, N.K.** (2012). Characterizing the role of rice NRAMP5 in Manganese, Iron and Cadmium Transport. *Sci. Rep.* **2**: 286.
- Islam, E., Khan, M.T., and Irem, S.** (2015). Biochemical mechanisms of signaling: Perspectives in plants under arsenic stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **114**: 126–133.
- Ivashikina N, Becker D, Ache P, Meyerhoff O, F.H. and K⁺, H.R.** (2001). K⁺ channel profile and electrical properties of Arabidopsis root hairs. *FEBS Lett.* **508**: 463–9.
- Jakoby, M., Wang, H.-Y., Reidt, W., Weisshaar, B., and Bauer, P.** (2004). FRU (BHLH029) is required for induction of iron mobilization genes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **577**: 528–534.
- Jing, Y., He, Z., and Yang, X.** (2007). Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **8**: 192–207.
- Jonak, C., Okrész, L., Bögre, L., and Hirt, H.** (2002). Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 415–24.
- Jones, O.A.H., Dias, D.A., Callahan, D.L., Kouremenos, K.A., Beale, D.J., and Roessner, U.** (2015). The use of metabolomics in the study of metals in biological systems. *Metallomics* **7**: 29–38.
- Jun, R., Ling, T., and Guanghua, Z.** (2009). Effects of chromium on seed germination, root elongation and coleoptile growth in six pulses. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **6**: 571–578.
- Jung, J.-Y., Shin, R., and Schachtman, D.P.** (2009). Ethylene Mediates Response and Tolerance to Potassium Deprivation in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 607–621.
- K.B. Balestrasse, S.M.G. and M.L.T.** (2004). Cadmium-induced senescence in nodules of soybean (*Glycine max L.*) plants (springer).
- Kabata-Pendias, A.** (2011). Trace elements in soils and plants. Ed. Boca Raton, Florida.
- Kamal, M., Ghaly, A.E., Mahmoud, N., and Côté, R.** (2004). Phytoaccumulation of heavy metals by aquatic plants. *Environ. Int.* **29**: 1029–1039.
- Kang, J., Park, J., Choi, H., Burla, B., Kretzschmar, T., Lee, Y., and Martinoia, E.** (2011). Plant ABC Transporters. *Arab. B.* **9**: e0153.
- Kappus, H. and Sies, H.** (1981). Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia* **37**: 1233–41.
- Karimi, N., Siyahat Shayesteh, L., Ghasmpour, H., and Alavi, M.** (2013) (2013). Effects of Arsenic on Growth, Photosynthetic Activity, and Accumulation in Two New Hyperaccumulating Populations of *Isatis cappadocica* Desv. *J. Plant Growth Regul* **32**: 823–830.

- Karimi, N., Ghaderian, S.M., Raab, A., Feldmann, J., and Meharg, A.A.** (2009). An arsenic-accumulating, hypertolerant brassica, *Isatis capadocica*. *New Phytol.* **184**: 41–47.
- Kehres, D.G., Zaharik, M.L., Finlay, B.B., and Maguire, M.E.** (2000). The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol. Microbiol.* **36**: 1085–100.
- Kerr MV, G.D.** (1975). Purification and properties of glycolate oxidase from *Pisum sativum* leaves. *Phytochem* **14**: 359–362.
- Kim, E.J., Kwak, J.M., Uozumi, N., and Schroeder, J.I.** (1998). AtKUP1: an Arabidopsis gene encoding high-affinity potassium transport activity. *Plant Cell* **10**: 51–62.
- Klein, M.A., Sekimoto, H., Milner, M.J., and Kochian, L. V** (2008). Investigation of Heavy Metal Hyperaccumulation at the Cellular Level: Development and Characterization of *Thlaspi caerulescens* Suspension Cell Lines. *Plant Physiol.* **147**: 2006–2016.
- Kobayashi, D., Uozumi, N., Hisamatsu, S., and Yamagami, M.** (2010). AtKUP/HAK/KT9, a K⁺ transporter from *Arabidopsis thaliana*, mediates Cs⁺ uptake in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**: 203–5.
- Kobayashi, T. and Nishizawa, N.K.** (2012). Iron Uptake, Translocation, and Regulation in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **63**: 131–152.
- Komárek, M., Tlustoš, P., Száková, J., and Chrástný, V.** (2008). The use of poplar during a two-year induced phytoextraction of metals from contaminated agricultural soils. *Environ. Pollut.* **151**: 27–38.
- Korshunova, Y.O., Eide, D., Clark, W.G., Gueriot, M.L., and Pakrasi, H.B.** (1999). The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol. Biol.* **40**: 37–44.
- Kotaś, J. and Stasicka, Z.** (2000). Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environ. Pollut.* **107**: 263–83.
- Kotrba, P., Najmanova, J., Macek, T., Ruml, T., and Mackova, M.** (2009). Genetically modified plants in phytoremediation of heavy metal and metalloids soil and sediment pollution. *Biotechnol. Adv.* **27**: 799–810.
- Krämer, U.** (2005). Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**: 133–141.
- Krinsky, N.I. and Deneke, S.M.** (1982). Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids. *J. Natl. Cancer Inst.* **69**: 205–10.
- Kühnlenz, T., Hofmann, C., Uruguchi, S., Schmidt, H., Schempp, S., Weber, M., Lahner, B., Salt, D.E., and Clemens, S.** (2016). Phytochelatin Synthesis Promotes Leaf Zn Accumulation of *Arabidopsis thaliana* Plants Grown in Soil with Adequate Zn Supply and is Essential for Survival on Zn-Contaminated Soil. *Plant Cell Physiol.* **57**: 2342–2352.
- Kumar, S., Dubey, R.S., Tripathi, R.D., Chakrabarty, D., and Trivedi, P.K.** (2015). Omics and biotechnology of arsenic stress and detoxification in plants: current updates and prospective. *Environ. Int.* **74**: 221–30.
- Küpper, H. and Andresen, E.** (2016). Mechanisms of metal toxicity in plants. *Metallomics* **8**: 269–85.
- Laemmli UK** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Lane, T.W. and Morel, F.M.** (2000). A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 4627–31.
- Lanquar, V., Lelièvre, F., Bolte, S., Hamès, C., Alcon, C., Neumann, D., Vansuyt, G., Curie, C., Schröder, A., Krämer, U., Barbier-Brygoo, H., and Thomine, S.** (2005). Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J.* **24**: 4041–4051.
- Lanquar, V., Ramos, M.S., Lelievre, F., Barbier-Brygoo, H., Krieger-Liszkay, A., Kramer, U., and Thomine, S.** (2010). Export of Vacuolar Manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 Is Required for Optimal Photosynthesis and Growth under Manganese Deficiency. *Plant Physiol.* **152**: 1986–1999.
- León, A.M., Palma, J.M., Corpas, F.J., Gómez, M., Romero-Puertas, M.C., Chatterjee, D., Mateos, R.M., Del Río, L.A., and Sandalio, L.M.** (2002). Antioxidative enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium. *Plant Physiol. Biochem.* **40**: 813–820.
- Lequeux, H., Hermans, C., Lutts, S., and Verbruggen, N.** (2010). Response to copper

excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant Physiol. Biochem.* **48**: 673–682.

Li, Y., Dhankher, O.P., Carreira, L., Lee, D., Chen, A., Schroeder, J.I., Balish, R.S., and Meagher, R.B. (2004). Overexpression of phytochelatin synthase in *Arabidopsis* leads to enhanced arsenic tolerance and cadmium hypersensitivity. *Plant Cell Physiol.* **45**: 1787–97.

Li, Z., Xiao, H., Cheng, S., Zhang, L., Xie, X., and Wu, Z. (2014). A comparison on the phytoremediation ability of triazophos by different macrophytes. *J. Environ. Sci.* **26**: 315–322.

Liang Zhu Y, Y.L., Pilon-Smits, E.A.H., Jouanin, L., and Terry, N. (1999). Overexpression of glutathione synthetase in indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol.* **119**: 73–80.

Lim, M.W., Lau, E. Von, and Poh, P.E. (2016). A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil - Present works and future directions. *Mar. Pollut. Bull.*

Lindsay, W.L. and Schwab, A.P. (1982). The chemistry of iron in soils and its availability to plants. *J. Plant Nutr.* **5**: 821–840.

Lippard, S.J. y Berg, J.M. (1994). Principles of bioinorganic chemistry.

Liu, S., Yang, R., Pan, Y., Ma, M., Pan, J., Zhao, Y., Cheng, Q., Wu, M., Wang, M., and Zhang, L. (2015). Nitric oxide contributes to minerals absorption, proton pumps and hormone equilibrium under cadmium excess in *Trifolium repens* L. plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **119**: 35–46.

López-Bucio, J., Hernández-Madrigal, F., Cervantes, C., Ortiz-Castro, R., Carreón-Abud, Y., and Martínez-Trujillo, M. (2014). Phosphate relieves chromium toxicity in *Arabidopsis thaliana* plants by interfering with chromate uptake. *BioMetals* **27**: 363–370.

Lopez-Marques, R.L., Poulsen, L.R., Hanisch, S., Meffert, K., Buch-Pedersen, M.J., Jakobsen, M.K., Pomorski, T.G., and Palmgren, M.G. (2010). Intracellular Targeting Signals and Lipid Specificity Determinants of the ALA/ALIS P4-ATPase Complex Reside in the Catalytic ALA -Subunit. *Mol. Biol. Cell* **21**: 791–801.

López-Marqués, R.L., Poulsen, L.R., and

Palmgren, M.G. (2012). A putative plant aminophospholipid flippase, the *Arabidopsis* P4 ATPase ALA1, localizes to the plasma membrane following association with a β -subunit. *PLoS One* **7**: e33042.

López Arias, M; Grau Corbi, J.. (2004). Metales pesado, materia orgánica y otros parámetros de la capa superficial de suelos agrícolas y de pastos de la España peninsular. In (INIA).

Lozano-Rodríguez E, Hernández LE, B. and P, C.-R.R. (1997). Distribution of Cd in shoot, and root tissues of maize and pea plants: physiological distribution. *J. Exp. Bot.* **48**: 23–128.

Luo, Z.-B., He, J., Polle, A., and Rennenberg, H. (2016). Heavy metal accumulation and signal transduction in herbaceous and woody plants: Paving the way for enhancing phytoremediation efficiency. *Biotechnol. Adv.* **34**: 1131–1148.

Lynch, J.P. and St.Clair, S.B. (2004). Mineral stress: the missing link in understanding how global climate change will affect plants in real world soils. *F. Crop. Res.* **90**: 101–115.

Ma, J.F., Yamaji, N., Mitani, N., Xu, X.-Y., Su, Y.-H., McGrath, S.P., and Zhao, F.-J. (2008). Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 9931–9935.

MacDiarmid, C.W., Gaither, L.A., and Eide, D. (2000). Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **19**: 2845–55.

Maestri, E., Marmioli, M., Visioli, G., and Marmioli, N. (2010). Metal tolerance and hyperaccumulation: Costs and trade-offs between traits and environment. *Environ. Exp. Bot.* **68**: 1–13.

Makris, K., Shakya, K., Datta, R., Sarkar, D., and Pachanoor, D. (2007). High uptake of 2,4,6-trinitrotoluene by vetiver grass – Potential for phytoremediation? *Environ. Pollut.* **146**: 1–4.

Maksymiec, W., Wianowska, D., Dawidowicz, A.L., Radkiewicz, S., Mardarowicz, M., and Krupa, Z. (2005). The level of jasmonic acid in *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus coccineus* plants under heavy metal stress. *J. Plant Physiol.* **162**: 1338–1346.

Maksymiec W, Malgorzata W, K.Z. (2007). Variation in oxidative stress and photochemical activity in *Arabidopsis thaliana* leaves subjected to cadmium and excess copper in the presence or

absence of jasmonate and ascorbate. *Chemosphere* **66**: 421–427.

Marone, M., Mozzetti, S., De Ritis, D., Pierelli, L., and Scambia, G. (2001). Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biol. Proced. Online* **3**: 19–25.

Marschner, H. and Marschner, P. (2012). *Marschner's mineral nutrition of higher plants* (Academic Press).

Marschner H (1995). *Mineral nutrition of higher plants* (Ed Acad Press Londres RU.).

Martinez-Cordero, M.A., Martinez, V., and Rubio, F. (2004). Cloning and functional characterization of the high-affinity K⁺ transporter HAK1 of pepper. *Plant Mol. Biol.* **56**: 413–421.

Maruthi Sridhar, B.B., Han, F.X., Diehl, S. V., Monts, D.L., and Su, Y. (2007). Effects of Zn and Cd accumulation on structural and physiological characteristics of barley plants. *Brazilian J. Plant Physiol.* **19**:15-22.

Mary, V., Ramos, M.S., Gillet, C., Socha, A.L., Giraudat, J., Agorio, A., Merlot, S., Clairet, C., Kim, S.A., Punshon, T., Guerinot, M. Lou, and Thomine, S. (2015). Bypassing Iron Storage in Endodermal Vacuoles Rescues the Iron Mobilization Defect in the natural resistance associated-macrophage protein3natural resistance associated-macrophage protein4 Double Mutant. *Plant Physiol.* **169**: 748.

Mäser, P. Thomine S, Schroeder J, Ward JM, Guerinot ML. (2001). Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **126**: 1646–67.

McDowell, S.C., López-Marqués, R.L., Cohen, T., Brown, E., Rosenberg, A., Palmgren, M.G., and Harper, J.F. (2015). Loss of the *Arabidopsis thaliana* P4-ATPases ALA6 and ALA7 impairs pollen fitness and alters the pollen tube plasma membrane. *Front. Plant Sci.* **6**: 197.

McDowell, S.C., López-Marqués, R.L., Poulsen, L.R., Palmgren, M.G., and Harper, J.F. (2013). Loss of the *Arabidopsis thaliana* P4-ATPase ALA3 reduces adaptability to temperature stresses and impairs vegetative, pollen, and ovule development. *PLoS One* **8**: e62577.

McGrath, S.P., Zhao, F.J., and Lombi, E. (2001). Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils.

Plant Soil **232**: 207–214.

McLaughlin, M.J. and Singh, B.R. (1999). Cadmium in Soils and Plants. In *Cadmium in Soils and Plants* (Springer Netherlands: Dordrecht), pp. 1–9.

Meharg, A.A. and Hartley-Whitaker, J. (2002). Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytol.* **154**: 29–43.

Memon, A.R. and Schröder, P. (2009). Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **16**: 162–75.

Mendoza-Cózatl, D.G., Xie, Q., Akmakjian, G.Z., Jobe, T.O., Patel, A., Stacey, M.G., Song, L., Demoin, D.W., Jurisson, S.S., Stacey, G., and Schroeder, J.I. (2014). OPT3 is a component of the iron-signaling network between leaves and roots and misregulation of OPT3 leads to an over-accumulation of cadmium in seeds. *Mol. Plant*: 1455–1469.

Metwally, A., Safronova, V.I., Belimov, A.A., and Dietz, K.-J. (2004). Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L. *J. Exp. Bot.* **12**: 197.

Mills, R.F., Peaston, K.A., Runions, J., and Williams, L.E. (2012). HvHMA2, a P(1B)-ATPase from barley, is highly conserved among cereals and functions in Zn and Cd transport. *PLoS One* **7**: e42640.

Mingorance, M.D., Barahona, E., and Fernández-Gálvez, J. (2007). Guidelines for improving organic carbon recovery by the wet oxidation method. *Chemosphere* **68**: 409–13.

Mira, H., Martínez-García, F., and Peñarrubia, L. (2001). Evidence for the plant-specific intercellular transport of the Arabidopsis copper chaperone CCH. *Plant J.* **25**: 521–8.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **7**: 405–10.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., and Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.* **16**: 300–309.

Molins, H., Michelet, I., Lanquar, v., Agorio, a., Giraudat, j., Roach, T., Krieger-Liszkay, A., and Thomine, S. (2013). Mutants impaired in vacuolar metal mobilization identify chloroplasts as a target for cadmium hypersensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant*.

Cell Environ. **36**: 804–817.

Montes-Holguin, M.O., Peralta-Videa, J.R., Meitzner, G., Martinez-Martinez, A., de la Rosa, G., Castillo-Michel, H.A., and Gardea-Torresdey, J.L. (2006). Biochemical and spectroscopic studies of the response of *Convolvulus arvensis L.* to chromium(III) and chromium(VI) stress. Environ. Toxicol. Chem. **25**: 220–6.

Morel, F.M.M. and Malcolm, E.G. (2005). The biogeochemistry of cadmium. Met. Ions Biol. Syst. **43**: 195–219.

Moreno-Jiménez, E., Peñalosa, J.M., Carpena-Ruiz, R.O., and Esteban, E. (2008). Comparison of arsenic resistance in Mediterranean woody shrubs used in restoration activities. Chemosphere **71**: 466–473.

Moreno, F.N., Anderson, C.W.N., Stewart, R.B., and Robinson, B.H. (2005). Mercury volatilisation and phytoextraction from base-metal mine tailings. Environ. Pollut. **136**: 341–352.

Van de Mortel, J.E., Almar Villanueva, L., Schat, H., Kwekkeboom, J., Coughlan, S., Moerland, P.D., Ver Loren van Themaat, E., Koornneef, M., and Aarts, M.G.M. (2006). Large expression differences in genes for iron and zinc homeostasis, stress response, and lignin biosynthesis distinguish roots of *Arabidopsis thaliana* and the related metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Plant Physiol. **142**: 1127–47.

Mosa, K.A., Saadoun, I., Kumar, K., Helmy, M., and Dhankher, O.P. (2016). Potential Biotechnological Strategies for the Cleanup of Heavy Metals and Metalloids. Front. Plant Sci. **7**: 303.

Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B. (2001). Remediation for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. Eng. Geol. **60**: 193–207.

Murashige and Skoog (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and BioAssays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant. **15**.

Nagarajan, M. and Ganesh, K.S. (2015). Growth and Nutrient Uptake of Paddy (*Oryza sativa L.*) under Chromium(VI) Treatment. Int. J. Environ. Bioenergy Int. J. Environ. Bioenergy J. homepage www.ModernScientificPress.com/Journals/IJEE.aspx Int. J. Environ. Bioener **10**: 115–121.

Narang R.A, Bruene A, A.T. (2000). Analysis

of phosphate acquisition efficiency in different Arabidopsis accessions. - PubMed - NCBI. plant Physiol. **124**: 1786–99.

Narasimhamoorthy, B., Blancaflor, E.B., Bouton, J.H., Payton, M.E., and Sledge, M.K. (2007). A Comparison of Hydroponics, Soil, and Root Staining Methods for Evaluation of Aluminum Tolerance in (*Barrel Medic*) Germplasm. Crop Sci. **47**: 321.

Navarro-Aviñó, J.P., Alonso, I.A., and López-Moya, J.R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. Rev. Ecosistemas **16**.

Navas, A. and Lindhorfer, H. (2003). Geochemical speciation of heavy metals in semiarid soils of the central Ebro Valley (Spain). Environ. Int. **29**: 61–8.

Nevo, Y. and Nelson, N. (2006). The NRAMP family of metal-ion transporters.

Nieves-Cordones, M., Ródenas, R., Chavanieu, A., Rivero, R.M., Martínez, V., Gaillard, I., and Rubio, F. (2016a). Uneven HAK/KUP/KT Protein Diversity Among Angiosperms: Species Distribution and Perspectives. Front. Plant Sci. **7**: 127.

Nihei, N., Ohya, T., Tanoi, K., Iikura, H., Kanke, B., and Nakanishi, T.M. (2005). Influence of Mercury on Soybean Plants (*Glycine max L.*) at Low pH. Soil Sci. Plant Nutr. **51**: 725–727.

Ochiai, E.-I. (1995). Toxicity of Heavy Metals and Biological Defense: Principles and Applications in Bioinorganic Chemistry-VII. J. Chem. Educ. **72**: 479.

Ogawa, T., Ishikawa, K., Harada, K., Fukusaki, E., Yoshimura, K., and Shigeoka, S. (2009). Overexpression of an ADP-ribose pyrophosphatase, *AtNUDX2*, confers enhanced tolerance to oxidative stress in Arabidopsis plants. Plant J. **57**: 289–301.

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

Opdenakker, K., Remans, T., Vangronsveld, J., and Cuypers, A. (2012). Mitogen-Activated Protein (MAP) kinases in plant metal stress: regulation and responses in comparison to other biotic and abiotic stresses. Int. J. Mol. Sci. **13**: 7828–53.

Ortega-Galisteo, A.P., Rodríguez-Serrano,

- M., Pazmiño, D.M., Gupta, D.K., Sandalio, L.M., and Romero-Puertas, M.C.** (2012). S-Nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: changes under abiotic stress. *J. Exp. Bot.* **63**: 2089–2103.
- Ortega-Villasante, C., Hernández, L.E., Rellán-Álvarez, R., Del Campo, F.F., and Carpena-Ruiz, R.O.** (2007). Rapid alteration of cellular redox homeostasis upon exposure to cadmium and mercury in alfalfa seedlings. *New Phytol.* **176**: 96–107.
- Ortiz, D.F., Ruscitti, T., McCue, K.F., and Ow, D.W.** (1995). Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J. Biol. Chem.* **270**: 4721–8.
- Osakabe, Y., Arinaga N; Umezawa T; Katsura S; Nagamachi K; Tanaka H; Ohiraki H; Yamada K; Seo S; Abo M; Yoshimura E.** (2013). Osmotic stress responses and plant growth controlled by potassium transporters in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 609–24.
- Ovečka, M. and Takáč, T.** (2014). Managing heavy metal toxicity stress in plants: Biological and biotechnological tools. *Biotechnol. Adv.* **32**: 73–86.
- Paul R. Wittbrodt and Carl D. Palmer** (1996). Effect of Temperature, Ionic Strength, Background Electrolytes, and Fe(III) on the Reduction of Hexavalent Chromium by Soil Humic Substances. *Environ. Sci. Technol.* **30**: 2470–2477.
- Padmavathiamma, P.K. and Li, L.Y.** (2007). Phytoremediation Technology: Hyperaccumulation Metals in Plants. *Water. Air. Soil Pollut.* **184**: 105–126.
- Palmgren, M.G. and Axelsen, K.B.** (1998). Evolution of P-type ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* **1365**: 37–45.
- Palmgren, M.G. and Harper, J.F.** (1999). Pumping with plant P-type ATPases. *J. Exp. Bot.* **50**: 883–893.
- Palmgren, M.G. and Nissen, P.** (2011). P-type ATPases. *Annu. Rev. Biophys.* **40**: 243–66.
- Pan, H., Wang, Y., Zha, Q., Yuan, M., Yin, L., Wu, T., Zhang, X., Xu, X., and Han, Z.** (2015). Iron deficiency stress can induce MxNRAMP1 protein endocytosis in *M. xiaojinensis*. *Gene* **567**: 225–234.
- Panda, S.K. and Choudhury, S.** (2005). Chromium stress in plants. *Brazilian J. Plant Physiol.*
- Panda S.K** (2007). Chromium mediated oxidative stress and ultrastructural changes in root cells of developing rice seedlings. *J. Plant Physiol.* **164**: 1419–1428.
- Pandey V, Dixit V, S.R.** (2005). Antioxidative responses in relation to growth of mustard (*Brassica juncea* cv. *Pusa Jaikisan*) plants exposed to hexavalent chromium. *Chemosphere* **61**: 40–47.
- Park, S., Cheng, N.H., Pittman, J.K., Yoo, K.S., Park, J., Smith, R.H., and Hirschi, K.D.** (2005). Increased calcium levels and prolonged shelf life in tomatoes expressing Arabidopsis H⁺/Ca²⁺ transporters. *Plant Physiol.* **139**: 1194–206.
- Patzer, S.I. and Hantke, K.** (2001). Dual Repression by Fe²⁺-Fur and Mn²⁺-MntR of the mntH Gene, Encoding an NRAMP-Like Mn²⁺ Transporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**: 4806–4813.
- Pazmiño M D, Rodriguez-Serrano M, Romero-Puertas M, Archilla Ruiz MC, del Río LA, Sandalio LM.** (2011). Differential response of young and adult leaves to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in pea plants: role of reactive oxygen species. *Plant. Cell Environ.* **34**: 1874–1889.
- Pence, N.S., Larsen, P.B., Ebbs, S.D., Letham, D.L., Lasat, M.M., Garvin, D.F., Eide, D., and Kochian, L. V** (2000). The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 4956–60.
- Peña, A., Mingorance, M.D., Guzmán-Carrizosa, I., and Fernández-Espinoza, A.J.** (2015a). Improving the mining soil quality for a vegetation cover after addition of sewage sludges: inorganic ions and low-molecular-weight organic acids in the soil solution. *J. Environ. Manage.* **150**: 216–25.
- Peralta, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., Tiemann, K.J., Gomez, E., Arteaga, S., Rascon, E., and Parsons, J.G.** (2001). Uptake and effects of five heavy metals on seed germination and plant growth in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **66**: 727–34.
- Pérez-Chaca, M.V., Rodríguez-Serrano, M., Molina, A.S., Pedranzani, H.E., Zirulnik, F., Sandalio, L.M., and Romero-Puertas, M.C.** (2014). Cadmium induces two waves of reactive oxygen species in *Glycine max* (L.) roots. *Plant*

Cell Environ. **37**: 1672–87.

Perfus-Barbeoch, L., Leonhardt, N., Vavasseur, A., and Forestier, C. (2002). Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J.* **32**: 539–548.

Perl-Treves, R. and Perl, A. Oxidative Stress: An Introduction. In *Oxidative stress in plants*, Inzé D. and Van Montagu M., eds (Taylor and Francis, London).

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29** (9): e45.

Picard, V., Govoni, G., Jabado, N., and Gros, P. (2000). Nramp 2 (DCT1/DMT1) Expressed at the Plasma Membrane Transports Iron and Other Divalent Cations into a Calcein-accessible Cytoplasmic Pool. *J. Biol. Chem.* **275**: 35738–35745.

Pilon-Smits, E.A. (2005). Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**: 15–39.

Pilon-Smits, E.A. and LeDuc, D.L. (2009). Phytoremediation of selenium using transgenic plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**: 207–212.

Pilon-Smits, E.A., Quinn, C.F., Tapken, W., Malagoli, M., and Schiavon, M. (2009). Physiological functions of beneficial elements. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**: 267–274.

Pinto, E., Sigaud-kutner, T.C.S., Leitao, M.A.S., Okamoto, O.K., Morse, D., and Colepicolo, P. (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.* **39**: 1008–1018.

Pittman, J.K. (2005). Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. *New Phytol.* **167**: 733–742.

Plumlee G (1994). Environmental geology models of mineral deposi. *SEG Newsl.* **16**: 5–6.

Pomorski, T. and Menon, A.K. (2006). Lipid flippases and their biological functions. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**: 2908–21.

Pomponi, M., Censi, V., Di Girolamo, V., De Paolis, A., di Toppi, L.S., Aromolo, R., Costantino, P., and Cardarelli, M. (2006). Overexpression of Arabidopsis phytochelatin synthase in tobacco plants enhances Cd²⁺ tolerance and accumulation but not translocation to the shoot. *Planta* **223**: 180–190.

Portnoy, M.E., Liu, X.F., and Culotta, V.C.

(2000). *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the nramp family of metal transporters. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 7893–902.

Poschenrieder, C., Gunse, B., and Barcelo, J. (1989). Influence of Cadmium on Water Relations, Stomatal Resistance, and Abscisic Acid Content in Expanding Bean Leaves I. *Plant Physiol* **90**: 1365–1371.

Poschenrieder, C., Tolrà, R., and Barceló, J. (2006). Can metals defend plants against biotic stress? *Trends Plant Sci.* **11**: 288–295.

Poschenrieder, C., Gunse´ B, B.J. (1993). Chromium-induced inhibition of ethylene evolution in bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves. *Physiol Plant* **89**: 404–408.

Pottier, M., Oomen, R., Picco, C., Giraudat, J., Scholz-Starke, J., Richaud, P., Carpaneto, A., and Thomine, S. (2015). Identification of mutations allowing Natural Resistance Associated Macrophage Proteins (NRAMP) to discriminate against cadmium. *Plant J.* **83**: 625–637.

Poulsen, L.R., López-Marqués, R.L., McDowell, S.C., Okkeri, J., Licht, D., Schulz, A., Pomorski, T., Harper, J.F., and Palmgren, M.G. (2008). The Arabidopsis P4-ATPase ALA3 localizes to the golgi and requires a beta-subunit to function in lipid translocation and secretory vesicle formation. *Plant Cell* **20**: 658–76.

Del Pozo, J.C., Allona, I., Rubio, V., Leyva, A., De La Peña, A., Aragoncillo, C., and Paz-Ares, J. (1999). A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilising/oxidative stress conditions. *Plant J.* **19**: 579–589.

Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin, B.A., and Stewart, C.R. (1994). Evidence for Chilling-Induced Oxidative Stress in Maize Seedlings and a Regulatory Role for Hydrogen Peroxide. *Plant Cell* **6**: 65–74.

Puig, S., Andrés-Colás, N., García-Molina, A. y Peñarrubia, L. (2007). Copper and iron homeostasis in Arabidopsis: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant. Cell Environ.* **3**: 271–290.

Puig, S. Mira H, Dorcey E, Sancenón V, Andrés Colás N, Pilon M, Peñarrubia L. (2007). Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**: 385–90.

- Quig, D.** (1998). Cysteine metabolism and metal toxicity. *Altern. Med. Rev.* **3**: 262–70.
- Quintero, F.J. and Blatt, M.R.** (1997). A new family of K⁺ transporters from Arabidopsis that are conserved across phyla. *FEBS Lett.* **415**: 206–11.
- Raab, A., Schat, H., Meharg, A.A., and Feldmann, J.** (2005). Uptake, translocation and transformation of arsenate and arsenite in sunflower (*Helianthus annuus*): formation of arsenic-phytochelatin complexes during exposure to high arsenic concentrations. *New Phytol.* **168**: 551–558.
- Rascio, N. and Navari-Izzo, F.** (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci.* **180**: 169–181.
- Raskin, I.** (1996). Plant genetic engineering may help with environmental cleanup. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 3164–3166.
- Rauser, W.E.** (1995). Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiol.* **109**: 1141–9.
- Rauser, W.E.** (1999). Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochem. Biophys.* **31**: 19–48.
- Reeves, R.D.** (2006). Hyperaccumulation of trace elements by plants.
- Reeves RD, Baker AJM, Borhidi A, B.R.** (1999). Nickel Hyperaccumulation in the Serpentine Flora of Cuba. *Ann. Bot.* **83**: 29–38.
- Reeves RD, B.A.** (2000). Metal-accumulating plants. In: Raskin I, Ensley BD (eds) *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment.* (New York).
- Remans, T., Opdenakker, K., Smeets, K., Mathijssen, D., Vangronsveld, J., and Cuypers, A.** (2010). Metal-specific and NADPH oxidase dependent changes in lipxygenase and NADPH oxidase gene expression in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium or excess copper. *Funct. Plant Biol.* **37**: 532.
- Richard A. Jefferson** (1987). Assaying Chimeric Genes in Plants: The GUS Gene Fusion System. *Plant Mol. Biol.* **5**: 387–405.
- Rigas, S., Debrosses, G., Haralampidis, K., Vicente-Agullo, F., Feldmann, K.A., Grabov, A., Dolan, L., and Hatzopoulos, P.** (2001). TRH1 encodes a potassium transporter required for tip growth in Arabidopsis root hairs. *Plant Cell* **13**: 139–51.
- Robinson, N.J., Procter, C.M., Connolly, E.L., and Guerinot, M. Lou** (1999). A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* **397**: 694–697.
- Robinson, N.J. and Winge, D.R.** (2010). Copper metallochaperones. *Annu. Rev. Biochem.* **79**: 537–62.
- Rocha AC, Canal EC, Campostrini E, Reis FO, C.G.** (2009). Influence of chromium in *Laguncularia racemosa* (L). *Braz J Plant Physiol* **21**: 87–94.
- Rodrigo-Moreno, A., Poschenrieder, C., and Shabala, S.** (2013). Transition metals: A double edge sword in ROS generation and signaling. *Plant Signal. Behav.* **8**: 1559–2324.
- Rodríguez-Liébana, J.A., Mingorance, M.D., and Peña, A.** (2014). Pesticide mobility and leachate toxicity in two abandoned mine soils. Effect of organic amendments. *Sci. Total Environ.* **497–498**: 561–9.
- Rodríguez-Liébana, J.A., Mingorance, M.D., and Peña, A.** (2013). Pesticide sorption on two contrasting mining soils by addition of organic wastes: Effect of organic matter composition and soil solution properties. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **435**: 71–77.
- Rodríguez-Serrano** (2007). Mecanismos Moleculares de Respuesta al Cadmio en Plantas de *Pisum sativum* L.: Función de las Especies de Oxígeno y Nitrógeno Reactivo.
- Rodríguez-Serrano, M., Barany, I., Prem, D., Coronado, M.-J., Risueno, M.C., and Testillano, P.S.** (2012). NO, ROS, and cell death associated with caspase-like activity increase in stress-induced microspore embryogenesis of barley. *J. Exp. Bot.* **63**: 2007–2024.
- Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., Pazmiño, D.M., Testillano, P.S., Risueno, M.C., Del Río, L.A., and Sandalio, L.M.** (2009). Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiol.* **150**: 229–43.
- Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., Zabalza, A., Corpas, F.J., Gómez, M., Del Río, L.A., and Sandalio, L.M.** (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 Environ.* **29**: 1532–44.

- Rogers, E.E., Eide, D.J., and Guerinot, M.L.** (2000). Altered selectivity in an Arabidopsis metal transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 12356–60.
- Rohnert, U., Schneider, W., and Elstner, E.F.** Superoxide-dependent and -independent nitrite formation from hydroxylamine: inhibition by plant extracts. *Z. Naturforsch. C.* **53**: 241–9.
- Romero-Puertas, M.C., Corpas, F.J., Rodríguez-Serrano, M., Gómez, M., del Río, L.A., and Sandalio, L.M.** (2007). Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *J. Plant Physiol.* **164**: 1346–1357.
- Romero-Puertas, M.C., Ortega-Galisteo, A.P., Rodríguez-Serrano, M., and Sandalio, L.M.** (2012). Insights into Cadmium Toxicity: Reactive Oxygen and Nitrogen Species Function. In *Metal Toxicity in Plants: Perception, Signaling and Remediation* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg), pp. 91–117.
- Romero-Puertas, M.C., Palma, J.M., Gomez, M., Del Rio, L.A., and Sandalio, L.M.** (2002). Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant, Cell Environ.* **25**: 677–686.
- Romero-puertas, M.C., Rodriguez-Serrano, M., Corpas, F.J., Gomez, M., del Rio, L.A., and Sandalio, L.M.** (2004). Cadmium-induced subcellular accumulation of $O_2^{\cdot-}$ and HO_2 in pea leaves. *Plant, Cell Environ.* **27**: 1122–1134.
- Römheld V y Marschner H** (1986). Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. *Adv Plant Nutr* 2: 155–204.
- Roosens, N.H.C.J., Willems, G., and Saumitou-Laprade, P.** (2008). Using Arabidopsis to explore zinc tolerance and hyperaccumulation. *Trends Plant Sci.* **13**: 208–15.
- Rosenwasser, S., Fluhr, R., Joshi, J.R., Leviatan, N., Sela, N., Hetzroni, A., and Friedman, H.** (2013). ROSMETER: a bioinformatic tool for the identification of transcriptomic imprints related to reactive oxygen species type and origin provides new insights into stress responses. *Plant Physiol.* **163**: 1071–83.
- Rossini Oliva, S., Bargagli, R., Monaci, F., Valdés, B., Mingorance, M.D., and Leidi, E.O.** (2009). Stress responses of *Erica andevalensis* Cabezudo & Rivera plants induced by polluted water from Tinto River (SW Spain). *Ecotoxicology* **18**: 1058–67.
- Ruan, Y.-L., Llewellyn, D.J., and Furbank, R.T.** (2001). The Control of Single-Celled Cotton Fiber Elongation by Developmentally Reversible Gating of Plasmodesmata and Coordinated Expression of Sucrose and K^+ Transporters and Expansin. *Plant Cell* **13**: 47.
- Rubio, F., Santa-Maria, G.E., and Rodriguez-Navarro, A.** (2000). Cloning of Arabidopsis and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. *Physiol. Plant.* **109**: 34–43.
- Ruiz, O.N. and Daniell, H.** (2009). Genetic engineering to enhance mercury phyto remediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**: 213–219.
- Sabreen, S. and Sugiyama, S.** (2008). Cadmium phytoextraction capacity in eight C_3 herbage grass species. *Grassl. Sci.* **54**: 27–32.
- Saito, K., Fujimura-Kamada, K., Furuta, N., Kato, U., Umeda, M., and Tanaka, K.** (2004). Cdc50p, a protein required for polarized growth, associates with the Drs2p P-type ATPase implicated in phospholipid translocation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **15**: 3418–32.
- Salazar R y Reyes R** (2000). Efectos tóxicos y mecanismos de tolerancia al cadmio en los seres vivos. *Universidad, Cienc. y Tecnol.* **13**: 17–22.
- Salomons, W.** (1995). Environmental impact of metals derived from mining activities: Processes, predictions, prevention. *J. Geochemical Explor.* **52**: 5–23.
- Salt, D.E., Prince, R.C., Pickering, I.J., and Raskin, I.** (1995). Mechanisms of Cadmium Mobility and Accumulation in Indian Mustard. *Plant Physiol.* **109**: 1427–1433.
- Salvador, V.H., Lima, R.B., dos Santos, W.D., Soares, A.R., Böhm, P.A.F., Marchiosi, R., Ferrarese, M. de L.L., and Ferrarese-Filho, O.** (2013). Cinnamic Acid Increases Lignin Production and Inhibits Soybean Root Growth. *PLoS One* **8**: e69105.
- Sancenón, V., Puig, S., Mateu-Andrés, I., Dorcey, E., Thiele, D.J., and Peñarrubia, L.** (2004). The Arabidopsis copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development. *J. Biol. Chem.* **279**: 15348–55.
- Sánchez-Bermejo, E., Castrillo, G., del Llano, B., Navarro, C., Zarco-Fernández, S., Martínez-Herrera, D.J., Leo-del Puerto, Y., Muñoz, R., Cámara, C., Paz-Ares, J., Alonso-Blanco, C., and Leyva, A.** (2014). Natural

- variation in arsenate tolerance identifies an arsenate reductase in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Commun.* **5**: 4617.
- Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gómez, M., Romero-Puertas, M.C., and del Río, L.A.** (2001). Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.* **52**: 2115–26.
- Sandalio, L.M., López-Huertas, E., Bueno, P., and Del Río, L.A.** (1997). Immunocytochemical localization of copper,zinc superoxide dismutase in peroxisomes from watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.) cotyledons. *Free Radic. Res.* **26**: 187–94.
- Sandalio, L.M., Rodríguez-Serrano, M., Gupta, D.K., Archilla, A., Romero-Puertas, M.C., and del Río, L.A.** (2012). Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Plants Under Cadmium Stress: From Toxicity to Signaling. In *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change* (Springer New York: New York, NY), pp. 199–215.
- Sandalio, L.M., Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., and del Río, L.A.** (2013). Role of Peroxisomes as a Source of Reactive Oxygen Species (ROS) Signaling Molecules. In *Sub-cellular biochemistry*, pp. 231–255.
- Sanità di Toppi, L. and Gabrielli, R.** (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* **41**: 105–130.
- Sano, T., Kutsuna, N., Becker, D., Hedrich, R., and Hasezawa, S.** (2009). Outward-rectifying K⁺ channel activities regulate cell elongation and cell division of tobacco BY-2 cells. *Plant J.* **57**: 55–64.
- Santa-Maria, G.E.** (1997). The HAK1 Gene of Barley Is a Member of a Large Gene Family and Encodes a High-Affinity Potassium Transporter. *Plant Cell Online* **9**: 2281–2289.
- Santa-María, G.E., Rubio, F., Dubcovsky, J., and Rodríguez-Navarro, A.** (1997). The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *Plant Cell* **9**: 2281–9.
- Dos Santos Utmazian, M.N., Wieshammer, G., Vega, R., and Wenzel, W.W.** (2007). Hydroponic screening for metal resistance and accumulation of cadmium and zinc in twenty clones of willows and poplars. *Environ. Pollut.* **148**: 155–165.
- Sarma, H.** (2011). Metal Hyperaccumulation in Plants: A Review Focusing on Phytoremediation Technology. *J. Environ. Sci. Technol.* **4**: 118–138.
- Sasaki, A., Yamaji, N., Yokosho, K., and Ma, J.F.** (2012). Nramp5 Is a Major Transporter Responsible for Manganese and Cadmium Uptake in Rice. *Plant Cell* **24**: 2155–2167.
- Sattler, S.E., Gilliland, L.U., Magallanes-Lundback, M., Pollard, M., and DellaPenna, D.** (2004). Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell* **16**: 1419–32.
- Schachtman, D.P. and Schroeder, J.I.** (1994). Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* **370**: 655–8.
- Schat, H.** (1999). Plant responses to inadequate and toxic micronutrient availability: general and nutrient-specific mechanisms. *Ecology and Plant Physiology*. 311-324
- Scheffer, F. & Schachtschabel, P.** (1989). *Lehrbuch der Bodenkunde*.
- Schellingen, K., Van Der Straeten, D., Remans, T., Vangronsveld, J., Keunen, E., and Cuypers, A.** (2015). Ethylene signalling is mediating the early cadmium-induced oxidative challenge in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* **239**: 137–46.
- Schiavon, M., Pittarello, M., Pilon-Smits, E.A.H., Wirtz, M., Hell, R., and Malagoli, M.** (2012). Selenate and molybdate alter sulfate transport and assimilation in *Brassica juncea* L. Czern.: Implications for phytoremediation. *Environ. Exp. Bot.* **75**: 41–51.
- Schleyer, M. and Bakker, E.P.** (1993). Nucleotide sequence and 3'-end deletion studies indicate that the K(+)-uptake protein kup from *Escherichia coli* is composed of a hydrophobic core linked to a large and partially essential hydrophilic C terminus. *J. Bacteriol.* **175**: 6925–31.
- Schneider, T., Schellenberg, M., Meyer, S., Keller, F., Gehrig, P., Riedel, K., Lee, Y., Eberl, L., and Martinoia, E.** (2009). Quantitative detection of changes in the leaf-mesophyll tonoplast proteome in dependency of a cadmium exposure of barley (*Hordeum vulgare* L.) plants. *Proteomics* **9**: 2668–77.
- Schützendübel, A. and Polle, A.** (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* **53**: 1351–65.

- Scoccianti, V., Bucchini, A.E., Iacobucci, M., Ruiz, K.B., and Biondi, S.** (2016). Oxidative stress and antioxidant responses to increasing concentrations of trivalent chromium in the Andean crop species *Chenopodium quinoa* Willd. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **133**: 25–35.
- Segonzac, C., Boyer, J.-C., Ipotesi, E., Szponarski, W., Tillard, P., Touraine, B., Sommerer, N., Rossignol, M., and Gibrat, R.** (2007). Nitrate Efflux at the Root Plasma Membrane: Identification of an Arabidopsis Excretion Transporter. *Plant Cell online* **19**: 3760–3777.
- Senn, M.E., Rubio, F., Bañuelos, M.A., and Rodríguez-Navarro, A.** (2001). Comparative functional features of plant potassium HvHAK1 and HvHAK2 transporters. *J. Biol. Chem.* **276**: 44563–9.
- Seregin, I.V., Ivanov, V.** (1997). Histochemical methods for the study of cadmium and lead distribution in plants. *Fiziol* **44**: 915–921.
- Shabala S. Jayakumar B, Anja Thoe Fuglsang, and Igor Pottosin** (2016). On a quest for stress tolerance genes: membrane transporters in sensing and adapting to hostile soils. *J. Exp. Bot.* **67**: 1015–1031.
- Serrano, I., Romero-Puertas, M.C., Sandalio, L.M., and Olmedilla, A.** (2015). The role of reactive oxygen species and nitric oxide in programmed cell death associated with self-incompatibility. *J. Exp. Bot.* **66**: 2869–2876.
- Sevilla-Perea, A. and Mingorance, M.D.** (2015). Field approach to mining-dump revegetation by application of sewage sludge co-compost and a commercial biofertilizer. *J. Environ. Manage.* **158**: 95–102.
- Sevilla-Perea, A. and Romero-Puertas, M.** (2016). Optimizing the combined application of amendments to allow plant growth in a multielement-contaminated soil. *Chemosphere* **148**: 220–226.
- Sevilla-Perea A, Fernández-Gálvez J, Rossini S, and Mingorance MD** (2010). Riesgos derivados de la presencia de residuos mineros: Disponibilidad de metales en minas abandonadas (IV Congreso Ibérico de la Ciencia del suelo, Granada).
- Sewelam, N., Kazan, K., and Schenk, P.M.** (2016). Global Plant Stress Signaling: Reactive Oxygen Species at the Cross-Road. *Front. Plant Sci.* **7**: 187.
- Shanker AK1, Cervantes C, Loza-Tavera H, Avudainayagam S.** (2005). Chromium toxicity in plants. *Environ. Int.* **31**: 739–753.
- Shanker, A.K. and Pathmanabhan, G.** (2004). Speciation dependant antioxidative response in roots and leaves of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench cv CO 27) under Cr(III) and Cr(VI) stress. *Plant Soil* **265**: 141–151.
- Sharma, I.** (2012). Arsenic induced oxidative stress in plants. *Biol. Sect. Bot.* **673**: 447–453.
- Sharma, S.S. and Dietz, K.-J.** (2009). The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci.* **14**: 43–50.
- Sharma and R. S. Dubey** (2005). Lead toxicity in plants. *J. Plant Physiol.* **17**: 35–52.
- Shi, Q. y Z.Z.** (2008). Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. *Environ. Exp. Bot.* **63**: 317–326.
- Shiyab, S., Chen, J., Han, F.X., Monts, D.L., Matta, F.B., Gu, M., Su, Y., and Masad, M.A.** (2009). Mercury-induced oxidative stress in Indian mustard (*Brassica juncea* L.). *Environ. Toxicol.* **24**: 462–471.
- Shahid M , Shamshad S , Rafiq M, Khalid S , Bibi I, Niazi N, Dumat C, and Rashid M.** (2017). Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: A review. *Chemosphere* **178**: 513–533.
- Shuman LM** (1991). Chemical forms of micronutrients in soils. En Luxmoore, R.J. (ed.), “Micronutrients Agric. Madison, WI SSSA : 114–44.
- Siegmund, A., Grant, A., Angeletti, C., Malone, L., Nichols, J.W., and Rudolph, H.K.** (1998). Loss of Drs2p Does Not Abolish Transfer of Fluorescence-labeled Phospholipids across the Plasma Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**: 34399–34405.
- Simontacchi, M., Galatro, A., and Puntarulo, S.** (2001). El estrés oxidativo en las plantas. *Ciencia Hoy*. Vol 10: 38-45.
- Singh, A.N., Srinivas, M., and Naik, B.N.** (2015a). Forecasting the Impact of Surface Mining on Surrounding using Cloud Computing. *J. Comput. Sci. Appl.* **3**: 118–122.
- Singh, H.P., Mahajan, P., Kaur, S., Batish, D.R., and Kohli, R.K.** (2013). Chromium toxicity and tolerance in plants. *Environ Chem Lett.* **11**: 229–254.

- Singh, N., Ma, L.Q., Srivastava, M., and Rathinasabapathi, B.** (2006). Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris ensiformis* L. *Plant Sci.* **170**: 274–282.
- Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V.P., and Prasad, S.M.** (2015b). Heavy Metal Tolerance in Plants: Role of Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, and Ionomics. *Front. Plant Sci.* **6**: 1143.
- Socha, A.L. and Guerinot, M. Lou** (2014). Mn-euvering manganese: the role of transporter gene family members in manganese uptake and mobilization in plants. *Front. Plant Sci.* **5**: 106.
- Song, W.-Y., Ju Sohn, E., Martinoia, E., Jik Lee, Y., Yang, Y.-Y., Jasinski, M., Forestier, C., Hwang, I., and Lee, Y.** (2003). Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants. *Nat. Biotechnol.* **21**: 914–919.
- Souri, Z., Karimi, N., and de Oliveira, L.M.** (2017). Antioxidant enzymes responses in shoots of arsenic hyperaccumulator, *Isatis cappadocica* Desv., under interaction of arsenate and phosphate. *Environ. Technol.*: 1–12.
- Sposito, G.** (1989). The chemistry of soils. Oxford Univ. Press. New York.
- Srivastava, S., Nigam, R., Prakash, S., and Srivastava, M.M.** (1999). Mobilization of Trivalent Chromium in Presence of Organic Acids: A Hydroponic Study of Wheat Plant (*Triticum vulgare*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **63**: 524–530.
- Stumm, W. & Morgan, J.** (1981). Aquatic Chemistry. *Enviro*
- Su, Y.H., McGrath, S.P., Zhu, Y.G., and Zhao, F.J.** (2008). Highly efficient xylem transport of arsenite in the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*. *New Phytol.* **180**: 434–441.
- Supek, F., Supekova, L., Nelson, H., and Nelson, N.** (1996). A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 5105–10.
- Suresh Kumar, K., Dahms, H.-U., Won, E.-J., Lee, J.-S., and Shin, K.-H.** (2015). Microalgae – A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **113**: 329–352.
- Suzuki, A., Guicheux, J., Palmer, G., Miura, Y., Oiso, Y., Bonjour, J.P., and Caverzasio, J.** (2002a). Evidence for a role of p38 MAP kinase in expression of alkaline phosphatase during osteoblastic cell differentiation. *Bone* **30**: 91–8.
- Suzuki, N., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., and Sano, H.** (2002b). Functional characterization of a heavy metal binding protein Cdi19 from *Arabidopsis*. *Plant J.* **32**: 165–73.
- Szczerba, M.W., Britto, D.T., and Kronzucker, H.J.** (2009). K⁺ transport in plants: Physiology and molecular biology. *J. Plant Physiol.* **166**: 447–466.
- Tamayo, E., Gómez-Gallego, T., Azcón-Aguilar, C., and Ferrol, N.** (2014). Genome-wide analysis of copper, iron and zinc transporters in the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *Front. Plant Sci.* **5**: 547.
- Tanaka, K., Fujimura-Kamada, K., and Yamamoto, T.** (2011). Functions of phospholipid flippases. *J. Biochem.* **149**: 131–43.
- Tan KH** (1994). Environmental soil science. New York Marcel Dekker Inc: 304.
- Tang, X., Halleck, M.S., Schlegel, R.A., and Williamson, P.** (1996). A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science* **272**: 1495–7.
- Tehseen, M., Cairns, N., Sherson, S., and Cobbett, C.S.** (2010). Metallochaperone-like genes in *Arabidopsis thaliana*. *Metallomics* **2**: 556–64.
- Tejada-Jiménez, M., Castro-Rodríguez, R., Kryvoruchko, I., Lucas, M.M., Udvardi, M., Imperial, J., and González-Guerrero, M.** (2015). *Medicago truncatula* Natural Resistance-Associated Macrophage Protein1 Is Required for Iron Uptake by Rhizobia-Infected Nodule Cells. *Plant Physiol.* **168**: 258–272.
- Thao, N.P., Khan, M.I.R., Thu, N.B.A., Hoang, X.L.T., Asgher, M., Khan, N.A., and Tran, L.-S.P.** (2015). Role of Ethylene and Its Cross Talk with Other Signaling Molecules in Plant Responses to Heavy Metal Stress. *Plant Physiol.* **169**: 73–84.
- Theodoulou, F.L. and Kerr, I.D.** (2015). ABC transporter research: going strong 40 years on. *Biochem. Soc. Trans.* **43**: 1033–40.
- Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L.A., Rhee, S.Y., and Stitt, M.** (2004). MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other

biological processes. *Plant J.* **37**: 914–39.

Thomine, S., Lelièvre, F., Debarbieux, E., Schroeder, J.I., and Barbier-Brygoo, H. (2003). AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J.* **34**: 685–95.

Thomine, S., Wang, R., Ward, J.M., Crawford, N.M., and Schroeder, J.I. (2000). Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 4991–4996.

Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., and Collinge, D.B. (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.* **11**: 1187–1194.

Trchounian, A. and Kobayashi, H. (1999). Kup is the major K⁺ uptake system in *Escherichia coli* upon hyper-osmotic stress at a low pH. *FEBS Lett.* **447**: 144–8.

Tripathi, R.D., Srivastava, S., Mishra, S., Singh, N., Tuli, R., Gupta, D.K., and Maathuis, F.J.M. (2007). Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends Biotechnol.* **25**: 158–165.

Udaykumar Kage, A.K. (2014). Metabolomics: A Novel Tool to Bridge Phenome to Genome under Changing Climate to Ensure Food Security. *Med. Aromat. Plants* **3**.

Usharani, B. and Vasudevan, N. (2014). Impact of Heavy metal toxicity and Constructed wetland system as a tool in remediation. *Arch. Environ. Occup. Health*: 00–00.

Vatanever, R., Filiz, E., and Ozyigit, I.I. (2016). In silico analysis of Mn transporters (NRAMP1) in various plant species. *Mol. Biol. Rep.* **43**: 151–163.

Vazquez Reina, S., Esteban, E., and Goldsbrough, P. (2005). Arsenate-induced phytochelatins in white lupin: influence of phosphate status. *Physiol. Plant.* **124**: 41–49.

Verbruggen, N., Hermans, C., and Schat, H. (2009). Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**: 364–372.

Vergne, P., Delvallee, I., and Dumas, C. (1987). Rapid Assessment of Microspore and Pollen Development Stage in Wheat and Maize Using Dapi and Membrane Permeabilization.

Stain Technol. **62**: 299–304.

Vert, G., Grotz, N., Dédaldéchamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M. Lou, Briat, J.-F., and Curie, C. (2002). IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* **14**: 1223–33.

Vidal, S., Belouchi, A.M., Cellier, M., Beatty, B., and Gros, P. (1995). Cloning and characterization of a second human NRAMP gene on chromosome 12q13. *Mamm. Genome* **6**: 224–30.

Vidal, S.M., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E., and Gros, P. (1993). Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell* **73**: 469–85.

Visioli, G. and Marmiroli, N. (2013). The proteomics of heavy metal hyperaccumulation by plants. *J. Proteomics* **79**: 133–45.

Wang, H.-Y., Klatte, M., Jakoby, M., Bäumlein, H., Weisshaar, B., and Bauer, P. (2007). Iron deficiency-mediated stress regulation of four subgroup Ib BHLH genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **226**: 897–908.

Wang, J. and Chen, C. (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnol. Adv.* **27**: 195–226.

Wang, Y., Dong, C., Xue, Z., Jin, Q., and Xu, Y. (2016). De novo transcriptome sequencing and discovery of genes related to copper tolerance in *Paeonia ostii*. *Gene* **576**: 126–135.

Watanabe, M.E. (1997). Phytoremediation on the Brink of Commercialization. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 182A–186A.

Waters, B.M., Lucena, C., Romera, F.J., Jester, G.G., Wynn, A.N., Rojas, C.L., Alcántara, E., and Pérez-Vicente, R. (2007). Ethylene involvement in the regulation of the H⁺-ATPase CsHA1 gene and of the new isolated ferric reductase CsFRO1 and iron transporter CsIRT1 genes in cucumber plants. *Plant Physiol. Biochem.* **45**: 293–301.

Weber, M., Harada, E., Vess, C., Roepenack-Lahaye, E. v., and Clemens, S. (2004). Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *Plant J.* **37**: 269–81.

Welch, O., Agric, J., Cary, E.E., Allaway, W.H., and Olson, O.E. (1975). Control of Chromium Concentrations in Food Plants. 1.

Absorption and Translocation of Chromium by Plants. *Food Chem* **23178**.

Welch, R., Norvell, W., Schaefer, S., Shaff, J., and Kochian, L. (1993). Induction of iron(III) and copper(II) reduction in pea (*Pisum sativum* L.) roots by Fe and Cu status: Does the root-cell plasmalemma Fe(III)-chelate reductase perform a general role in regulating cation uptake? *Planta* **190**: 555–561.

Wilson, G.W. (1990). Physicochemical basis of free radical formation in cells. Production and defenses. In *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanism*, W. Smallwood, ed (Wiley-Liss Inc.: UK), pp. 57–86.

Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., and Provart, N.J. (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS One* **2**: e718.

Wintz, H., Fox, T., Wu, Y.-Y., Feng, V., Chen, W., Chang, H.-S., Zhu, T., and Vulpe, C. (2003). Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *J. Biol. Chem.* **278**: 47644–53.

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

Xie, Q.-E., Yan, X.-L., Liao, X.-Y., and Li, X. (2009). The Arsenic Hyperaccumulator Fern *Pteris vittata* L. *Environ. Sci. Technol.* **43**: 8488–8495.

Xie, Y., Ye, S., Wang, Y., Xu, L., Zhu, X., Yang, J., Feng, H., Yu, R., Karanja, B., Gong, Y., and Liu, L. (2015). Transcriptome-based gene profiling provides novel insights into the characteristics of radish root response to Cr stress with next-generation sequencing. *Front. Plant Sci.* **6**: 202.

Xiong, J., Fu, G., Tao, L., and Zhu, C. (2010). Roles of nitric oxide in alleviating heavy metal toxicity in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* **497**: 13–20.

Xu, L., Wang, Y., Liu, W., Wang, J., Zhu, X., Zhang, K., Yu, R., Wang, R., Xie, Y., Zhang, W., Gong, Y., and Liu, L. (2015a). De novo sequencing of root transcriptome reveals complex cadmium-responsive regulatory networks in radish (*Raphanus sativus* L.). *Plant Sci.* **236**: 313–323.

Xu, W., Dai, W., Yan, H., Li, S., Shen, H.,

Chen, Y., Xu, H., Sun, Y., He, Z., and Ma, M. (2015b). *Arabidopsis* NIP3;1 Plays an Important Role in Arsenic Uptake and Root-to-Shoot Translocation under Arsenite Stress Conditions. *Mol. Plant* **8**: 722–733.

Xudong Cheng, L.L., Ling, H.-Q., and Ling, H.-Q. (2004). Isolation and characterization of Fe(III)-chelate reductase gene LeFRO1 in tomato. *Plant Mol. Biol.* **54**: 125–136.

Yadav, S.K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African J. Bot.* **76**: 167–179.

Yang, G., Wang, C., Wang, Y., Guo, Y., Zhao, Y., Yang, C., and Gao, C. (2016). Overexpression of ThVHAc1 and its potential upstream regulator, ThWRKY7, improved plant tolerance of Cadmium stress. *Sci. Rep.* **6**: 18752.

Yang, M., Zhang, Y., Zhang, L., Hu, J., Zhang, X., Lu, K., Dong, H., Wang, D., Zhao, F.-J., Huang, C.-F., and Lian, X. (2014). OsNRAMP5 contributes to manganese translocation and distribution in rice shoots. *J. Exp. Bot.* **65**: 4849–4861.

Yang, X.E., Long, X.X., Ye, H.B., He, Z.L., Calvert, D.V., and Stoffella, P.J. (2004). Cadmium tolerance and hyperaccumulation in a new Zn-hyperaccumulating plant species (*Sedum alfredii* Hance). *Plant Soil* **259**: 181–189.

Yang H, Pritzker M, Fung SY, Sheng Y, Wang W, C.P. (2006). Nanostructure of a metal ion binding self-assembling peptide. *EMBO J.* **22**: 8553–8562.

Yuan, Y., Wu, H., Wang, N., Li, J., Zhao, W., Du, J., Wang, D., and Ling, H.-Q. (2008). FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in *Arabidopsis*. *Cell Res.* **18**: 385–397.

Zawoznik, M.S., Groppa, M.D., Tomaro, M.L., and Benavides, M.P. (2007). Endogenous salicylic acid potentiates cadmium - induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*.

Zeng, H., Xu, L., Singh, A., Wang, H., Du, L., and Poovaiah, B.W. (2015). Involvement of calmodulin and calmodulin-like proteins in plant responses to abiotic stresses. *Front. Plant Sci.* **6**: 600.

Zha, Q., Xiao, Z., Zhang, X., Han, Z., and Wang, Y. (2016). Cloning and functional analysis of MxNRAMP1 and MxNRAMP3, two

genes related to high metal tolerance of *Malus xiaojinensis*. *South African J. Bot.* **102**: 75–80.

Zhang, S., Lin A, Chen B, Wang Y, Smith S. (2006). Effects of *Glomus moseae* on the toxicity of heavy metals to *Vicia faba*. *J. of Env. Sciences.* **18**: 721-726.

Zhang, X.-H., Liu, J., Huang, H.-T., Chen, J., Zhu, Y.-N., and Wang, D.-Q. (2007). Chromium accumulation by the hyperaccumulator plant *Leersia hexandra* Swartz. *Chemosphere* **67**: 1138–1143.

Zhang, X. and Oppenheimer, D.G. (2009). Irregular trichome branch 2 (ITB2) encodes a putative aminophospholipid translocase that regulates trichome branch elongation in *Arabidopsis*. *Plant J.* **60**: 195–206.

Zhao, F.-J. and McGrath, S.P. (2009a). Biofortification and phytoremediation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**: 373–380.

Zhao, F.J., Ma, J.F., Meharg, A.A., and McGrath, S.P. (2009b). Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytol.* **181**: 777–794.

Zhao, H. and Eide, D. (1996). The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**: 23203–10.

Zhu, X., Feng, Y., Liang, G., Liu, N., and Zhu, J.-K. (2013). Aequorin-Based Luminescence Imaging Reveals Stimulus- and Tissue-Specific Ca^{2+} Dynamics in *Arabidopsis* Plants. *Mol. Plant* **6**: 444–455.

Zhu YL, Zayed AM, Qian J-H, deSouza M, T.N. (1999). Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: II. Water Hyacinth. *J Env. Qual* **28**: 339–344.

Zwolak, I. and Zaporowska, H. (2012). Selenium interactions and toxicity: a review. *Cell Biol. Toxicol.* **28**: 31–46.

Anexos

Abreviaturas

¹O₂: Oxígeno en estado singlete

O₂^{·-}: Radical superóxido

·OH: Radical hidroxilo

A. thaliana: *Arabidopsis thaliana*

ABA: Ácido abscísico

ABC: Familia de proteínas transmembrana

AL1: Suelo de Alquife (Cd, Cr, Cu)

AL2: Suelo de Alquife (Cd, Cu, Ni)

APX: Ascorbato peroxidasa

ATP: Adenosina trifosfato

ATPasa: Bomba de protones que hidroliza ATP

ASC: Ascorbato

BA: Enmienda de cenizas

BSA: Albúmina sérica bovina

CAPS: Ácido-3-[ciclohexilamino]-1-propanosulfónico

CAT: Catalasa

CAX: Intercambiador de cationes

CE: Conductividad eléctrica

CIC: Capacidad de intercambio catiónico

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

CDF / MTP: Facilitador de difusión catiónica / proteína de tolerancia metálica

Col-0: Ecotipo Columbia

COPT: Transportadores de cobre

DAPI: 4',6-diaminido-2-fenilindol diacetato

DAB: Diaminobencidina

DHA: Deshidroascorbato

DHAR: Deshidroascorbato reductasa

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxinucleótido trifosfato

DEPC: Dietilpirocarbonato

DPI: Difenil-iodonio

E.coli: *Escherichia coli*

EGPA-SDS: Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

GFP: Green fluorescence protein

GOX: Glicolato oxidasa

GR: Glutación reductasa

GSH/GSSG: Glutation reducido (γ -glutamyl-cisteinil-glicina)/ glutation oxidado

GR: Glutation reductasa

GSH: Glutation reducido (γ -glutamyl-L-cisteina-glicina oxidado)

GSSG: Glutación oxidado

GORK: Canal de K^+ rectificador de salida

GUS: β -glucuronidasa

HAK/KUP/KT: Familia de transportadores de K^+ : H^+ de alta afinidad.

H_2O_2 : Peróxido de hidrógeno

HEPES: Ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2-etanosulfónico

HVA: Ácido homovanilínico

ICP-MS: Espectrómetro de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo

IgG: Inmunoglobulina G

IRT: Transportador de hierro

LCT1: canales de Ca^{2+} de trigo (*Triticum aestivum* L.)

MAPK: Proteínas quinasas

MDA: Malondialdehído

MnSOD: Manganese superóxido dismutasa

MS: Medio de cultivo Murashige y Skoog

MT: metalotioneinas

MDHAR: Monodehidroascorbato reductasa

NADH: Nicotinamín adenina dinucleótido reducido

NADP: Nicotinamín adenina dinucleótido fosfato oxidado

NADPH: Nicotinamín adenina dinucleótido fosfato reducido

NASC: Nottingham Arabidopsis Stock Center

NIP: Acuoporinas tipo nodulina

NRAMP: Proteínas de macrófagos asociadas a la resistencia natural de macrófagos

NtBP4: Canales de unión de calmodulina de alta afinidad de Ca^{2+}

PBS: Tampón fosfato salino (fosfato-K 20mM, pH7.5, NaCl 150mM)

PIPES: Tampón KOH 50 mM, pH 7,4

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PCs: Fitoquelatinas

Pi: Fosfato inorgánico

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RNA: Ácido ribonucleico

ROS: Especies de oxígeno reactivo

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa

RT1: Suelo de Riotinto (Cd, Cu, Pb)

RBOH: Respiratory burst oxidative homolog

SVC: Enmienda de compost de depuradora

%TF: Factor de translocación

TAE: Tampón Tris-HCl 45 mM (pH 8,0), ácido acético glacial 45 mM y EDTA 1 mM

TAIR: The Arabidopsis Information Resource

TBS: Tampón tris Salino (HCl 20 mM pH 7.8, NaCl 0.18 M)

TCA: Ácido tricloroacético

T-DNA: DNA de transferencia

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametil-etilén-diamina

Tris: Tris-hidroximetil aminometano

YSL: Transportador con forma de franja amarilla (Yellow strike line)

ZIP: Proteína transportadora de Zinc

WT: *Arabidopsis thaliana*, fenotipo silvestre

WRKY: Factor de transcripción

Índice de Figuras

Figura 1.1. Fuentes antropogénicas de contaminación por metales pesados.	4
Figura 1.2. Distribución de los metales en los suelos.	6
Figura 1.3. Familia de transportadores implicados en la entrada y translocación de metales en plantas.	15
Figura 1.4. Localización de los entornos mineros de Riotinto y Alquife.	23
Figura 1.5. Mecanismos de fitorremediación. Modificado de Lim y col., 2016 y Mosa y col., 2016.	27
Figura 1.6. Localización subcelular de los transportadores NRAMP en <i>Arabidopsis thaliana</i> y los metales que transportan (Tabla 1.2).	35
Figura 1.7. Árbol filogenético de proteínas NRAMP. Tomados de Curie y col., 2000 (A) y Tejada-Jiménez y col., 2015 (B).	37
Figura 1.8. Distribución de los transportadores KT/KUP/HAK en los distintos reinos en los que se han descrito. Modificado de Grabov, (2007).	38
Figura 1.9. Árbol filogenético representativo de los transportadores de K ⁺ de la familia HAK.	39
Figura 1.10. Transportadores de K ⁺ en <i>Arabidopsis</i> . Adaptación de Mäser y col., (2001).	40
Figura 1.11. Patrones de expresión de los genes KT/KUP en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de una semana.	41
Figura 1.12. Relación filogenética de las proteínas HIPP y HPP. Se muestra el código AGI. Las proteínas se agrupan en siete grupos principales (Tehseen y col., 2010).	46
Figura 1.13. Relación filogenética de los genes HPP y HIPP de los grupos VI y VII dentro del tándem en el cromosoma 5.	47
Figura 1.14. Formación de especies de oxígeno reactivo.	48
Figura 1.15. Balance entre las reacciones de oxidación y la defensa antioxidante.	50
Figura 1.16. Reacciones tipo Fenton y tipo Haber-Weiss, Halliwell y Gutteridge, (2015).	51
Figura 1.17. Respuesta diferencial en la planta dependiendo del tiempo de exposición a metales pesados.	52
Figura 1.18. Papel señalizador de las ROS activando la respuesta antioxidante y de defensa en la planta.	55
Figura 1.19. Papel de señalización de los ROS en respuesta a diferentes tipos de estrés. Modificado de Van Breusegem, (2006).	56
Figura 3.1. Esquema general de la inserción del T-DNA en el gen At1g17500. Modificado de la web. http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html	63

Figura 3.2. Esquema de polinización dirigida.....	65
Figura 3.3. Esquema de los cruces realizados para generar dobles mutantes homocigotos.....	66
Figura 3.4. Sistema de cultivo hidropónico.....	68
Figura 3.5. Fórmula para el cálculo de expresión relativa.	82
Figura 3.6. Fórmula matemática para el cálculo de la expresión relativa. Pfaffl, (2001).	84
Figura 3.7. Material vegetal incluido en los bloques de acrilamida, hoja (A) y raíz (B).	87
Figura 4.1. Efecto de las distintas mezclas de metales sobre la germinación de semillas de Arabidopsis WT tras 11 días después de su siembra.....	98
Figura 4.2. Crecimiento de las plántulas tras 11 días de la siembra en los medios al 10 % de la concentración de metales.	99
Figura 4.3. Germinación y crecimiento de plántulas de Arabidopsis a los 11 días en los medios con los metales de la Tabla 4.4.	100
Figura 4.4. Germinación y desarrollo de la raíz de plántulas de Arabidopsis a los 7 días en los diferentes medios utilizados respecto del control.....	102
Figura 4.5. Longitud de la raíz de plantas crecidas en cada una de las concentraciones de metales de la Tabla 4.6 a los 7 y 11 días de cultivo.	103
Figura 4.6. Germinación y crecimiento de plantas a los 7 días.....	104
Figura 4.7. Selección de líneas resistentes y sensibles.....	105
Figura 4.8. Imagen representativa de una placa de la selección con 16 líneas mutantes después de 7 días de cultivo.....	105
Figura 4.9. Esquema de las selecciones realizadas en la colección de mutantes (Ln).	106
Figura 4.10. Longitud de la raíz de las líneas resistentes seleccionadas.....	107
Figura 4.11. Clasificación de los genes seleccionados.....	113
Figura 4.12. Análisis MapMan de los genes seleccionados y caracterizados en las funciones celulares.....	114
Figura 4.13. Análisis MapMan de los genes seleccionados y caracterizados en la respuesta frente a patógenos.....	115
Figura 4.14. Análisis MapMan de los genes seleccionados y relacionados con la regulación post-traducional implicados en la degradación de proteínas dependiente de ubiquitina.....	116
Figura 4.15. Datos de expresión de <i>HPP9</i> (A) y <i>ALA4</i> (B) y localización subcelular de las proteínas correspondientes (C y D), disponibles en http://bar.utoronto.ca	117
Figura 4.16. Genotipado mediante PCR de las plantas mutantes <i>Athpp9</i> Y <i>Atala4</i> y el genotipo silvestre.	118

- Figura 4.17.** Fenotipo (A) y longitud de la raíz después de 7 días de crecimiento en el medio con la mezcla de metales (B) de los mutantes *Athpp9* y *Atala4* respecto a las plantas WT. 119
- Figura 4.18.** Tasas de germinación de *Athpp9* y *Atala4* respecto de WT en el medio con la mezcla de metales y en condiciones control..... 119
- Figura 4.19.** Expresión relativa mediante qRT-PCR de *HPP9* y *ALA4* en el genotipo WT, en plántulas de 7 días crecidas en placa con la mezcla de metales pesados. 120
- Figura 4.20.** Metabolismo oxidativo de los mutantes *Athpp9* y *Atala4* en respuesta a metales pesados. 121
- Figura 4.21.** Análisis mediante ICP del contenido de Cd, Cr y Cu en raíces y hojas de los mutantes *Athpp9* y *Atala4* y en WT..... 122
- Figura 4.22.** Expresión de *HPP9* y *ALA4* en respuesta a metales. 125
- Figura 4.23.** Estudio de fenotipo de *Athpp9* y *Atala4* en extractos de suelos enmendados. 126
- Figura 4.24.** Peroxidación lipídica en *Athpp9* y *Atala4* crecidas en las enmiendas. 126
- Figura 4.25.** Datos de expresión de *KUP8* disponibles en <http://bar.utoronto.ca>. 128
- Figura 4.26.** Expresión de *KUP8* en experimentos con auxinas durante el desarrollo de raíces laterales. Datos disponibles en <http://bar.utoronto.ca>..... 128
- Figura 4.27.** Localización de la inserción de T-DNA en el gen At5g14880 (*KUP8*) 129
- Figura 4.28.** Fenotipo (A) y longitud de la raíz (B) del mutante *Atkup8* y del WT después de 7 días de crecimiento en el medio control y con la mezcla de metales. 130
- Figura 4.29.** Árbol de homología entre las secuencias aminoacídicas de las proteínas KUP de *Arabidopsis thaliana*, según el programa “Vector NTI”..... 131
- Figura 4.30.** Expresión de la familia de genes *KUP* mediante RT-PCR semicuantitativa en el WT (A) y el mutante *Atkup8* (B) en respuesta al tratamiento con la mezcla de metales. 132
- Figura 4.31.** Datos de expresión de *KUP1* disponibles en <http://bar.utoronto.ca>. 133
- Figura 4.32.** Expresión de *KUP1* en experimentos con auxinas durante el desarrollo de raíces laterales. 134
- Figura 4.33.** Localización de la inserción de T-DNA en el gen At2g30070 (*KUP1*) 134
- Figura 4.34.** Fenotipo (A) y longitud de la raíz (B) del mutante *Atkup1* respecto de WT después de 7 días de crecimiento en el medio control y con la mezcla de metales. 135
- Figura 4.35.** Porcentaje de germinación de *Atkup8*, *Atkup1* y WT en medio Hoagland con las diferentes concentraciones de metales: As 30 μ M, Cr 100 μ M, Cu 25 μ M..... 136
- Figura 4.36.** Imagen representativa del crecimiento de plántulas de *Atkup8*, *Atkup1* y WT (A), peso fresco (B) y longitud de raíz (C) crecidas en placas durante 7 días en medio Hoagland y los distintos metales: As 30 μ M, Cr 100 μ M, Cu 25 μ M. 137

Figura 4.37. Tasa de aparición de hojas verdaderas en plantas <i>Atkup8</i> , <i>Atkup1</i> y WT crecidas en medio Hoagland con los distintos metales; As 30 μ M, Cr 100 μ M, Cu 25 μ M.....	137
Figura 4.38. Porcentaje de germinación (A), tasa de aparición de hojas verdaderas (B), peso fresco (mg/planta) (C) y longitud de la raíz principal (D) en plántulas de <i>Atkup8</i> , <i>Atkup1</i> , <i>Atkup1kup8</i> y de WT cultivadas en medio Hoagland control, la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu) y en Cd 25 μ M.	139
Figura 4.39. Imagen representativa del crecimiento de las plántulas de 7 días en control y los tratamientos con la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu), Cd 50 μ M y Cd 25 μ M.....	140
Figura 4.40. Área foliar (A), hojas en roseta de plantas crecidas en hidroponía (B) y en tierra (C) durante 21 días y producción de silicuas (D), de plantas crecidas en tierra durante 38 días.....	141
Figura 4.41. Peso fresco de plantas <i>Atkup8</i> , <i>Atkup1</i> y WT crecidas en cultivo hidropónico y 24 h de tratamiento posterior en la mezcla de metales.....	142
Figura 4.42. Análisis mediante ICP del contenido de Cd, Cr y Cu en hojas y raíces de los mutantes <i>Atkup8</i> , <i>Atkup1</i> y en plantas WT.....	143
Figura 4.43. Expresión mediante RT-PCR semicuantitativa de <i>KUP8</i> en hoja y raíz a diferentes tiempos de tratamiento con la mezcla de metales.	145
Figura 4.44. Metabolismo oxidativo en respuesta a metales en <i>Atkup8</i> y WT.	146
Figura 4.45. Peso fresco de plantas <i>Atkup8</i> y WT crecidas en cultivo hidropónico y posterior tratamiento con Cd 50 μ M durante 24 h.	147
Figura 4.46. Análisis mediante ICP del contenido de Cd en hojas y raíces del mutante <i>Atkup8</i> y del WT.....	147
Figura 4.47. Expresión relativa mediante RT-PCR semicuantitativa del gen <i>KUP8</i> en hoja y raíz de plantas WT	149
Figura 4.48. Metabolismo oxidativo de los kup en respuesta a Cd.....	151
Figura 4.49. Expresión relativa de <i>KUP8</i> en raíz mediante qRT-PCR en los genotipos <i>Atrboh C</i> , <i>Atrboh D</i> , <i>Atrboh F</i> y WT en condiciones control y de estrés por el tratamiento con cadmio 50 μ M durante 24 horas.	152
Figura 4.50. Porcentaje de germinación de <i>Atkup8</i> , <i>Atkup1</i> , <i>Atkup1kup8</i> respecto de WT en MS conteniendo: 0, 200 y 400 μ M de Mn.	155
Figura 4.51. Tasa de aparición de hojas verdaderas en plántulas de <i>Atkup8</i> , <i>Atkup1</i> , <i>Atkup1kup8</i> respecto de WT cultivadas en MS conteniendo: 0, 200 y 400 μ M de Mn.	156
Figura 4.52. Peso fresco de las plántulas <i>Atkup8</i> , <i>Atkup1</i> , <i>Atkup1kup8</i> y WT tras 10 días de crecimiento en MS conteniendo: 0, 200 y 400 μ M de Mn.....	157
Figura 4.53. Efecto del manganeso en el desarrollo de la raíz de plantas <i>Atkup8</i> , <i>Atkup1</i> , <i>Atkup1kup8</i> y WT tras 10 días de crecimiento en placas de cultivo en MS conteniendo: 0, 200 y 400 μ M de Mn.....	158

Figura 4.54. Porcentaje de germinación (A) y tasa de aparición de hojas verdaderas (B) de <i>Atkup8</i> , <i>Atkup1</i> y <i>Atkup1kup8</i> respecto de WT en medio Hoagland control, exceso 4x y ausencia de hierro.	159
Figura 4.55. Peso fresco en las plántulas de <i>Atkup8</i> , <i>Atkup1</i> , <i>Atkup1kup8</i> y WT de 10 días de crecimiento en placas de cultivo conteniendo Hoagland control, exceso 4x y ausencia de hierro.	160
Figura 4.56. Efecto del hierro en el desarrollo de la raíz de plantas de <i>Atkup8</i> , <i>Atkup1</i> , <i>Atkup1kup8</i> y WT.	160
Figura 4.57. Datos de expresión de <i>NRAMP5</i> en las distintas partes de la planta.	161
Figura 4.58. Expresión de <i>NRAMP5</i> en las diferentes fases de desarrollo del polen (A). Expresión de <i>NRAMP5</i> en las células guarda y del mesófilo, en experimentos con ABA (B, C y D).	162
Figura 4.59. Árbol de homología entre las secuencias aminoacídicas de las proteínas NRAMP. (A) De <i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>At</i>) y <i>Oryza sativa</i> (<i>Os</i>) y (B) solo de <i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>At</i>).	163
Figura 4.60. Estudio del número de hojas de roseta en plantas crecidas en hidroponía (A) y en tierra (B) durante 21 días, producción de silicuas (C) y área foliar (D), de plantas crecidas en tierra durante 21 días. Fenotipo en tierra y en cultivo hidropónico (E).	164
Figura 4.61. Localización de la inserción de T-DNA en el gen At4g18790 (<i>NRAMP5</i>)	165
Figura 4.62. Fenotipo (A) y longitud de la raíz (B) del mutante <i>Atnramp5</i> respecto al WT después de 7 días de crecimiento en el medio control y con la mezcla de metales.	166
Figura 4.63. Expresión de la familia <i>NRAMP</i> mediante RT-PCR semicuantitativa en las líneas silvestre WT (A) y <i>Atnramp5</i> (B) a los 7 días de la germinación en control (C) y la mezcla de metales (M).	167
Figura 4.64. Expresión de la familia <i>NRAMP</i> mediante qRT-PCR en el mutante <i>Atnramp5</i> respecto al WT, en condiciones control.	167
Figura 4.65. Estudio de peso fresco de plantas crecidas en cultivo hidropónico y 24 h de tratamiento posterior en la mezcla de metales.	168
Figura 4.66. Análisis mediante ICP del contenido en Cd, Cr y Cu en hojas y raíces del mutante <i>Atnramp5</i> y en WT.	169
Figura 4.67. Metabolismo oxidativo en plantas WT y <i>Atnramp5</i> en respuesta a la mezcla de metales.	172
Figura 4.68. Porcentaje de germinación de <i>Atnramp5</i> y del WT en medio Hoagland 0.5x con las diferentes concentraciones de metales: Cd 50 μ M, As 30 μ M, Cr 100 μ M, Cu 25 μ M.	173
Figura 4.69. Peso fresco de plántulas de 7 días crecidas en placas en horizontal con medio Hoagland y los metales: Cd 50 μ M, As 30 μ M, Cr 100 μ M, Cu 25 μ M.	174

Figura 4.70. Tasa de aparición de hojas verdaderas en plantas <i>Atnramp5</i> y WT crecidas en placas en horizontal en medio Hoagland 0,5x con los distintos metales: Cd 50 μ M, As 30 μ M, Cr 100 μ M, Cu 25 μ M.	174
Figura 4.71. Longitud de raíz de plantas <i>Atnramp5</i> y WT crecidas en medio Hoagland con los distintos tratamientos: Cd 50 μ M, As 30 μ M, Cr 100 μ M.	175
Figura 4.72. Expresión relativa mediante qRT-PCR de <i>NRAMP5</i> en plántulas WT y <i>Atnramp5</i>	176
Figura 4.73. Tinción de Cd con ditizona en diferentes tejidos de plántulas de <i>A. thaliana</i> , WT y <i>Atnramp5</i> tratadas con Cd 50 μ M durante 24 h	177
Figura 4.74. Estudios de peso fresco de plantas <i>Atnramp5</i> y WT.	178
Figura 4.75. Análisis mediante ICP de Cd en hojas y raíces del mutante <i>Atnramp5</i> y en plantas WT.	178
Figura 4.76. Metabolismo oxidativo en plantas WT y <i>Atnramp5</i> en respuesta al Cd.	181
Figura 4.77. Contenido en catalasa en hojas de <i>Atnramp5</i> y WT, a diferentes tiempos de tratamiento con Cd mediante Western (A). Estudio de expresión mediante qRT-PCR en hojas (B) a diferentes tiempos de tratamiento con cadmio en WT y <i>Atnramp5</i>	182
Figura 4.78. Expresión relativa de <i>NRAMP5</i> en raíz mediante RT-PCR semicuantitativa en pNRAMP5::GUS, líneas 1.1 y 2.4 en condiciones control y de estrés por el tratamiento con cadmio 50 μ M durante 24 y 48 horas.	183
Figura 4.79. Tinción histoquímica mediante X-gluc (GUS) de las plantas control positivo, que expresan la FBPassa citosólica (A), la línea pNRAMP5::GUS 1.1 (B) y la línea pNRAMP5::GUS 2.1 (C).	184
Figura 4.80. Expresión relativa de <i>NRAMP5</i> en raíz (A) y en hoja (B) mediante RT-PCR semicuantitativa en los mutantes <i>NRAMP5::NRAMP5:GFP</i> , líneas 3.2 y 8.3 en condiciones control y de estrés por el tratamiento con cadmio 50 μ M.	185
Figura 4.81. Visualización de GFP en raíces tratadas con Cd 50 μ M durante 48 horas.	186
Figura 4.82. Inmunohistoquímica para la localización de GFP con revelado DAB.	187
Figura 4.83. Inmunohistoquímica para la localización de GFP en haces vasculares.	188
Figura 4.84. Inmunohistoquímica de GFP y visualización de núcleos.	188
Figura 4.85. Expresión relativa de <i>NRAMP5</i> en raíz mediante qRT-PCR en los mutantes <i>Atrboh C</i> , <i>Atrboh D</i> , <i>Atrboh F</i> y WT en condiciones control y de estrés por el tratamiento con cadmio 50 μ M durante 24 horas.	189
Figura 4.86. Porcentaje de germinación de <i>Atnramp5</i> y <i>NRAMP5::NRAMP5:GFP</i> líneas 3.2 y 8.3 respecto al WT en medio MS con diferentes concentraciones de Mn: 0, 200 μ M y 400 μ M.	192

Figura 4.87. Tasa de aparición de hojas verdaderas en plántulas de <i>Atnramp5</i> y <i>NRAMP5::NRAMP5:GFP</i> líneas 3.2 y 8.3 respecto de WT cultivadas en medio MS con diferentes concentraciones de Mn: 0, 200 μ M y 400 μ M.	193
Figura 4.88. Peso fresco de las plántulas de <i>Atnramp5</i> , <i>NRAMP5::NRAMP5:GFP</i> líneas 3.2 y 8.3 y WT de 10 días de crecimiento en placas de cultivo con diferentes concentraciones de Mn: 0, 200 μ M y 400 μ M.	194
Figura 4.89. Efecto del manganeso en el desarrollo de la raíz de plantas <i>Atnramp5</i> , <i>NRAMP5::NRAMP5:GFP</i> líneas 3.2 y 8.3 y WT tras 10 días de crecimiento en placas con MS conteniendo 0, 200 y 400 μ M de Mn.	195
Figura 4.90. Expresión relativa (vs <i>TUB</i>) mediante RT-PCR de <i>NRAMP5</i> en plántulas de 7 días de WT y <i>NRAMP5::NRAMP5:GFP</i> (8.3) crecidas en medios con diferentes concentraciones de Mn.	196
Figura 4.91. Porcentaje de germinación de <i>Atnramp5</i> y <i>NRAMP5::NRAMP5:GFP</i> líneas 3.2 y 8.3 respecto de WT en medio Hoagland control, exceso de hierro (4x) y ausencia de hierro. .	197
Figura 4.92. Tasa de aparición de hojas verdaderas en plántulas de <i>Atnramp5</i> y <i>NRAMP5::NRAMP5:GFP</i> líneas 3.2 y 8.3 respecto de WT cultivadas en medio Hoagland control, exceso de hierro 4x y ausencia de hierro.....	197
Figura 4.93. Peso fresco de las plántulas de <i>Atnramp5</i> , <i>NRAMP5::NRAMP5:GFP</i> líneas 3.2 y 8.3 y WT de 10 días de crecimiento en placas de cultivo en medio Hoagland 0.25x control, exceso de hierro (4x) y ausencia de hierro.....	198
Figura 4.94. Efecto del hierro en el desarrollo de la raíz de plantas <i>Atnramp5</i> , <i>NRAMP5::NRAMP5:GFP</i>	199
Figura 4.95. Expresión relativa (vs <i>TUB</i>) mediante RT-PCR de <i>NRAMP5</i> en plántulas de 7 días de WT crecidas en medios con diferentes concentraciones de hierro.	200
Figura 4.96. Localización de acúmulos de hierro en raíces de plántulas WT de 7 días mediante histoquímica de Perls	200
Figura 4.97. Tinción histoquímica de hierro (Perls) en hojas.	201
Figura 4.98. Localización de acúmulos de hierro mediante histoquímica de Perls, en el interior de los pelos radicales de las plantas <i>Atnramp5</i> , <i>NRAMP5::NRAMP5:GFP</i> 8.3 y WT	202
Figura 4.99. Porcentaje de germinación en el medio preparado con la enmienda 1(A), enmienda 2 (B), longitud de raíz (C) y peso fresco (D) de plántulas <i>Atnramp5</i> y WT crecidas en placa de cultivo durante 7 días en los diferentes medios.....	203

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Propiedades físico-químicas de los suelos de Alquife y Riotinto	26
Tabla 1.2. Principales características de los transportadores NRAMP en diferentes especies... 36	36
Tabla 1.3. Características y localización de las proteínas KUP de <i>Arabidopsis thaliana</i>	42
Tabla 3.1. Líneas mutantes y transgénicas empleadas.	64
Tabla 3.2. Composición del medio nutritivo Hoagland modificado para <i>Arabidopsis</i> sp.....	70
Tabla 3.3. Concentración de iones del medio Hoagland	71
Tabla 3.4. Composición del medio nutritivo MS	71
Tabla 3.5. Modificación de medios empleados	72
Tabla 3.6. Relación de anticuerpos empleados y sus condiciones de uso.	79
Tabla 3.7. Programa de temperatura para RT-PCR-semicuantitativa	82
Tabla 3.8. Programa de temperatura para iQ-RT-PCR	83
Tabla 3.9. Eficiencia y temperatura empleadas por cada pareja de oligonucleótidos para la RT-PCR	84
Tabla 3.10. Oligonucleótidos utilizados para comprobar la homocigosis de las líneas mutantes.	85
Tabla 3.11. Oligonucleótidos empleados para PCR cuantitativa y semicuantitativa.	86
Tabla 4.1. pH y concentraciones de metales presentes en los suelos de Alquife y Riotinto.	97
Tabla 4.2. Concentración de metales en los distintos medios utilizados.....	97
Tabla 4.3. Concentración final de metales en el medio conteniendo el 10 % de la concentración original en los suelos.....	98
Tabla 4.4. Concentración de metales en los distintos medios analizados.	99
Tabla 4.5. Germinación y crecimiento de las plántulas en los diferentes medios de la. Tabla 4.4. Se expresan con “+” la respuesta positiva y con “-” la negativa.....	101
Tabla 4.6. Concentraciones de metales utilizados para los distintos medios de AL1.	101
Tabla 4.7. Germinación y crecimiento a los 11 días de plántulas cultivadas con los medios de la Tabla 4.6.....	103
Tabla 4.8. Selección mutantes resistentes	107
Tabla 4.9. Selección mutantes sensibles	111

Tabla 4.10. Porcentaje de translocación de cadmio (Cd), cobre (Cu) y cromo (Cr) de raíces a la parte aérea en plantas <i>Athpp9</i> y <i>Atala4</i> y WT de 21 días expuestas durante 1 día a Cd 50 μ M, Cu 50 μ M y Cr 100 μ M.	123
Tabla 4.11. Efecto del tratamiento con la mezcla de metales pesados durante 1 día sobre el contenido de Fe, Mn y Zn (mg/Kg) de hojas y raíces y el % de translocación en WT, <i>Athpp9</i> y <i>Atala4</i>	123
Tabla 4.12. Efecto del tratamiento con la mezcla de metales pesados durante 1 día sobre el contenido de macronutrientes (g/100g) en hojas y raíces y el % de translocación de plantas WT, <i>Athpp9</i> y <i>Atala4</i>	124
Tabla 4.13. Porcentaje de translocación de cadmio (Cd), cobre (Cu) y cromo (Cr) de raíces a la parte aérea de plantas <i>Atkup8</i> , <i>Atkup1</i> y WT de 21 días expuestas durante 1 día a Cd 50 μ M, Cu 50 μ M y Cr 100 μ M.	142
Tabla 4.14. Efecto del tratamiento con metales pesados durante 1 día sobre el contenido de Fe, Mn y Zn (mg/Kg) de hojas y raíces y el % de translocación en <i>Atkup8</i> , <i>Atkup1</i> y WT.	144
Tabla 4.15. Efecto del tratamiento con mezcla de metales pesados durante 1 día sobre el contenido de macronutrientes (g/100g) en hojas y raíces y el % de translocación en plantas WT, <i>Atkup8</i> , <i>Atkup1</i>	145
Tabla 4.16. Porcentaje de translocación de cadmio (Cd) de raíces a la parte aérea de plantas <i>Atkup8</i> y WT de 21 días expuestas durante 1 día a Cd 50 μ M.	148
Tabla 4.17. Efecto del tratamiento con Cd 50 μ M durante 1 día sobre el contenido de Fe, Mn y Zn (mg/Kg) de hojas y raíces y el % de translocación de WT y <i>Atkup8</i>	148
Tabla 4.18. Efecto del tratamiento con Cd 50 μ M durante 1 día sobre el contenido de macronutrientes (g/100g) en hojas y raíces y el % de translocación de plantas WT y <i>Atkup8</i>	149
Tabla 4.19. Parámetros estudiados en <i>Atkup8</i> en los tratamientos con Cd y la mezcla de metales.	153
Tabla 4.20. Contenido total y % de translocación de Cd, Cr y Cu en hojas y raíces, en el mutante <i>Atnramp5</i> y en plantas WT. Los mutantes se cultivaron en condiciones hidropónicas durante tres semanas y después se añadió la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu) durante 24 h.	169
Tabla 4.21. Análisis mediante ICP de los micronutrientes (Fe, Mn y Zn) en parte aérea y raíces, en el mutante <i>Atnramp5</i> y en WT. Las plantas se cultivaron en condiciones de hidroponía durante tres semanas y después se añadió la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu) durante 24 h.	170
Tabla 4.22. Análisis mediante ICP de los macronutrientes en hojas y raíces del mutante <i>Atnramp5</i> y en WT. Las plantas se cultivaron en condiciones de hidroponía durante tres semanas y después se añadió la mezcla de metales (Cd+Cr+Cu) durante 24 h.	171
Tabla 4.23. Porcentaje de translocación y contenido total de Cd en plantas de <i>Atnramp5</i> y WT de 21 días expuestas durante 1 día a Cd 50 μ M.	179
Tabla 4.24. Efecto del tratamiento de Cd 50 μ M durante 24 h sobre el contenido de Fe, Mn y Zn en hojas y raíces, el contenido total de los mismos y el % de translocación en el mutante <i>Atnramp5</i>	

y el WT. Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes \pm SD, cada uno con tres repeticiones..... 179

Tabla 4.25. Efecto del tratamiento de Cd 50 μ M durante 24 h sobre el contenido de macronutrientes (g/100g) en hojas y raíces, el contenido total de los mismos y el % de translocación de WT y *Atnramp5*..... 180

Tabla 4.26. Parámetros estudiados y su respuesta para NRAMP5 en ambos tratamientos..... 190

