

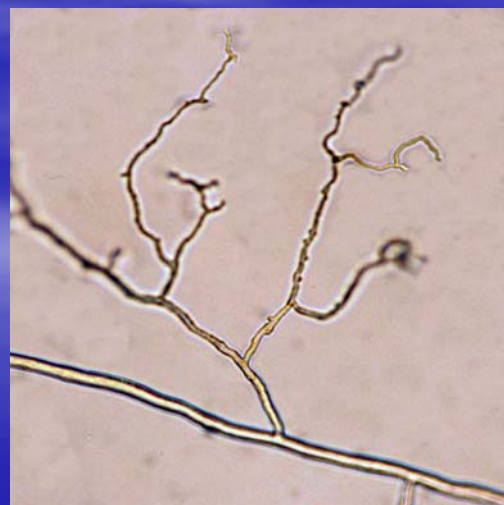
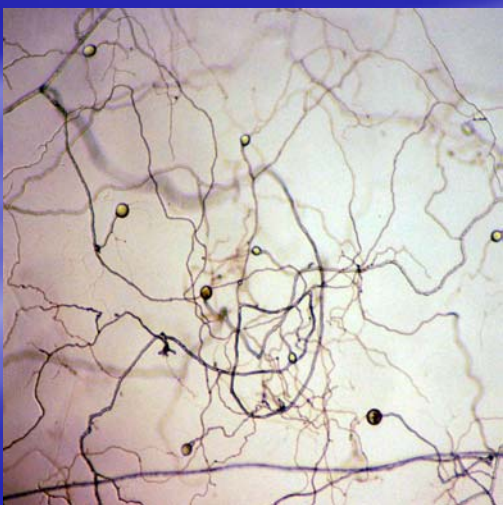
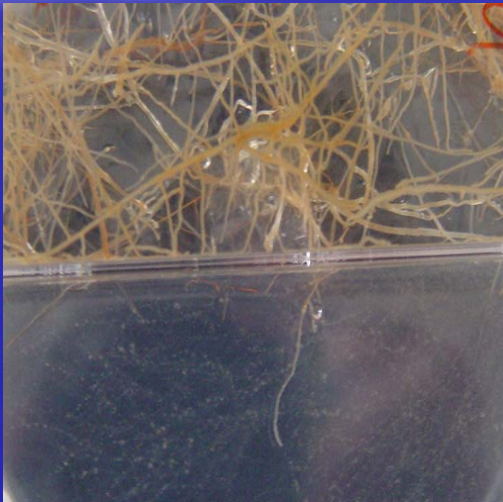


Universidad de Granada  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas



## TESIS DOCTORAL

Estudio de los mecanismos implicados en la  
homeostasis de metales pesados en el hongo formador  
de micorrizas arbusculares *Glomus intraradices*



Manuel González Guerrero  
Granada, 2005

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Manuel González Guerrero  
D.L.: Gr. 729 - 2005  
ISBN: 84-338-3368-5



**Universidad de Granada**  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

**Estudio de los mecanismos implicados en la homeostasis  
de metales pesados en el hongo formador de micorrizas  
arbusculares *Glomus intraradices***

**Manuel González Guerrero**  
**Granada, 2005**



**Estudio de los mecanismos implicados en la homeostasis  
de metales pesados en el hongo formador de micorrizas  
arbusculares *Glomus intraradices***

Memoria que presenta el Licenciado en  
Bioquímica Manuel González Guerrero  
para aspirar al Título de Doctor

Fdo. Manuel González Guerrero

VºBº

Las Directoras

Fdo. D<sup>a</sup>. Concepción Azcón González de Aguilar  
Doctora en Biología  
Profesor de Investigación del C.S.I.C.

Fdo. D<sup>a</sup>. Nuria Ferrol González  
Doctora en Química  
Científico Titular del C.S.I.C.

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
2005



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín (C.S.I.C.), Granada, y financiada mediante una beca predoctoral FPU del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte y por el Proyecto de Investigación titulado "Genes and genetic engineering for arbuscular mycorrhizal technology and applications in sustainable agriculture (GENOMYCA)" ref QLK5-CT-2000-01319.





**A mis padres**

<b>INTERÉS DEL TRABAJO</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b>	5
<b>1. MICORRIZAS</b>	7
<b>1.1. Tipos de micorriza</b>	7
<b>2. MICORRIZAS ARBUSCULARES</b>	9
<b>2.1. Características generales de los hongos formadores de micorrizas arbusculares</b>	9
<b>2.2. Filogenia de los hongos micorrícicos</b>	11
<b>2.3. Ciclo de vida de los hongos formadores de micorrizas arbusculares</b>	12
2.3.1. Germinación de las esporas y etapas de precolonización	13
2.3.2. Colonización intraradical	15
2.3.3. Micelio extraradical	17
<b>2.4. Fisiología de la simbiosis</b>	18
2.4.1. Metabolismo del carbono	18
2.4.2. Nutrición mineral	20
2.4.2.1. <i>Nutrición fosforada</i>	21
2.4.2.2. <i>Nutrición nitrogenada</i>	23
2.4.2.3. <i>Micronutrientes</i>	24
<b>2.5. Hongos micorrícicos y metales pesados</b>	25
<b>3. MECANISMOS MOLECULARES DE CONTROL DE LA HOMEOSTASIS E METALES PESADOS EN EUCARIOTAS</b>	28
<b>3.1. A nivel extracelular</b>	28
<b>3.2. La barrera de la pared celular</b>	29
<b>3.3. La transferencia a través de la membrana plasmática</b>	29
3.3.1. Transportadores que introducen metales en el citosol	30
3.3.1.1. <i>Familia ZIP (Zrt1-Irt1-like Proteins)</i>	30
3.3.1.2. <i>Familia Nramp (Natural resistance associated macrophage protein)</i>	32
3.3.1.3. <i>Familia Ctr (Cu transporter)</i>	33
3.3.2. Transportadores que extraen metales del citosol	34
3.3.2.1. <i>Familia CDF (Cation Diffusion Facilitator)</i>	34
3.3.2.2. <i>Familia de transportadores ABC (ATP binding cassette)</i>	35
3.3.2.3. ATPasas de tipo P de la subfamilia CPx	36
<b>3.4. Quelación a nivel citoplasmático</b>	37
3.4.1. Glutathion y Fitoquelatinas	37
3.4.2. Metalotioneínas	39

3.4.3. Metalochaperonas	40
<b>3.5. Metales pesados y defensas antioxidantes</b>	41
<b>Objetivos</b>	42
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	45
<b>1. MATERIALES BIOLÓGICOS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO</b>	47
<b>1.1. Materiales biológicos</b>	47
1.1.1. Micorriza (cultivo monoxénico)	47
1.1.1.1. Establecimiento de los cultivos	47
1.1.1.2. Tratamientos con metales pesados y paraquat	48
1.1.2. Cepas de levadura	48
1.1.3. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	49
1.1.4. Mantenimiento de las cepas	50
<b>1.2. Medios de cultivo</b>	50
1.2.1. Medio para el cultivo monoxénico de hongos micorrícicos	50
1.2.2. Medios para el cultivo de <i>S. cerevisiae</i>	51
1.2.2.1. Medio YPD (Yeast extract-Peptone-Dextrose)	51
1.2.2.2. Medio SD (Synthetic Dextrose)	51
1.2.2.3. Medio LZM (Low Zn Medium)	52
1.2.2.4. Medio YPGE (Yeast extract-Peptone-Glycerol-Ethanol)	52
1.2.3. Medios de cultivo para <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	53
1.2.3.1. Medio YES (Yeast extract with supplementation)	53
1.2.3.2. Medio EMM (Edinburgh Minimal Medium)	53
1.2.4. Medios de cultivo de <i>E. coli</i>	54
1.2.4.1. Medio LB (Luria Bertani)	54
1.2.4.2. Medio SOC	54
<b>2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR</b>	55
<b>2.1. Plásmidos</b>	55
<b>2.2. Aislamiento de ADN</b>	57
2.2.1. Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	57
2.2.2. Extracción de ADN plasmídico de <i>S. cerevisiae</i>	57
2.2.3. Extracción de ADN genómico de <i>G. intraradices</i>	58
2.2.3.1. Recuperación del micelio extraradical de <i>G. intraradices</i>	58
2.2.3.2. Extracción de ADN	58
<b>2.3. Cuantificación de ADN</b>	58
<b>2.4. Visualización del ADN mediante electroforesis en geles de agarosa</b>	59

<b>2.5. Reacción en cadena de la polimerasa</b>	59
<b>2.6. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción</b>	61
<b>2.7. Desfosforilación de vectores de clonación</b>	61
<b>2.8. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa</b>	62
<b>2.9. Ligación en vectores de clonación</b>	62
2.9.1. Productos de PCR	62
2.9.1.1. Ligación en <i>pGEM-T Easy</i>	62
2.9.1.2. Ligación en <i>TOPO pYES 2.1</i>	62
2.9.2. Ligación de fragmentos de restricción	63
2.9.3. Ligación mediante recombinación homóloga	63
<b>2.10. Transformación</b>	63
2.10.1. Transformación de células de <i>E. coli</i>	63
2.10.1.1. Preparación de células quimiocompetentes	63
2.10.1.2. Preparación de células electrocompetentes	64
2.10.1.3. Transformación de células quimiocompetentes	65
2.10.1.4. Transformación de células electrocompetentes	65
2.10.2. Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	66
2.10.3. Transformación de <i>S. pombe</i>	66
<b>2.11. Paseo cromosómico</b>	67
<b>2.12. Escrutinio de genotecas</b>	67
2.12.1. Obtención de placas líticas	67
2.12.2. Transferencia de ADN a membranas de nitrocelulosa	68
2.12.3. Marcaje de la sonda	69
2.12.4. Hibridación y autorradiografía	69
<b>2.13. Extracción de ARN</b>	70
2.13.1. Extracción de ARN de <i>S. cerevisiae</i>	70
2.13.2. Extracción de ARN de <i>G. intraradices</i>	70
2.13.3. Cuantificación del ARN	71
2.13.4. Visualización del ARN mediante electroforesis en geles de agarosa	71
<b>2.14. Técnicas de RACE</b>	72
<b>2.15. Análisis de PCR cuantitativa a tiempo real</b>	72
2.15.1. Síntesis de ADNc	72
2.15.2. PCR	73
<b>2.16. Secuenciación</b>	74
<b>3. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS</b>	75

<b>3.1. Extracción de proteínas de levadura</b>	75
<b>3.2. Cuantificación de proteínas</b>	75
<b>3.3. Gel desnaturizante de poliacrilamida</b>	75
<b>3.4. Tinción de las proteínas en los geles</b>	76
<b>3.5. Western blot</b>	76
3.5.1. Transferencia de proteínas a membrana	76
3.5.2. Inmunodetección	77
<b>3.6. Análisis de la actividad <math>\beta</math>-galactosidasa</b>	77
<b>4. MÉTODOS DE MICROSCOPIA</b>	78
<b>4.1. Cuantificación del micelio externo</b>	78
<b>4.2. Inmunofluorescencia</b>	79
<b>4.3. Análisis elemental mediante espectroscopía de difracción de rayos-X (EDXS)</b>	79
4.3.1. Preparación de las muestras	79
4.3.2. Análisis elemental	81
<b>5. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS</b>	81
<b>5.1. Identificación de secuencias de interés en bases de datos</b>	81
<b>5.2. Diseño de cebadores</b>	82
<b>5.3. Comparación de múltiples secuencias</b>	82
<b>5.4. Análisis de promotores</b>	82
<b>5.5. Obtención de la secuencia aminoacídica</b>	82
<b>5.6. Predicción de la topología de proteínas transmembrana</b>	83
<b>5.7. Predicción de la estructura terciaria de proteínas solubles</b>	83
<b>6. MÉTODOS ESTADÍSTICOS</b>	83
<b>RESULTADOS</b>	85
<b>1. ESTUDIO DE LA RESPUESTA MORFOGENÉTICA DE <i>G. INTRARADICES</i> A LOS METALES PESADOS</b>	87
<b>1.1. Morfogénesis de <i>G. intraradices</i> en presencia de Cd</b>	87
<b>1.2. Morfogénesis de <i>G. intraradices</i> en presencia de Zn</b>	87
<b>1.3. Morfogénesis de <i>G. intraradices</i> en presencia de Cu</b>	88
<b>2. LOCALIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE METALES PESADOS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE RAYOS X (EDXS)</b>	93
<b>2.1. Localización de Zn</b>	95
<b>2.2. Localización de Cu</b>	95
<b>2.3. Localización de Cd</b>	96
<b>3. IDENTIFICACIÓN DE LOS MECANISMOS MOLECULARES DE HOMEOSTASIS DE METALES PESADOS EN <i>G. INTRARADICES</i></b>	97

<b>3.1. Aislamiento y caracterización del transportador de Zn</b>	
<b><i>GintZnT1</i></b>	98
3.1.1. Clonación de <i>GintZnT1</i>	98
3.1.2. Aislamiento y análisis de la secuencia del promotor de <i>GintZnT1</i>	102
3.1.3. Expresión ectópica de <i>GintZnT1</i>	103
3.1.4. Regulación de <i>GintZnT1</i> por metales pesados	105
3.1.5. Regulación de <i>GintZnT1</i> por estrés oxidativo	108
<b>3.2. Aislamiento y caracterización del transportador ABC</b>	
<b><i>GintABC1</i></b>	109
3.2.1. Clonación de <i>GintABC1</i>	109
3.2.2. Regulación de <i>GintABC1</i> por metales pesados	110
3.2.3. Regulación de <i>GintABC1</i> por estrés oxidativo	112
<b>3.3. Aislamiento y caracterización de la metalotioneína</b>	
<b><i>GintMT1</i></b>	113
3.3.1. Clonación y análisis de la secuencia de <i>GintMT1</i>	113
3.3.2. Aislamiento y análisis del promotor de <i>GintMT1</i>	115
3.3.3. Expresión ectópica de <i>GintMT1</i>	117
3.3.4. Regulación de <i>GintMT1</i> por metales pesados	117
3.3.5. Regulación de <i>GintMT1</i> por estrés oxidativo	119
<b>3.4. Aislamiento de genes que codifican para fitoquelatín sintasas</b>	120
<b>3.5. Aislamiento y caracterización de la Cu,Zn superóxido dismutasa <i>GintSOD1</i></b>	120
3.5.1. Clonación y análisis de la secuencia de <i>GintSOD1</i>	121
3.5.2. Regulación de <i>GintSOD1</i> por metales pesados	124
3.5.3. Regulación de <i>GintSOD1</i> por estrés oxidativo	126
<b>4. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA TOLERANCIA A METALES PESADOS EN GLOMUS sp. RIOTINTO</b>	127
<b>DISCUSIÓN</b>	131
<b>CONCLUSIONES</b>	145
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	149

**INTERÉS  
DEL  
TRABAJO**





La industrialización global provoca la liberación de grandes cantidades de compuestos potencialmente tóxicos a la biosfera, entre los que destacan los metales pesados, como Cd, Hg, Pb, Zn o Ni. En las últimas cinco décadas, la liberación global de metales pesados ha llegado a alcanzar las 22000 toneladas de Cd, 939000 de Cu, 783000 de Pb y 1350000 de Zn. Es obvio que la acumulación de estos elementos en el suelo tiene un impacto negativo en los agrosistemas y ecosistemas naturales. De hecho, en algunas zonas del mundo las concentraciones de metales son tales que hacen incompatible la presencia de muchas formas de vida, o bien, en sus casos menos extremos, su acumulación en las cadenas tróficas puede llevar a la intoxicación de numerosas especies, incluida la humana. Debido al aumento de la concienciación pública hacia el problema de la contaminación en los últimos años comenzaron a promoverse estrategias destinadas a la recuperación de los suelos contaminados con metales pesados. Dentro de estas estrategias, la biorremediación, es decir, el uso de seres vivos para recuperar zonas contaminadas, está cobrando gran protagonismo. En el caso de los suelos contaminados con metales pesados, especialmente interesante es la fitorremediación, el uso de plantas para la descontaminación. Sobre esta estrategia se han escrito numerosos trabajos y revisiones, que arrojan resultados que han llevado a ponerlas en práctica en la recuperación de suelos contaminados como consecuencia de accidentes como los de Chernobyl o de Aznalcollar.

Hay que tener en cuenta, sin embargo, que en condiciones naturales las plantas no viven solas, sino en estrecha asociación con una amplia variedad de microorganismos, con los cuales interactúan a distintos niveles, inmersas en una compleja red de flujos de energía y nutrientes. En este sentido, no hay que olvidar que entorno al 90% de las plantas terrestres forman micorrizas, asociaciones entre plantas y hongos del suelo que aumentan la capacidad de absorción de nutrientes por la planta y la protegen frente a estreses bióticos y abióticos. En general, se ha observado que las plantas micorrizadas se desarrollan mejor en suelos deficientes en micronutrientes, pero que, a su vez, toleran mejor los ambientes contaminados con metales. Podría considerarse en ese sentido que las micorrizas actúan como tamponadores de la concentración de metal en la planta. Sin embargo, pese a la importancia de esta asociación simbiótica, pocos estudios han abordado en profundidad las razones subyacentes en estos efectos.

Es por ello que, en esta Tesis Doctoral nos propusimos como objetivo fundamental el estudio de los mecanismos que controlan la homeostasis de metales pesados por hongos formadores de micorrizas arbusculares, el tipo de micorriza más extendido en la naturaleza y probablemente la asociación simbiótica de plantas más universal que existe.

**INTRODUCCIÓN**  
**Y**  
**OBJETIVOS**



## 1. MICORRIZAS

Las micorrizas son asociaciones simbióticas mutualistas que se establecen entre plantas y hongos del suelo. Probablemente se trate del tipo de simbiosis más extendido en la biosfera, ya que entorno al 90 % de las plantas terrestres son capaces de establecer algún tipo de micorrizas (Smith & Read 1997). El hongo ayuda a la planta a absorber nutrientes minerales del suelo y a cambio la planta le cede al hongo compuestos carbonados derivados de la fotosíntesis. El mantenimiento de esta asociación simbiótica se debe principalmente al papel crucial que el hongo desempeña en la nutrición mineral de la planta colonizada, de forma que fue posiblemente el establecimiento de esta simbiosis lo que permitió la colonización de la superficie terrestre por las plantas (Simon *et al.* 1993; Redecker *et al.* 2000). Sin embargo, el papel de las micorrizas no sólo se limita a mejorar la nutrición mineral de las plantas, sino que también contribuyen a la protección de las mismas frente a patógenos del suelo y a una mayor tolerancia frente a estreses abióticos (salino, hídrico o debido a la presencia de metales pesados) (Van Tichelen *et al.* 2001; Azcón-Aguilar *et al.* 2002; Ruiz-Lozano 2003).

### 1.1. Tipos de micorriza

En base a su estructura y al tipo de plantas y hongos implicados, las micorrizas se clasifican en tres grandes grupos (esquemático en la Figura 1):

- Ectomicorrizas. Suponen aproximadamente un 3 % de las asociaciones micorrícicas (Meyer 1973) y se presentan principalmente en especies de interés forestal: Fagáceas, Pináceas, Betuláceas, Quercíneas, etc... Se caracterizan porque las hifas del hongo (normalmente un basidiomiceto y también algunos ascomicetos) no penetran en el interior de las células vegetales, sino que se limitan a desarrollarse entre los espacios intercelulares del córtex de la raíz, formando la denominada red de Hartig. La superficie de la raíz queda rodeada por un entramado denso de hifas que constituyen el denominado "manto" (Smith & Read 1997).
- Endomicorrizas. Se caracterizan porque no forman manto y las hifas penetran en las células de la epidermis y/o del córtex de la raíz.
- Ectendomicorrizas. Son las menos extendidas y presentan características comunes con los otros dos tipos generales de micorrizas, ya que pueden formar un manto más o menos desarrollado, red de Hartig y existe una

ligera penetración de las hifas en las células de la corteza, en las que forman enrollamientos u ovillos (Yu *et al.* 2001). Este tipo de micorriza lo suelen formar especies de basidiomicetos con plantas arbutoides o monotropales fundamentalmente. Los hongos implicados pueden también formar ectomicorrizas con árboles de la misma zona

Las endomicorrizas son las más frecuentes en la naturaleza y dentro de ellas se distinguen:

- Orquidoides. Formada por basidiomicetos y plantas de la familia Orquidaceae. En esta asociación, la planta, que presenta una fase heterótrofa en su ciclo de vida, recibe compuestos carbonados a partir del hongo (Smith 1966). Éste penetra en las células de la raíz, invagina la membrana y forma ovillos dentro de la célula, así como agregados de hifas poco estructurados, conocidos como "pelotones", que al degenerar liberan los nutrientes que contienen.
- Ericoides. Formada por ascomicetos o basidiomicetos y plantas de la familia de las Ericáceas. El componente fúngico de esta simbiosis presenta una gran versatilidad en el uso de distintas fuentes de C, N y P, orgánicas o no, lo que contribuye significativamente a la capacidad de las plantas que forman este tipo de micorrizas para crecer en suelos con un alto contenido orgánico (Pearson & Read 1975; St-John *et al.* 1985).
- Arbusculares. Las micorrizas arbusculares las forman entre el 80 y el 85 % de todas las plantas terrestres (Smith & Read 1997) y los hongos del phylum Glomeromycota (Schüßler *et al.* 2001). El hongo es capaz de penetrar las células del córtex de la raíz, en las que se ramifica dicotómicamente de forma repetida para dar lugar a los arbuscúlos, estructuras típicas de la colonización de estos hongos. Antes se conocían también como vesículo-arbusculares, en base a unas estructuras globosas, las vesículas, que contienen sustancias de reserva y que forman algunas especies de hongos micorrícicos en el interior de la raíz. Sin embargo, dado que no todas las especies de hongos micorrícicos son capaces de formar vesículas, es término ha caído bastante en desuso.

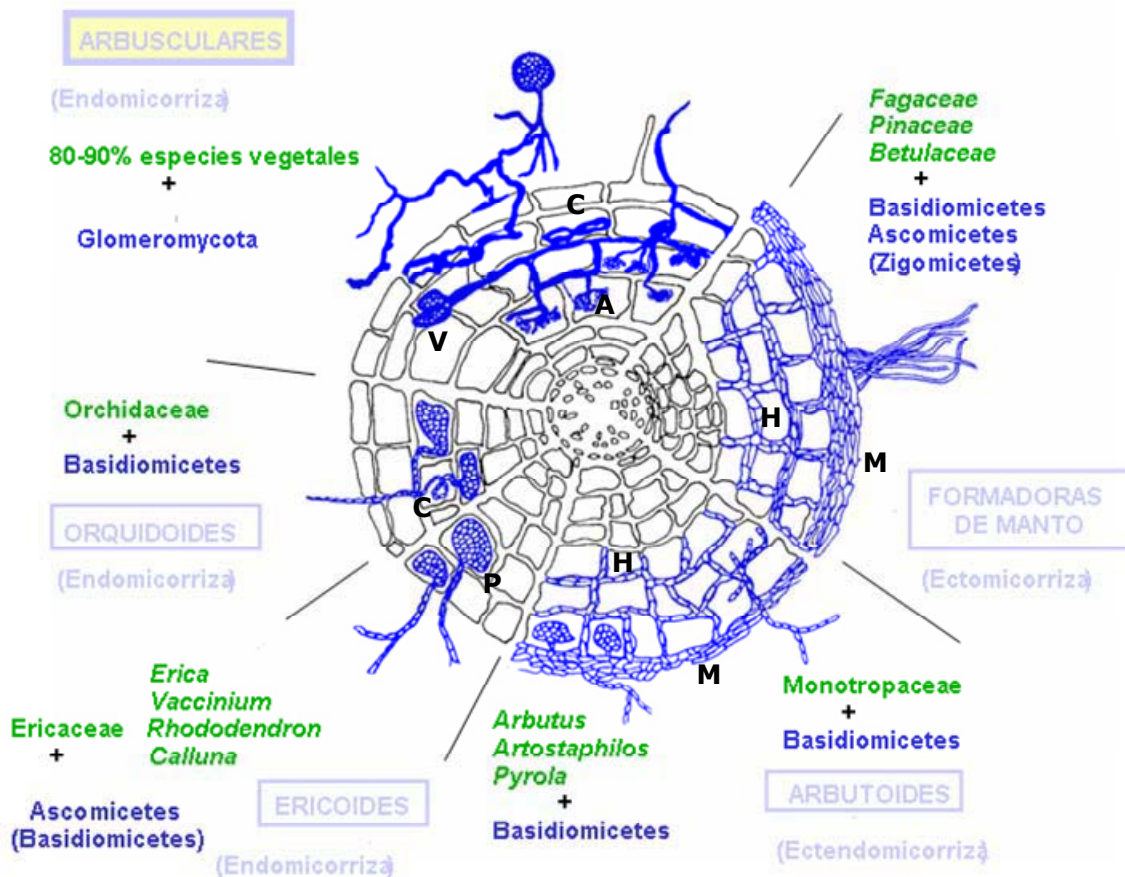


Figura 1. Tipos de micorrizas y simbiosis implicados en la formación de las mismas. Se representa en azul el desarrollo del micelio en cada tipo de micorriza. Leyenda: M= manto, H = red de Hartig, P= agregados de hifas o "pelotones", C=ovillos o "coils", A=arbuscúlos, V=vesículas. Modificación de esquema cedido por José Miguel Barea.

## 2. MICORRIZAS ARBUSCULARES

La presente Memoria de Tesis Doctoral ha tenido como objetivo los hongos formadores de micorrizas arbusculares, de modo que a partir de aquí nos vamos a centrar exclusivamente en la exposición de los hechos más relevantes al tema en micorrizas arbusculares, a las que, por brevedad expositiva, nos referiremos simplemente como micorrizas.

### 2.1. Características generales los hongos formadores de micorrizas arbusculares

Los hongos micorrícicos son organismos biotrofos obligados que para completar su ciclo de vida necesitan colonizar una planta susceptible (planta hospedadora) y establecer la simbiosis. Esta íntima asociación entre hongos micorrícicos y plantas terrestres tiene una antigüedad de más de 460 millones de



años (Redecker *et al.* 2000), lo que ha condicionado decisivamente la biología de estos hongos. No se les conoce ninguna fase de reproducción sexual, pero sí la formación de esporas de resistencia sobre hifas vegetativas. Se trata de esporas multinucleadas, con un número de núcleos que oscila desde los 720 de *Scutellospora castanea* (Hosny *et al.* 1998) a 2600 para especies del género *Gigaspora* (Cooke *et al.* 1987; Bécard & Pfeffer 1993). Asimismo, estos hongos, especialmente los miembros del género *Gigaspora*, pueden ser hospedadores de bacterias endosimbióticas (Bianciotto *et al.* 1996) de función y origen desconocidos, e incapaces, al igual que los propios hongos que los albergan, de una fase de vida independiente (Jargeat *et al.* 2004).

El contenido en ADN de los núcleos varía notablemente en función de la especie de hongo micorrizico, desde las 16.54 Mb de *Glomus intraradices* (Hijri & Sanders 2004), a las 1058 Mb de *Scutellospora gregaria* (Hosny *et al.* 1998). Este genoma consta tanto de secuencias de copia única, como de secuencias repetidas, ocupando estas últimas entorno al 1.6% del genoma de *Glomus intraradices* (Hijri & Sanders 2004). Estas secuencias repetidas pueden ser muy numerosas, como las 2600 copias de la secuencia SC1 encontrada en *S. castanea* (Hosny *et al.* 1999), aunque existen muchas otras de número más reducido repartidas por el genoma (Gollotte A., comunicación personal). No se han encontrado transposones, pero sí secuencias con homología con Long Terminal-Repeats (LTRs) de retrotransposones.

El genoma de estos hongos se caracteriza también por un contenido muy bajo de GC, entorno al 30-35 % (Hosny *et al.* 1997), con casi el 25% de la cisteína metilada, algo sorprendentemente alto en hongos. A modo de ejemplo, *Neurospora crassa* presenta tan sólo un 1-2 % del total de la cisteína metilada (Russell *et al.* 1987).

Existen, además, indicios de que los núcleos de una misma espóra no son iguales, lo que se manifiesta por la presencia de polimorfismos a nivel del ADN ribosómico de una misma espóra (Clapp *et al.* 2001), así como en el número de estos loci en un mismo núcleo (Trouvelot *et al.* 1999). Sin embargo, este último aspecto necesita aún ser confirmado, puesto que existen evidencias en contra de un modelo heterocariótico en el que los polimorfismos fueran variantes en un mismo núcleo (Pawlowska & Taylor 2002). También resulta polémico el tipo de multiplicación nuclear, clonal o con recombinación, con evidencias en ambos sentidos (Rosendahl & Taylor 1997; Vandenkoornhuyse *et al.* 2001).

Al margen de hipotéticos eventos de recombinación nuclear, los hongos micorrícicos podrían aumentar su patrimonio genético mediante el intercambio de núcleos de unas colonias fúngicas a otras. Las hifas de los hongos micorrícicos son cenocíticas y en repetidas ocasiones (Giovannetti *et al.* 2001; de la Providencia *et al.* 2005) se ha puesto de manifiesto la presencia de anastomosis entre hifas de micelios distintos, aunque pertenecientes a aislados de la misma especie, a través de las cuales se ha puesto de evidenciado la transferencia de núcleos de unas hifas a otras (Giovannetti *et al.* 2001).

## **2.2. Filogenia de los hongos micorrícicos**

El origen de los hongos micorrícicos se remonta al Ordovicio (hace 460 millones de años), como sugieren tanto los registros fósiles, como los resultados de la datación molecular (Redecker *et al.* 2000; Schüßler *et al.* 2001). Es en este periodo de tiempo cuando se está produciendo la colonización del medio terrestre por las plantas a partir de un medio acuoso. Se ha hipotetizado que los hongos micorrícicos tuvieron un papel determinante en esta transición (Malloch *et al.* 1980), ayudando a los antecesores de las plantas actuales en la absorción de nutrientes de baja movilidad, como el fosfato, y de agua. Hoy día perduran evidencias de esta temprana asociación de hongos micorrícicos con plantas primitivas, como son las asociaciones con briófitos (Schüßler 2000). La historia evolutiva de los hongos micorrícicos es crucial para el entendimiento del origen monofilético o no de estos hongos.

Los intentos de clasificar los hongos formadores de micorrizas arbusculares se remontan a finales del siglo XIX - principios del XX, cuando se incluían en la familia Endogonaceae, dentro del phylum Zygomycota, basándose principalmente en el parecido de esporas y esporocarpos a los de los zigomicetos (revisado por (Gerdemann & Trappe 1974). Por entonces no era evidente el posible origen monofilético de estos hongos, es decir, que compartieran o no un ancestro común. Hoy día, en base al análisis de la subunidad pequeña del ARNr se ha podido determinar su origen monofilético y se han agrupado en un nuevo phylum, denominado Glomeromycota. Este phylum se encontraría más próximo de los ascomicetos y basidiomicetos, con los que compartiría un ancestro común, que de los zigomicetos (Schüßler *et al.* 2001). Incluye una sola clase, los Glomeromycetes y cuatro órdenes, como se refleja en la Figura 2 B.

Un aspecto destacable de esta nueva clasificación es que el género *Glomus*, antes clasificado en base a criterios morfológicos y estructurales, se ha escindido en, al menos, tres familias distintas: Glomeraceae A, B y Diversisporaceae. Este hecho da idea de que bajo la aparente uniformidad de morfotipos de hongos micorrícicos se esconde una gran diversidad genética y, posiblemente, funcional aún por describir.

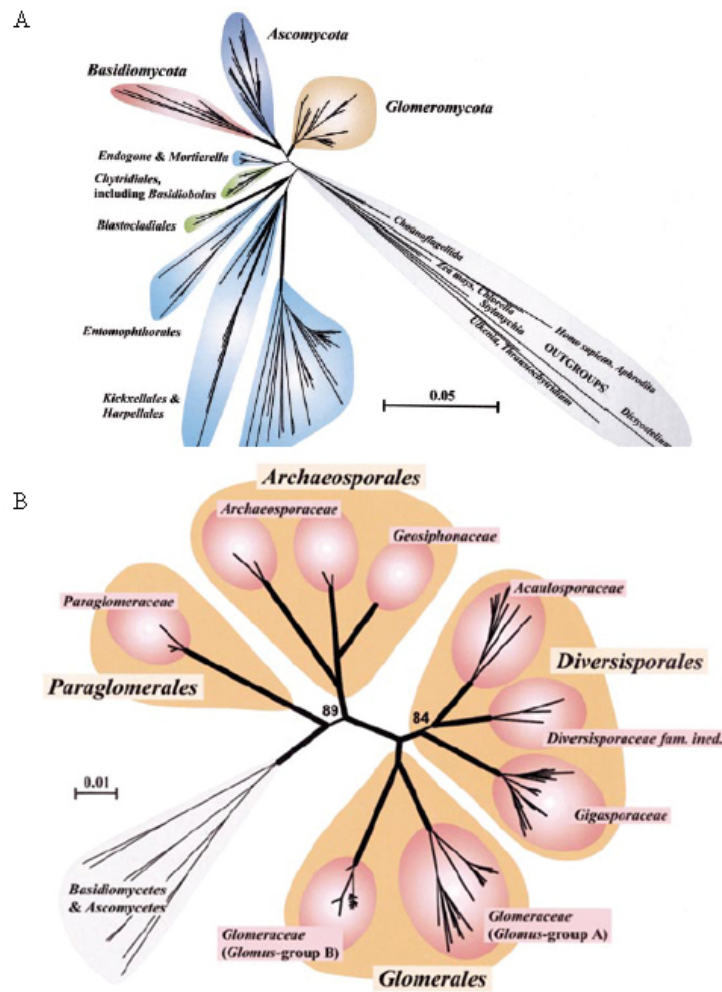


Figura 2. Filogenia propuesta para los hongos formadores de micorrizas arbusculares basadas en las secuencias de la subunidad pequeña (SSU) del ARNr (A). Estructura taxonómica propuesta del phylum Glomeromycota en base a las secuencias de la SSU del ARNr (B). Tomado de Schüßler *et al.* (2001).

### 2.3. Ciclo de vida de los hongos formadores de micorrizas arbusculares

Como se ha señalado con anterioridad, los hongos micorrícicos son simbiontes estrictos que necesitan colonizar la raíz de una planta susceptible de formar micorrizas para completar su ciclo de vida. A continuación se describen las distintas etapas del mismo, que se resumen esquemáticamente en la Figura 3.

### 2.3.1. Germinación de las esporas y etapas de precolonización

Los hongos micorrícicos producen esporas de origen asexual, caracterizadas por contener un gran número de núcleos y de glóbulos lipídicos. El ciclo de vida se inicia con la germinación de las esporas. Este es un proceso independiente de la presencia de la planta hospedadora, que no requiere más que de unas condiciones adecuadas de humedad y temperatura. Sin embargo, se sabe que determinados factores físicos, como la vernalización previa de las esporas (Hepper 1981), químicos, como concentraciones elevadas de CO<sub>2</sub> y presencia de exudados radicales (Becard & Piché 1989) y biológicos, derivados de la presencia de una amplia variedad de hongos y bacterias del suelo (Azcón-Aguilar *et al.* 1986; Azcón 1987; Hildebrandt *et al.* 2002) aceleran el ritmo de germinación de las esporas. La germinación se evidencia por la formación de uno o varios tubos de germinación y va acompañada de una activación del metabolismo de la espora, reflejado en cambios en la estructura nuclear y en la replicación del ADN (Sward 1981; Bonfante-Fasolo 1984). Durante la germinación el número de núcleos aumenta considerablemente, pasando de los 800 – 2000 que se encontraban en la espora en reposo, a casi 30.000. También incrementa la actividad mitocondrial y de sistemas enzimáticos como la H<sup>+</sup>-ATP-asa, principal responsable del transporte iónico. Esta actividad se localiza fundamentalmente en el ápice del tubo de germinación (Beilby & Kidby 1982; Tamasloukht *et al.* 2003). En los primeros días de su desarrollo, el tubo de germinación consume trehalosa (Bécard *et al.* 1991) y posteriormente pasa a consumir triglicéridos (Beilby 1980).

El tubo de germinación produce un micelio que, en ausencia de planta hospedadora, alcanza un desarrollo muy limitado. Sin embargo, en presencia de raíces de especies micotróficas, o de los exudados radicales que producen, el micelio alcanza un mayor desarrollo, aumentando especialmente su grado de ramificación (Gianinazzi-Pearson *et al.* 1989; Tamasloukht *et al.* 2003). Esta estimulación no se produce en las proximidades de las raíces de plantas no hospedadoras, o cuando los exudados proceden de especies no micotróficas. Se desconoce la identidad del componente de los exudados radicales responsable de este efecto, pero sí se sabe que no tiene una naturaleza flavínica (Buee *et al.* 2000).

Al igual que el hongo reacciona ante la presencia de una planta hospedadora, también ésta se prepara para el establecimiento de la simbiosis. Así, en presencia del hongo se inicia el desarrollo de un programa genético que es, en parte, similar al desencadenado en leguminosas en presencia de su *Rhizobium*

específico. Esto se ha puesto de manifiesto en leguminosas mutantes afectadas en la nodulación, que también tienen alterada la formación de micorrizas (Balagi *et al.* 1994; Albrecht *et al.* 1998). En este sentido se ha comprobado que factores difusibles producidos por hongos micorrícicos son capaces de activar genes de la nodulación, como ENOD11 (Kosuta *et al.* 2003), activación que se restringe a la zona de la raíz en contacto con el hongo (Chabaud *et al.* 2002). Sin embargo, pese a compartir vías comunes de señalización, la simbiosis con los hongos micorrícicos y con los rizobios presentan distintas rutas de integración de la señal, lo que se refleja en que determinados mutantes que no responden a factores Nod, no pierden la capacidad de responder a los hongos micorrícicos (Chabaud *et al.* 2002).

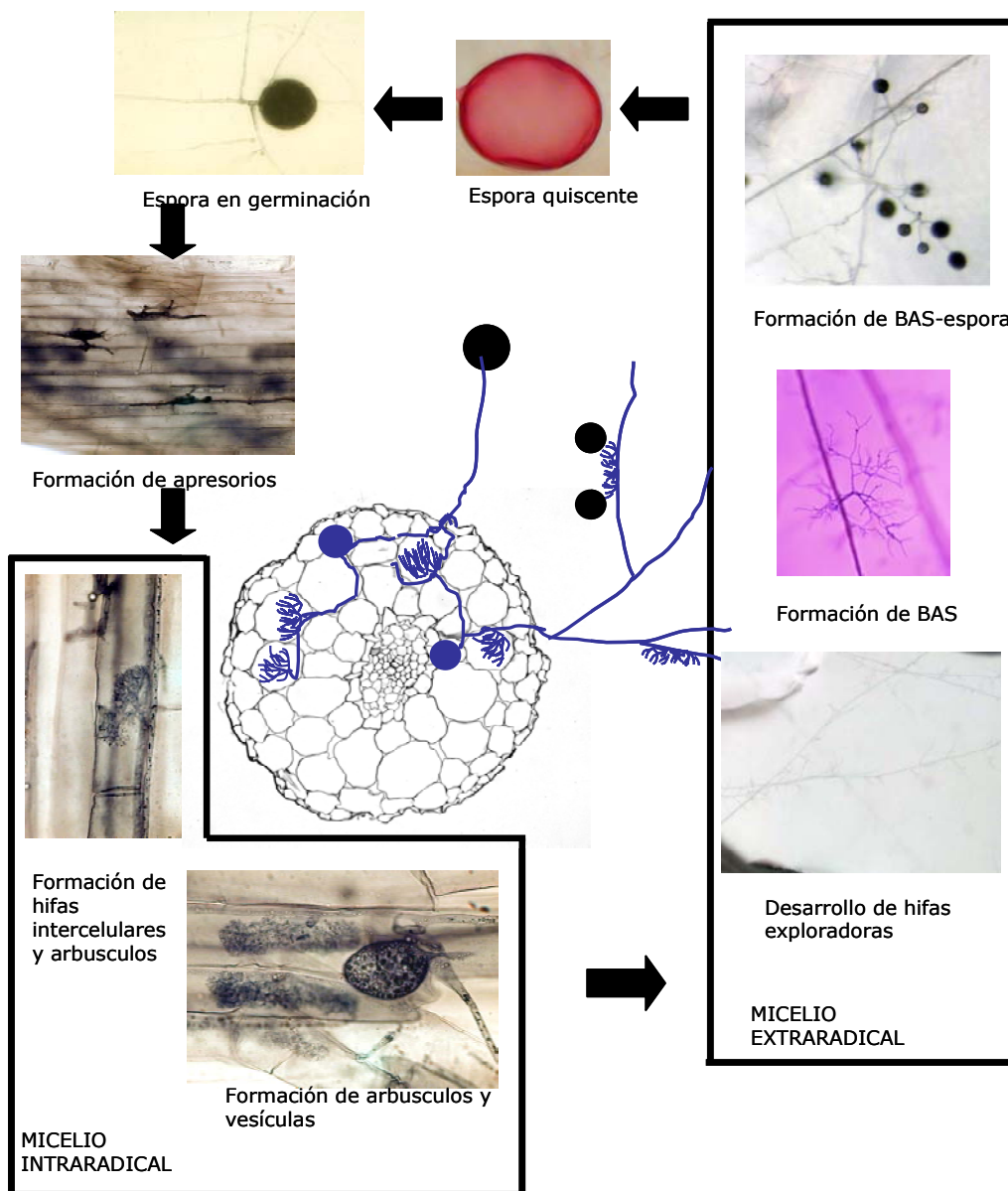


Figura 3. Ciclo de vida de *Glomus intraradices*.

Cuando el hongo no encuentra una raíz susceptible de ser colonizada se produce un micelio muy reducido, que se mantiene en crecimiento tan sólo unos días tras la producción del tubo de germinación y, transcurrido ese tiempo, comienza a retraer el citoplasma de las hifas hacia la espora entrando ésta nuevamente en reposo (Azcón-Aguilar *et al.* 1998). La espora tiene capacidad para iniciar el proceso de germinación repetidas veces, y, de hecho, lo iniciará nuevamente cuando las condiciones vuelvan a ser favorables (Bago *et al.* 1998; Azcón-Aguilar *et al.* 1998).

Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, si el hongo encuentra una raíz susceptible de ser micorrizada, experimenta una notable estimulación que se manifiesta en una abundante proliferación del micelio y, sobre todo, por una profusa ramificación que aumenta sus posibilidades de contacto con la raíz (Giovannetti. M. *et al.* 1993). Cuando una hifa contacta con la superficie de la raíz, se adhiere a ella y forma un apresorio, estructura de precolonización a partir de la cual, dos o tres días después, se iniciará la penetración en la raíz de la planta (Giovannetti *et al.* 1993; Jolicoeur *et al.* 1998).

### 2.3.2. Colonización intraradical

Los mecanismos que permiten la penetración del hongo en la raíz aún no se conocen en su totalidad. Estos parece que incluyen la presión que ejercen los apresorios y las hifas de penetración en su avance y la producción y liberación de una limitada cantidad de enzimas hidrolíticas. En este sentido, se ha comprobado que los hongos micorrícicos son capaces de una limitada producción de pectinasas y celulasas (García-Romera *et al.* 1990; García-Romera *et al.* 1991; Bonfante-Fasolo *et al.* 1992). Simultáneamente al avance de las hifas de penetración, la planta activa un conjunto de genes, regulados por LjSYM4 y LjSYMRK4, que permiten su paso a zonas más profundas del córtex de la raíz (Novero *et al.* 2002; Parniske 2004; Demchenko *et al.* 2004). Cuando faltan estos genes, la entrada del hongo en la raíz ocurre, pero la interacción es abortada, lo cual se ha asociado con la muerte tanto de las células corticales, como del ápice de la hifa (Bonfante *et al.* 2000).

Una vez superadas las primeras capas de células de la raíz, que constituyen un auténtico cuello de botella para el establecimiento de la simbiosis, el hongo micorrícico coloniza el córtex de la misma siguiendo dos patrones de desarrollo diferentes, de acuerdo a la estructura de la raíz: *Arum* y *Paris*. En las micorrizas de tipo *Arum*, el más descrito en la bibliografía, las hifas del hongo se extienden por

los espacios intercelulares del córtex, formando a intervalos regulares pequeñas ramificaciones laterales que penetran las paredes celulares y se ramifican dicotómicamente, de forma repetida, dando lugar a los arbuscúlos. En las micorrizas tipo *Paris*, presentes en *Ginkgo* (Bonfante-Fasolo & Fontana 1985), *Taxus* (Strullu 1978) y otras especies sin apenas espacios entre las células, la formación de hifas intercelulares está muy limitada, por lo que la colonización se extiende de célula en células formando bucles en los que se producen pequeñas ramificaciones a modo de arbuscúlos. Salvo que se indique lo contrario, nos referiremos siempre a las micorrizas tipo *Arum*.

La formación de los arbuscúlos supone una alteración profunda de la célula vegetal, lo que se manifiesta principalmente por la deformación del plasmalema y del protoplasto para acomodar al arbuscúlo, el cual nunca penetra al citoplasma. Se produce igualmente una reordenación del citoesqueleto (Gianinazzi-Pearson *et al.* 1981; Matsubara *et al.* 1999), lo que conlleva un cambio en la posición del núcleo, que pasa a una posición central, y una fragmentación de la vacuola. Se observa, asimismo una menor heterocromaticidad del núcleo de la célula, lo que indica una mayor actividad transcripcional y un aumento del metabolismo. No sólo la célula vegetal se altera: el propio hongo experimenta cambios en su estructura que se manifiestan en una progresiva reducción del grosor de la pared celular a medida que se producen las ramificaciones más finas, pasando de unos 500 nm de grosor en las hifas intercelulares, a los 50 nm en los ápices de los arbuscúlos (Bonfante-Fasolo *et al.* 1992). Todos estos datos, unidos a la localización en la membrana periarbuscular de transportadores de fosfato específicos de la simbiosis (Rausch *et al.* 2001) y una mayor actividad H<sup>+</sup>-ATPasa (Gianinazzi-Pearson *et al.* 1991), sugieren que es a nivel de los arbuscúlos donde se produce el intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo.

La formación de arbuscúlos y la extensión de la colonización parecen estar estrictamente controlados por la planta, como indica el hecho de que mutantes en el gen *har1*, también asociado con el control de nódulos radicales en leguminosas (Nishimura *et al.* 2002), presentan un número mayor de arbuscúlos que las plantas silvestres (Solaiman *et al.* 2000).

La vida media de los arbuscúlos es muy breve, aproximadamente 7 días (Alexander *et al.* 1988). Transcurrido este tiempo, los arbuscúlos degeneran. El colapso arbuscular podría estar inducido por el reconocimiento por parte de la planta del arbuscúlo como una estructura extraña y su consecuente reacción en contra (García-Garrido & Ocampo 2002). Sin embargo, no es descartable que el

colapso arbuscular sea parte del programa de desarrollo de los hongos micorrícicos. En este caso, la degeneración ocurriría por autólisis (Peterson & Bonfante 1994). Este hecho podría explicar la acumulación de Ca en el arbusculo senescente (Ryan *et al.* 2003), pudiendo servir este ion como detonante de eventos apoptóticos en el arbusculo.

En ciertas especies de hongos se observa también la formación de vesículas, estructuras ovoides repletas de glóbulos lipídicos cuya función parece ser el acúmulo de productos de reserva (Smith & Gianninazzi-Pearson 1988).

### 2.3.3. Micelio extraradical

Simultáneamente a la colonización de la raíz, el hongo desarrolla en el suelo una red de micelio que constituye la fase extraradical de la simbiosis, la principal responsable de la absorción de nutrientes minerales que serán posteriormente cedidos a la planta. Dado el carácter de simbiote estricto de los hongos micorrícicos, la observación directa del micelio del hongo ha sido extremadamente difícil hasta el desarrollo de las técnicas de cultivo monoxénico que permiten el establecimiento de la simbiosis en una placa de Petri con un medio sintético, entre raíces micotróficas y hongos micorrícicos (Bécard & Fortin 1988). Estas técnicas han permitido una mejor observación del micelio extraradical y la posibilidad de controlar el entorno de éste. Bago *et al.* (1998a) fueron los primeros en describir el desarrollo de esta fase externa de la simbiosis usando cultivos monoxénicos de *Glomus intraradices*, y sus observaciones han sido validadas por trabajos posteriores en otros hongos micorrícicos (Declerck *et al.* 1996; Souza & Berbara 1999; Pawlowska *et al.* 1999; Karandashov *et al.* 2000; Tiwari & Adholeya 2002). Inicialmente se producen unas hifas relativamente gruesas denominadas hifas exploradoras, que crecen con una marcada apicalidad. Estas hifas exploradoras sufren periódicas ramificaciones (hifas secundarias), que a su vez vuelven a ramificarse varias veces (hifas terciarias, cuaternarias, ...). Las hifas exploradoras son las responsables del avance del micelio y de la extensión de la colonia fúngica. A intervalos regulares, se forman estructuras muy ramificadas, que recuerdan en cierta medida a los arbusculos, conocidas hoy día como BAS (del inglés *Branched Absorbing Structures*, Estructuras ramificadas de absorción), cuya hipotética función sería la absorción de nutrientes del suelo (Bago 2000). Esta hipótesis está respaldada por las modificaciones estructurales que ocurren a nivel del BAS: una disminución progresiva del grosor de la pared hacia el ápice de las hifas, lo que



facilitaría la absorción de nutrientes, y un aumento en el número de mitocondrias en la base del mismo, aumentando la disponibilidad de energía para el transporte (Bago *et al.* 1998b). Los BAS son estructuras transitorias y al cabo de pocos días pierden su contenido citoplasmático a menos que desarrollen esporas. Las esporas, según la especie de hongo micorrícico, pueden desarrollarse libres (como en *G. intraradices*) o agrupadas en cuerpos fructíferos conocidos como esporocarpos (caso de *G. mosseae*), cerrándose de este modo el ciclo de vida (Figura 3).

Cabe destacar que, en contraste con el micelio intraradical, que se encuentra protegido por los tejidos de la raíz de la planta, el micelio extraradical, al desarrollarse directamente en el suelo, se encuentra mucho más expuesto a las condiciones ambientales, y a la acción de otros microorganismos del suelo. Con ellos va a desarrollar una serie de interacciones de gran importancia para el desarrollo de las plantas, el equilibrio de las poblaciones microbianas en el suelo y la formación de agregados estables en el mismo y el mantenimiento de su estructura (Jeffries & Barea 2001).

## **2.4. Fisiología de la simbiosis**

El carácter mutualista de la simbiosis supone que ambos simbiosntes resultan beneficiados de esta relación, lo que generalmente se traduce en una mejor nutrición de ambos. A continuación se resumen los aspectos fundamentales del funcionamiento de la simbiosis, referidos principalmente al intercambio de nutrientes entre ambos simbiosntes, y su papel en la absorción e inmovilización de micronutrientes.

### 2.4.1. Metabolismo del carbono

Dada la capacidad fotosintética de las plantas, resulta lógico suponer que el papel de ésta es aportar fotosintatos al microsimbionte heterótrofo. Esto no pudo ser determinado hasta que Ho y Trappe (1973), usando  $^{14}\text{CO}_2$ , demostraron que tras unas semanas se detectaba C marcado en el micelio del hongo. El carácter de simbiosntes estrictos de los hongos formadores de micorrizas arbusculares y la imposibilidad de cultivarlos axénicamente, han motivado grandes esfuerzos a estudiar qué es lo que impide que los hongos micorrícicos completen su ciclo vital en ausencia de planta hospedadora.

El micelio intraradical es capaz de captar fructosa y glucosa (Shachar-Hill *et al.* 1995; Pfeffer *et al.* 1999), que son rápidamente transformados en trehalosa y en glucógeno, con el fin de disminuir la osmolaridad. Se han aislado transportadores de carbohidratos regulados por la formación de la simbiosis e implicados en la transferencia de carbono a las células corticales (Harrison 1996), o en la salida de hexosas de las hojas (García-Rodríguez *et al.*, 2005), aunque aún se desconocen los implicados en la transferencia de hexosas entre la planta y el hongo. Parte de estos carbohidratos son transformados en el micelio intraradical a compuestos lipídicos, que posteriormente serán transportados al micelio extraradical (Bago *et al.* 2002), en donde mediante gluconeogénesis se transformarán en carbohidratos. El micelio extraradical depende de este aporte de productos carbonados dada su incapacidad para absorber hexosas del medio (Bago *et al.* 2000). Recientemente, Bago *et al.* (2003) han demostrado que también se transfiere una pequeña cantidad de glucógeno desde el micelio intraradical al extraradical. En los hongos micorrícicos se produce una compartimentación del metabolismo, de forma que las capacidades de síntesis lipídica sólo residen en el micelio intraradical, mientras que las capacidades gluconeogénicas se localizan únicamente en el micelio extraradical. Esta marcada compartimentación del metabolismo del hongo, asociada a la diferenciación que experimenta el micelio al establecer la simbiosis, podría estar en la base de la incapacidad del hongo para crecer independientemente de la planta.

Como se mencionó anteriormente, la espora es capaz de un cierto, aunque limitado, desarrollo en ausencia de raíz hospedadora. Éste está sustentado por las reservas lipídicas de la espora dado que el micelio producido no es capaz de sintetizar ácidos grasos (Bago *et al.* 1999). No obstante, en este micelio sí se han detectado otras rutas metabólicas como son: gluconeogénesis, glucólisis, ciclo de la urea, ruta de las pentosas fosfato, ciclo del glioxalato y vía de los ácidos tricarbónicos (Macdonald & Lewis 1978; Saito 1995; Harrier *et al.* 1998; Bago *et al.* 1999).

Estos aspectos del metabolismo del carbono se resumen en la Figura 4.

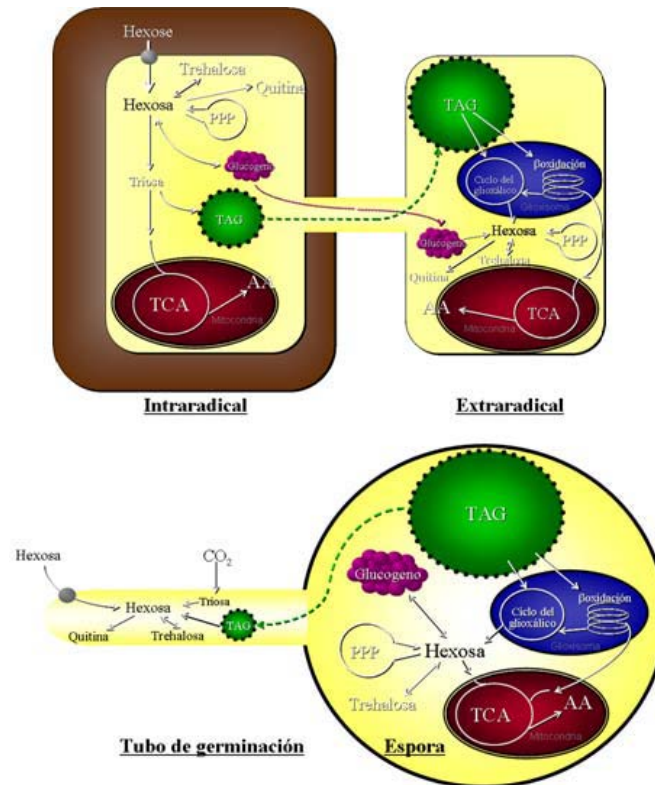


Figura 4. Compartimentación del metabolismo del carbono en hongos formadores de micorrizas arbusculares. El carbono es transferido por la planta en forma de hexosas, que en el micelio intraradical se transformará en lípidos y glucógeno. Estos lípidos y parte del glucógeno viajan por el micelio hasta llegar a las hifas extraradicales, donde serán usados para la gluconeogénesis. En la espora, como en el micelio extraradical, no existe síntesis lipídica, por lo que la germinación se realiza a expensas de lípidos preexistentes. Esquema cedido por A. Bago.

#### 2.4.2. Nutrición mineral

La nutrición mineral en relación a las micorrizas arbusculares es uno de los aspectos más estudiados de la simbiosis, debido a la importancia que esta tiene en el desarrollo vegetal, con implicaciones en áreas tan diversas como la nutrición humana, la agricultura sostenible o la biodiversidad de los ecosistemas terrestres.

Fue a mediados del siglo pasado cuando empezó a cobrar interés el estudio de las causas del mejor crecimiento de las plantas micorrizadas. El primer trabajo sobre el tema señalaba cómo el manzano micorrizado presentaba un mayor contenido en Fe y Cu que el no micorrizado cuando crecía en suelos deficientes en estos micronutrientes (Mosse 1957). Posteriormente se puso de manifiesto que los hongos formadores de micorrizas arbusculares mejoran también la absorción de fosfato por la planta (Gerdemann 1964; Daft & Nicolson 1966; Baylis 1967). Las causas de esta mejora de la nutrición pueden ser múltiples:

1.- Las hifas del hongo son capaces de explorar un mayor volumen de suelo que las propias raíces, por lo que aumentan la capacidad de absorción de nutrientes, especialmente de aquellos que difunden con dificultad en la solución del suelo, lo que condiciona la formación de zonas de deficiencia alrededor de la raíz, es decir, zonas del suelo, en contacto directo con la raíz (Sanders & Tinker 1973).

2.- Por su tamaño, las hifas son capaces de competir mucho mejor con otros microorganismos del suelo por nutrientes (Linderman 1992).

3.- Se ha postulado que los transportadores de los hongos micorrícicos presentan una mayor afinidad por su sustrato que los de la planta (Cress *et al.* 1979).

4.- La posibilidad de absorber fuentes de nutrientes no disponibles para la propia planta (Swaminathan 1979).

En esta sección nos ocuparemos brevemente de recopilar la información más relevante en relación a la nutrición mineral en plantas micorrizadas.

#### 2.4.2.1. Nutrición fosforada

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que la mayoría de las plantas aumentan la absorción de fósforo al establecer asociaciones micorrícicas (Raghothama 1999; Rausch & Bucher 2002; Jia *et al.* 2004). Éstas, de hecho, pueden llegar a ser responsables del 100 % de la incorporación de fosfato en algunas especies vegetales (Smith *et al.* 2004), incluso en situaciones, como con el tomate, en las que el crecimiento se afecta muy poco al establecer la simbiosis. La información bibliográfica al respecto es muy numerosa (Sanders & Tinker 1973; Dunne & Fitter 1989; Merryweather & Fitter 1995; Jakobsen 1996; Bi *et al.* 2003), por lo que en vez de desarrollar más este aspecto, nos centraremos en la descripción de los mecanismos que posibilitan la absorción, el transporte y la transferencia de fosfato a la planta.

La absorción de fosfato es un mecanismo altamente eficiente, lo que se pone de manifiesto por la rápida incorporación de fósforo por las hifas del micelio extraradical, requiriéndose tan sólo tres horas para alcanzar los niveles máximos de acumulación de polifosfato (Ezawa *et al.* 2004), una velocidad comparable a la de los microorganismos hiperacumuladores de fosfatos. Esta capacidad de incorporación es fruto de la existencia de transportadores de alta afinidad de fosfato en el micelio extraradical. Estos hasta la fecha, han sido identificados en

*Glomus vermiforme* (Harrison & van Buuren 1995), *G. intraradices* (Maldonado-Mendoza *et al.* 2001) y *Gi. margarita* (Lanfranco, comunicación personal). Con el fin de evitar la acumulación de iones fosfato, que dificultarían el funcionamiento normal del hongo mediante un incremento de la presión osmótica, se polimerizan varias unidades (entorno a 17) formando cadenas de polifosfatos, que se acumulan fundamentalmente en las vacuolas (Rasmussen *et al.* 2000). El fosfato es transportado al micelio intraradical vehiculizado en el interior de las vacuolas, y más concretamente, de unas vacuolas tubulares que se encuentran asociadas a los microtúbulos del citoesqueleto que dirigen las corrientes citoplasmáticas (Olsson *et al.* 2002; Uetake *et al.* 2002). Este mecanismo de transporte es energéticamente más rentable que la transferencia directa del fosfato (1983).

Una vez en el micelio intraradical, el polifosfato es hidrolizado, liberándose el fosfato mediante la actividad de ciertas fosfatasas alcalinas presentes en la vacuola (Gianinazzi-Pearson & Gianinazzi 1978). Recientemente se han clonado dos genes (uno de *G. intraradices* y otro de *Gigaspora margarita*) que codifican fosfatasas alcalinas (Aono *et al.* 2004), aunque no se ha podido poner de manifiesto su capacidad para hidrolizar polifosfatos y, aparentemente, no están regulados por fósforo.

El lugar exacto en el que ocurre la transferencia de fosfato a la planta no se conoce con exactitud, aunque numerosos autores sugieren que tiene lugar a nivel del arbusculo (Smith & Smith 1990; Gianinazzi 1991; Smith & Read 1997). Sin embargo, el uso de técnicas de microscopía electrónica acopladas a métodos de análisis elemental han mostrado una acumulación de fosfato en las células corticales que contienen arbusculos, y también en la interfase que rodea a las hifas intercelulares (Ryan *et al.* 2003), lo que reabre la posibilidad de que la transferencia de fosfato no esté limitada a los arbusculos.

Aún no se conoce el mecanismo de extrusión de fosfato del micelio intraradical. Sin embargo, sí que se han descrito varios transportadores de fosfato que tan sólo se expresan en plantas micorrizadas. Este es el caso de StPT3 en patata (Rausch *et al.* 2001) y MtPT4 en *Medicago truncatula* (Harrison *et al.* 2002). El mejor caracterizado es este último, que codifica un transportador de baja afinidad (lo que da idea de la alta concentración de fosfato existente en las interfases hongo-planta) y que se localiza en la membrana periarbuscular (Harrison *et al.* 2002). Este último hecho que refuerza la hipótesis de que es el arbusculo el sitio preferencial de transferencia de fosfato.

#### 2.4.2.2. Nutrición nitrogenada

Los hongos micorrícicos son también capaces de transferir N a la planta, mediante la absorción de  $\text{NH}_4^+$  (Johansen *et al.* 1992; Frey & Schüepp 1993; Johansen *et al.* 1993), o  $\text{NO}_3^-$  (George *et al.* 1992; Tobar *et al.* 1994; Bago *et al.* 1996) del suelo circundante, y su posterior transferencia. En el caso del nitrato, la incorporación esta asociada probablemente a un simporte de protones (Bago *et al.* 1996) mientras que la de amonio está asociada a un antiporte protónico (Bago & Azcón-Aguilar 1997). Asimismo, hay indicios de cierta capacidad de transporte de N orgánico (Hodge *et al.* 2001), especialmente aminoácidos (Hawkins *et al.* 2000), habiéndose aislado un gen que codifica una permeasa de aminoácidos de *G. mosseae* (Lanfranco, comunicación personal).

Parece ser que los hongos micorrícicos prefieren amonio, frente al nitrato, como fuente de N (Johansen *et al.* 1992), pese a que el crecimiento en medios ricos en amonio produce alteraciones en el desarrollo normal del hongo, induciendo una menor esporulación (Bago *et al.* 2004). La incorporación de amonio se lleva a cabo mediante transportadores específicos. Hasta la fecha tan sólo se ha aislado uno, de alta afinidad, en *G. intraradices* (López-Pedrosa *et al.*, comunicación personal). El amonio sería rápidamente incorporado al glutamato, para dar glutamina, mediante distintos mecanismos, aunque el más probable parece ser el ciclo de la Glutamina sintasa/Glutamato sintasa, ya que estas actividades se han detectado en hongos MA (Johansen *et al.* 1996; Breuninger *et al.* 2004).

La asimiliación del nitrato parece estar facilitada por la enzima nitrato reductasa, cuya actividad se ha detectado en esporas (Ho & Trappe 1975) y en extractos de raíces micorrizadas (Subramanian & Charest 1998). Asimismo se ha aislado el gen de una nitrato reductasa, que se expresa fundamentalmente en el arbusculo (Kaldorf *et al.* 1998). Esta actividad nitrato reductasa permitiría la reducción del nitrato y su incorporación a la glutamina en forma de amonio.

Otras actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del N en hongos micorrícicos es la actividad ureasa, puesta de manifiesto por la capacidad de usar urea marcada como fuente de N y que este marcaje se detecte posteriormente tanto en la planta, como en el hongo (Shachar-Hill *et al.* 1997).

Dos hipótesis intentan explicar la transferencia de N a la planta. En la primera de ellas, basada en la detección de actividad nitrato reductasa en el arbusculo, se propone que es nitrato lo que se transfiere (Kaldorf *et al.* 1998). La otra, en cambio, sugiere que es amonio lo que se transfiere en un proceso asociado

al ciclo de la urea y al transporte de polifosfato (Bago *et al.* 2001). Esta última hipótesis propone que el N es incorporado a través del ciclo de la urea, pero el transporte hasta el arbusculo tendría lugar en forma de arginina, asociada a los polifosfatos, neutralizando su carga. Una vez allí y de nuevo mediante el ciclo de la urea, se liberaría el amonio que sería transferido a la planta. Esta hipótesis está respaldada por i) la detección de actividad de enzimas involucradas en el ciclo de la urea en estos hongos (Bago *et al.* 1999), ii) el elevado contenido de arginina libre en el micelio (Johansen *et al.* 1996), iii) el elevado contenido de arginina en las vacuolas (entre 50 y 1000 veces superior al del citoplasma) (1995) y iv) por el hecho de que en ectomicorrizas, la arginina se encuentra frecuentemente asociada a polifosfatos (Bücking *et al.* 1998). La posibilidad de una transferencia directa de arginina desde el hongo se ha descartado debido a que el marcaje del carbono no se detecta en la parte aérea de la planta (Fitter *et al.* 1998). Esta hipótesis se resume en la Figura 5.

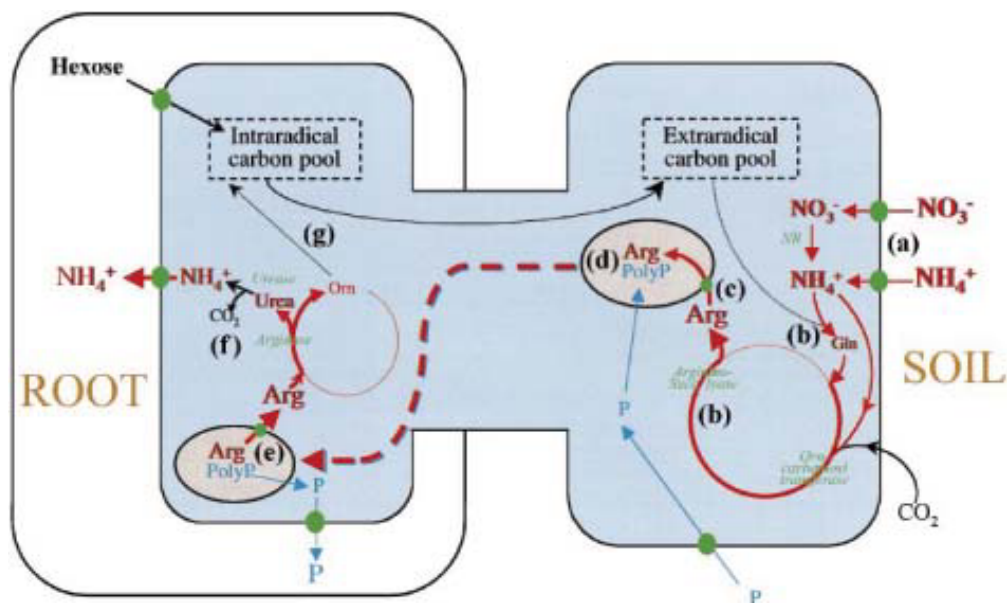


Figura 5. Mecanismo propuesto para el transporte de nitrógeno a la planta en micorrizas arbusculares. El nitrógeno adquirido se transforma en amonio o se adquiere como tal. Mediante el ciclo de la urea pasa a formar parte de la arginina. La transferencia al micelio intraradical se lleva a cabo en forma de arginina, asociada a los polifosfatos. Una vez en el micelio intraradical, se libera el amonio de nuevo mediante el ciclo de la urea. Tomado de Bago *et al.* (2001).

#### 2.4.2.3. Micronutrientes

Este aspecto será abordado en la siguiente sección.

## 2.5. Hongos micorrícicos y metales pesados

Dentro de los metales pesados distinguimos dos grupos, unos que son esenciales en pequeña cantidad para la vida (Fe, Zn, Cu, ...), y otros que, a cualquier concentración resultan nocivos (Cd, Pb, ...). El mantenimiento de la homeostasis de los metales pesados del primer grupo es clave para la existencia de un ser vivo, dado que, tanto su exceso como su defecto, resultan perjudiciales. Esto es especialmente importante en plantas, ya que un amplio porcentaje de suelos son deficientes en micronutrientes tales como Fe o Zn (Ruel & Bouis 1998). Además, la actividad industrial y el uso de aguas residuales para riego, elevan la concentración de metales pesados en el suelo hasta límites no tolerables para el desarrollo de muchas especies vegetales.

En este contexto cobran especial relevancia las micorrizas, al representar estas el componente fundamental de la interfase planta-suelo. En repetidas ocasiones se ha puesto de manifiesto la capacidad tamponadora de los hongos micorrícicos sobre el nivel de metales pesados en la planta hospedadora. Este efecto amortiguador se traduce en un aumento en el suministro de micronutrientes a la planta cuando esta crece en suelos deficientes en esos micronutrientes, mientras que reducen la incorporación de metales a los tejidos vegetales cuando las plantas crecen en suelos con niveles elevados de los mismos (Diaz *et al.* 1996; Chen *et al.* 2003b). Así por ejemplo, Chen y col (2003b) demostraron que los hongos micorrícicos eran capaces de aumentar la concentración de Zn en los frutos cuando la planta se cultivaba en suelos pobres en Zn, mientras que cuando los niveles de metal en el suelo superaron cierto umbral, la concentración de Zn fue menor que en los frutos de las plantas no micorrizadas.

El efecto protector de las micorrizas sobre los tejidos de la parte aérea de la planta ha sido observado en múltiples ocasiones, habiéndose descrito protección frente a Al (Cumming & Ning 2003), U (Rufyikiri *et al.* 2002), Cs (Berreck & Hanselwandter 2001), Sr (Entry *et al.* 1999), Cd (Rivera-Becerril *et al.* 2002), Mn (Malcová *et al.* 2003), Zn (Bi *et al.* 2003) y Cu (Griffioen *et al.* 1994). Este efecto protector es debido fundamentalmente a la inmovilización del metal en el micelio del hongo, especialmente en las paredes celulares (Joner *et al.* 2000), aunque también en estructuras del micelio interno como son las vesículas o, a un nivel intracelular, los gránulos de polifosfato (Rauser & Ackerley 1987; Turnau *et al.* 1993; Weiersbye 1999). La acumulación del metal en el micelio interno del hongo, es lo que explicaría su acumulación en las raíces de la planta micorrizada considerada en su conjunto (raíz+hongo) (Rivera-Becerril *et al.* 2002; Rufyikiri *et*



*al.* 2003; Chen *et al.* 2003a). De hecho, los tejidos vegetales de la raíz micorrizada tienen menores niveles de metales pesados que los de la raíz no micorrizada cuando la planta crece en suelos con niveles elevados de metales (Rivera-Becerril *et al.* 2002).

Estas observaciones han planteado el uso de los hongos micorrícicos en la biorremediación de suelos contaminados, principalmente mediante técnicas de bioestabilización (Rufyikiri *et al.* 2002; Chen *et al.* 2003a). Estas alternativas se ven respaldadas por la existencia de numerosas especies de hongos micorrícicos que son capaces de crecer naturalmente en suelos contaminados con metales pesados y de establecer la simbiosis con las plantas (Turnau *et al.* 1993; Weissenhorn *et al.* 1994; Hildebrandt *et al.* 1999; del Val *et al.* 1999b; Tonin *et al.* 2001; Malcová *et al.* 2003). De hecho, cuando se compara el grado de protección que confieren estos aislados procedentes de suelos contaminados en relación a aislados de suelos no contaminados, se observa que los primeros son más efectivos (Hildebrandt *et al.* 1999; del Val *et al.* 1999a; Malcová *et al.* 2003), aunque su cultivo sucesivo en suelos no contaminados puede reducir esa capacidad (Malcová *et al.* 2003). El hecho de que no todos los hongos micorrícicos presenten la misma tolerancia a metales pesados, podría facilitar el uso de los aislados más sensibles como bio-marcadores de contaminación (Jacquot *et al.* 2000).

La tolerancia a metales pesados se logra mediante la acción coordinada a distintos niveles de varios mecanismos protectores. Así, una primera barrera la constituiría la pared celular del hongo que, al estar dotada de carga negativa, tendría una gran capacidad de adsorción de cationes, la forma en que normalmente se encuentran los metales. Este extremo fue confirmado por Joner *et al.* (2000), atribuyéndole a la pared celular casi el 50 % de la capacidad de fijación del metal por hongos micorrícicos. Se ha planteado incluso la posibilidad de que la propia pared celular pueda cambiar de composición cuando el hongo crece en presencia de niveles supraóptimos de metales, de modo que sea capaz de retener mayor cantidad de metal, tal y como se ha sugerido en hongos formadores de micorrizas ericoides (Lanfranco *et al.* 2002).

Sin embargo, en suelos muy contaminados, parte del metal superaría la barrera que supone la pared celular y alcanzaría el citoplasma del hongo. Para evitar el daño que su excesiva acumulación pudiera originar, existen una serie de quelantes intracelulares capaces de dejarlo inerte en el citoplasma. Hasta la fecha, de los posibles quelantes intracelulares descritos, sólo se ha encontrado un tipo en los hongos micorrícicos: las metalotioneinas. Como veremos con más profundidad

en la siguiente sección, las metalotioneínas son polipéptidos de unos 70-75 aminoácidos con un alto contenido de cisteína, aminoácido capaz de formar complejos con cationes mediante su grupo sulfhidrilo. Al inicio del trabajo que constituye esta Tesis Doctoral, no había ninguna descrita en hongos micorrícicos. Actualmente, se han clonado dos genes que codifican metalotioneínas en hongos micorrícicos: *GmarMT1* (Lanfranco *et al.* 2002) y *GrosMT1* (Stommel *et al.* 2001) en *Gi. margarita* y *Gi. rosea*, respectivamente. *GmarMT1* ha sido estudiado en detalle, probándose su capacidad de quelar Cu y Cd mediante su expresión en levaduras mutantes en el gen de la metalotioneína. Asimismo, se comprobó su regulación por estos cationes y por la fase de desarrollo del hongo (Lanfranco *et al.* 2002). Sin embargo, este estudio carecía de datos acerca de la expresión del gen cuando la presencia de los cationes es prolongada en el tiempo, lo que podría arrojar datos acerca de su papel en la adaptación de los hongos micorrícicos a suelos contaminados con metales pesados.

De otro lado, la cantidad de metal que llega hasta el citoplasma depende, en gran medida, de la existencia de transportadores que faciliten su entrada en el organismo, ya que, dado el carácter muy polar de los cationes metálicos, estos no pueden atravesar la membrana plasmática por sí solos. Además, en numerosos organismos hay descritos transportadores de metales pesados que se encargarían de retirar estos iones del citoplasma, ya sea extruyéndolos hacia el exterior celular (Palmiter & Findley 1995) o translocándolos al interior de orgánulos de almacenaje, como las vacuolas (MacDiarmid *et al.* 2002). Sin embargo, pese a que se conoce con gran detalle el funcionamiento de numerosos transportadores de plantas, existen muy pocos trabajos que estudien el efecto del establecimiento de la micorriza sobre estos transportadores o los transportadores implicados en los hongos micorrícicos. Tan sólo Burleigh y col. (2003) encontraron un transportador de Zn en *Medicago truncatula* que se inhibía al establecerse la simbiosis.

Pese a que aún nos encontramos en los albores del estudio de la homeostasis de metales pesados en hongos micorrícicos y de cómo estos influyen la homeostasis de metales en la planta, el advenimiento de nuevos enfoques como la proteómica (Repetto *et al.* 2003) permitirán avances importantes en la comprensión de estos procesos.

En resumen, podríamos decir que tanto la capacidad de incrementar la adquisición de micronutrientes minerales por las plantas que crecen en suelos pobres, como la de disminuirla en las que se desarrollan en suelos contaminados con metales, dependen de la acción de un conjunto de procesos destinados a

mantener la homeostasis de micronutrientes en los hongos formadores de micorrizas arbusculares. Para comprender estos procesos, y poder mejorar esta capacidad es necesario conocer los mecanismos responsables en hongos micorrícicos y en qué grado interactúan y contribuyen al mantenimiento de la homeostasis. Éste es el objetivo último de este trabajo de Tesis Doctoral. Con el objeto de ofrecer al lector una ligera panorámica de los mecanismos de control de la homeostasis de metales pesados existentes en las células eucariotas, en la siguiente sección se va a proceder a realizar un breve análisis de los mismos

### **3. MECANISMOS MOLECULARES DE CONTROL DE LA HOMEOSTASIS DE METALES PESADOS EN EUCARIOTAS**

La importancia del zinc, cobre, hierro y otros elementos de transición en procesos bioquímicos clave de la célula ha condicionado que sean esenciales para el desarrollo de los seres vivos, aunque se requieran en muy pequeña concentración. Así, están involucrados en reacciones tan importantes como la respiración mitocondrial, la fotosíntesis y la transcripción del ADN (Vallee & Auld 1990). Sin embargo, estos micronutrientes son tolerados en un margen de concentraciones muy estrecho, por lo que ligeros aumentos en la cantidad de estos en la célula tienen efectos muy perjudiciales. Así por ejemplo, el exceso de cobre facilita la formación de radicales libres que atacarán a lípidos, proteínas y ADN, dañando e incluso destruyendo la célula (Drazkiewicz *et al.* 2004). Dadas estas características de los metales de ser esenciales a niveles bajos y tóxicos a niveles ligeramente superiores, los seres vivos han desarrollado una maquinaria que garantiza un aporte adecuado de micronutrientes, pero que a la vez es capaz de evitar una excesiva acumulación de los mismos.

Esta maquinaria comprende un gran número de mecanismos que actúan a distintos niveles: extracelular, a nivel de la pared celular (si la hubiere), a nivel de las membranas y en el citoplasma. En esta sección haremos una breve revisión de todos ellos.

#### **3.1. A nivel extracelular**

Los organismos, en un intento de satisfacer sus demandas nutritivas, promueven cambios en la composición de su entorno que facilitan la movilización

de nutrientes. De este modo, las plantas liberan exudados a la rizosfera capaces de aumentar la adquisición de nutrientes (Marschner 1995), ya sea mediante la acidificación del medio (Ohwaki & Sugahara 1997) o por quelación mediante determinados ácidos orgánicos, como citrato y oxalato (Pickering *et al.* 1999). Este nivel comprende todos los mecanismos encargados de facilitar la absorción de micronutrientes cuando éstos se encuentran a bajas concentraciones en el medio exterior, o que disminuyen la movilidad de estos metales cuando se encuentran en exceso.

### **3.2. La barrera de la pared celular**

La pared celular, cuando está presente, constituye la primera barrera que cualquier molécula debe superar para alcanzar el interior de la célula. Si bien su composición es muy variable, en la inmensa mayoría de los organismos se caracteriza por su gran densidad de cargas negativas, lo que determina una alta afinidad por cationes. De este modo, las paredes celulares presentan una elevada capacidad de adsorción de metales pesados, constituyendo un eficaz sistema de protección frente al exceso de los mismos. Asimismo, algunos organismos cuando crecen en medios con altas concentraciones de metales, son capaces de cambiar la composición de su pared para que ésta sea capaz de adsorber más metales. Este es el caso de algunos hongos formadores de micorrizas ericoides, que cuando son cultivados en presencia de elevadas concentraciones de zinc, cambian la composición y estructura de su pared celular (Lanfranco *et al.* 2002).

En otras ocasiones el metal presente en la pared celular ha sido incorporado a su estructura. Este es el caso de *Silene vulgaris*, en la que el metal absorbido desde el suelo es translocado hasta las hojas, donde pasa a formar parte de la pared de las células epidérmicas, ya sea asociado a proteínas o a silicatos (Bringezu *et al.* 1999).

### **3.3. La transferencia a través de la membrana plasmática**

Pese a la relevancia de los dos niveles señalados anteriormente, el control del paso a través de la membrana plasmática es el nivel clave para el mantenimiento de la homeostasis de metales pesados, tanto en condiciones de deficiencia, como de exceso. Para ello, los seres vivos disponen de numerosas familias de transportadores, que controlan la incorporación o la extrusión de estos

micronutrientes, en numerosas ocasiones con gran especificidad. Asimismo, el hecho de que casi todos estos transportadores se encuentren en la mayoría de los seres vivos, independientemente de su situación en la escala filogenética, nos hace pensar que ya en los albores de la evolución de la vida se hizo necesario el desarrollo de mecanismos para el mantenimiento de la homeostasis de metales en las células. A continuación se presentan las familias de transportadores de metales más conocidas.

### 3.3.1. Transportadores que introducen metales en el citosol

#### *3.3.1.1. Familia ZIP (Zrt1-Irt1-like proteins)*

Los transportadores de esta familia deben su nombre a los dos primeros miembros descritos en la misma: Irt1 (*Iron responsive transporter 1*) de *Arabidopsis thaliana* (Eide *et al.* 1996) y Zrt1 (*Zinc responsive transporter*) de *Saccharomyces cerevisiae* (Zhao & Eide 1996a). Hoy en día se conocen varias decenas de transportadores de esta familia, conocidos como transportadores ZIP, los cuales están distribuidos tanto en bacterias, como en plantas, animales y hongos (Gaither & Eide 2001).

Estructuralmente todos estos transportadores tienen ocho dominios transmembrana, presentando tanto los extremos N- como C-terminal en la zona extracitoplasmática. Entre estos pasos transmembrana se forma bucles de distinta extensión, siendo el mayor el que se forma entre el tercer y cuarto dominio transmembrana, el cual, además de por su extensión, se caracteriza porque presenta una secuencia (HX)<sub>3-5</sub>, que podría estar involucrada en la captación del catión a transportar. Bucles de menor extensión, pero también importantes, son el formado entre el paso segundo y tercero, en donde, al menos en Irt1, se encuentran los aminoácidos que determinan la especificidad por el sustrato (Rogers *et al.* 2000); y el formado por los pasos cuarto y quinto, con un carácter anfipático y rico en histidinas, que podría estar involucrado en la formación del canal por el cual se introducirán los cationes en el citoplasma (Rogers *et al.* 2000).

A nivel funcional, todos los ZIPs que se han caracterizado hasta la fecha, introducen cationes divalentes en el citoplasma. Estos transportadores parecen estar codificados por familias multigénicas, existiendo al menos tres en levadura (Gaither & Eide 2001), lo que sugiere que cada uno tiene una función específica que justifica su mantenimiento a lo largo de la evolución. La naturaleza exacta del ion que transportan puede ser muy diversa, así como su especificidad, pero

típicamente incluyen Fe, Zn, Mn y Co (Eide *et al.* 1996; Zhao & Eide 1996a; Korshunova *et al.* 1999), aunque también cationes no esenciales como Cd (Weber *et al.* 2004). La función de estos transportadores esta orientada hacia la absorción del medio exterior de micronutrientes esenciales, o la movilización de reservas intracelulares (Zhao & Eide 1996a; Zhao & Eide 1996b; MacDiarmid *et al.* 2000). De este modo, los transportadores Zrt1 y Zrt2, localizados en la membrana plasmática de *S. cerevisiae*, son los responsables de absorber la mayor parte del Zn incorporado por la célula, si bien con distinto grado de afinidad. La localización vacuolar de Zrt3, por el contrario, determina que su función sea la de movilizar el Zn almacenado en este orgánulo cuando existe una deficiencia del metal (MacDiarmid *et al.* 2000).

Pese a que se conoce bastante bien la función de muchos de estos transportadores, aún queda mucho por saber de la bioquímica del transporte. El mejor conocido es Zrt3 de *S. cerevisiae*, cuya capacidad de transportar Zn depende del antiporte de un protón, hecho que se ha puesto de manifiesto por la incapacidad de extruir Zn al citoplasma en mutantes afectados en la acidificación de la vacuola (MacDiarmid *et al.* 2000). Sin embargo, parece haber excepciones, como hZIP1, cuya capacidad transportadora podría estar acoplada a un simporte de carbonato (Gaither & Eide 2001). Otros transportadores podrían estar relacionados con el antiporte de sodio o potasio (Gaither & Eide 2000).

Toda esta variedad de transportadores ZIP y de mecanismos de transporte evidencian la importancia de mantener el delicado equilibrio que supone la obtención de micronutrientes minerales, y sugieren la existencia de mecanismos muy precisos de regulación de estos transportadores. Esta regulación se ejerce a dos niveles principalmente, transcripcional y post-traducciona. El primero de los niveles se basa en la presencia de elementos de respuesta a Zn (ZRE) en la zona promotora (Zhao *et al.* 1998). Estos dominios son reconocidos por el factor de transcripción Zap y sus ortólogos y su unión al ADN promueve la transcripción. Esta unión se logra mediante la pérdida de Zn de uno de sus dominios en "dedos de Zn", lo que se produce en condiciones de deficiencia de este metal (Bird *et al.* 2003).

La regulación post-traducciona se lleva a cabo mediante la retirada de los transportadores de la membrana cuando la célula detecta una acumulación excesiva del catión divalente correspondiente en el citoplasma. Este es el caso de Zrt1, que es ubiquitinado cuando se acumulan niveles elevados de Zn en el citoplasma (Gitan *et al.* 2003).

3.3.1.2. Familia NRAMP (*Natural-resistance-associated macrophage protein*)

Pese a que el nombre sugiere que está relacionado con el sistema inmune, los transportadores de esta familia se encuentran no sólo en animales, sino también en plantas, hongos, bacterias y arqueas. El nombre se debe al primer miembro de esta familia en ser identificado, Nramp1, un transportador de mamíferos, asociado a la membrana del endosoma/lisosoma, cuya función parece ser el control del crecimiento de las bacterias fagocitadas mediante la retirada de Fe del fagosoma (Govoni *et al.* 1995).

En todos los miembros de esta familia se predicen once o doce dominios transmembrana, con una secuencia característica en un dominio citoplasmático entre el octavo y noveno pasos transmembrana. Esta secuencia, parecida también a la de los transportadores *shaker* de potasio, es QSSTITGTYAGQFIMGGFLN. Suelen formar familias multigénicas, existiendo al menos tres en *S. cerevisiae*, seis en *Arabidopsis thaliana* o tres en *Oryza sativa* (Hall & Williams 2003).

La función de estos transportadores está ligada, en general, al aumento de cationes divalentes en el citoplasma, especialmente de Mn e Fe, aunque también pueden transportar Zn, Co, Cu o Ni (Portnoy *et al.* 2000; Delhaize *et al.* 2003; Agranoff *et al.* 2005). De este modo, el transportador en levaduras SMF1 es el encargado de incorporar Mn, por lo que se localiza en la membrana plasmática en condiciones de hambre de Mn (aunque también puede detectarse cuando se produce hambre de Fe). SMF2 se localiza en vesículas intracelulares, por lo que sería responsable de la movilización de las reservas de Mn. SMF3, localizado en la vacuola, sería el encargado de movilizar las reservas de Fe vacuolares (Portnoy *et al.* 2000).

El mecanismo exacto del transporte sólo se conoce en algunos casos. Así, mientras que Nramp1 usa un antiporte con H<sup>+</sup> para sacar Mn/Fe del fagosoma (Forbes & Gros P. 2001), otro Nramp del intestino emplea un simporte con H<sup>+</sup> para absorber Mn, Fe, Co, Ni, Cu y Zn (Knöpfel *et al.* 2000).

En cuanto a su regulación, existe un cierto control por sustrato a nivel transcripcional. Sin embargo, también a nivel post-traducciona se modulan estos transportadores. Es el caso de SMF1 y 2. Cuando existe una deficiencia de Mn, estos transportadores se localizan a nivel de la membrana plasmática y en vesículas intracelulares, respectivamente. Sin embargo, cuando hay suficiente Mn o cuando está presente la proteína BSD2 (implicada en el control de calidad de proteínas del

retículo endoplásmico y en el control de la homeostasis de metales pesados), son dirigidos a la vacuola donde serán degradados (Portnoy *et al.* 2000). El otro Nramp de levadura, SMF3, no se regula por BSD2 o Mn, sino por Fe, ya que se localiza en la vacuola siempre que existe deficiencia en este nutriente, por lo que se supone que está implicado en su movilización.

### 3.3.1.3. Familia Ctr (Cu transporter)

Esta familia está formada por un conjunto de proteínas que de forma homo o heterodimérica son capaces de transportar Cu al interior de la célula. El Cu absorbido normalmente está en su forma +1, por lo que debe ser reducido antes de incorporarse a la célula (Hassett & Kosman 1995; Georgatsou *et al.* 1997).

En líneas generales su topología se caracteriza por tres dominios transmembrana, con el extremo N-terminal extracitoplasmático y el C-terminal en el citoplasma. El extremo N-terminal presenta normalmente unas secuencias ricas en metionina, siguiendo el patrón, MxxM o MxM, mientras que la zona C-terminal es rica en aminoácidos cargados, en cisteína y en histidina. Sin embargo, existen excepciones como Ctr3 de *S. cerevisiae* que carece de los motivos ricos en cisteína.

Estado monomérico estas proteínas en no son funcionales, sino que suelen ser di- o triméricas, formando normalmente un homooligómero, como en Ctr1 y Ctr3 (Dancis *et al.* 1994; Peña *et al.* 2000). En otros casos varios polipéptidos distintos se asocian formando heterómeros para transportar Cu, como ocurre en el caso de Ctr4 y Ctr5 en *Schizosaccharomyces pombe* (Zhou & Thiele 2001).

Como se ha mencionado, su función parece ser exclusivamente el transporte de Cu al interior de la célula, lo que tiene distintas implicaciones fisiológicas. Así, mientras que Ctr1 y 3 son transportadores de alta afinidad por el Cu (Dancis *et al.* 1994; Peña *et al.* 2000), Ctr2 moviliza las reservas vacuolares de Cu en caso de deficiencias (Kampfenkel *et al.* 1995).

No se conoce las características bioquímicas de los procesos llevados a cabo por estos transportadores. En cuanto a su regulación, están regulados transcripcionalmente y post-transcripcionalmente por los niveles de Cu (Bellemare *et al.* 2002; Petris *et al.* 2003). Si estos son elevados, la proteína es endocitada, llegando incluso a ser degradada para así asegurar que el Cu que ha sido incluido en la vesícula endocítica no es transferido al citoplasma (Petris *et al.* 2003). Esta



endocitosis es posible por el reconocimiento de uno de los dominios MxM (Guo *et al.* 2004).

### 3.3.2. Transportadores que extraen metales del citosol

#### *3.3.2.1. Familia CDF (Cation Diffusion Facilitator)*

Los miembros de esta familia se caracterizan por su capacidad de disminuir la concentración de cationes divalentes en el citoplasma. Forman una extensa familia con miembros en todos los niveles filogenéticos: bacterias, arqueas y eucariotas. En general, las proteínas que codifican estos genes presentan una topología característica con seis dominios transmembrana y los extremos N y C-terminal en la zona citoplasmática. Sin embargo, algunos miembros, como Msc2 (Li & Kaplan 2001), presentan doce pasos a través de la membrana, lo que puede ser el resultado de la fusión de un elemento con seis dominios transmembrana al típico de la familia CDF.

Otro rasgo distintivo es la presencia de un gran bucle citoplasmático entre las hélices IV y V. En esta zona se haya una secuencia rica en histidinas, con un patrón (HX)<sub>3-6</sub>. Ésta es una característica común con la familia ZIP. Asimismo es frecuente encontrar el motivo H-D/E-X-H-X-W-X-L-T-X<sub>8</sub>-H en la zona C terminal de la proteína.

Las secuencias de las hélices I, II y V están muy conservadas entre los distintos CDFs, y comparten un carácter anfipático que las hace candidatas a formar el canal por donde debe pasar el catión.

Los CDFs vegetales presentan también un motivo de "cremallera de leucina" que promueve la oligomerización de estas proteínas y que son esenciales para su función (Blaudez *et al.* 2003). No se sabe con seguridad si los CDFs de otros organismos son también oligoméricos o no.

Esta familia de transportadores es capaz de transportar distintos cationes divalentes, tales como Zn, Co o Mn (Conklin *et al.* 1992; Miyabe *et al.* 2001; Delhaize *et al.* 2003), y otros no esenciales como Cd (MacDiarmid *et al.* 2002). La consecuencia inmediata de la actividad de estos transportadores es una disminución del metal libre en el citoplasma, lo que logran ya sea exportándolo al exterior celular (Palmiter & Findley 1995) o al interior de orgánulos (MacDiarmid *et al.* 2003). Con respecto a los mecanismos de transporte se han descrito distintas posibilidades. Así, el transportador vacuolar Zrc1 depende de un antiporte

de H<sup>+</sup> (MacDiarmid *et al.* 2002; Delhaize *et al.* 2003). No obstante, se conocen casos de antiporte con Na<sup>+</sup> (Ohana *et al.* 2003).

En cuanto a su regulación, muchos de estos CDFs se regulan a nivel transcripcional (Gaither & Eide 2001), aunque existen algunas excepciones, como ZnT4 o ZnT6. En estos casos, cuando la concentración de Zn en el citosol se eleva por encima de cierto valor, ZnT4 y ZnT6 migran desde la red trans-Golgi a la membrana plasmática, donde contribuirían a la expulsión de Zn al exterior celular (Huang *et al.* 2002).

### 3.3.2.2. Familia de transportadores ABC (ATP binding cassette)

Son una gran superfamilia de transportadores primarios, que usan la hidrólisis del ATP para transportar una inmensa variedad de sustancias: lípidos, péptidos, azúcares, complejos de glutatión (GSH), glucurónidos, etc... Debido a la gran variedad de funciones en las que pueden intervenir, los genomas de los seres vivos contienen muchos miembros de esta superfamilia, como es el caso de *S. cerevisiae* con 29 transportadores ABC distintos (Decottignies & Goffeau 1997).

Típicamente constan de dos módulos, uno con seis dominios transmembrana (TMD) y otro, en la cara citoplasmática, de unión a ATP (NBD). Para realizar su función los transportadores ABC requieren de la acción de los dos tipos de módulos. Estos se pueden encontrar en el mismo polipéptido o en péptidos distintos, por lo que, en este último caso, el transporte sería realizado por la acción coordinada de, al menos, dos polipéptidos distintos (Hyde *et al.* 1990; Dean & Allikmets 1995). En el dominio NBD, de aproximadamente unos 200 aminoácidos, se conservan tres motivos. Uno de ellos es el llamado marca o firma de ABC, LSXGXR/K, específico de los miembros de esta familia, flanqueado por otros dos motivos, Walker A y B, implicados en la unión del ATP. Las secuencias Walker A y B, GX<sub>4</sub>GKT/S y RX<sub>6-8</sub>H<sub>4</sub>D respectivamente, no son exclusivas de los transportadores ABC, sino que también se encuentran en otras familias de proteínas con actividad kinasa (Walker *et al.* 1982; Higgins *et al.* 1986).

Como ya se ha indicado, los transportadores ABC intervienen en una gran variedad de procesos fisiológicos, lo que determina una gran diversidad estructural y la existencia de varias subfamilias. Dado que en esta Memoria de Tesis Doctoral nos interesan tan sólo aquellas que están involucradas en la homeostasis de metales pesados, nos centraremos pues en la subfamilia MRP (*Multidrug Resistance Protein*). Para más información sobre las otras subfamilias de transportadores ABC

se remite al lector interesado a algunas de las numerosas revisiones al respecto, como por ejemplo las de Theodolou (2000) y Bauer (1999).

Los transportadores MRP presentan la estructura TMD-NBD-TMD-NBD, si bien algunos, como *yfc1* y MRP1, presentan además una extensión en el extremo N-terminal que consta de 5 dominios transmembrana seguidos de una secuencia peptídica citoplasmática que une con el primer TMD (Falcón-Pérez *et al.* 1999; Leslie *et al.* 2004). Esta región adicional se conoce como TM0.

Se encuentran implicados principalmente en el transporte a la vacuola o al exterior celular de sustancias tóxicas conjugadas a glutatión, glucurónidos o taurocolato. La variedad de estas funciones determina que existan varios transportadores MRP distintos en cada organismo. Así, *A. thaliana* presenta al menos 14 (Kolukisaoglu *et al.* 2002) y *S. cerevisiae* al menos 11 (Bauer *et al.* 1999). Su función biológica es variada, desde la tolerancia a metales pesados, detoxificación de drogas y protección frente a estreses oxidativos (Szczyпка *et al.* 1994; Rebbeor *et al.* 2002; Kruh & Belinsky 2003; Bovet *et al.* 2005). Cuando se trata de protección frente a metales pesados, ésta se logra mediante la formación de complejos con glutatión, que serán luego introducidos en la vacuola, como es el caso de *yfc1* en *S. cerevisiae* (Li *et al.* 1996) o complejos con fitoquelatinas, como ocurre en *S. pombe*, que son introducidos en la vacuola por el transportador HMT1 (Ortiz *et al.* 1995).

En cuanto a su regulación sólo se conoce una activación transcripcional causada por la presencia del sustrato a transportar (Rebbeor *et al.* 2002). Además, en algunas ocasiones se han observado modificaciones post-traduccionales, como es el caso de la proteólisis de *yfc1* en dos fragmentos, uno consistente en el dominio TM0 y otro que contiene los dos TMDs y los dos NBDs propios de los MRPs. Pese a esta escisión, para que *yfc1* sea capaz de transportar complejos de glutatión ambos fragmentos han de estar presentes, si bien se desconoce cual es la base de esta interacción (Wemmie & Moye-Rowley 1997).

### 3.3.2.3. ATPasas de tipo P de la subfamilia CPx.

Las ATPasas del tipo P son una superfamilia de transportadores primarios de cationes, especialmente H, Ca, Mg, Na, Zn o Cu (Solioz & Vulpe 1996). Se caracterizan por tener ocho dominios transmembrana y una serie de secuencias consenso, como la de unión del ATP (GDXXNDXP), (Palmgren & Harper 1999) o la de fosforilación (DKTGT). Se encuentran a lo largo de toda la escala filogenética:

arqueas, bacterias y eucariotas. Dentro de esta superfamilia se distinguen distintas subfamilias, entre ellas la CPx, que además de los rasgos comunes mencionados presenta otros específicos como son el dominio de unión a metales (GMTCCXC) y las secuencias CPX en los segmentos transmembrana (CPC, CPH o CPS), de función regulatoria.

Las ATPasas de tipo P de la subfamilia CPx mejor estudiadas en eucariotas son las responsables de las enfermedades de Menkes y de Wilson, trastornos asociados a bajos niveles en sangre de Cu, motivada por la alteración de los genes MNK y WND respectivamente (Vulpe *et al.* 1993; Bull *et al.* 1993). Hoy día se conocen homólogos de estos genes en *S. cerevisiae* (Fu *et al.* 1995) y *A. thaliana* (Williams *et al.* 2000), entre otros. Estas ATPasas realizan un transporte activo de Cu, reduciendo los niveles citosólicos de este metal.

El mecanismo de transporte supone la formación de un intermediario acilfosfato que luego es desfosforilado por una actividad fosfatasa endógena, lo que libera la energía necesaria para transportar el Cu (Kuhlbrandt 2004).

La regulación y localización de estos transportadores obedece a la cantidad de Cu en el citoplasma (Lane *et al.* 2004; Mills *et al.* 2005).

### **3.4. Quelación a nivel citoplasmático**

En este apartado estudiaremos aquellos péptidos o pequeñas proteínas que, libres en el citoplasma, sirven para retener el exceso de metal, o para actuar de reserva de los mismos o dirigirlos hacia donde sea necesario.

#### 3.4.1. Glutation y Fitoquelatinas

El glutatión (GSH) es un tripéptido sintetizado enzimáticamente (Figura 6) con la secuencia:  $\gamma$ -glu-cys-gly. Está asociado principalmente al mantenimiento del potencial redox en el citoplasma mediante la oxidación reversible de su grupo tiol, en el ciclo GSH/GSSG (Noctor & Foyer 1998). Sin embargo, el GSH juega otros papeles, ligados fundamentalmente a la eliminación de compuestos tóxicos, en un proceso conocido como conjugación (Edwards *et al.* 2000). En la conjugación, el GSH se une mediante las enzimas glutatión-S-transferasas a sustratos poco solubles. Una vez conjugado, el producto será compartimentado en una vacuola o excretado al exterior celular. Un tercer aspecto del GSH es su capacidad para unirse a cationes divalentes (como el Cd), formando complejos que serán retirados del

citoplasma mediante transportadores específicos como *yfc1*, descrito anteriormente (Li *et al.* 1997). De este modo, numerosos organismos, como *S. cerevisiae* y briófitos, responden ante la presencia de Cd con una elevación de sus niveles de GSH (Bruns *et al.* 2001; Westwater *et al.* 2002).

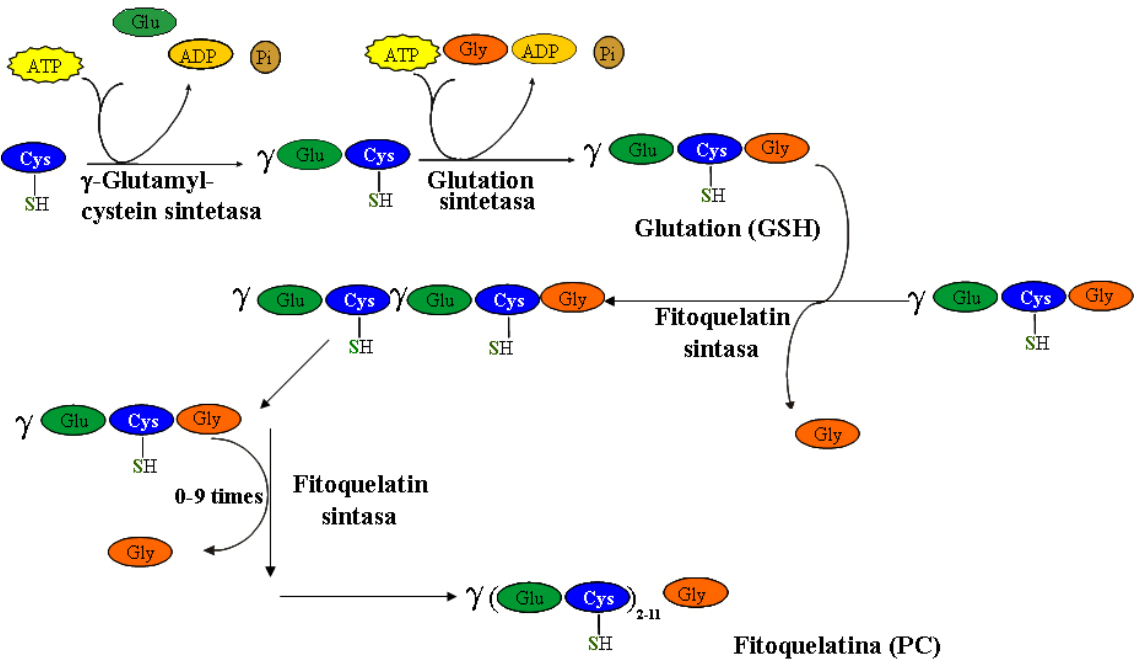


Figura 6. Síntesis de glutatión y fitoquelatina

Si la capacidad de quelación del GSH se basa en los grupos tiolos de la cisteína, es lógico pensar que a más grupos tiolos, mayor capacidad de quelación tendrá la molécula. Ésta es la razón de ser de las fitoquelatinas (PCs), oligopéptidos sintetizados enzimáticamente a partir del GSH y cuya estructura general es  $(\gamma$ -Glu-Gly)<sub>2-11</sub>-Gly, aunque este último aminoácido puede ser sustituido por  $\beta$ -alanina, serina o glutamato (Rauser 1995; Zenk 1996; Rauser 1999; Cobbett 2000). Como se observa en la Figura 6, la síntesis de PCs sólo requiere una enzima, la fitoquelatín sintasa (PCS) que usa como sustrato GSH. Esta enzima fue caracterizada por primera vez en *A. thaliana* en 1989 (Grill *et al.* 1989), pero se tardaron varios años más en obtener genes que codificaran la PCS, aislándose primeramente en *A. thaliana* y *S. pombe* (Howden *et al.* 1995; Ha *et al.* 1999). Sin embargo, pese al prefijo fito-, hoy día se sabe que las PCs no están limitadas solamente a plantas y hongos, sino que también se encuentran en algunas especies animales como *Caenorhabditis elegans* (Clemens *et al.* 2001).

A nivel transcripcional, la PCS puede estar regulada por metales pesados, como en *Triticum aestivum* (Clemens *et al.* 1999), pero en otros organismos parece ser que la única modulación se lleva a cabo a nivel de la activación de la enzima, como ocurre en *A. thaliana* (Vatamaniuk *et al.* 1999; Ha *et al.* 1999). La actividad PCS aumenta por la entrada en su centro activo de GSH con el grupo tiol bloqueado (por ejemplo con Cd) (Vatamaniuk *et al.* 2000).

Al igual que para el GSH, existen transportadores específicos capaces de retirar del citoplasma la PC unida al metal, como HMT1 en *S. pombe* (Ortiz *et al.* 1995)

#### 3.4.2. Metalotioneínas

Las metalotioneínas constituyen una familia de proteínas de pequeño tamaño, típicamente entre los 75 y 100 aminoácidos, caracterizadas por tener un alto contenido en cisteínas. Este contenido en cisteína es el que hace posible sus funciones, principalmente la quelación de iones metálicos y la protección frente a agentes oxidantes (Andrews 2000). La primera de sus funciones es a causa de la alta estabilidad de los cationes metálicos al coordinarse con los radicales sulfhidrilo del aminoácido. La segunda es debida a la capacidad de oxidarse reversiblemente de los radicales sulfhidrilo, formando puentes disulfuro con otros restos de cisteína próximos, aunque también puede asociarse a la retirada de metales que pudieran catalizar reacciones tipo Fenton. Estas reacciones consisten en la conversión del peróxido de hidrógeno en radicales hidroxilo catalizada por cationes divalentes como Fe y Cu.

El hecho de que para la funcionalidad de la proteína tan sólo sean importantes los restos de cisteína y la distancia entre ellos, ha condicionado que presenten una gran variedad de estructuras primarias, lo que a su vez dificulta su clasificación. De este modo, varios han sido los criterios usados para clasificar estas proteínas, aunque normalmente esta clasificación ha quedado reducida a las metalotioneínas de un grupo concreto de organismos, no siendo válida para la totalidad de las metalotioneínas conocidas. El intento más reciente de englobarlas a todas bajo un mismo criterio de clasificación, se basa en el establecimiento de familias que comparten un patrón de cisteínas común. De este modo hoy se conocen 16 familias, que engloban las metalotioneínas de procariontes, arqueas y eucariotas.

La acción de estas proteínas parece estar regulada sólo a nivel transcripcional por distintos estímulos, como son la presencia de metales pesados o de radicales libres (Andrews 2000; Lanfranco *et al.* 2002).

A diferencia del GSH o las PCs, no se conoce ningún transportador de MTs, por lo que se deduce que éstas se acumulan en el citoplasma.

### 3.4.3. Metalochaperonas

La escasez de micronutrientes minerales en algunos ambientes naturales y el devastador efecto que una acumulación de estos puede ejercer sobre la fisiología celular, han condicionado que la disponibilidad de metal libre, no asociado a proteínas, en el citoplasma sea casi nula. De este modo, en *Escherichia coli* se ha demostrado que la concentración de Zn y Cu libre en el citoplasma está por debajo de 1 pM (Outten & O'Halloran 2001; Changela *et al.* 2003), lo que traducido al volumen de una bacteria, supone menos de un ion libre en todo el citoplasma. Esto implica que la síntesis de metaloproteínas pudiera estar seriamente limitada por la bajísima concentración de metal. Para solucionar este problema hay un conjunto de proteínas, llamadas metalochaperonas, cuya función es la de servir de lanzaderas de metal, de modo que estos sean transferidos con rapidez para la síntesis de metaloproteínas.

El metal mejor estudiado en este sentido es el Cu, para el cual se han descrito tres tipos de metalochaperonas distintas: las de la ruta de secreción microsomal (retículo endoplásmico, aparato de Golgi y vesículas producidas por ellos), las que intervienen en la síntesis de la Cu, Zn SOD y las que intervienen en la síntesis de la citocromo oxidasa mitocondrial (O'Halloran & Culotta 2000; Rosenzweig & O'Halloran 2000; Harrison *et al.* 2000).

Atx1 en *S. cerevisiae* y su ortólogo en humanos Atox1 son los encargados de la transferencia de Cu a las ATPasas de tipo P de la red trans-Golgi (Larin *et al.* 1999; Hamza *et al.* 1999; Huffman & O'Halloran 2000). Estas proteínas constan de una estructura  $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$  que les permite mantener un átomo de Cu coordinado con la secuencia MxCxxC de su interior (Pufahl *et al.* 1997; Hung *et al.* 1998; Portnoy *et al.* 1999; Wernimont *et al.* 2000), e interaccionan con los dominios de unión a metal de las ATPasas de tipo P de la familia CPx como MNK y WND en humanos (Larin *et al.* 1999). Una vez que el Cu está en el interior del lumen del orgánulo, se desconoce si existen metalochaperonas que lo capten. Este mismo sistema de

transporte (Atox1/MNK) se ha descrito en *A. thaliana*, involucrando a las proteínas CCH/RAN1 (Himmelblau *et al.* 1998).

Las superóxido dismutasas son enzimas implicadas en la detoxificación de radicales libres, para lo cual necesitan de determinados núcleos metálicos. Una de ellas es la Cu, ZnSOD, enzima dimérica cuyos núcleos lo constituyen Cu y Zn. La enzima CCS (*Copper Chaperone for SOD*) en *S. cerevisiae* y su homóloga en *S. pombe*, PCCS (*Pombe CCS*), son las encargadas de transferir el Cu a la apoproteína (Rae *et al.* 1999; Laliberte *et al.* 2004). Estas metalochaperonas se unen a la apoproteína como si fueran uno de los monómeros, dado que su zona central se asemeja a la de la SOD. Posteriormente, los extremos N- y C-terminal de la metalochaperona transfieren el Cu coordinado desde regiones específicas de su secuencia (MxCxxC y CxC respectivamente) a la apo-SOD (Lamb *et al.* 1999; Schmidt *et al.* 2000; Lamb *et al.* 2000; Hall *et al.* 2000).

Por último y como ejemplo del tercer tipo de metalochaperonas, Cox17 es una metalochaperona citoplasmática capaz de translocarse al espacio intermembranoso de la mitocondria y ceder Cu a Sco1 y Cox11, proteínas de la membrana mitocondrial interna, para que éstas puedan formar los dos núcleos de Cu de la citocromo oxidasa (Glerum *et al.* 1996; Beers *et al.* 1997).

Pese al conocimiento relativamente detallado de las metalochaperonas de Cu, nada se sabe acerca de proteínas con función análoga para el Zn. Recientemente las metalotioneínas están recibiendo más atención en este sentido. De este modo, son cada vez más las observaciones de metalotioneínas que se inhiben por metales pesados o cuya deficiencia es letal en casos de hambre de Zn (Cui *et al.* 1998; Andrews & Geiser 1999; Egli *et al.* 2003). Asimismo, se ha verificado que algunos transportadores de Zn no son capaces de tomar el Zn libre, sino que requieren que se les presente asociado a una metalotioneína (Costello *et al.* 2004).

### **3.5. Metales pesados y defensas antioxidantes**

Numerosas evidencias sugieren que la exposición de las plantas a concentraciones excesivas de metales pesados con actividad oxidante, como Fe o Cu, causan daños oxidativos (de Vos *et al.* 1992; Gallego *et al.* 1996; Yamamoto *et al.* 1997). Esto parece deberse a la auto-oxidación de proteínas o a reacciones tipo Fenton. Además, este daño oxidativo se ha observado que plantas que tan sólo han sido expuestas a metales pesados sin actividad redox, como Cd o Ni, presentan



síntomas de daño oxidativo y especies de oxígeno reactivas (Gallego *et al.* 1996; Rao & Sresty 2000). En estos casos parece ser que el efecto de los metales pesados se debe fundamentalmente a un consumo importante de glutatión empleado en su detoxificación (Grill 1987; de Vos *et al.* 1992) (ver sección de transportadores ABC). Dado que el glutatión es un componente importante en el balance redox de la célula, esta reducción de sus niveles puede causar una acumulación de oxígeno reactivo (Noctor & Foyer 1998). De este modo, la presencia de metales pesados promueve respuestas específicas de daño oxidativo.

La reducción efectiva del daño oxidativo requiere de la acción de varias enzimas antioxidantes actuando en sincronía. El ion superóxido se transforma rápidamente en peróxido por acción de las superóxido dismutasas (Bowler *et al.* 1992). Sin embargo, el peróxido sigue siendo nocivo dada su capacidad de oxidar grupos tioles, por lo que no se debe acumular en niveles excesivos (Noctor & Foyer 1998). La catalasa se encarga de retirarlo, convirtiendo el peróxido en agua y oxígeno molecular. Un modo alternativo de eliminación del peróxido es mediante las peroxidasas (Jiménez *et al.* 1997). Las plantas también presentan niveles elevados de las enzimas involucradas en el ciclo del ascorbato-glutatión, en el que se elimina peróxido. En el primer paso de esta ruta, la ascorbato peroxidasa cataliza la reducción del peróxido a agua por el ascorbato, que a su vez es reducido mediante la acción conjunta de ascorbato reductasas y de glutatión reductasa.

En la Introducción de esta Memoria de Tesis Doctoral se ha intentado reflejar la importancia de los hongos formadores de micorrizas arbusculares en la nutrición mineral de las plantas y en la tolerancia de éstas a la presencia de niveles excesivos de metales pesados en el suelo. Se han revisado los mecanismos conocidos hasta la fecha por los que las micorrizas arbusculares actúan como elementos amortiguadores de la concentración de metales en los tejidos de la planta y los aspectos conocidos del mantenimiento de la homeostasis de metales en eucariotas. Sin embargo, y a pesar de su importancia, se conoce muy poco de los mecanismos moleculares implicados en la homeostasis de metales pesados en hongos pertenecientes a la Glomeromycota. Por lo tanto, el **objetivo general** de la presente Tesis Doctoral se centra en profundizar en el conocimiento de las bases moleculares de regulación de homeostasis de metales pesados en hongos formadores de micorrizas arbusculares. Como hongo modelo se ha elegido *Glomus*

*intraradices* por dos razones fundamentales: la facilidad de su cultivo monoxénico y el hecho de haber sido seleccionado por el Departamento de Energía de Estados Unidos para la secuenciación de su genoma.

Para la consecución de este objetivo general se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estudiar la respuesta de *G. intraradices* a la presencia de metales pesados en el medio a nivel morfogénico y citológico.
2. Identificación y caracterización de genes que codifican proteínas implicadas en su transporte y quelación así como de aquéllos implicados en la protección frente a estreses oxidativos.
3. Estudiar los genes identificados en un *Glomus* sp., aislado de suelos con altos niveles de metales pesados y adaptados a los mismos.
4. Definir mecanismos de tolerancia a metales pesados en hongos micorrícicos.



**MATERIALES**  
**Y**  
**MÉTODOS**



## 1. MATERIALES BIOLÓGICOS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

### 1.1. Materiales biológicos

#### 1.1.1. Micorriza (cultivo monoxénico)

##### 1.1.1.1. Establecimiento de los cultivos

Para la realización de la presente Memoria de Tesis Doctoral se han utilizado micorrizas desarrolladas en cultivos monoxénicos, es decir, cultivos dobles en placas de Petri de un hongo micorrícico y de raíces en condiciones de completa esterilidad. Como material vegetal se utilizaron raíces de zanahoria (*Daucus carota*) DC2 transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* y como material fúngico se utilizaron los hongos micorrícicos *Glomus intraradices* Smith & Schenck (DAOM 197198, Biosystematic Research Center, Ottawa, Canada), suministrado por el Dr. A. Bago de la EEZ-CSIC, Granada, y *Glomus sp.* aislado de suelos de Riotinto (Huelva) y puesto en cultivo monoxénico por C. Azcón, C. Cano y A. Bago de la EEZ-CSIC, Granada.

Los cultivos se establecieron en placas de Petri bi-compartimentadas con el fin de obtener compartimentos en los que sólo crecía el hongo, lo que facilitó la obtención de cantidades suficientes de biomasa fúngica sin interferencia de las raíces hospedadoras para acometer los estudios propuestos.

El establecimiento de los cultivos se realizó siguiendo la metodología descrita por St-Arnaud et al. (1996), con algunas modificaciones. Para ello, en uno de los compartimentos de la placa, compartimento de la raíz o CR (Fig. 7), se añadió medio M, mientras que en el otro, compartimento de las hifas o CH (Fig. 7), se puso medio M sin sacarosa (medio M-C). En el compartimento de la raíz se colocó un fragmento de unos 3-4 cm de una raíz joven proveniente de un cultivo axénico en medio M y el inóculo fúngico, consistente en un cubo de 0.5 cm<sup>3</sup> conteniendo al menos unas 50 esporas. Las placas se incubaron en oscuridad a 24°C durante varias semanas, aunque se abrieron periódicamente para retirar y devolver al CR las raíces que invadían el CH. Las placas se mantuvieron en las condiciones descritas hasta que el material fúngico del CH alcanzó el inicio de la transición de fase absorbente a fase esporulativa, salvo en aquellas placas que se destinaron a la cuantificación del hongo, que se mantuvieron hasta que el hongo completó la fase esporulativa.

### 1.1.1.2. Tratamientos con metales pesados y paraquat

El hongo desarrollado en el CH se sometió a dos tipos diferentes de tratamientos con los metales pesados: tratamientos a largo y a corto plazo.

En los tratamientos a largo plazo, las placas se prepararon como se indica en el apartado anterior con la diferencia de que el medio M-C del CH fue suplementado con diferentes concentraciones de  $ZnSO_4$  (75, 750 ó 7500  $\mu M$ ),  $CuSO_4$  (50, 500 ó 5000  $\mu M$ ) o  $CdSO_4$  (4.5, 45 ó 450  $\mu M$ ), mediante la adición del metal a partir de una solución estéril concentrada al medio M-C estéril antes de ser vertido a la placa.

En los tratamientos a corto plazo, los metales se adicionaron al hongo que se había desarrollado en el CH en medio M-C, como se describe en el apartado anterior. Para ello, se adicionaron por goteo 500  $\mu l$  de una solución concentrada estéril de  $ZnSO_4$ ,  $CuSO_4$  o  $CdSO_4$  por toda la superficie del CH para obtener concentraciones finales de 75 ó 7500  $\mu M$   $ZnSO_4$ , 50 ó 5000  $\mu M$   $CuSO_4$  o 450  $\mu M$   $CdSO_4$ . Las placas así suplementadas se incubaron durante 6 h, 12h, 24 h o 7 d en oscuridad a 24 °C.

En el caso de los tratamientos de paraquat, este compuesto se añadió de igual modo que en los tratamientos de metales pesados de corta duración, de modo que la concentración final en el CH fuera de 500  $\mu M$ . Al igual que en el caso anterior, las placas se incubaron durante 6h, 12 h, 24 h o 7 d en oscuridad a 24 °C

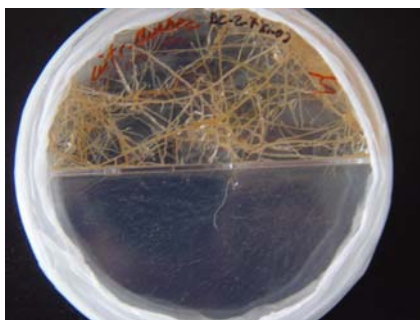


Figura 7. Placa de cultivo monoxénico.

### 1.1.2. Cepas de levadura

Para el análisis funcional de los genes de *G. intraradices* aislados en el presente estudio se han utilizado las siguientes cepas de levadura:

- DY1457 (*MAT $\alpha$ ade6can1-100ochis3leu2trp1ura3*): Cepa silvestre de *Saccharomyces cerevisiae*. Suministrada por el Dr. D. Eide (Universidad de Madison-Wisconsin, EE.UU.).
- CM137 (*MAT $\alpha$  can1-100oc his3 leu2 trp1 ura3-52 zrc1::his3 cot1::kanr*): Carece de los transportadores de Zn Zrc1 y Cot1 de la vacuola. Presenta hipersensibilidad al Zn y no puede crecer en medio SD suplementado con concentraciones de Zn superiores a 60  $\mu$ M (MacDiarmid et al. 2003). Suministrada por el Dr. D. Eide (Universidad de Madison-Wisconsin, EEUU).
- DEY1551 (*MAT $\alpha$ ade6can1-100oc his3.11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52  $\Delta$ msc2*). Cepa de *S. cerevisiae* mutada en el transportador CDF MSC2 del retículo endoplásmico (Ellis et al. 2004). No puede crecer en medio YPGE a 37° C (Li & Kaplan 2001). Suministrada por el Dr. D. Eide (Universidad de Madison-Wisconsin, EEUU).
- DTY113 (*MAT $\alpha$ gal1leu2-3,112histrp1-1ura3-50 $\Delta$ cup1*). Cepa de *S. cerevisiae* mutada en el gen de la metalotioneína (CUP1). No puede crecer en concentraciones de Cu o Cd superiores a 500 y 50  $\mu$  M, respectivamente (Tamai et al. 1993). Suministrada por el Dr. S. Otonello (Universidad de Parma, Italia).
- FY261 (*h<sup>+</sup>ade6-M216leu1-32ura4- $\Delta$ 18can1-1*). Cepa silvestre de *Schizosaccharomyces pombe* (Clemens et al. 2002). Suministrada por el Dr. S. Clemens (Universidad de Halle, Alemania).
- $\Delta$ zhf::ura4 (*h<sup>+</sup>ade6-M216leu1-32ura4- $\Delta$ 18 can1-1 $\Delta$ zhf::ura4*). Cepa de *S. pombe* mutada en un transportador CDF del retículo endoplásmico (ZHF). Su crecimiento se ve muy afectado por aumentos en la concentración de Zn en el medio (Clemens et al. 2002). Suministrada por el Dr. S. Clemens (Universidad de Halle, Alemania).

Todas las cepas se cultivaron en oscuridad a 30° C durante 3 días, salvo que se indique lo contrario.

### 1.1.3. Cepas de *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* utilizadas para la multiplicación de los plásmidos usados en este estudio son las siguientes:



- XL1-Blue (*recA1endA gyrA96 thi-1hsdR17supE44relA1lac* [F' *proAB lacIqZ.M15Tn10(Tetr)*]). Cepa de alta eficiencia para la transformación de ADN que permite transformaciones eficientes de ADN metilado y no metilado y la selección de clones recombinantes mediante detección de actividad β-galactosidasa. El hecho de que sea *recA*, minimiza el riesgo de recombinaciones inespecíficas.
- TOP10F' (F' {*lacI<sup>q</sup> Tn10(Tet<sup>R</sup>)*} *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) *phi80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG*) Cepa de alta eficiencia para la transformación de ADN que permite transformaciones eficientes de ADN metilado y no metilado, selección mediante detección de actividad β-galactosidasa de clones recombinantes. Además es *recA*, por lo que se minimiza el riesgo de recombinaciones inespecíficas.
- MRA(P2) Δ(*mrcA*)183 Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac*). Cepa que se empleó para el escrutinio de genotecas en fagos. Permite la selección de fagos recombinantes al impedir el desarrollo de los no recombinantes.

#### 1.1.4. Mantenimiento de cepas

Las cepas de levadura y de *E. coli* descritas anteriormente se conservaron a -80° C en glicerol al 20 %. Para ello se cultivan en medio líquido selectivo hasta el final de la fase de crecimiento exponencial (cultivo de 16 horas). A 200 μl de estos cultivos se le añaden 800 μl de glicerol al 80 % estéril, se agita vigorosamente y se almacenan a -80° C.

### **1.2. Medios de cultivo**

#### 1.2.1. Medio para el cultivo monoxénico de los hongos micorrícicos

Los cultivos monoxénicos de los hongos micorrícicos se establecieron en medio M (Chabot *et al.* 1992), cuya composición es:

1.21 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

21.8 mM NaFe/EDTA

4.51 μM KI

10 % Solución Macroelementos

0.1% Microelementos

1% Vitaminas

1 % Sacarosa

0.35 % Phytigel

Finalmente el pH se ajustó a 5.5 con NaOH y el medio se esterilizó en autoclave a 120° C durante 20 minutos.

Solución de macroelementos: 30 mM MgSO<sub>4</sub>, 7.9 mM KNO<sub>3</sub>, 8.7 mM KCl, 0.35 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 14 mM NaSO<sub>4</sub>.

Solución de microelementos: 30 mM MnCl<sub>2</sub>, 9.3 mM ZnSO<sub>4</sub>, 24.2 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5 mM CuSO<sub>4</sub>, 10 μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.

Vitaminas (100 X): 4 mM Glicina, 29.6 μM Tiamina hidrocloreto, 49 μM Piridoxina hidrocloreto, 0.4 mM Ácido nicotínico, 27.7 mM Mio-inositol.

### 1.2.2. Medios de cultivo de *S. cerevisiae*

#### *1.2.2.1 Medio YPD (Yeast extract- Peptone-Dextrose)*

Éste es un medio no selectivo, usado para el crecimiento de cepas de *S. cerevisiae* que no portan plásmidos (Sherman *et al.* 1986).

1 % Extracto de levadura

2 % Peptona

2 % Glucosa

El medio se esterilizó en autoclave a 120° C durante 20 minutos.

#### *1.2.2.2. Medio SD (Synthetic-Dextrose)*

El SD es un medio selectivo que permite seleccionar en base a la auxotrofia que presenta la cepa a cultivar (Sherman *et al.* 1986). Se usa siempre que la cepa esté transformada con algún plásmido.

0.67% Difco Yeast Nitrogen Base sin aminoácidos

2% Glucosa

0.01% adenina, arginina, cisteína, leucina, lisina, treonina, triptófano y uracilo

0.005% Del resto de aminoácidos

El medio se esterilizó en autoclave a 120° C durante 20 minutos

La fuente de carbono, aminoácidos y bases nitrogenadas se escogerán en función de las necesidades auxotróficas de la levadura.

#### 1.2.2.3. Medio LZM (*Low Zn Medium*)

LZM es un medio de cultivo con muy bajas concentraciones de Zn (Gitan & Eide 2000). Por ello, para su preparación se debe evitar el usar elementos metálicos, como espátulas y se usará material de policarbonato lavado previamente con 1M EDTA y 1 M citrato sódico pH 4.2. Las soluciones se esterilizan mediante filtración con filtros de nitrato de celulosa 0.45 µM. El medio consiste de:

0.17% BIO101 yeast nitrogen base sin aminoácidos, sulfato amónico, ni Zn

43 mM sulfato amónico

20 mM citrato sódico pH 4.2

22.5 µM MnCl<sub>2</sub>

9.25 µM FeCl<sub>3</sub>

2% Hexosa (Glucosa, Galactosa,...)

0.01% aminoácidos o bases nitrogenadas

1 mM EDTA pH 8.0

Esterilizar por filtración y poner en matraces de 500 ml de policarbonato.

La elección de la fuente carbonada y de los aminoácidos y bases nitrogenadas dependerá de la auxotrofia de la levadura.

#### 1.2.2.4. Medio YPGE (*Yeast extract- Peptone – Glycerol – Etanol*)

Se trata de un medio para el crecimiento respiratorio de *S. cerevisiae* (Li & Kaplan 2001) y está compuesto de:

1 % Extracto de levadura

2 % Peptona

2 % Glicerol

2 % Etanol

Este medio se esteriliza por filtración.

### 1.2.3. Medios de cultivo de *Schizosaccharomyces pombe*

#### *1.2.3.1. Medio YES (Yeast Extract with Supplementation)*

Este medio se emplea para el crecimiento de cepas de *S. pombe* no transformadas (Moreno *et al.* 1991), y está compuesto por

0.5 % Extracto de levadura

3 % Glucosa

0.0225 % aminoácidos y bases nitrogenadas (en función de la auxotrofia)

El medio se esterilizó en autoclave a 120° C durante 20 minutos

#### *1.2.3.2. Medio EMM (Edinburgh Minimal Medium)*

Este medio se emplea para el cultivo de *S. pombe* que portan plásmidos y está compuesto por (Moreno *et al.* 1991):

0.3% Hidrógeno ftalato potásico

0.22% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0.5% NH<sub>4</sub>Cl

2% Glucosa

0.0225% aminoácidos y bases nitrogenadas (en función de la auxotrofia)

20 ml/l Solución de sales

1 ml/l Solución de vitaminas

0.1 ml/l Solución de minerales

El medio se esterilizó por filtración

---

Solución de sales: 5.25% MgCl<sub>2</sub>, 0.0735% CaCl<sub>2</sub>, 5% KCl, 0.2% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Esterilizar por filtración.

Solución de vitaminas: 0.1% Ácido pantoténico, 1% Ácido nicotínico, 1% Inositol, 0.001% Biotina. Esterilizar por filtración.

Solución de minerales: 0.5% H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.4% MnSO<sub>4</sub>, 0.4% ZnSO<sub>4</sub>, 0.2% FeCl<sub>2</sub>, 0.04% Ácido molibdicó, 0.1% KI, 0.04% CuSO<sub>4</sub>, 1% Ácido cítrico. Esterilizar por filtración.

Los medios de levadura descritos se gelificaron mediante la adición 2% agar, cuando fue necesario.

#### 1.2.4. Medios de cultivo de *E. coli*

##### *1.2.4.1. Medio LB (Luria-Bertani)*

Es el medio usado habitualmente para el cultivo de esta bacteria:

1 % Triptona

0.5 % Extracto de levadura

1 % NaCl

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH. Cuando se requerían medios sólidos se adicionó 1.5% agar.

##### *1.2.4.2. Medio SOC*

Ha sido el medio de elección para optimizar el crecimiento de células transformadas por electroporación:

2 % Triptona

0.5 % Extracto de levadura

0.05 % NaCl

2.5 mM KCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

20 mM Glucosa

Ajustar el pH a 7.5 con NaOH

Estos medios se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 120° C.

Estos medios se gelificaron cuando resultó necesario con la adición de 1.5% agar.

La selección de transformantes en los medios de cultivo descritos se realizó mediante la adición de 0.1 mg/ml de ampicilina a los mismos. Para discriminar entre aquellas colonias con actividad  $\beta$ -galactosidasa y aquellas que no la tienen, se

suplementó cada placa de cultivo con 100  $\mu$ l de 100 mM IPTG y 35  $\mu$ l de 50 mg/ml X-gal. La adición de estos compuestos confiere color azul a las colonias que presentan  $\beta$ -galactosidasa.

## 2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### 2.1. Plásmidos

- pGEM-T Easy (Promega): Vector de clonación de *E. coli* por colas de adenina típicas de PCR con enzimas sin actividad correctora de prueba. El sitio de clonación se encuentra en el marco del gen LacZ, lo que permite la selección de los plásmidos portadores del inserto mediante un escrutinio de colonias blancas/azules cuando se cultivan en presencia de X-gal. La selección se realiza por la tolerancia al antibiótico ampicilina que confiere este plásmido.
- TOPO pYES 2.1 (Invitrogen): Vector de clonación de *S. cerevisiae* por colas de adenina típicas de PCR con enzimas sin actividad correctora de prueba. Es un vector de alto número de copias (origen de replicación del plásmido de 2 $\mu$ ) seleccionable en cepas auxotróficas para uracilo. Asimismo presenta un origen de replicación de *E. coli*, donde confiere resistencia a ampicilina.
- pYES2: Vector de expresión de alto número de copia de *S. cerevisiae*. La transcripción se logra al añadir galactosa como fuente de carbono, ya que induce la transcripción a partir del promotor Gal1 que presenta el plásmido. Presenta el origen de replicación del plásmido de 2 $\mu$  y un origen de replicación de *E. coli*. La selección se hace en base a auxotrofia de uracilo, cuando está en *S. cerevisiae*, y por resistencia a ampicilina, cuando se encuentra en *E. coli*. Suministrado por el Dr. K. Venema (Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada).
- pGintZnT1: pYES2: Contiene la secuencia codificante del transportador de Zn de *G. intraradices* *GintZnT* bajo el control del promotor Gal1.
- pGintZnT1-HA: pGintZnT1 al que se le han añadido tres epítomos de la hemaglutinina del virus de la gripe en la zona C-terminal. Esta fusión se logró mediante recombinación homóloga de pYES2 con el producto de amplificar *GintZnT1* con los cebadores ZnT3 y ZnT8 y con el fragmento obtenido por PCR de pZRC1-HA usando los cebadores HA1 y HA2.

- pZRC1-HA. Plásmido centromérico de *S. cerevisiae* que contiene el promotor y la secuencia codificante del transportador de Zn Zrc1 fusionada, a tres epítomos de la hemaglutinina del virus de la gripe en la zona C-terminal (MacDiarmid *et al.* 2002). Presenta asimismo un origen de replicación de *E. coli*. En *S. cerevisiae* es seleccionable mediante auxotrofia a uracilo y en *E. coli* mediante resistencia a la ampicilina. Suministrado por el Dr. Colin MacDiarmid (Universidad de Missouri-St Louis, EE.UU).
- pDg2L. Plásmido centromérico reportero de los niveles de Zn citoplasmáticos. Detecta los niveles de Zn mediante la inducción de un promotor con secuencias ZRE (secuencia inducible en condiciones de deficiencia de Zn) que promueve la transcripción del gen de la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* (Zhao *et al.* 1998). Se selecciona en cepas auxotróficas para la leucina. Este plásmido se puede replicar de forma estable en *E. coli*, a la que confiere resistencia a ampicilina. Suministrado por el Dr. David Eide (Universidad de Wisconsin, EE.UU).
- pFL61. Vector de expresión de *S. cerevisiae* de alto número de copia, dado que posee el origen de replicación del plásmido de  $2\mu$ . El inserto se transcribe a partir de un promotor constitutivo de la fosfoglicerato kinasa (Minet *et al.* 1992). La selección de los transformantes se realiza mediante auxotrofia a uracilo. Este plásmido se puede replicar de forma estable en *E. coli*, a la que confiere resistencia a ampicilina. Suministrado por la Dra. M. Minet (Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, Francia)
- pFL61::GmarMT1. pFL61 que contiene la secuencia de la metalotioneína de *Gi. margarita* (Lanfranco *et al.* 2002). Suministrado por la Dra. L. Lanfranco (Universidad de Turín, Italia).
- pMT1: pFL61 que contiene la secuencia de la metalotioneína de *G. intraradices* bajo el control del promotor de la PGK.
- pSGP72. Vector de expresión de *S. pombe* seleccionable por uracilo (Clemens *et al.* 2002). Este plásmido se puede replicar de forma estable en *E. coli*, a la que confiere resistencia a ampicilina. Suministrado por el Dr. S. Clemens (Universidad de Halle, Alemania).
- YEp363. Vector de *S. cerevisiae* que permite la fusión de una secuencia reguladora aguas arriba del gen *LacZ* (Myers *et al.* 1986). Posee orígenes de replicación de *E. coli* y del círculo de  $2\mu$ . En *S. cerevisiae* se selecciona

mediante auxotrofia a leucina y en *E. coli* mediante resistencia a ampicilina. Suministrado por el Dr. D. Eide (Universidad de Wisconsin, EE.UU).

## 2.2. Aislamiento de ADN

### 2.2.1. Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

Se usó el kit QIAPREP de QIAGEN siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 2.2.2. Extracción de ADN plasmídico de *S. cerevisiae*

Protocolo adaptado de Ausubel *et al.* (2005)

1. Crecer las células toda la noche en 10 ml de medio selectivo.
2. Sedimentar las células centrifugando a 3000xg durante 5 min. y lavar el sedimento con 0.5 ml de agua estéril.
3. Transferir a un tubo de microcentrífuga y centrifugar 15 seg a 10000g
4. Eliminar el sobrenadante y añadir 0.2 ml de tampón de extracción, 0.2 ml fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), 0.3 ml de bolitas de vidrio de 425-600  $\mu\text{m}$  (SIGMA)
5. Agitar vigorosamente con el vortex durante 3-4 min.
6. Añadir 0.2 ml de tampón TE y centrifugar a 10000xg durante 5 min.
7. Transferir la fase superior acuosa a un tubo nuevo de microcentrífuga y añadir 1 ml de isopropanol. Incubar toda la noche a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a 10000xg durante 10 min. y retirar el sobrenadante.
9. Lavar el sedimento con 1 ml de 70% etanol
10. Retirar el etanol y dejar secar el sedimento al vacío durante 10 min.
11. Resuspender en 50  $\mu\text{l}$  de agua destilada

El rendimiento de este procedimiento es normalmente bajo, por lo que para recuperar cantidad suficiente de ADN, es necesario utilizar 1  $\mu\text{l}$  de esta solución para transformar células electrocompetentes de *E. coli*. Posteriormente, se extrajeron



el ADN plasmídico de las células transformadas de *E. coli* transformadas siguiendo el protocolo indicado en el apartado anterior.

Tampón de extracción: 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM TrisCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0.

Tampón TE: 10 mM TrisHCl pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0.

### 2.2.3. Extracción de ADN genómico de *G. intraradices*

#### *2.2.3.1 Recuperación del micelio extraradical de *G. intraradices**

El micelio se recupera siguiendo el método descrito por Bago *et al* (1999), consistente en disolver el compartimiento de las hifas con citrato sódico. Para ello se retira con un bisturí estéril el compartimiento de las hifas de un máximo de 4 placas de cultivo y se añaden a 200 ml de citrato sódico 0'5 M pH 6.0. El medio se disuelve en un homogeneizador (Waring) mediante la aplicación de un pulso de 5 seg. a máxima potencia y seguidos un minuto después de 5 pulsos, separados por un minuto entre sí, a menor potencia de 5 seg. cada uno. El micelio así homogeneizado se recupera con un tamiz de 50  $\mu$ m de malla y se seca en papel de filtro. Una vez seco se transfiere a un tubo eppendorf y se congela en nitrógeno líquido, y se almacena a -80°C hasta su posterior uso.

#### *2.2.3.2. Extracción de ADN*

El ADN genómico de *G. intraradices* se extrajo de unos 30 mg de micelio procedente de cultivo monoxénico empleando el kit DNeasy Plant Minikit de Qiagen, siguiendo las instrucciones de fabricante.

### **2.3. Cuantificación de ADN**

El ADN extraído se cuantificó con la ayuda de un espectrofotómetro. Para ello se utilizaron cubetas de cuarzo. La absorbancia de una alícuota de 5  $\mu$ l de muestra diluída en 995  $\mu$ l de agua milli-Q estéril fue medida a 230, 260 y 280 nm. Cada unidad de absorbancia a 260 nm fue considerada como 50  $\mu$ g/ml de ADN. Para poder conocer una posible contaminación por carbohidratos se calculó la relación entre las absorbancias obtenidas a 260 y 230 nm, debiendo ser ésta superior a 2. Para considerar una muestra libre de proteínas y/o fenol la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm debía tomar un valor superior a 1.8.

## 2.4. Visualización del ADN mediante electroforesis en geles de agarosa

La separación electroforética del ADN se realizó en geles de agarosa al 1.6% en tampón TBE. La electroforesis se realizó en tampón TBE a 100 V. Se confirió densidad a las muestras disolviéndolas en tampón de carga 1x. La visualización del ADN en los geles se realizó mediante tinción con bromuro de etidio y fotografía del gel expuesto a luz UV (260 nm).

El rendimiento de este procedimiento es normalmente bajo, por lo que para recuperar cantidad suficiente de ADN, es necesario utilizar 1  $\mu$ l de esta solución para transformar células electrocompetentes de *E. coli*. Posteriormente, se extrajo el ADN plasmídico de las células transformadas de *E. coli* transformadas siguiendo el protocolo indicado en el apartado anterior.

---

Tampón TBE: 89 mM Tris Base, 89 mM Ácido bórico, 2 mM EDTA. Ajustar a pH 8.0 con HCl.

Tampón de carga (6x): 50% sacarosa, 0.3% Azul de bromofenol.

## 2.5. Reacción en cadena de la polimerasa

En tubos de 0.2 ml se preparó la siguiente mezcla de reacción:

ADN molde (10-100 ng)  
2.5  $\mu$ l Tampón 10x de la Polimerasa Termostable  
0.75  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> 50 mM  
5  $\mu$ l dNTPs 1mM  
0.5  $\mu$ l Cebador 5' (10  $\mu$ M)  
0.5  $\mu$ l Cebador 3' (10  $\mu$ M)  
0.5  $\mu$ l Polimerasa termostable (5 U/ml)  
Agua bidestilada estéril hasta 25  $\mu$ l

Los tubos se colocaron en un termociclador (Perkin-Elmer Mod 2400) y se utilizó un programa estándar de 35 ciclos, consistiendo cada ciclo en una desnaturalización a 94°C durante 30 seg., una fase de hibridación a 55°C durante 30 seg. y una extensión 72° C de durante 45seg/kb en caso de polimerasas

termostables sin actividad correctora de prueba y 90 seg/kb si presentan dicha actividad. Al final se realizó una extensión a 72 C durante 7 minutos.

Los cebadores usados en las diferentes PCRs realizadas en este estudio se recogen en la Tabla 1.

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Uso</b>
ZnT1	TATTCTCATGTCCGCTATTCCTTA	3' RACE GintZnT1
ZnT2	AGCAAGCAAGCAGTTTCGTGATTAT	5' RACE GintZnT1
ZnT3	CACTATAGGGAATATTAAGCTTGGTACCGAGCTCG GATCCCGCAGAGTTCGCGGGGGAAA	Ensamblaje GintZnT1 completo
ZnT4	GCACAACCAACTCCAAGGAT	Ensamblaje GintZnT1 completo
ZnT5	AAAATCCGTTGTTGTCATC	Ensamblaje GintZnT1 completo
ZnT6	TTCATTTGCGACAAGTTCCA	Ensamblaje GintZnT1 completo
ZnT7	GCAACTTCTGATACGAAGCG	Ensamblaje GintZnT1 completo
ZnT8	GCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAG AATTCAATTTTAAATTAGAGGGAGTCG	Ensamblaje GintZnT1 completo
ZnT9	ATGGCTTTATGTCTTAGTATTTTC	PCR Cuantitativa GintZnT1
ZnT10	TCTCGTGACTCTTGTCAGCC	PCR Cuantitativa GintZnT1 y Paseo Cromosómico
HA1	ATCACAACCACCAAAAGATATGACGACGACTCCCT CTAATTACCCATACGATGTTCC T	Adición de epítipo HA a GintZnT1
HA2	GCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAG AATTCTTAAGCGTAATCTGGAA	Adición de epítipo HA a GintZnT1
ABC1	AGAGATAGAGAAACAAGTCAACCTG	PCR Cuantitativa de GintABC1
ABC2	TAATCATAATACCCACACCAGCATA	PCR Cuantitativa de GintABC1

Tabla 1. Lista de cebadores usados. La temperatura de alineamiento usada para todos ellos es de 55° C salvo que se indique lo contrario.

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Uso</b>
MT1	GGAGATAGTTGTCAATGTACAGGTG	3' RACE y PCR Cuantitativa de GintMT1
MT2	AGTTACATGCTCCTGGAGAACAACCTT	5' RACE y PCR Cuantitativa de GintMT1 y Paseo Cromosómico
PCS1	GARCCIGCITIYTG YGG	Búsqueda de Fitoquelatín sintasa
PCS2	GGR TAYTTRAAICKIGC	Búsqueda de Fitoquelatín sintasa
SOD1	GTACTATTACTTTTCATTCAGGA	PCR Cuantitativa de GintSOD1
SOD2	AGTTCATGACCACCTTTACCAA	PCR Cuantitativa de GintSOD1
RMF	TGTTAATAAAAATCGGTGCGTTGC	Primers ARNr 18S para PCR Cuantitativa
RMR	AAAACGCAAATGATCAACCGGAC	Primers ARNr 18S para PCR Cuantitativa

Tabla 1. Lista de cebadores usados. La temperatura de alineamiento usada para todos ellos es de 55° C salvo que se indique lo contrario.

## 2.6. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

Las digestiones del ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas de tampón y temperatura, siguiendo las indicaciones recomendadas por el proveedor (New England Biolabs).

## 2.7. Desfosforilación de vectores de clonación

Para evitar la posible circularización y la ligación entre dos moléculas del vector, los vectores digeridos con endonucleasas de restricción se desfosforilaron mediante tratamiento con fosfatasa alcalina de intestino de ternero (Roche). Para ello se incubó a 37° C durante 30 min. la siguiente mezcla de reacción:

- 10 µl de vector digerido
- 2 µl de tampón de fosfatasa alcalina (10x)
- 1 µl de fosfatasa alcalina (1U/ µl)
- 17 µl de agua miliQ

Tras la desfosforilación se purificó el ADN usando el protocolo de "CleanUp" del kit QiaexII de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **2.8. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa**

Para ello se empleó el kit QiaexII de Qiagen usando las instrucciones del fabricante.

## **2.9. Ligación en vectores de clonación**

La ligación entre un fragmento de ADN y el vector de clonación adecuado se realizó usando una relación molar inserto:vector de 3:1.

### 2.9.1 Productos de PCR

#### *2.9.1.1. Ligación en pGEM-T Easy*

En un tubo de microcentrífuga se incubó durante toda una noche a 4°C la siguiente mezcla de reacción:

- X µl inserto
- 1 µl ligasa
- 1 µl vector (50ng/ml)
- X+2 µl tampón (2x)

#### *2.9.1.2. Ligación en TOPO pYES 2.1*

La razón de elegir este vector es que su promotor es un promotor gal4 eucariótico con lo que al transformar una bacteria no se corre el peligro de que el fragmento del gen resulte tóxico. Es especialmente indicado para la clonación de genes que codifican proteínas transportadoras. Para ello se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente la siguiente mezcla de reacción

- 0'5-4 µl producto de PCR
- 1 µl Solución salina
- 1 µl vector
- Completar hasta 6 µl con agua miliQ

### 2.9.2. Ligación de fragmentos de restricción

Los productos de una digestión con extremos compatibles se ligaron en un tubo de microcentrífuga durante toda la noche a 4°C. La mezcla de ligación consistía de:

- X µl inserto
- 50 ng vector
- 1 µl tampón ligasa T4
- 1 µl ligasa (Roche)
- Completar hasta 10 µl con agua miliQ

### 2.9.3. Ligación mediante recombinación homóloga

Este método permite unir fragmentos de ADN sin necesidad de usar ligasa. Se requiere que los fragmentos a ligar compartan 40 pb de homología en sus extremos. Estos fragmentos son frecuentemente obtenidos mediante PCR, salvo el vector de clonación, el cual ha de ser linearizado previamente para que ocurra el evento de recombinación. En el caso de la recombinación homóloga en levadura, se siguió el protocolo indicado a continuación:

1. Preparar una solución consistente en 7 µl de cada producto de PCR (no hay necesidad de purificar el producto de PCR) y unos 100 ng de vector linearizado.
2. Transformar *S. cerevisiae* con la solución de ADN preparada.
3. Plaquear en un medio selectivo de acuerdo con la autotrofia conferida por el plásmido.

## **2.10. Transformación**

### 2.10.1. Transformación de células de *E. coli*

#### *2.10.1.1. Preparación de células quimiocompetentes*

Para ello se siguió la metodología descrita por Hanahan (Hanahan 1983), la cual se describe a continuación:

1. Inocular 50 ml de LB suplementado con 10 mM de MgSO<sub>4</sub> con 2 ml de un precultivo.

2. Incubar a 37° C hasta que alcance una D.O.<sub>550</sub> de 0.5 (1-2 horas).
3. Transferir los cultivos a un tubo de centrifuga de 25 ml y enfriar en hielo durante 15 min.
4. Sedimentar las bacterias centrifugando a 750xg durante 12 min. a 4°C.
5. Retirar el sobrenadante suavemente y limpiar bien las paredes del tubo.
6. Resuspender las células en 16 ml de solución RFI e incubar durante 15 min. en hielo.
7. Centrifugar como en el paso 4 y resuspender las células en 2 ml de RFII.
8. Incubar 15 min. en hielo.
9. Preparar alícuotas de 100 µl.
10. Congelar a -80° C.

Todo el material usado (puntas, tubos de centrifugas,...) han de estar fríos.

---

RFI: 100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM Acetato potásico, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 11.9% Glicerol. Ajustar el pH a 5.8 con acético 0'.2 M.

RFII: 10 mM MOPS, 1 mM RbCl, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 11.9% Glicerol. Ajustar el pH a 6.8 con NaOH 0.5 M. Ambas soluciones se esterilizan por filtración.

#### *2.10.1.2. Preparación de células electrocompetentes*

Protocolo adaptado de Ausubel et al (2005)

1. Inocular l de LB a una D.O.<sub>600</sub> 0.02 e incubar a 37° C hasta que alcancen una D.O.<sub>600</sub> de 0.6 (2.5 horas).
2. Repartir entre tubos de de centrifuga de X ml y centrifugar 4000xg durante 10 min.
3. Eliminar el sobrenadante.
4. Lavar las células con 200 ml de agua estéril y volver a centrifugar como se indica en el paso 2.
5. Lavar el sedimento con 100 ml de agua estéril. Repetir el paso 2.
6. Lavar el sedimento con 50 ml de glicerol al 10 %. Repetir el paso 2.

7. Lavar el sedimento con 50 ml de glicerol al 10 %. Repetir el paso 2.
8. Retirar con cuidado el sobrenadante y añadir 2 ml de glicerol al 10 %.
9. Hacer alícuotas de 20  $\mu$ l por tubo y conservar a -80° C.

#### *2.10.1.3. Transformación de células quimiocompetentes*

Para transformar las células quimiocompetentes se utilizó la metodología descrita por Rodríguez y Tait (1983), siguiendo el protocolo que se indica a continuación:

1. Incubar las células competentes 15 min. en hielo
2. Añadir 25 ng de plásmido e incubar en hielo 30 min.
3. Incubar durante seg. a 42° C.
4. Incubar en hielo 10 min.
5. Añadir 1 ml de LB e incubar 1 hora en agitación a 37° C
6. Plaquear las células en placas de medio selectivo.

#### *2.10.1.4. Transformación de células electrocompetentes*

Las células electrocompetentes se transformaron usando un electroporador EC-100 (Krakeler Scientific Inc.), siguiendo las intrucciones del fabricante. Básicamente, se siguió el siguiente protocolo:

1. Colocar las células electrocompetentes y las cubetas en hielo
2. Encender el generador de corriente y cargar a 1500 V.
3. Mezclar 20  $\mu$ l de células con el ADN y pasar a la cubeta sin dejar burbujas. Secar la cubeta y poner en la cámara de descarga.
4. Realizar la descarga
5. Colocar la células inmediatamente en hielo y añadir 450  $\mu$ l de SOC
6. Transferir las células a un tubo de microcentrífuga e incubar 1 h a 37°C en agitación.
7. Plaquear en medio selectivo.



### 2.10.2. Transformación de *S. cerevisiae*

Se utilizó la metodología descrita por Schiestl y Gietz (1989) consistente en:

1. Inocular 10 ml de medio YPD con células en fase estacionaria, de modo que la D.O.<sub>600</sub> sea próxima a 0.1. Incubar a 30° C en agitación hasta que alcance una D.O.<sub>600</sub> de 0.4 (unas 4 horas)
2. Sedimentar las células mediante centrifugación a 3000g durante 5 min. Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 5 ml de Solución de Litio.
3. Centrifugar de nuevo, eliminar el sobrenadante y resuspender las células con 100 µl de Solución de Litio.
4. Mientras se centrifugan las células, hervir el esperma de salmón (10 mg/ml) durante 10 min. Poner en hielo.
5. Añadir a un tubo de microcentrífuga ADN plasmídico (0.1-1 µg), 60 µl de las células resuspendidas en el paso 3 y 7 µl de esperma de salmón. Agitar vigorosamente.
6. Añadir 0.45 ml de Solución PEG. Agitar vigorosamente.
7. Incubar las células a 30° C durante 30 min.
8. Dar un choque de calor de 42° C durante 15 min.
9. Plaquear 200 µl en placas de medio selectivo. Incubar a 30° C durante 2-3 días.

---

Solución de Litio: 10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.1 M Acetato de Litio.

Solución PEG: 10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.1 M Acetato de Litio, 40% PEG (4000 o 3350).

### 2.10.3. Transformación de *S. pombe*

Se empleó la metodología descrita por Eitinger *et al.* (2000), consistente en:

1. Sedimentar las células de 20 ml de cultivo con una concentración aproximada de células de 10<sup>7</sup> células/ml (aproximadamente a una D.O.<sub>600</sub> de 0.6), centrifugando a 3000g durante 5 min.
2. Lavar las células dos veces con agua destilada y una con la Solución de Litio que se describe en el apartado anterior.

3. Resuspenderlas en 100  $\mu\text{l}$  de Solución de Litio. Añadir a esta suspensión 20  $\mu\text{g}$  de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y el 0.1-1  $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico.
4. Incubar 10 min. a temperatura ambiente.
5. Añadir 260  $\mu\text{l}$  de Solución de PEG (Ver apartado anterior).
6. Incubar a 30° C 1 hora.
7. Añadir 43  $\mu\text{l}$  de DMSO.
8. Incubar 5 min. a 42° C.
9. Lavar las células y resuspenderlas en 500  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada estéril.
10. Plaquear 250  $\mu\text{l}$  en placas de medio selectivo.

### **2.11. Paseo cromosómico**

Se empleó el kit Universal GenomeWalker de Clontech siguiendo las instrucciones del fabricante, partiendo de 2.5  $\mu\text{g}$  de ADN genómico. Para el paseo, consistente en una PCR, se emplearon 6.6 ng de ADN por reacción.

### **2.12. Escrutinio de genotecas**

Para la clonación de genes del hongo micorrícico mediante el empleo de sondas heterólogas se usó una genoteca de ADN de *Glomus mosseae* en el vector  $\lambda$ -DASHII (Clontech) suministrada por la Dra A. Gollote (UMR-INRA, Francia) con una titulación de  $10^7$  ufp/ml. Puesto que se, el tamaño medio del inserto de la genoteca es de 13 kb y el tamaño del genoma del hongo es de aproximadamente unas  $10^9$  pb, se realizó el escrutinio de 231000 ufp con el fin de tener representado el genoma del hongo 3 veces.

#### 2.12.1 Obtención de placas líticas

Para la obtención de placas de lisis representativas de 3 veces el genoma de *G. mosseae*, se plaquearon 25  $\mu\text{l}$  de la genoteca, repartida en 5 placas de 135 mm (5  $\mu\text{l}$  de la genoteca/placa) conteniendo LB suplementado con 10 mM de  $\text{MgSO}_4$ . La metodología empleada está adaptada de la descrita por Ausubel et al (2005), procedimiento que se detalla a continuación:

1. Crecer durante 16 h ( $D_{600}$  0.5) un cultivo de 5 ml de de la cepa de *E. coli* MRA(P2), susceptible de lisis por el fago  $\lambda$ , en medio LB suplementado con 10 mM  $MgSO_4$  y 0.2% maltosa
2. Añadir a 600  $\mu$ l de cultivo del cultivo de *E. coli* 5  $\mu$ l de la genoteca.
3. Incubar durante 20 min. a 37° C min y añadir 10 ml de "top agarosa" (LB con 0.7 % agarosa) suplementado con 10 mM  $MgSO_4$  y previamente calentado a 47°C.
4. Agitar vigorosamente y distribuir homogéneamente las células en una placa de 150 mm.
5. Incubar las placas a 37°C hasta que los halos de lisis sean confluentes (aproximadamente unas 8 horas).
6. Enfriar las placas a 4°C durante al menos 2 horas.

#### 2.12.2. Transferencia de ADN a membranas de nitrocelulosa

El procedimiento empleado está adaptado de Ausubel et al (2005)

1. Poner una membrana de nitrocelulosa 2 min. sobre la placa marcando la orientación de éstas. Si se quiere hacer un duplicado, se vuelve a poner otra membrana sobre la placa durante 4 min.
2. Desnaturalizar el fago incubando la membrana durante 2 min. en la solución de desnaturalización
3. Neutralizar incubando la membrana en la solución de neutralización durante 5 min.
4. Incubar durante 30 seg en 0.2 M TrisHCl (pH 7.5), 2 x SSC.
5. Secar las membranas en papel Whatman
6. Fijar el ADN a la membrana mediante calentamiento a 120°C durante 30 min a vacío. Las membranas se pueden guardar en este estado a 4° C.

---

Solución de desnaturalización: 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH.

Solución de neutralización: 1.5 M NaCl, 0.5 M TrisHCl pH 8.0.

### 2.12.3. Marcaje de la sonda

La metodología empleada es una adaptación de la descrita por Ausubel et al (2005). El marcaje se realiza mediante PCR en la que parte de la dCTP usada es  $\alpha^{32}\text{P}$  dCTP a 3000 Ci/mmol. La reacción de PCR se establece tal y como se describió con anterioridad, con la única excepción de que los dNTPs presentan un porcentaje de  $^{32}\text{P}$  dCTP, de modo que la mezcla de dNTPs 1 mM consta de: 1 mM de dATP, dGTP, dTTP, 330  $\mu\text{M}$  de dCTP fría y 660  $\mu\text{M}$  de  $^{32}\text{P}$  dCTP.

Dado que los dNTPs se adicionan a la reacción de PCR en exceso, el resto de  $^{32}\text{P}$  dCTP que no se ha incorporado a la sonda ha de ser eliminado. Para ello se purifica la sonda usando el kit miniQuick Spin Columns (Boehringer), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 2.12.4. Hibridación y autorradiografía

La metodología empleada ha sido adaptada de Ausubel et al (2005).

1. Prehibridar las membranas a 55° C durante 2 horas en tampón de prehibridación.
2. Añadir la sonda desnaturalizada (5 min. a 100°C) a 50 ml de tampón de prehibridación fresco, de modo que la actividad específica de la sonda en la solución de hibridación sea de  $10^6$  cpm/ml.
3. Incubar durante 16 h a 55°C en un horno de hibridación.
4. Retirar el tampón de hibridación
5. Lavar las membranas 2 veces durante 15 min con 5 x SSC, 0'1 %SDS y 1 vez durante 15 min. con 1x SSC, 0'1%SDS.
6. Secar ligeramente las membranas y exponer a una película fotográfica X-Omat (Kodak) durante 24 y 72 horas a -80°C.
7. Revelar las membranas.

---

SSC (20x): 3 M NaCl, 0.3 M Citrato sódico. Ajustar a pH 7.0 con HCl.

Tampón de hibridación: 7% SDS, 0.3 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7.2, 1 mM EDTA pH 8.0.

## 2.13. Extracción de ARN

### 2.13.1. Extracción de ARN de *S. cerevisiae*

El protocolo aquí detallado es una modificación del descrito por Ausubel et al (2005)

1. Crecer un cultivo de 50 ml en medio selectivo hasta que alcance una D.O.<sub>600</sub> 1-2
2. Sedimentar las células a 3000 xg durante 5 min a 4°C.
3. Lavar las células con agua bidestilada fría. Resuspender en 350 µl de TrisCl (pH7.4), 2 mM EDTA y transferir a un tubo de microcentrífuga.
4. Añadir 400 µl de bolitas de vidrio de 425-600 µm (SIGMA) a las células e incubar en hielo durante 10 min.
5. Añadir 350 µl de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y agitar vigorosamente 3 veces durante 20seg., enfriando durante 20 seg. entre las diferentes agitaciones.
6. Centrifugar 2 min a 10000 xg y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo
7. Añadir fenol:cloroformo:isoamílico, agitar vigorosamente 20 seg y centrifugar a 10000 xg durante 2 min.
8. Repetir los dos pasos anteriores dos veces más.
9. Añadir a la solución acuosa recuperada 1/20 de su volumen de 10 M LiCl, 2 volúmenes de 95 % etanol y dejar toda la noche a -20°C.
10. Centrifugar a 10000 xg durante 2 min, retirar el sobrenadante, añadir 1 ml de 95 % etanol y centrifugar a 10000g durante 2 min. Retirar el sobrenadante y secar el precipitado a temperatura ambiente durante 15 min.
11. Resuspender el precipitado en 50 µl de 1 mM EDTA pH 8 y conservar a -20° C.

### 2.13.2. Extracción de ARN de *G. intraradices*

Para extraer el ARN se usó el kit RNeasy mini kit de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante, modificando la cantidad de tampón de

homogeneización utilizado (600  $\mu$ l en lugar de los 400 recomendados). De los dos tampones de homogeneización que contiene el kit, se eligió el tampón RLC. En esta extracción se realizó el protocolo opcional de tratamiento con DNasa.

Sin embargo, como en esta preparación de ARN aún quedan moléculas de ADN contaminante, se aplicó un tratamiento con DNasa adicional, consistente en:

1. Mezclar en un tubo de microcentrífuga:

20  $\mu$ g ARN total

1  $\mu$ l tampón

1  $\mu$ l Inhibidor RNasa RNaseOut (Invitrogen, 40U/ $\mu$ l)

1  $\mu$ l DNasa pancreática (Roche, 10U/ $\mu$ l)

Completar hasta 40  $\mu$ l con agua DEPC.

2. Incubar a 37°C durante 30 min.

El ARN así tratado se vuelve a purificar para eliminar las DNasas usadas en el paso anterior. Para ello se emplea el protocolo "RNA CleanUp" del kit RNeasy mini kit de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 2.13.3. Cuantificación del ARN

La cuantificación del ARN se realizó espectrofotométricamente siguiendo la metodología descrita por Sambrook et al (1989). Para ello se utilizaron cubetas de cuarzo. La absorbancia de una alícuota de 5  $\mu$ l de muestra diluída en 745  $\mu$ l de agua DEPC fue medida a 230, 260 y 280 nm. Cada unidad de absorbancia a 260 nm fue considerada como 40  $\mu$ g/ml de ARN. Para poder conocer una posible contaminación por carbohidratos se calculó la relación entre las absorbancias obtenidas a 260 y 230 nm, debiendo ser ésta superior a 2. Para considerar una muestra libre de proteínas y/o fenol la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm debía ser superior a 1.8

### 2.13.4. Visualización del ARN mediante electroforesis en geles de agarosa

Para determinar la calidad del ARN extraído se procedió a la separación electroforética de 1  $\mu$ g de ARN. Para ello se preparó la muestra en tampón de

muestra 1x y tampón de carga 1x. A continuación, se desnatura el ARN incubando esta solución a 65° C durante 15 min. La separación se realizó en geles de 0.6% agarosa en tampón MOPS estéril conteniendo 1.85% formaldehído. La electroforesis se desarrolló en tampón MOPS a un voltaje de 80V. Para visualizar el ARN se expuso el gel a luz ultravioleta.

---

Tampón de muestra: 50 % Formamida desionizada, 14% Formaldehído. Esta solución se prepara en tampón MOPS 1x.

Tampón de carga (10x): 50% Sacarosa, 0.3% Azul de bromofenol, 1µg/ml Bromuro de etidio. Esta solución se prepara en tampón MOPS 1x.

Tampón MOPS (10x): 200 mM MOPS pH 7.0, 50 mM Acetato sódico, 10 mM EDTA.

## **2.14. Técnicas de RACE**

Para la obtención de la secuencia completa de aquéllos genes de los que sólo se conoce una parte de la misma, utilizamos técnicas de RACE. Con este fin se ha empleado el kit SMART RACE (Clontech), siguiendo las instrucciones del fabricante con las dos modificaciones que se detallan a continuación:

- La síntesis de ADNc se realizó a partir de 1 µg de ARN total.
- La temperatura a la que se realizó el paso de hibridación y de extensión de la PCR se bajó a 62° C. La razón de esta modificación es el alto contenido de A/T del genoma de estos hongos, que impide diseñar cebadores con mayor contenido en G/C.

## **2.15. Análisis de PCR cuantitativa a tiempo real.**

### 2.15.1. Síntesis de ADNc

La síntesis del ADNc se realizó a partir de 1 µg de ARN total usando la reversotranscriptasa SuperscriptII (Invitrogen) por el método de los cebadores aleatorios usando las condiciones del fabricante, que se detallan a continuación:

#### 1. Mezclar en un tubo de microcentrífuga:

1 µg de ARN total

1 µl dNTPs 10 mM

1 µl de cebadores aleatorios (100 ng/ µl)

Completar hasta 12 µl con agua DEPC

#### 2. Incubar a 65° C durante 5 min.

3. Incubar 1 min. en hielo
4. Añadir al tubo de microcentrífuga
  - 4  $\mu$ l First Strand Buffer (5x)
  - 2  $\mu$ l DTT 0.1 M
  - 1  $\mu$ l Inhibidor de RNasa RNaseOUT (Invitrogen, 40U/  $\mu$ l)
5. Mezclar con la pipeta e incubar a 42° C durante 2 min.
6. Añadir 1  $\mu$ l de SuperScript II (200U/  $\mu$ l). Mezclar con la pipeta.
7. Incubar a 25° C durante 10 min.
8. Incubar a 42° C durante 50 min.
9. Inactivar la enzima incubando a 70°C durante 15 min.

#### 2.15.2. PCR

Las PCRs cuantitativas a tiempo real se realizaron en el termociclador iCycler (Biorad). Cada reacción contenía:

- 1  $\mu$ l de una dilución 1:10 de ADNc
- 2.5  $\mu$ l de Tampón 10x
- 1.5  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> 50mM
- 5  $\mu$ l dNTPs 10 mM
- 0.5  $\mu$ l Cebador 5' 10  $\mu$ M
- 0.5  $\mu$ l Cebador 3' 10  $\mu$ M
- 2.5  $\mu$ l Solución SyBr Green
- 0.1  $\mu$ l Taq Platinum (Invitrogen, 5U/  $\mu$ l)
- Completar con agua hasta 25  $\mu$ l

---

Solución de SyBr Green (500x): 18  $\mu$ l DMSO, 1  $\mu$ l Fluoresceína (Molecular Probes), 1  $\mu$ l SyBr Green (Molecular Probes). Guardar en la oscuridad y desechar tras 7-10 días.

El programa de PCR consistió en 5 min. de incubación a 95°C para activar la Taq de "arranque caliente" (*Hot Start*), seguido de 35 ciclos de 30 seg. a 95°C, 45



seg a 55°C y 45 seg a 70°C. La fluorescencia emitida por el SyBr Green se midió al final de la extensión de cada ciclo.

La eficiencia de la PCR se realizó mediante PCRs a tiempo real usando como molde diluciones (normalmente 1:100-1:100000) de ADN plasmídico que contiene el amplicón a estudiar. Se consideran válidas aquellas parejas de cebadores cuya eficiencia esté entre en 90 y el 100%.

La especificidad de la amplificación por PCR se comprobó mediante la realización de una curva de desnaturalización del amplicón una vez finalizada la PCR. Para ello se efectuó un calentamiento (desde 70°C a 100°C incrementando la temperatura 1°C cada minuto).

Las cuantificaciones se realizaron a partir de tres reacciones de PCR independientes. En cada una de estas reacciones, cada muestra se determinó por triplicado. El ciclo umbral (Ct) es calculado por el software que acompaña a la PCR cuantitativa en tiempo real, y es el ciclo en el que comienza a detectarse el amplicón. Los resultados obtenidos se estandarizaron a los niveles del ARNr 18S (cebadores RMF y RMR). Los niveles relativos de transcrito se calcularon usando el método del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen 2001), que se resume en la siguiente expresión algebraica:

$$\text{Inducción} = 2^{[\Delta Ct(\text{muestra}) - \Delta Ct(\text{control})]}$$

$$\Delta Ct(\text{muestra}) = Ct(R)_m - Ct(R)_c$$

$$\Delta Ct(\text{control}) = Ct(C)_m - Ct(C)_c$$

Donde  $Ct(R)_m$  y  $Ct(R)_c$  son el valor de Ct para los genes ribosómicos (u otro gen tomado como estándar) en el tratamiento analizado y en el se considera como control, respectivamente. De modo análogo,  $Ct(P)_m$  y  $Ct(P)_c$  son el valor de Ct del gen estudiado (problema) en un tratamiento analizado y en el se considera como control, respectivamente.

## **2.16. Secuenciación**

Las reacciones de secuenciación se realizaron en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología López Neyra (CSIC, Granada). Las secuencias se determinaron mediante secuenciación de cadena única, usando un

secuenciador automático Perkin-Elmer ABI Prism 373. Cada reacción consistía de 100-200 ng de ADN molde y 6.4 pmoles de cebador.

### **3. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS**

#### **3.1. Extracción de proteínas de levadura**

1. Crecer un cultivo de 50 ml de células hasta la fase exponencial (D.O.<sub>600</sub> 0.5-1).
2. Recoger por centrifugación a 3000 g durante 5 min. y lavar con un volumen igual de agua destilada.
3. Resuspender las células en 0.5 ml de tampón MIB con inhibidores de proteasas.
4. Añadir 500 µl de bolitas de cristal de 420-600 µm y romper las células mediante agitación vigorosa con un vortex (4 x 20 seg.) incubando en hielo durante 1 min. entre las agitaciones.
5. Centrifugar a 4000 xg los homogenados a 4 °C durante 5 min.
6. Recoger el sobrenadante.

---

Tampón MIB con inhibidores de proteasas: 0.6 M manitol, 20 mM Hepes/KOH pH 7.4, 1 mM EDTA pH 8.0, 1 mM PMSF, 1 mM pepstatina A.

#### **3.2. Cuantificación de proteínas**

La cuantificación de proteínas totales se llevo a cabo mediante el método de Bradford (1976) usando el reactivo Dye Reagent de Biorad. Para la curva de calibración se utilizó albúmina bovina. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

#### **3.3. Gel desnaturizante de poliacrilamida**

La separación electroforética se realizó en un equipo de electroforesis Mini-Protean (Biorad) para geles de 8 cm de ancho x 7 cm de longitud x 1 mm de espesor, utilizando el método discontinuo de Laemmli (1970). Las proteínas (10-20 µg) se solubizaron hirviéndolas 4 min. en tampón de muestra. Las proteínas solubizadas y las proteínas patrón de peso molecular (Pre Stained SDS Standard

Broad Range de Biorad ) se separaron en un gel de poliacrilamida (2 cm de gel de concentración y 5 cm de gel de resolución) durante 1 hora a 20mA por gel.

---

Gel de concentración: 3.75% Poliacrilamida, 0.12 M Tris HCl pH 6.8, 0.1 % SDS 10%, 0.05 % Persulfato amónico, 0.05 % TEMED.

Gel de separación: 10 % Poliacrilamida, 0.37 mM TrisHCl pH 8.8, 0.1 % SDS 10%, 0.05 % Persulfato amónico, 0.05 % TEMED.

Tampón Tris-glicina: 0.25 M Tris Base, 0.19 M Glicina, 0.1% SDS. Ajustar el pH a 8.3 con HCl.

Tampón de carga (2x): 4.6% SDS, 1.4 M  $\beta$ -mercaptoetanol, 20% Glicerol, 124 mM TrisHCl pH 6.8, 0.01% Azul de bromofenol.

### **3.4. Tinción de las proteínas en los geles**

Se siguió el protocolo de Ausubel et al. (2005)

1. Incubar el gel durante toda la noche en solución de tinte.
  2. Retirar la solución de tinte e incubar en solución de destinte A durante 1 hora, cambiando la solución a intervalos.
  3. Retirar la solución anterior e incubar el gel en solución de destinte B hasta que se obtengan bandas azules nítidas y un fondo claro.
- 

Solución de tinte: 50% Metanol, 0.05% Azul Coomassie R-250, 10% Ácido acético. Disolver el azul Coomassie en metanol antes de añadir el ácido acético o agua.

Solución de destinte A: 50% Metanol, 10% Ácido acético.

Solución de destinte B: 20% Metanol, 7% Ácido acético.

### **3.5. Western blot.**

#### 3.5.1. Transferencia de proteínas a membrana

La transferencia se realizó siguiendo el método de Towbin *et al.* (1979) en una cubeta de transferencia Transblot (Biorad). La metodología empleada se describe brevemente a continuación:

1. Cortar una hoja de membrana de PVDF y 4 hojas de papel absorbente (Whatman 3MM o equivalente) del tamaño del gel
2. Mojar la membrana en metanol absoluto hasta que este translúcida. Equilibrar en tampón de transferencia hasta que quede sumergida.
3. Sumergir membrana, papeles de filtro y almohadillas de soporte en tampón de transferencia para asegurar que todo esta húmedo.

4. Ensamblar el sistema de transferencia de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
  5. Colocar el sándwich en el tanque de transferencia con la membrana lo más cerca posible del electrodo positivo.
  6. Transferir 2 h a 100 V en a 4 C.
- 

Tampón de transferencia: 25 mM Tris base, 190 mM glicina, 20% metanol.

### 3.5.2. Inmunodetección

1. Lavar la membrana 4 x 10 min con TBST
  2. Añadir el tampón de bloqueo y dejar toda la noche en agitación.
  3. Lavar la membrana 4 x 10 min. con TBST
  4. Añadir la solución del anticuerpo primario (AntiHA de ratón 12CA5, Roche) en tampón de bloqueo diluido 1:2000. Incubar durante 1 h.
  5. Lavar la membrana con TBST dos veces durante 10 seg., una durante 15 min., y dos durante 5 min
  6. Añadir el anticuerpo secundario (Anti IgG murino de cabra conjugado con peroxidasa de rábano, Pierce 31430) diluido 1:5000 en tampón de bloqueo. Incubar 1 h.
  7. Lavar la membrana con TBST dos veces durante 10 seg., una durante 15 min, dos durante 5 min.
  8. Mezclar 5 ml de solución 1 y 5 ml de solución del 2 del kit de detección ECL (Amersham). Incubar 1 min. y eliminar la solución de detección. Detectar por quimiluminiscencia exponiendo la membrana a una película X-Omat (Kodak) entre 15 seg y 1 h.
- 

TBST: 100 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20.

Tampón de bloqueo: 20 mM Tris pH 7.5, 500 mM NaAc, 0.1% Tween 20.

### **3.6. Análisis de actividad $\beta$ -galactosidasa**

La actividad  $\beta$ -galactosidasa en levadura se determinó siguiendo la metodología descrita por Guarente (1983). Para ello,

1. Crecer un cultivo de 3-5ml en medio selectivo durante aproximadamente 16 h hasta  $D.O_{600}$  0.8-1.2. Guardar medición

2. Coger 1 ml de cultivo y centrifugar 1 min a máxima velocidad en una microcentrífuga. Retirar sobrenadante y lavar el sedimento con 1 ml de tampón Z frío
3. Resuspender las células en 1ml de tampón Z. Añadir con una pipeta Patear 1-2 gotas de 0.1% SDS y 1-2 gotas de cloroformo. Agitar vigorosamente con el vortex.
4. Incubar durante 5 min. a 30°C.
5. Añadir 200 µl de ONPG (4 mg/ml) previamente calentado a 30°C durante 5 min.
6. Incubar a 30 C y medir el tiempo que tarda la solución en ponerse moderadamente amarilla.
7. Parar la reaccion mediante la adición de 0.5 ml de 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.
8. Centrifugar 1 min. a máxima para sedimentar las células.
9. Medir D.O<sub>420</sub> del sobrenadante.
10. Calcular las unidades Miller de acuerdo con la fórmula:

$$1UM = \frac{1000 \times DO_{420}}{(ml \text{ vol células ensayado} \times \text{tiempo de reaccion (min)} \times DO_{600})}$$

---

Tampón Z: 60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 30 mM β-mercaptoetanol. Ajustar el pH a 7.0 con 50% NaOH.

## 4. MÉTODOS DE MICROSCOPIA

### 4.1. Cuantificación del micelio externo

Se utilizó el método de cuantificación descrito por Bago *et al.* (1998b). La longitud de hifas, el número de BAS y el número de esporas se cuantificaron en 3 cuadrículas de 1 cm<sup>2</sup> en cada una de las 3 placas de cultivo distintas usadas por tratamiento. La longitud de hifas se obtuvo al registrar las intersecciones de éstas con las líneas de una malla de 2 x 2 mm, usando el método de Marsch (Marsh 1971), que consiste en la aplicación de la siguiente fórmula matemática:

$$\text{Longitud total} = \frac{\pi A n}{2H}; \text{ donde,}$$

n= número de intersecciones

H= longitud total de las líneas de la retícula (12 cm)

A= Área sobre la que se distribuye la muestra (1 cm<sup>2</sup>)

## 4.2. Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia se realizó como describe Pringle *et al.* (1991). Este protocolo consiste en:

1. Fijar las células con 10 volúmenes de metanol frío (-20°C) durante 30 min.
2. Tratar las células fijadas con glucosidasa para eliminar la pared celular y unir las a los porta tratados con poli-lisina.
3. Incubar a temperatura ambiente durante 2 horas en tampón de bloqueo.
4. Incubar durante 16 h en una dilución 1:200 del anticuerpo 12CS5 (antiHA murino) en solución de bloqueo.
5. Lavar e incubar a 37°C durante 1 hora en una dilución 1:200 del anticuerpo de cabra anti IgG murino acoplado al fluoróforo Alexa 488 (Molecular Probes) en solución de bloqueo.
6. Lavar las células 10 veces con PBS y observar con epifluorescencia.

---

PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Solución de bloqueo: 10 % albúmina bovina en PBS.

## 4.3. Análisis elemental mediante espectroscopía de difracción de rayos-X (EDXS)

### 4.3.1. Preparación de muestras

1. *Fijación*. Cortar porciones de 1-2 mm<sup>3</sup> del micelio extraradical crecido en medio M-C, e introducir en una solución de 1% de glutaraldehído y 4% de paraformaldehído en 50 mM tampón de cacodilato sódico pH 7.2. Incubar durante 3 horas a temperatura ambiente en la cámara de gases.
2. *Deshidratación*. Retirar la solución fijadora y deshidratar la muestra en una serie graduada de diluciones de etanol: 50, 70, 80, 90, 95, 100, 100, 100% incubando la muestra al menos media hora en cada una de ellas. Una vez que el micelio se encuentra en 100 % etanol se deja incubando toda la noche.
3. Para mejorar la deshidratación realizar otra serie de graduada de diluciones con óxido de propileno: 50, 70, 80, 90, 95, 100, 100, 100% en etanol al 100% incubando la muestra al menos media hora en cada

una de ellas. Una vez que el micelio se encuentra en 100% óxido de propileno, se deja toda la noche.

4. *Infiltración.* Se usa la resina Spurr que se incorporará gradualmente en forma de diluciones seriadas en óxido de propileno (33% durante 30 min, 50% durante 30 min, 66% durante 30 min, 100% 60 min, 100% 60 min, 100% toda la noche). Esta resina se prepara extemporáneamente, consistiendo de:

- 10 g VCD (vinylcyclohexene dioxide ERL 4206)
- 6 g DER 736 (Diglycidyl ether of polypropylene glycol DER 736)
- 26 g NSA (Nonenyl succinic anhydride NSA)
- 0.4 ml DMAE (Dimethylaminoethanol). MUY TÓXICO.

La resina es muy viscosa, por lo que todo el proceso se hace en agitación

5. *Inclusión.* Cambiar por resina Spurr fresca. Esta nueva resina contiene una modificación con respecto a la anterior, consistente en que el contenido de DMAE es menor, pasando éste de 0.4 ml a 0.2 ml. Verter el micelio inmerso en esta nueva solución en moldes. e incubar en un horno a 60 ° C durante 16 h.

6. *Tallado.* Los bloques se tallan para que tengan una cabeza trapezoidal de no más de 1 mm de longitud. Los cortes se realizan con un ultramicrotomo Reichert recogiendo cortes de color púrpura-dorado en una balsa de agua, y transfiriéndolos posteriormente a gradillas de níquel con 100 perforaciones recubiertas de formvar.

7. *Contraste:* Las muestras que no se van a usar para el análisis elemental se contrastan con una solución de acetato de uranilo y otra de citrato de plomo:

- a. Extender tiras de parafilm en dos placas de petri a las que previamente se les ha puesto un fondo de cera. Añadir perlas de NaOH a una de ellas para crear una atmósfera básica. Mantener las placas cerradas.
- b. Poner una gota de acetato de uranilo en el parafilm de la placa que no tiene NaOH y otra de citrato de plomo en la placa restante.

- c. Incubar las muestras en la gradilla en contacto directo con la gota de acetato de uranilo.
- d. Incubar durante 10 min.
- e. Lavar en el agua destilada durante 1 min., alternando en distintos vasos de agua destilada y mojando rápidamente con un ángulo de 90°.
- f. Incubar las muestras en el citrato de plomo, y contrastar durante 5 min.
- g. Lavar en agua destilada como antes
- h. Poner las gradillas en papel de filtro.

---

Solución de Acetato de uranilo: 2% de acetato de uranilo en 70% etanol.

Solución de citrato de plomo; 80 mM  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , 100 mM citrato sódico.

#### 4.3.2. Análisis elemental

Los microanálisis se realizaron en un microscopio electrónico de transmisión Philips 400 T equipado con un sistema EDAX DX-4. Los espectros se registraron entre 0 y 20 keV con un detector de rayos X de Li(SI) con una ventana de 100 mm<sup>2</sup>. Las medidas se tomaron durante 100 segundos con un voltaje de aceleración de 100 kV.

La distribución elemental se muestra como una relación Pico a Fondo (Peak to Background o P/B) para minimizar los efectos de las irregularidades de las muestras. Se realizaron de 3 a 8 mediciones (siendo el número más común 5) del micelio externo de *G. intraradices procedente* de distintas placas de monoxénico de las distintas estructuras analizadas. Debido a las dificultades de estandarización, la relación P/B se usó como un índice semicuantitativo de las cantidades relativas de metal en las localizaciones muestreadas.

## **5. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS**

### **5.1. Identificación de secuencias de interés en bases de datos**

Con el fin de encontrar genes implicados en el metabolismo de metales pesados en *G. intraradices*, se analizaron las bases de datos públicas de ESTs o de ADN genómico disponibles en la red ([srs.ebi.ac.uk](http://srs.ebi.ac.uk) y <http://darwin.nmsu.edu/~plammers/glomus/>). Las secuencias allí encontradas



fueron comparadas con las secuencias conocidas de aminoácidos de otros organismos usando el algoritmo Blastx (Altschul et al. 1990).

### **5.2. Diseño de cebadores**

Los cebadores se diseñaron empleando el programa Oligo Primer Analysis (Molecular Biology Insights, Inc).

### **5.3. Comparación de múltiples secuencias**

El grado de homología de las secuencias obtenidas en este estudio con las de otros organismos presentes en las bases de datos se determinó usando el programa BESTFIT del Genetics Computer Group. Los alineamientos múltiples se llevaron a cabo con el programa CLUSTALW (Thompson et al. 1994).

### **5.4 Análisis de promotores**

Para estudiar la presencia de posibles motivos de unión de factores de transcripción en las regiones no codificantes hacia 5' del gen, se empleó el programa TOUCAN (<http://www.esat.kuleuven.ac.be/~saerts/software/toucan.php>). Esta aplicación permite la búsqueda en una determinada secuencia de motivos de regulación registrados en numerosas bases de datos de factores de transcripción. Dadas las características de nuestro organismo, se usaron las bases de datos referidas a hongos (Transfac 6.0 Fungi y SCPD) y como organismo molde, *S. cerevisiae*. Se aceptaron como más probables los motivos se obtuvieron a partir de ambas bases de datos.

### **5.5. Obtención de la secuencia aminoacídica**

La determinación de la secuencia aminoacídica a partir de la secuencia nucleotídica se realizó con la herramienta Translate de Expasy (<http://expasy.org>).

### **5.6. Predicción de la topología de proteínas transmembrana**

La identificación de dominios transmembrana se hizo mediante SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html><http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html>) (Hirokawa et al. 1998).

### **5.7 Predicción de la estructura terciaria de proteínas solubles**

La estructura terciaria de enzimas solubles se determinó mediante modelización por homología usando como molde secuencias de proteínas de las que ya se han obtenido datos cristalográficos y que han sido depositadas en el Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>). El software elegido fue el SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) y se la estructura terciaria se visualizó con los programas informáticos SPDV y Rasmol (Schwede et al. 2003).

## **6. MÉTODOS ESTADÍSTICOS**

Todos los datos numéricos se analizaron mediante el programa estadístico SuperAnova con un nivel de significación de  $P > 0.05$ . Todos los datos de porcentaje se transformaron en el arcoseno de su raíz cuadrada antes de someterlos al SuperAnova.



## **RESULTADOS**



## **1. ESTUDIO DE LA RESPUESTA MORFOGENÉTICA DE *G. INTRARADICES* A LOS METALES PESADOS**

En esta sección se describe cómo se altera la morfogénesis de *G. intraradices* cuando se desarrolla en presencia de diferentes concentraciones de Cd, Zn y Cu. Para ello, se observaron las alteraciones en su patrón de desarrollo normal, y se cuantificó la longitud de hifas, formación de elementos de absorción (BAS) y de estructuras de reproducción/resistencia (esporas). Para su comparación, en las Figuras 8a y b se muestra el patrón de desarrollo normal del micelio extraradical de *G. intraradices* crecido en medio M-C, cuya descripción se realizó en la sección de Introducción (página 17).

### **1.1. Morfogénesis de *G. intraradices* en presencia de Cd**

Pese a las elevadas concentraciones de Cd usadas (hasta 450  $\mu\text{M}$ ) y a que éste no es un bioelemento, el micelio desarrollado en placas suplementadas con Cd presentó un patrón de desarrollo muy semejante al del micelio desarrollado en las placas control. Así, se observó que las hifas exploradoras se extienden en forma rectilínea y sufren ramificaciones de unos 45° originando hifas secundarias, terciarias, etc... En las hifas surgidas de las ramificaciones se observó la formación de BAS a intervalos regulares, mientras que en las partes más antiguas del micelio se observó una profusa esporulación (Figura 8).

La cuantificación de los parámetros morfológicos mostró que la suplementación de los medios, tanto con 4.5 como con 450  $\mu\text{M}$  Cd, provocó un aumento de la longitud de las hifas y una disminución de la densidad de esporas en las hifas (parámetro esporas/hifa). La densidad de BAS (BAS/hifa) disminuyó en los tratamientos con Cd, aunque esta disminución fue significativa solamente en las placas suplementadas con 45  $\mu\text{M}$  Cd.

### **1.2. Morfogénesis de *G. intraradices* en presencia de Zn**

Cuando el hongo se desarrolló en un medio suplementado con 75  $\mu\text{M}$  de Zn, la morfogénesis del micelio extraradical no se afectó aparentemente con respecto a la de los controles (Figuras 9a y 9b). Sin embargo, cuando el hongo creció en medios suplementados con 750 ó 7500  $\mu\text{M}$  de Zn, la arquitectura del micelio se vió visiblemente alterada (Figuras 9c-f). En ambos casos las hifas aparecen desorganizadas en los primeros puntos de contacto con el medio y pierden la

dominancia apical (Figuras 9d y 9e). Además, la hifas se ramifican de una forma profusa, muy excitada (Figuras 9c-f). Las hifas exploradoras se vuelven más gruesas, aparecen frecuentemente enmarañadas (Figuras 9d y 9f) y muestran una cierta tendencia a pegarse unas a otras formando "cordones" que, frecuentemente, se anastomosan. En estos tratamientos se forman pocas esporas, y las pocas que se forman aparecen generalmente vacías.

Como se muestra en la Tabla 2, estas observaciones están avaladas por los datos obtenidos de la cuantificación del micelio extraradical. En los tratamientos suplementados con 75 y 750  $\mu\text{M}$  de Zn se observó un aumento de la longitud de las hifas y del número de BAS. El número de esporas aumentó en los tratamientos suplementados con 75  $\mu\text{M}$  de Zn, mientras que disminuyó en aquéllos suplementados con 750 y 7500  $\mu\text{M}$ .

En las placas suplementadas con 7.5 mM Zn, debido al gran enmarañamiento de las hifas, no se pudo cuantificar la longitud de las hifas, ni el número de BAS. En este caso, como se ha indicado anteriormente, se observó una gran reducción en el número de esporas (menos de 30  $\text{cm}^{-2}$ ), muchas de las cuales estaban vacías o incluso rotas (Figura 9f).

### **1.3. Morfogénesis de *G. intraradices* en presencia de Cu**

Cuando el medio M-C se suplementa con 50  $\mu\text{M}$  de Cu, las hifas extraradicales de *G. intraradices* pierden completamente la dominancia apical e intentan desarrollarse radialmente a partir de unos pocos puntos iniciales de contacto con el medio, aunque con poco éxito (Figura 10a). Las hifas a menudo forman horquillas y bucles ("coils"), cuya frecuencia incrementa conforme se aumenta la concentración de Cu en el medio (Figuras 10c y e). Además, en estos tratamientos las hifas son más irregulares, presentan los extremos ahorquillados y protruidos en los extremos, especialmente, en los ápices (Figuras 10c, 10e y 10f). En los tratamientos con 50  $\mu\text{M}$  de Cu se observó un aumento de la longitud total de las hifas y del número de BAS, así como un descenso en el número de esporas, lo que afecta considerablemente la relación espora/longitud de hifas (Tabla 2).

Las placas suplementadas con 500  $\mu\text{M}$  de Cu no se cuantificaron debido a que en este tratamiento el desarrollo del hongo se limitó a unos pocos puntos de contacto que se desarrollaban tan sólo unos milímetros. En el tratamiento con 5 mM de Cu el micelio extraradical no se desarrolló.

Tabla 2. Parámetros morfológicos del micelio extraradical de *G. intraradices* crecido en presencia de metales pesados

	<b>Longitud de las hifas (cm/cm<sup>2</sup>)</b> <sup>1</sup>	<b>BAS/cm<sup>2</sup></b>	<b>Esporas/cm<sup>2</sup></b>	<b>BAS/Hifa</b>	<b>Esporas/Hifa</b>
<b>Control</b>					
(9.3 μM Zn, 0.5 μM Cu)	87.0 <b>a</b>	536.0 <b>a</b>	1052.5 <b>d</b>	6.2 <b>bc</b>	12.1 <b>d</b>
<b>Cadmio</b>					
4.5 μM	122.2 <b>b</b>	601.7 <b>a</b>	1425.8 <b>e</b>	5.0 <b>a</b>	11.9 <b>d</b>
450 μM	113.4 <b>b</b>	639.6 <b>a</b>	894.1 <b>c</b>	5.7 <b>abc</b>	7.9 <b>c</b>
<b>Zinc</b>					
75 μM	184.5 <b>c</b>	884.8 <b>b</b>	1389.7 <b>e</b>	5.3 <b>ab</b>	7.6 <b>c</b>
750 μM	118.6 <b>b</b>	974.3 <b>b</b>	906.8 <b>c</b>	7.5 <b>d</b>	7.6 <b>c</b>
7500 μM	-- <sup>2</sup>	-- <sup>3</sup>	30.0 <b>b</b>	--	--
<b>Cobre</b>					
50 μM	262.5 <b>d</b>	1693.8 <b>c</b>	827.3 <b>c</b>	6.5 <b>cd</b>	3.2 <b>b</b>
500 μM	-- <sup>2</sup>	-- <sup>3</sup>	0.0 <b>a</b>	--	0.0 <b>a</b>
5000 μM	-- <sup>2</sup>	-- <sup>3</sup>	0.0 <b>a</b>	--	0.0 <b>a</b>

<sup>1</sup> Los datos que no comparten una letra en común son significativamente distintos de acuerdo con el test protegido de Fisher LSD ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>2</sup> El desarrollo del micelio se restringió a 1cm<sup>2</sup> alrededor del punto de contacto y/o demasiado enmarañado para ser cuantificados.

<sup>3</sup> Las hifas estaban demasiado enmarañadas para distinguir los BAS o para cuantificarlos.



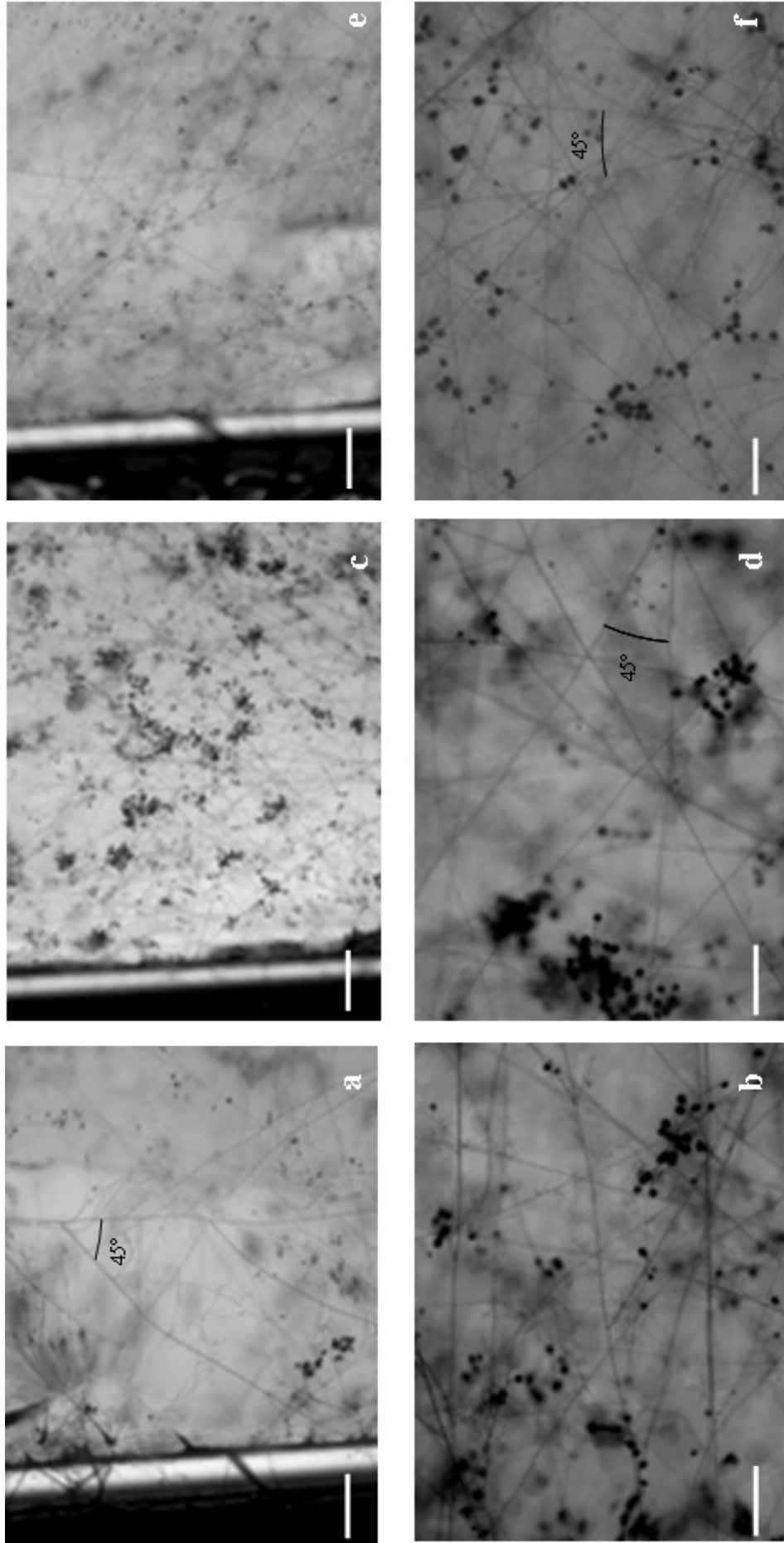


Figura 8. Desarrollo del micelio en medio M-C (a y b), M-C + 4.5  $\mu$ M Cd (c y d) y M-C + 450  $\mu$ M Cd (e y f). Escalas: a = 1.5 mm; b, d, f = 0.5 mm; c, e = 2 mm.

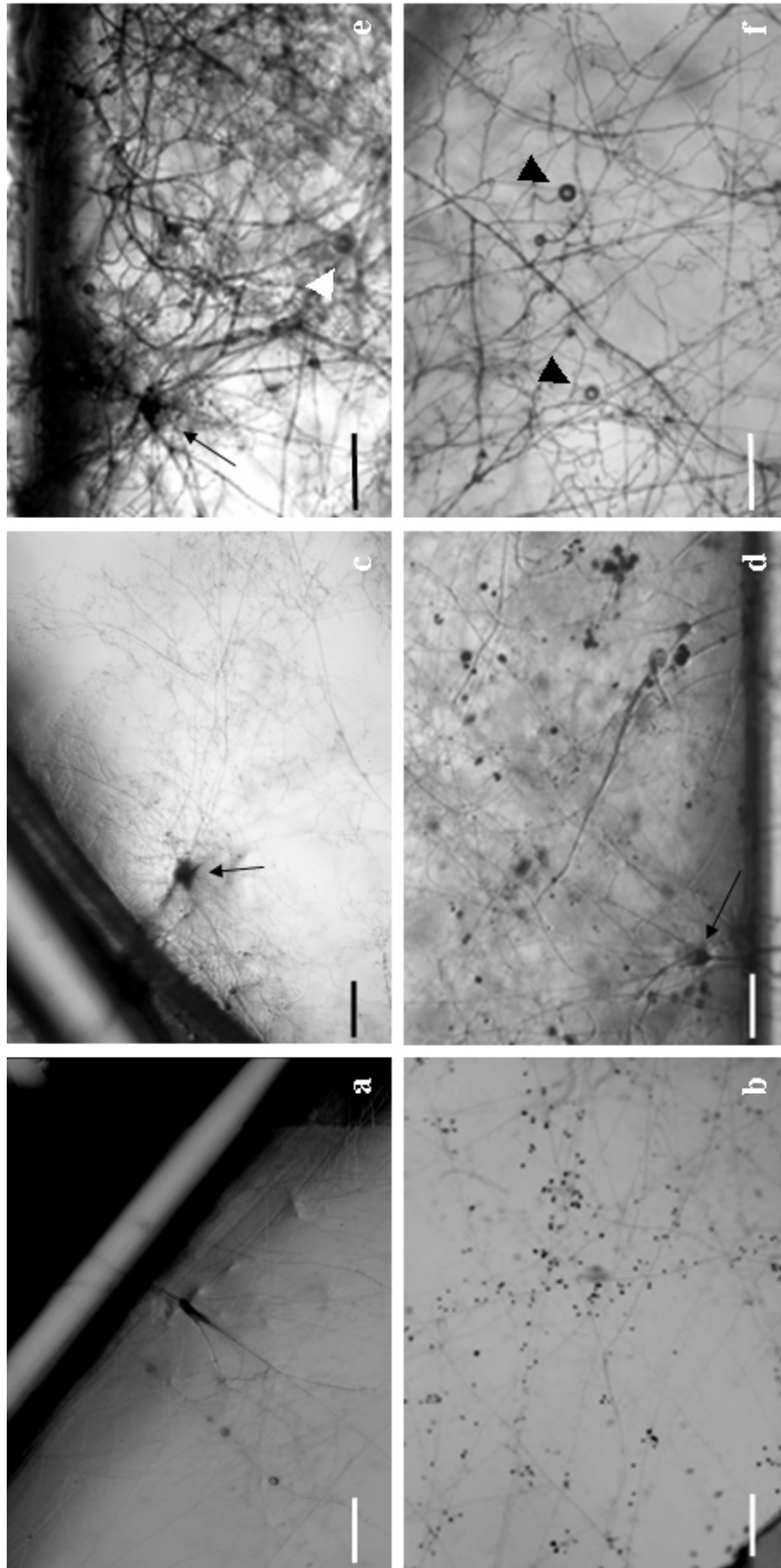


Figura 9. Desarrollo del micelio en medio M-C + 75  $\mu\text{M}$  Zn (a y b), M-C + 75  $\mu\text{M}$  Zn (c y d) y M-C+ 7500  $\mu\text{M}$  Zn (e y f). Escalas: a = 0.75 mm; b = 2 mm; c = 0.33 mm; d= 0.75 mm; e y f = 0.75 mm. Las flechas señalan hifas protruidas y las cabezas de flecha esporas vacías.

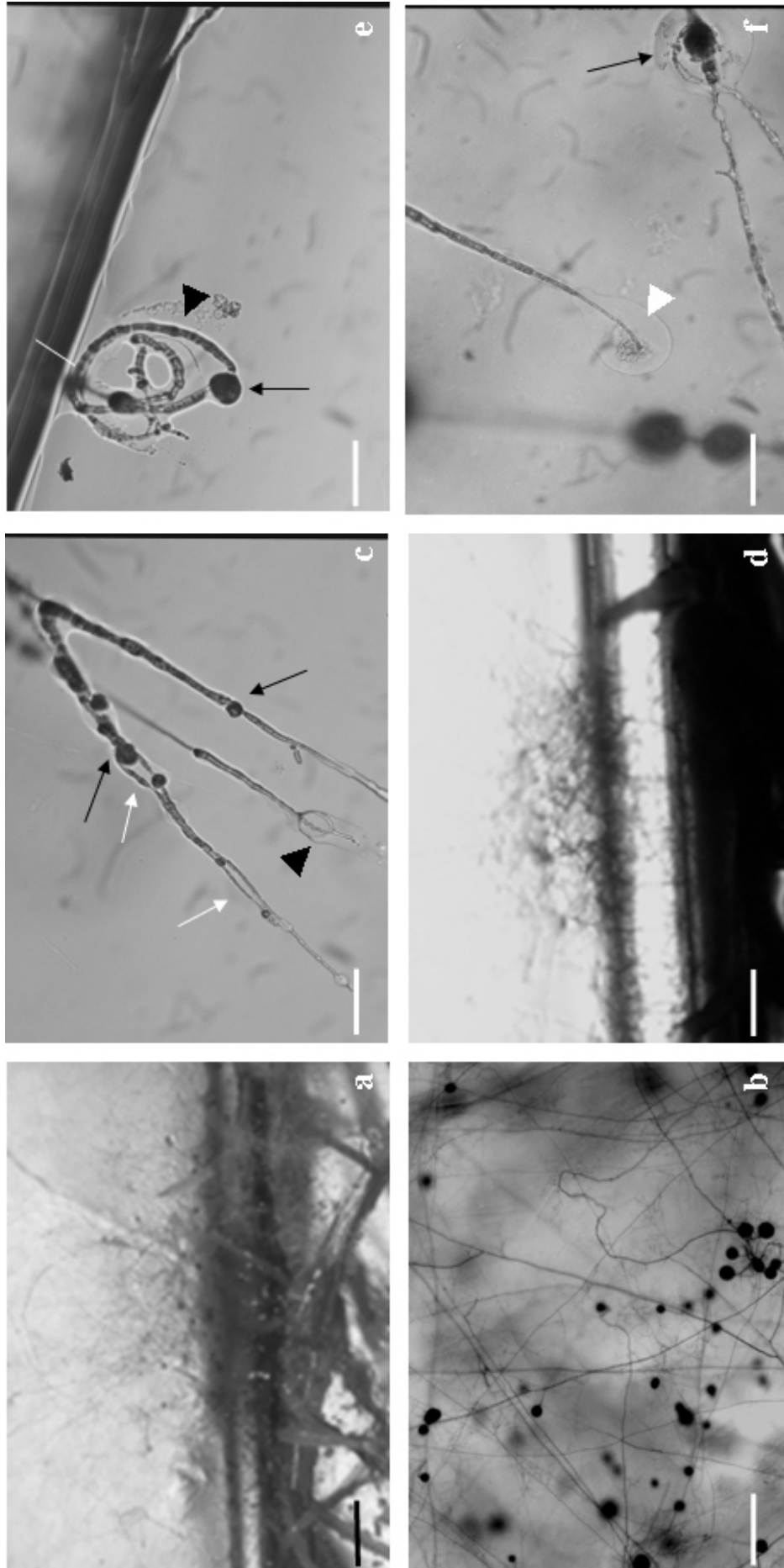


Figura 10. Desarrollo del micelio en medio M-C + 50  $\mu$ M Cu (a y b), M-C + 500  $\mu$ M Cu (c y d) y M-C+ 5000  $\mu$ M Cu (e y f). Escalas: a = 1.5 mm; b = 0.33 mm; c, e and f = 0.1 mm. d = 0.75 mm. Las flechas negras indican hifas protruidas, las blancas anastomosis, cabeza de flechas negras a bucles y las blancas a rupturas en el ápice de las hifas.

## 2. LOCALIZACIÓN ULTRASTRUCTURAL DE METALES PESADOS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X (EDXS)

La capacidad de *G. intraradices* de crecer en medios con altos niveles de metales pesados refleja, en cierta medida, su capacidad para protegerse frente a ellos, ya sea, reduciendo la absorción de los mismos, y/o retirándolos a orgánulos de almacenamiento. Con el fin de determinar las estructuras fúngicas y citológicas en las que se acumulan preferencialmente los metales pesados, se determinó la localización de Zn, Cu y Cd mediante espectroscopia de difracción de rayos X acoplado a un microscopio electrónico de transmisión tras la exposición del hongo a 7.5 mM Zn, 5 mM de Cu o 4.5 Cd durante 8 horas y 7 días. La localización de los metales se analizó tanto en la fase vegetativa (hifas) como en la reproductiva (esporas) del hongo.

Como se muestra en la Figura 11, en cada una de las fases de desarrollo del hongo analizadas se observaron tres estructuras citológicas claramente diferenciables: pared fúngica, citoplasma amorfo y gránulos electrodensos (Figura 11a). La pared de la espora es multilaminada con zonas electrodensas y electroclaras (Figura 11b) y, aunque las muestras no se trataron con osmio, la presencia de halos claros rodeando los gránulos electrodensos sugiere la presencia de una membrana (Figura 11c). En los gránulos electrodensos de las esporas y de las hifas se detectó un alto contenido en fósforo, especialmente en estos últimos, lo que sugiere la presencia de polifosfato en estas estructuras (Tabla 3). La consideración de que numerosos estudios indican que el polifosfato está asociado a las vacuolas fúngicas (Rasmussen *et al.* 2000; Uetake *et al.* 2002) sugiere que los gránulos observados están localizados en las vacuolas.

Tabla 3. Contenido en fósforo de la pared, citoplasma y gránulos electrodensos en esporas e hifas de *G. intraradices* mediante la relación Pico a Fondo (Peak to Background o P/B) (n=3-8). Datos que no comparten una letra en común difieren significativamente, de acuerdo con el test de mínima diferencia significativa de Fisher LSD ( $P \leq 0.05$ ).

Localización	Relación P/B
Esporas	
Pared	0 a
Citoplasma	1.05 a
Gránulo	15.27 b
Hifas	
Pared	0.74 a
Citoplasma	6.53 ab
Gránulo	37.74 c

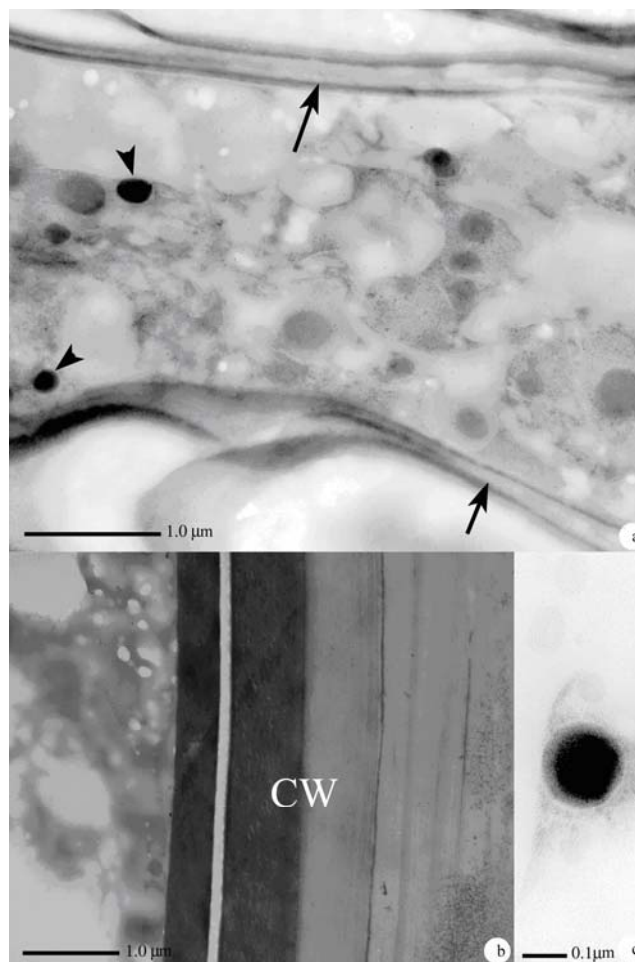


Figura 11. Micrografía obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión de las hifas extraradicales y de las esporas de *G. intraradices*. Las paredes fúngicas se indican mediante flechas y los gránulos electrodensos mediante las cabezas de flecha (a). Detalle de la pared de la espora (CW) (b). Detalle de un gránulo electrodenso (c).

## 2.1. Localización de Zn

El micelio de las placas control (desarrollado en medio M-C y suplementado con agua) presenta cantidades mínimas de Zn distribuido homogéneamente en hifas y esporas (Tabla 4). Tras 8 h de exposición a Zn, se observó un incremento en la cantidad de este metal en los gránulos electrodensos de las esporas y de las hifas, así como en la pared de la espora. Sin embargo, el Zn no se acumuló en el citoplasma de ninguna de estas estructuras ni en las paredes de las hifas. No obstante, después de 7 días, los niveles de Zn incrementaron en las paredes de las hifas. Además, los niveles de Zn en la pared de la espora y en los gránulos electrodensos de esporas e hifas tras 7 días de exposición a Zn fueron inferiores que los detectados tras 8 h (Tabla 4).

Tabla 4. Acumulación de Zn en la pared, citoplasma y gránulos electrodensos en esporas e hifas de *G. intraradices* tras la aplicación de un pulso de 7.5 mM Zn durante 8 h y 7 días mediante la relación Pico a Fondo (P/B) (n=3-8). Los datos que no comparten una letra en común difieren significativamente de acuerdo con el test de mínima diferencia significativa de Fisher, LSD ( $P \leq 0.05$ ). Las letras que no están en negrita permiten la comparación de datos en la misma columna, mientras que las letras en negrita permiten la comparación en la misma fila.

Localización	Relación P/B		
	0 h	8 h	7 d
Esporas			
Pared	1.57 a <b>a</b>	25.94 c <b>c</b>	11.99 cd <b>b</b>
Citoplasma	0.12 a <b>a</b>	0.72 a <b>a</b>	6.06 ab <b>b</b>
Gránulo	2.87 a <b>a</b>	25.88 c <b>c</b>	15.32 d <b>b</b>
Hifa			
Pared	1.94 a <b>a</b>	1.40 a <b>a</b>	8.79 bc <b>b</b>
Citoplasma	2.10 a <b>a</b>	0.90 a <b>a</b>	2.54 a <b>a</b>
Gránulo	2.06 a <b>a</b>	10.75 b <b>c</b>	6.01 ab <b>b</b>

## 2.2. Localización de Cu

Previo a la adición de Cu al medio, éste presenta aproximadamente los mismos niveles en esporas e hifas, independiente de la estructura citológica analizada: pared, citoplasma o gránulo electrodenso (Tabla 5). Tras 8 h de la aplicación de Cu al micelio, se observó una fuerte acumulación de este elemento en las paredes y gránulos de la espora, así como en los gránulos electrodensos de las hifas. A los 7 días de la aplicación del Cu, todas las estructuras analizadas mostraron un contenido de Cu mayor que las del micelio de las placas control.

Además, se observó que entre las 8 horas y los 7 días tras la aplicación de Cu al micelio se produjo un importante aumento en los niveles de Cu en todas las estructuras analizadas, excepto en los gránulos electrodensos de las hifas (Tabla 5).

Tabla 5. Acumulación de Cu en la pared, citoplasma y gránulos electrodensos en esporas e hifas de *G. intraradices* tras la aplicación de un pulso de 5 mM Cu durante 8 h y 7 d mediante la relación Pico a Fondo (P/B) (n=3-8). Los datos que no comparten una letra en común difieren significativamente de acuerdo con el test de mínima diferencia significativa de Fisher, LSD ( $P \leq 0.05$ ). Las letras que no están en negrita permiten la comparación de datos en la misma columna, mientras que las letras en negrita permiten la comparación en la misma fila.

Localización	Relación P/B		
	0 h	8 h	7 d
Esporas			
Pared	3.32 a <b>a</b>	31.35 b <b>b</b>	56.54 bc <b>c</b>
Citoplasma	2.50 a <b>a</b>	6.61 a <b>a</b>	63.29 c <b>b</b>
Gránulo	2.93 a <b>a</b>	39.64 b <b>b</b>	112.83 d <b>c</b>
Hifas			
Pared	2.66 a <b>a</b>	7.65 a <b>a</b>	36.06 ab <b>b</b>
Citoplasma	4.65 a <b>a</b>	7.47 a <b>a</b>	31.33 a <b>b</b>
Gránulo	3.40 a <b>a</b>	75.91 c <b>b</b>	51.96 ab <b>b</b>

### 2.3. Localización de Cd

El cadmio, que no es un bioelemento, no se detectó en el micelio de las placas control. Sin embargo, cuando los cultivos se expusieron a Cd, este elemento se detectó en todas las localizaciones estudiadas a los dos tiempos analizados. Los niveles de Cd fueron los mismos a las 8 h y a los 7 días de la aplicación del metal en todas las localizaciones analizadas, excepto en los gránulos electrodensos de la espora, donde los niveles disminuyeron.

Tabla 6. Acumulación de Cd en la pared, citoplasma y gránulos electrodensos en esporas e hifas de *G. intraradices* tras la aplicación de un pulso de 450  $\mu$ M Cd durante 8 h y 7 días mediante la relación Pico a Fondo (P/B) (n=3-8). Los datos que no comparten una letra en común difieren significativamente de acuerdo con el test de mínima diferencia significativa de Fisher, LSD ( $P \leq 0.05$ ). Las letras que no están en negrita permiten la comparación de datos en la misma columna, mientras que las letras en negrita permiten la comparación en la misma fila.

Localización	Relación P/B		
	0 h	8 h	7 d
<b>Esporas</b>			
Pared	0 a <b>a</b>	2.29 c <b>b</b>	1.66 c <b>b</b>
Citoplasma	0 a <b>a</b>	0.52 a <b>b</b>	0.63 ab <b>b</b>
Gránulo	0 a <b>a</b>	1.89 bc <b>c</b>	0.43 a <b>b</b>
<b>Hifas</b>			
Pared	0 a <b>a</b>	0.90 ab <b>b</b>	1.15 bc <b>b</b>
Citoplasma	0 a <b>a</b>	1.35 abc <b>b</b>	0.81 ab <b>b</b>
Gránulo	0 a <b>a</b>	1.00 ab <b>b</b>	0.61 ab <b>ab</b>

### 3. IDENTIFICACIÓN DE LOS MECANISMOS MOLECULARES DE HOMEOSTASIS DE METALES PESADOS EN *G. INTRARADICES*

El crecimiento de *G. intraradices* en medios suplementados con Cu, Zn y Cd debe de ser consecuencia de la capacidad que presenta el hongo de controlar finamente los niveles citosólicos de Cu y Zn, que aunque son nutrientes esenciales son potencialmente tóxicos a elevadas concentraciones, y de minimizar los niveles Cd, metal no esencial tóxico incluso a concentraciones muy bajas, en el citosol. Ello debe ser el resultado de la acción conjunta de una serie de proteínas que regulan la absorción, distribución y quelación de los metales pesados en los diferentes orgánulos.

Con el fin de identificar los mecanismos moleculares implicados en el mantenimiento de la homeostasis celular de los metales pesados y, por tanto, de los mecanismos implicados en la tolerancia del hongo a metales pesados, en la presente Memoria de Tesis Doctoral se han identificado y caracterizado genes que codifican proteínas implicadas en los procesos de transporte y quelación de metales pesados en *G. intraradices*.



### **3.1. Aislamiento y caracterización del transportador de Zn *GintZnT1***

#### 3.1.1. Clonación de *GintZnT1*

El análisis de las secuencias no anotadas de ESTs (“*expressed sequence tags*”) de *G. intraradices* presentes en las bases de datos reveló que el número de acceso BI452096 presentaba gran homología con transportadores de Zn de la familia CDF. Esta secuencia era 563 pb y correspondía al extremo 3’ del gen, dado que contenía un codon de terminación y una cola de poliadeninas. El resto de la secuencia codificante se obtuvo mediante la técnica de 5’ RACE, usando el primer ZnT2. El gen completo, llamado *GintZnT1*, contiene un marco de lectura abierto de 454 aminoácidos, con un peso molecular predicho de 54 kDa (Figura 12).

La comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de *GintZnT1* con otros miembros de la familia CDF revela una elevada homología con los transportadores Zrc1 y Cot1 de *S. cerevisiae* y con el Zhf de *S. pombe* (Tabla 7). La clasificación de *GintZnT1* dentro de la familia de transportadores CDFs se ve reforzada por el perfil hidrófilo que presenta y por su topología predicha. Como se muestra en la Figura 13 A, la topología deducida mediante distintos programas de predicción revela 6 pasos a través de membrana, un amplio bucle citoplasmático entre los pasos IV y V, y los extremos N- y C- terminal citosólicos. La secuencia de aminoácidos de los dominios transmembrana de *GintZnT1* presenta un alto grado de identidad con la de los transportadores Zrc1 y Cot1 de *S. cerevisiae* y Zhf de *S. pombe*. Además, *GintZnT1* tiene un motivo rico en histidinas (HX)<sub>8</sub> en el bucle citoplasmático grande, y la secuencia C-terminal E-X-H-X-W-X-L-S-X<sub>8</sub>-H, al igual que los CDFs de levaduras (Figura 13 B).

```

gaaaaaaagtcattaatataaataacactttattaatataataaaaaaaaaaattagaataa
aaaatgaagttatcacgacaaactcgtataatcatactgcttataattgatattagtttt
  M K L S R Q T R I I I L L I I D I S F
tttataacagaaattattcttggttattggatcaattctttggcaataatagctgactca
  F I T E I I L G Y W I N S L A I I A D S
tttcatatgttaaagatataatatttagtttggtagtgcgctttatatgctttaaagcttgct
  F H M L N D I F S L V V A L Y A L K L A
tctaggtcaacatcttcatcaaaatattcatatggttggcaacgagcggaagtttttaggt
  S R S T F S S K Y S Y G W Q R A E V L G
gctcttataaaatgggtgatttttaatggctttatgtcttagtattttcattcaagctatt
  A L I N G V F L M A L C L S I F I Q A I
gaaagatTTTTTgatccaccagatattaaaaatccggttgtcatccttggagttgggtgt
  E R F F D P P D I K N P V V I L G V G C
gcaggattactttcaaatatagttggattattattttcatgaacatgggtcacggacat
  A G L L S N I V G L L L F H E H G H G H
agtcatgggtcacagtcgatcatggtaagaaatctgctgacgtcgatgtacccatagac
  S H G H S H D H G K K S A D V D V P I D
gaaatacttgtagatcctgctgcgcgctcatatagtcgaaggctgcacaagagtcga
  E I L V H P A A S R R S I V K A A Q E S
cgagattcacaggagtttaagaaatcataaatgataattcaaatcattcaaatcatca
  R D S Q E F K E I I N D N S N H S N S S
aataatgagaacatttcaattaagaagaagaatctgatacaaaataacaatcaaaaaatt
  N N E N I S I K E E E S D T N N N Q K I
tctgagactgaagataatcaaaatcatcgcgataatcagtctcataaaaaagataaaaaat
  S E T E D N Q N H R D N Q S H K K D K N
ctcaatatgctggagttttcattcatgtgttgggtgatgctctaggtaaatattggggctc
  L N M R G V F I H V L G D A L G N I G V
gtttgctctggtttatattttacctcacacatttctcatggagattttatatagatcct
  V C S G L F I Y L T H F S W R F Y I D P
cttactagtttaataacttacaattattattctcatgtccgctattccttttagtaaagage
  L T S L I L T I I I L M S A I P L V K S
gcatcatttattctcctacaaaagggtccctcagggttaccgattgatgatgtacgatca
  A S F I L L Q K V P S G L P I D D V R S
agaattaaagatttatggagtatttccggttcactgaactgcatatttggcaactttct
  R I K E L Y G V L S V H E L H I W Q L S
gatacgaagcgaatatgttcagtgcacattttgctagcaccatcagctaattatatggag
  D T K R I C S V H I L L A P S A N Y M E
atagctgccgatataagaaaaatacttcatgttcacggagttcattcaataacaatacaa
  I A A D I R K I L H V H G V H S I T I Q
ccagaatatgtaaagattggattaataaaaaatgatagtggtgaagtaattatggtggtt
  P E Y V K I G L N K N D S G E V I M V V
gaaaattcaacaaaaggagaagtggaacttgtcgcaaatgaagttgataatcacgaaact
  E N S T K G E V E L V A N E V D N H E T
gcttgcttgcttgcgttgtaacttggattcctcttgactcagaatttatgctgtccgcct
  A C L L R C N L D S S C T Q N L C C P P
ccggtatcacaaccacaaaagatatgacgacgactccctctaattaaaaattatcattt
  P V S Q P P K D M T T T P S N -
tcataaaatttttaaatttagcagataattggtt

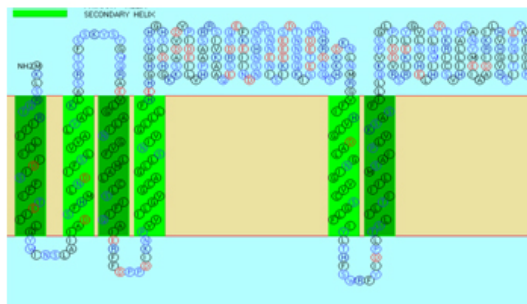
```

Figura 12. Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos de *GintZnT1*.

Tabla 7. Homología de GintZnT1 con los transportadores CDFs de otros organismos.

Transportador	Organismo	Similitud	Identidad
Cot1	<i>S. cerevisiae</i>	70.8 %	54.4 %
Zrc1	<i>S. cerevisiae</i>	57.9 %	39.3 %
Zhf	<i>S. pombe</i>	53.6 %	39.5 %
ZnT1	<i>H. sapiens</i>	32.5 %	49.3 %
Zat	<i>A. thaliana</i>	21.5 %	38.0 %
Msc2	<i>S. cerevisiae</i>	16.1 %	27.0 %

A



B

```

Zhf      MFDLARQTRIIILLGIDVTFVFFIEIITGYAIDSLALIADSFHMLNDIVSLVVALWATRLA
GintZnT1 -MKLSRQTRIIILLIIDISFFITEIILGYWINSLAIADSFHMLNDIFSLVVALYALKLA
Zrc1     MITG-KELRIISLLTLDTVFFLEITIGYMSHSLALIADSFHMLNDIISLLVALWAVDVA
Cot1     MKLGSQVKIISLLLDTVFFGIEITTYLSHSLALIADSFHMLNDIISLVVALWAVNVA
          : : ** ** : * ** ** ** .***:*****.***:**: * :
          TM I                                TM II

Zhf      HSTSHEPKYTYGWQRAEILGALSNGVFLIALCMFIFMEAIERFIEPPSVSNPTLMFFVGS
GintZnT1 SRSTFSSKYSGWQRAEVLGALINGVFLMALCLSIFIQAIERFFDPPDIKNPVVILGVGC
Zrc1     KNRGPDAKYTYGWKRAEILGALINAVFLIALCFSIMIEALQRLIEPQEIQNPRVLVYGVV
Cot1     KNRNPDSTYTYGWKRAEILGALINAVFLIALCVSILIEALQRIIAPPVIENPKFVLYVGV
          ...*:***:***:*** * .***:***. *:::***: * : ** .: **
          TM III

Zhf      LGLLSNFVGIPLFHDHGHDHPHTHTAQN-----YDFPEEDDIESVLP--TIVHRCNTS
GintZnT1 AGLLSNIVGLLLFHEHGHHGSHGSHDHGKKSADVDPIDEILVHPAASRRSIVKAAQES
Zrc1     AGLISNVVGLFLFHDHGSDS--LHSHSHG---SVESGNNDLDIESNATHSHSHAS-LPND
Cot1     AGLISNTVGLFLFHDHDQEHGHHGSHG---GIFA-DHEMHMPPSSHTHTAHVDGIENT
          **: ** **:***:.. * : : : . :
          TM IV

Zhf      Q-----QEVSH--THTQVADSATESSPLLSYTGNNHGAGTSKPVNHNHGSIEQDAPKQTKK
GintZnT1 RDSQEFKEIIN--DNSNHSNNSNNENISIKEESDTNNNQKISETEDNQNHDRDQSHKKD
Zrc1     NLAIDEDAISSPGSGQIGEVLPQSVVNRLSNESQPLLNHDDHDSHES-----KKPGH
Cot1     TPMDSTDNISEIMPNAIVDSFMNENTRLLTPENASKTPTSSTSSHTIASGGNYTEHNKRK
          . : . : . : . :
          RNLNMHGCVFLHVLGDALGNIGVISAALFIKYTDYSWRFLFDPCISILLTFIILFSAIPLC
GintZnT1 KNLNMRGVFIHVLGDALGNIGVCSGLFIYLTHFSWRFYIDPLTSLILTIIILMSAIPLV
Zrc1     RSLNMHGCVFLHVLGDALGNIGVIAAALFIWKTEYSWRYYSDPIVSLIITIIIFSSALPLS
Cot1     RSLNMHGCVFLHVLGDALGNIGVHLSAFFIWKTDYSWKYYTDPLVSLIITGIIFSSALPLS
          :.***:***:*****: :.*** * .***: ** *::: ** ** **
          TM V                                TM VI

Zhf      KSAALILLQVAPQSIKLLDVSNIINHLDGVESVHELHIWQLSDVVKLIATVHVCVSLPDDK
GintZnT1 KSASFILLQKVPGLPIDDVRSRIKELYGVLVSVHELHIWQLSDTKRICSVHILLAPSAN-
Zrc1     RRASRILLQATPSTISADQIQREILAVPGVIAVHDFHWNLTESIYIASINHQIDCAPDK
Cot1     CKASKILLQATPSTLSGDQVEGDLKIPGIIAIDHFIWNLTESIFIASLHIQLDISPEQ
          * : *** .*. : **: : : * : : ** : ** : * : ** : : . :
          GESYTKLTTDIRNVLQSGFIYDVTIQPEFA-----
GintZnT1 ---YMEIAADIRKILHVHGVHSITIQPEYVKIGLNKNDGSEVIMVVENSTRGEVELVANE
Zrc1     ---FMSSAKLIRKIFHQHGIHSATVQPEFVSGDVNEDIRRRFSIAGGSPSSSQEAFDSH
Cot1     ---FTDLAKIVRSKLRHRYGIHSATLQPEFITREV-----TSTERAGDSQ
          : . : :*. : : .*: : ** :
          --NHP---LLCDQGSSS-----
GintZnT1 VDNHETACLRLCNDSSCTQNLCCPPVSPQPKDMHTTTPSN-
Zrc1     G-NTEHGRKRSPTAYGATTASSNCIVDDAVNNTSNCL---
Cot1     GDHLQNDPLSLRPKTYGTGISGSTCLIDDAANCNTADCLEDH

```

Figura 13. Topología predicha de GintZnT1 mediante SOSUI (A). Alineamiento múltiple de GintZnT1 con las secuencias de aminoácidos de los CDFs de *S. pombe* y *S. cerevisiae* (B). Los dominios transmembrana (TM) están subrayados. Los dominios ricos en histidina conservados están en negrita.

### 3.1.2. Aislamiento y análisis de la secuencia del promotor de *GintZnT1*

Mediante paseo cromosómico se lograron aislar 810 pb aguas arriba del codón de inicio de la transcripción. El análisis bioinformático de esta secuencia nos ha permitido identificar dos secuencias de unión a Factores de Choque Térmico (HSF, *Heat Shock Factor*) y otra a Rml1, factor de transcripción de *S. cerevisiae* implicado en las rutas de transducción de señales responsables del mantenimiento de la integridad de la pared celular en condiciones de estrés (Jung *et al.* 2002) (Figura 14).

+ TAATACGACT	CACTATAGGG	CACGCGGGGT	CGACGGCCCG	GGCTGGTATC	ATAAATTAAT	AAATTTAATT
- ATTATGCTGA	GTGATATCCC	GTGCGCCCCA	GCTGCCGGGC	CCGACCATAG	TATTTAATTA	TTTAAATTAA
+ TTTAATCATT	CATTTTATTT	TAAATAAAT	TACAAGTATT	ATGTAAGTCG	TGTGTACATA	ATAATTGTTT
- AAATTAGTAA	GTAATAAATA	AATTTATTTA	ATGTTTCATA	TACATTCAGC	ACACATGTAT	TATTAACAAA
+ GTTGCTCAAG	AATCTTTTTT	CTCATAGTCA	TCTATGTATA	GCATGATTGT	GACAATAAAT	ATATGCTAAA
- CAACGAGTTC	TTAGAAAAAA	GAGTATCAGT	AGATACATA	CGTACTAACA	CTGTTATTTA	TATACGATTT
+ TAAGCCAATT	CAATGGCTAA	AAATTTCAAG	ATAATTTACG	AACCTTTCGT	TCTTTGGGTA	TAATGTTTCT
- ATTCGGTTAA	GTTACCGATT	TTTAAAGTTC	TATTAATGCG	TTGGAAAGCA	AGTAACCCAT	ATTACAAAGA
+ ATTGATATGT	CACGAGGTCT	CATACTGTTT	AGGATCAACC	GGATCAACAA	GGGCAGTTTC	TTTTTTCCAT
- TAACTATACA	GTGCTCCAGA	GTATGACAAA	TCCTAGTTGG	CCTAGTTGTT	CCCGTCAAAG	AAAAGGTA
+ CCTGTTATTG	GAAATCGAGT	AGCATGGAGT	GGGAATTTTT	TTTTCATTA	AAGAAATTA	ACGTTGATCA
- GGACAATAAC	CTTTAGCTCA	TCGTACCTCA	CCCTAAAAA	AAAAGTAATT	TTCTTTAATT	TGCAACTAGT
+ CTAATAAAAA	AATAAATTC	CTTATACATA	TATGTACCAT	TGCGTTATTG	AGCGTTGATT	CAATATTTAT
- GATTTTTTTT	TTATTTAAGG	GAATATGTAT	ATACATGGTA	ACGCAATAAC	TCGCAACTAA	GTTATAAATA
+ TATATTCAAA	AAAATAACCA	TATTAGTTTT	TACCAAAAA	ATATGAGCGC	ATTTAGTTCT	TTATATTTAT
- ATATAAGTTT	TTTTATTGGT	ATAATCAAAA	ATGGTTTTTA	TATACTCGCG	TAAATCAAGA	AATATAAATA
+ AAAAAAGGGA	AATTTTAAAA	ATAGTTGCAA	CTAATATATT	CTTTTGATGC	AGATCTTGGA	TGCAGATCTT
- TTTTTTCCCT	TTAAATTTT	TATCAACGTT	GATTATATAA	GAAACTACG	TCTAGAACCT	ACGTCTAGAA
+ GTTACGAGTT	TACATGTGAA	ATATATTAAT	ATAACGGGTT	ATAACGGTTT	TAGCGAATTA	ATTATAAAAA
- CAATGCTCAA	ATGTACACTT	TATATAATTA	TATTGCCCAA	TATTGCCAAA	ATCGCTTAAT	TAATATTTT
+ CCACTCGCAT	TCTGCTATCT	TTTTTTTTTT	TCTTTAAAAA	CTTTGAAAA	AAGTCATTAA	TATAAATAAC
- GGTGAGCGTA	AGACGATAGA	AAAAAAAAAA	AGAAATTTTT	GAAACTTTTT	TTCAGTAATT	ATATTTATGT
+ ACTTATTAAT	ATAATAAAAA	AAAAAATTAG	AAATAAAAA	TG		
- TGAATAATTA	TATTATTTTT	TTTTTTAATC	TTTATTTTTT	AC		

Figura 14. Análisis del promotor de *GintZnT1*. En rojo se muestra el dominio de unión de Rml1 y en azul las secuencias de reconocimiento de HSF. El codón de inicio de la transcripción está remarcado en amarillo, mientras que la zona 5' que es transcrita pero no traducida está en celeste.

Con el fin de caracterizar el promotor de *GintZnT1*, se analizó ectópicamente en levadura una fusión transcripcional de dicho promotor con el gen que codifica la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*. El hecho de que el análisis se realizará en un sistema

heterólogo se basa en que, como se ha indicado en la Sección de Introducción, no existen actualmente técnicas que permitan manipular genéticamente los hongos micorrícicos. Sin embargo, no fue posible realizar la caracterización del promotor propuesta, ya que no se detectó actividad  $\beta$ -galactosidasa en las levaduras transformadas y crecidas bien en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de Zn.

### 3.1.3. Expresión ectópica de *GintZnT1*

Como se acaba de indicar en el apartado anterior, la imposibilidad de manipular genéticamente los hongos micorrícicos, nos llevó a caracterizar funcionalmente *GintZnT1* en un sistema heterólogo. Para ello, el ADNc de *GintZnT1* se expresó en una serie de levaduras mutantes deficientes en distintos genes CDFs.

En primer lugar, se comprobó si *GintZnT1* era capaz de restaurar la sensibilidad a Zn de un doble mutante de *S. cerevisiae* deficiente en los transportadores vacuolares de Zn *zrc1* y *cot1*, el cual no es capaz de crecer a concentraciones superiores de 60  $\mu$ M de Zn (MacDiarmid *et al.* 2003). Sin embargo, *GintZnT1* no fue capaz de restaurar la tolerancia de esta cepa al Zn.

La falta de complementación del mutante *zrc1cot1* por *GintZnT1*, podría deberse a problemas transcripcionales, traduccionales o a que el producto génico se localice en una membrana diferente a la de la vacuola. La posibilidad de que la transcripción de este gen fuera errónea se descartó al comprobarse que *GintZnT1* se transcribía correctamente en la levadura mutante (Figura 15 A). Asimismo, la detección mediante técnicas de Western blot de una banda diferencial de unos 30 kDa en extractos proteicos de levaduras transformadas con p*GintZnT1*-HA, un plásmido que contiene una fusión traduccional de *GintZnT1* con tres epítomos HA en el extremo 3', indicaba que la proteína se traducía. Aunque el tamaño de la proteína detectada era menor del esperado, estos datos indican que el extremo C-terminal de la proteína se sintetizaba en la levadura mutante (Figura 15 B). Sin embargo, estudios de inmunofluorescencia en las levaduras transformadas con p*GintZnT1*-HA revelaron que la proteína se localizaba en el retículo endoplasmático en vez de en la vacuola, como se habría esperado (Figura 15C). Ello podría justificar el que *GintZnT1* sea incapaz de restaurar el fenotipo de una cepa deficiente en los transportadores de Zn vacuolares.

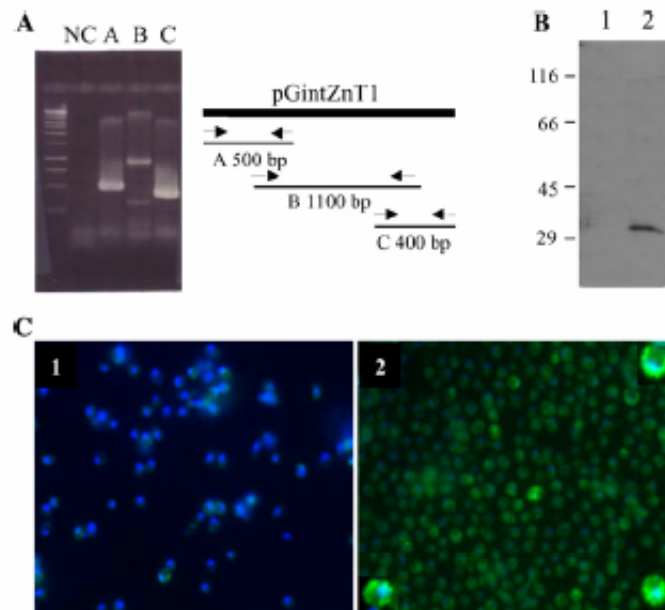


Figura 15. Expresión de *GintZnT1* en levadura. (A) Detección del RNAm de *GintZnT1* en la levadura mutante en *zrc1 cot1* de transformada con pGintZnT1 mediante RT-PCR. El ADNc de *GintZnT1* se amplificó por PCR usando las siguientes parejas de cebadores: ZnT3-ZnT4 (calle A), ZnT5-ZnT6 (calle B) y ZnT7-ZnT8 (calle C). Los tamaños de los amplicones se indican en el gráfico. NC indica al control negativo (sin añadir transcriptasa reversa). (B) Detección de proteínas mediante análisis de Western blot de un extracto de proteínas totales aisladas de transformantes con pYES2 (calle 1) o pGintZnT1-HA (calle 2). La detección se realizó con el anticuerpo murino anti-HA. Las posiciones de los marcadores de peso molecular, en kilodaltons, se indican a la izquierda. (C) Localización mediante inmunofluorescencia de *GintZnT1*-HA en una cepa mutante en *zrc1* y *cot1* de levadura. Los núcleos teñidos con DAPI se indica en azul y el anticuerpo anti-HA en verde. El panel 1 muestra el transformante con pYES2 (control negativo) y el panel 2 muestra el transformante pGintZnT1-HA. En las esquinas del panel 2 se muestran las células a mayor aumento).

Dado que *GintZnT1* se localiza en el retículo endoplásmico, se analizó si podía restaurar el fenotipo de un mutante deficiente en *Msc2*, miembro de la familia CDF involucrado en la captación de zinc para la síntesis de metaloproteínas en el retículo endoplásmico, el cual es incapaz de crecer en medio YP con glicerol/etanol como fuente de carbono, a 37° C (Li & Kaplan 2001; Ellis *et al.* 2004). De nuevo, *GintZnT1* fue incapaz de complementar este mutante.

La consideración de que ciertos CDFs de diferentes organismos, como ZAT1 de *A. thaliana*, pese a que presentan la mayor homología con CDFs de *S. cerevisiae* no son funcionales en *S. cerevisiae* pero sí en *S. pombe*, nos llevó a analizar *GintZnT1* en una cepa de *S. pombe* deficiente en el gen *Zhf*, transportador CDF

del retículo endoplásmico. Sin embargo, *GintZnT1* no fue capaz de devolver el fenotipo silvestre a esta cepa de *S. pombe*.

Por último, se analizó la capacidad de *GintZnT1* de eliminar Zn del citosol mediante la determinación del efecto que ejerce la expresión de *GintZnT1* en los niveles citosólicos de Zn de levadura. Para ello se midió el grado de inducción de elementos de respuesta a Zn (ZRE), indicador de los niveles citosólicos de Zn, en cepas salvajes DY1457 co-transformadas con los plásmidos pYES2, p*GintZnT1* o pZRC1-HA y pDg2L. Este último plásmido porta una fusión transcripcional entre el gen de la  $\beta$ -galactosidasa y un promotor con un elemento ZRE, y es, por tanto, inducible cuando disminuyen los niveles citosólicos de Zn. Como se muestra en la Fig. 16, la expresión tanto de *GintZnT1* como la de *Zrc1-HA* (control positivo) incrementó la actividad  $\beta$ -galactosidasa, indicando que la expresión de estos genes provoca una disminución de los niveles citosólicos de la levadura, probablemente debido a la retirada de este ión a la vacuola, en el caso de *Zrc1-HA*, o al retículo endoplásmico en el caso de *GintZnT1*.

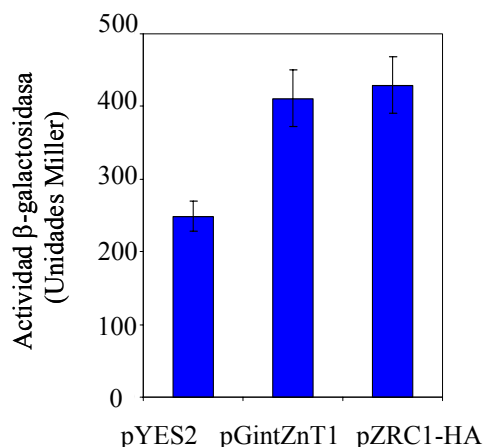


Figura 16. Inducción de elementos de respuesta a Zn (ZRE). La cepa de levadura DY1457 se co-transformó con los plásmidos pYES2, p*GintZnT1* o pZRC1-HA y el plásmido reportero pDg2L que contiene la fusión ZRE-lacZ. Las células de cada transformante se crecieron hasta fase logarítmica en un medio SD con 2% glucosa, y posteriormente se transfirieron a medio LZM con 2% galactosa. La actividad  $\beta$ -galactosidasa se midió 2 horas después de la inoculación en LZM. Los datos representan la media de tres repeticiones de dos experimentos representativos. La barra de error indica el error estándar.

#### 3.1.4. Regulación de *GintZnT1* por metales pesados

Con el fin de determinar si *GintZnT1* está involucrado en la detoxificación de Zn en *G. intraradices*, se estudió su posible regulación por este metal. Para ello se analizó, mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real usando los cebadores específicos de ZnT9 y ZnT10, la expresión de este gen en ARN extraído de micelio externo de *G. intraradices* expuesto durante diferentes tiempos a distintas



concentraciones de Zn, o bien desarrollado en medios suplementados con diferentes concentraciones de este metal.

La exposición del micelio durante 12 h a una concentración moderada de Zn (75  $\mu$ M) provocó un aumento de 4 veces en los niveles de expresión de *GintZnT1* (Figura 17 A). La adición al micelio de una concentración de Zn mayor (7.5 mM) también causó una inducción de 4 veces en la expresión de *GintZnT1*, aunque en este caso, la inducción se observó 6 horas después de la adición del metal. Sin embargo, se observó una inhibición en la expresión de *GintZnT1* en todos los demás puntos analizados tras la adición del pulso de 7.5 mM (Figura 17 B).

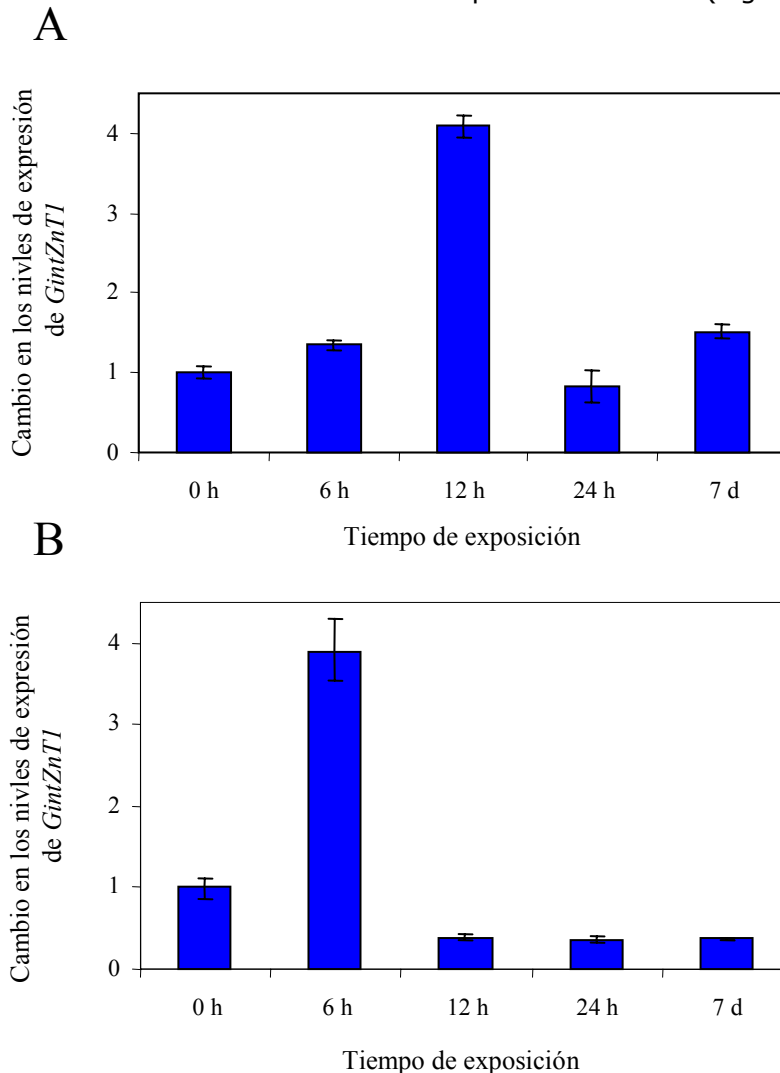


Figura 17. Expresión de *GintZnT1* en el micelio extraradical de *G. intraradices* tras la aplicación de diferentes pulsos de Zn. ARN total se extrajo de micelio expuesto durante 0, 6, 12, 24 horas y 7 días a 75  $\mu$ M (A) o 7.5 mM Zn (B). La expresión se estudió por RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores específicos para el ARNr 18S y *GintZnT1*. Los niveles relativos de transcripción se calcularon usando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Los datos representan las medias de tres repeticiones de un experimento representativo y las barras de error la desviación estándar.

Los resultados mostrados en la Figura 18 indican los niveles de transcripción de *GintZnT1* cuando el micelio se desarrolla en medios suplementados con Zn. Como se aprecia, la expresión de este gen sufre consistentemente una inducción del 60% cuando el micelio extraradical se creció en presencia de 75  $\mu\text{M}$  Zn. No obstante, se observó una marcada inhibición de 5 veces cuando el micelio cultivó en medios suplementados con 750 y 7500  $\mu\text{M}$  Zn.

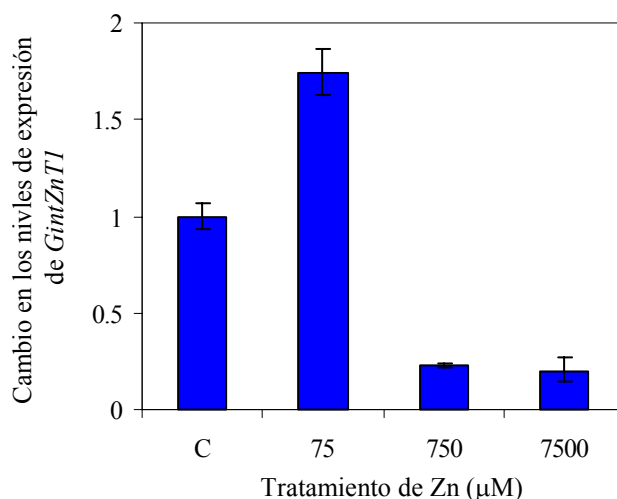


Figura 18. Expresión de *GintZnT1* en el micelio extraradical de *G. intraradices* desarrollado en medios suplementados con diferentes concentraciones de Zn. El ARN total se extrajo de micelio crecido en M-C medio sin suplementar (C) o suplementado con 75, 750 o 7500  $\mu\text{M}$  de Zn. La expresión se estudió por RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores específicos para el ARNr 18S y *GintZnT1*. Los niveles relativos de transcripción se calcularon usando el método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . Los datos representan las medias de tres repeticiones de un experimento representativo y las barras de error la desviación estándar.

Dado que algunos transportadores CDF también son capaces de transportar Cd, se estudió si este metal es capaz de afectar a los niveles de expresión de *GintZnT1*. Para ello se evaluó el efecto de este metal en dos situaciones análogas a las empleadas para estudiar el efecto del Zn: en micelio externo de *G. intraradices* expuesto a 450  $\mu\text{M}$  de Cd, y en micelio desarrollado en medios suplementados con diferentes concentraciones de este metal. Como se observa en la Figura 19, el Cd no ejerce ningún efecto sobre los niveles de expresión de *GintZnT1* en ninguna de las condiciones estudiadas.

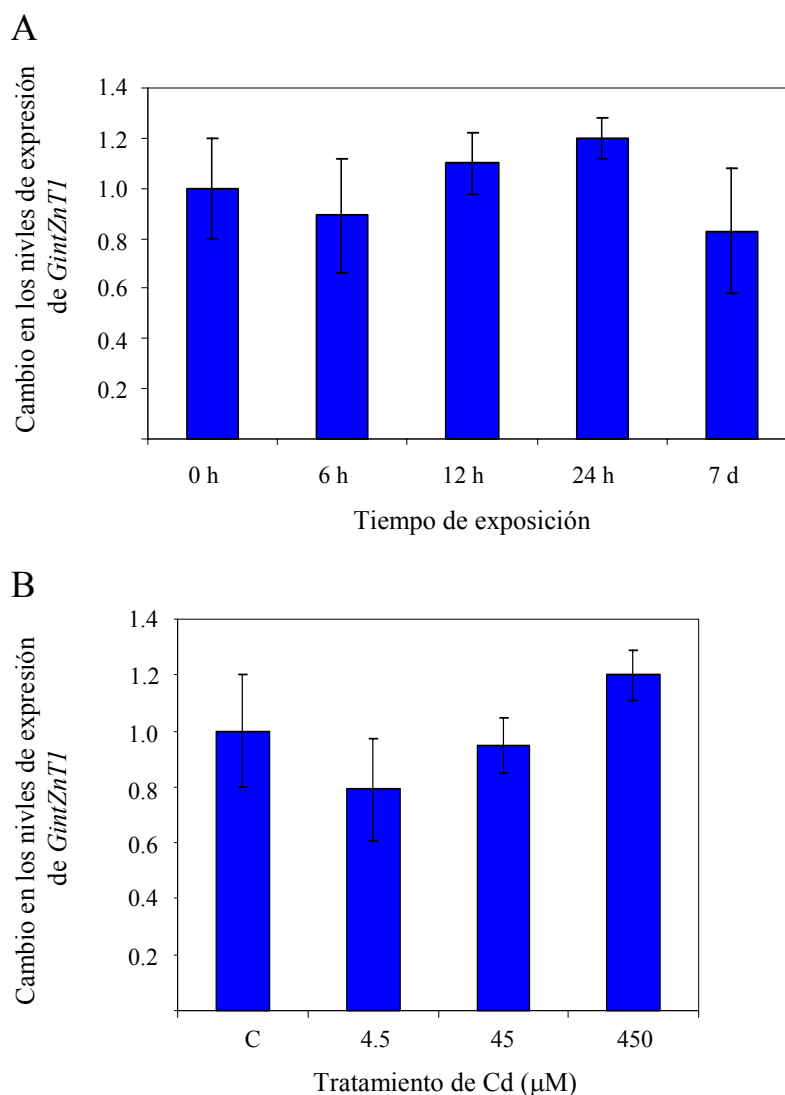


Figura 19. Expresión de *GintZnT1* en el micelio extraradical de *G. intraradices* tras una exposición corta a 450  $\mu\text{M}$  de Cd. ARN total se extrajo de micelio expuesto a 0, 6, 12, 24 horas y 7 días (A). Expresión de *GintZnT1* en el micelio extraradical de *G. intraradices* expuestas por largo tiempo a Zn. El ARN total se extrajo de micelio crecido en M-C medio sin suplementar (C) o suplementado con 4.5, 45 ó 450  $\mu\text{M}$  de Cd (B). La expresión se estudió por RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores específicos para el ARNr 18S y *GintZnT1*. Los niveles relativos de transcripción se calcularon usando el método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . Los datos representan las medias de tres repeticiones de un experimento representativo y las barras de error la desviación estándar.

### 3.1.5. Regulación de *GintZnT1* por estrés oxidativo

Dado que el análisis del promotor de *GintZnT1* ha mostrado secuencias reconocidas por HSFs, y que estos factores de transcripción pueden responder a estreses oxidativos (Hahn *et al.* 2004), se ha estudiado si este tipo de estrés afecta a los niveles de expresión de *GintZnT1*. Para ello se determinaron los niveles de expresión de *GintZnT1* en micelio externo expuesto durante periodos de tiempo a paraquat, un agente oxidante. Los datos obtenidos indican que la alteración de los niveles redox del hongo no afectan la expresión de este gen (Figura 20).

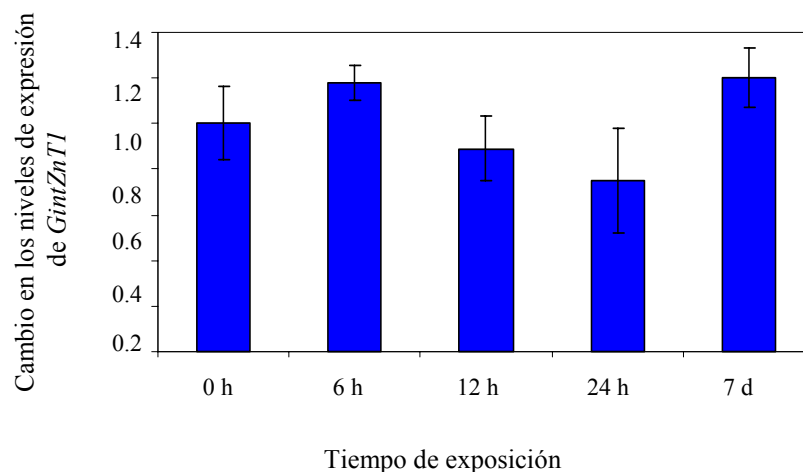


Figura 20. Expresión de *GintZnT1* en el micelio extraradical de *G. intraradices* tras una exposición corta a 500  $\mu\text{M}$  de paraquat. ARN total se extrajo de micelio expuesto a 0, 6, 12, 24 horas y 7 días. La expresión se estudió por RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores específicos para el ARNr 18S y *GintZnT1*. Los niveles relativos de transcripción se calcularon usando el método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . Los datos representan las medias de tres repeticiones de un experimento representativo y las barras de error la desviación estándar.

### 3.2. Aislamiento y caracterización del transportador ABC *GintABC1*

#### 3.2.1. Clonación de *GintABC1*

En un listado de secuencias anotadas procedentes de una colección de clones genómicos de *G. intraradices*, disponible en la página web del Dr. P. Lammers (<http://darwin.nmsu.edu/~plammers/glomus/>), encontramos que el clon Bgl53-T7 presentaba una elevada homología con genes de la subfamilia MRP de transportadores ABC, los cuales están involucrados en la tolerancia frente a metales pesados. Dado que era un clon genómico parcial, el ADNc de este gen se obtuvo mediante técnicas de RACE usando los oligonucleótidos ABC1 y ABC2. Esta secuencia se corresponde con un clon parcial, correspondiente al extremo 5' de esta familia de genes. Como se observa en la Figura 21, este gen codifica una región con 5 dominios transmembrana y una cola C-terminal citoplasmática, lo que recuerda en gran medida al dominio TM0 de algunos MRPs como *yfc1* (Figura 21).

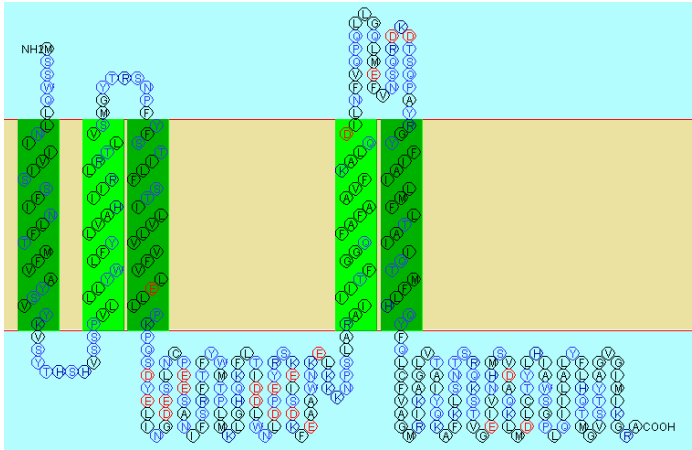


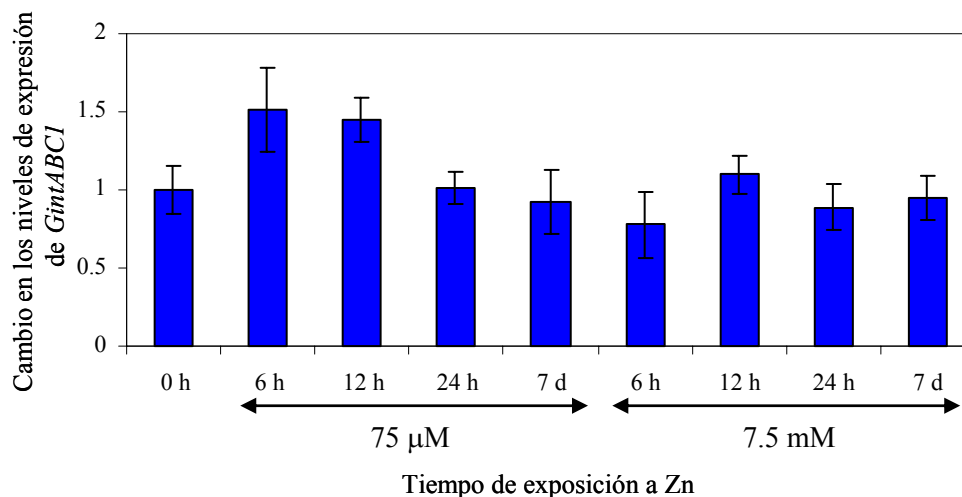
Figura 21. Topología de la región clonada de *GintABC1* predicha mediante SOSUI

### 3.3.2. Regulación de *GintABC1* por metales pesados

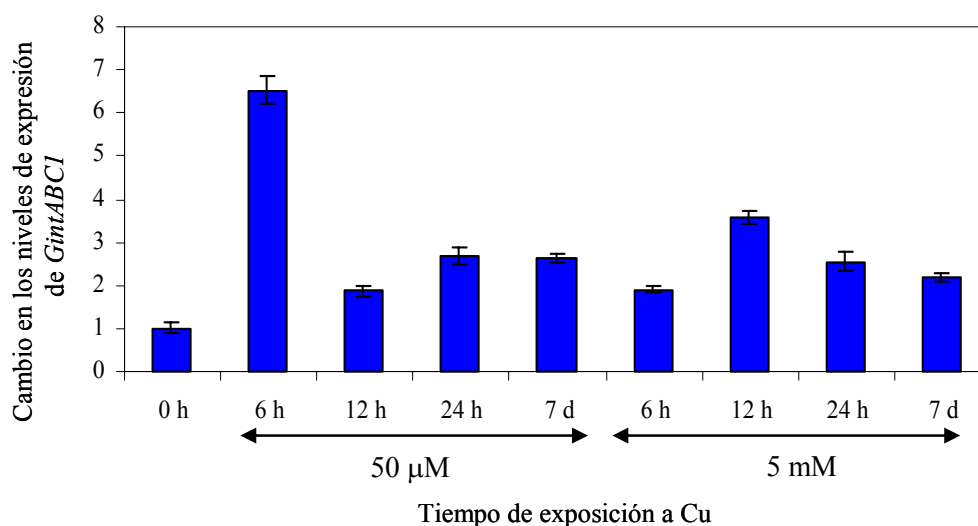
Con el fin de determinar si *GintABC1* está involucrado en la detoxificación de metales pesados en *G. intraradices*, se estudió su posible regulación por Cu, Cd o Zn. Para ello se analizó, mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real usando los cebadores específicos de ABC1 y ABC2, la expresión de este gen en ARN extraído de micelio externo de *G. intraradices* expuesto durante diferentes tiempos a Cu, Cd o Zn, o bien desarrollado en medios suplementados con diferentes concentraciones de estos metales pesados.

Como se muestra en la Fig. 22a, la exposición del micelio a las dos concentraciones de Zn utilizadas en este estudio no alteró significativamente los niveles de expresión de *GintABC1* en ninguno de los tiempos analizados. Por el contrario, la aplicación tanto de concentraciones bajas y altas de Cu como de una concentración alta de Cd, metales con capacidad de alterar el equilibrio redox, causó un aumento en los niveles de expresión de *GintABC1* en todos los tiempos medidos (Figuras 22 B y C). Los niveles máximos de expresión se detectaron en las primeras horas de exposición a Cu (6-12h), mientras que en el caso del Cd se detectaron tras 7 días de exposición al metal.

A



B



C

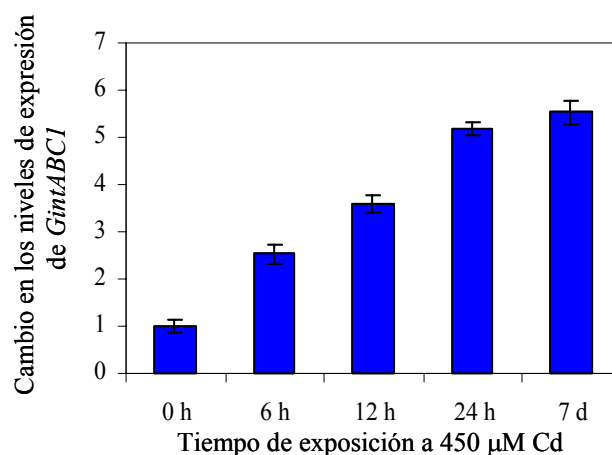


Figura 22. Expresión de *GintABC1* en el micelio extraradical de *G. intraradices* tras una exposición corta a 75 ó 7500 µM Zn (A), 50 ó 5000 µM Cu (B), o 450 µM Cd (C). ARN total se extrajo de micelio expuesto a 0, 6, 12, 24 horas y 7 días. La expresión se estudió por RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores específicos para el ARNr 18S y *GintABC11*. Los niveles relativos de transcripción se calcularon usando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Los datos representan las medias de tres repeticiones de un experimento representativo y las barras de error la desviación estándar.

Cuando el micelio se cultivó en presencia de los metales pesados, tan sólo en el micelio recuperado de las placas suplementadas con Cu se observó una inducción (2-3 veces) de la expresión de *GintABC1*, no detectándose cambios significativos en el micelio desarrollado en presencia de Zn y Cd (Figura 23).

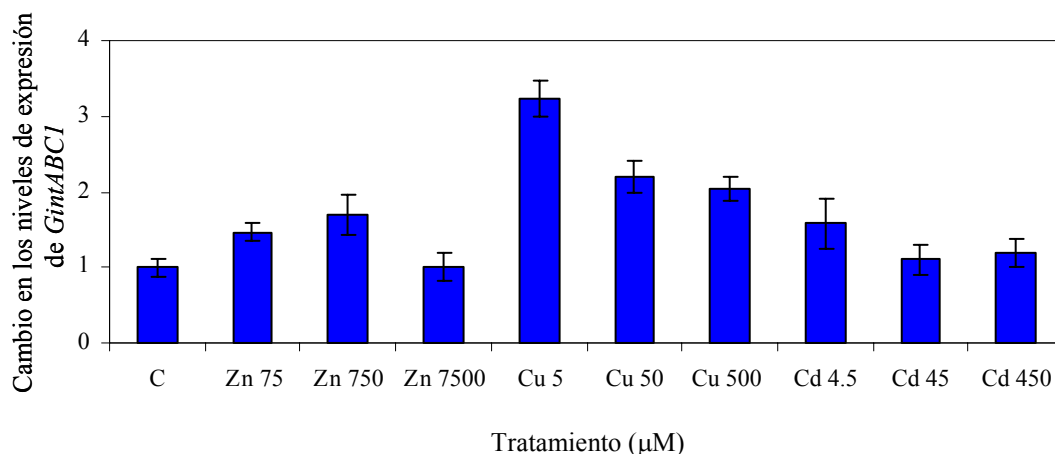


Figura 23. Expresión de *GintABC1* en el micelio extraradical de *G. intraradices* tras una exposición prolongada a 75, 750 ó 7500 µM Zn; 5, 50 ó 5000 µM Cu; o 4.5 45 ó 450 µM Cd. Se extrajo ARN total de micelio expuesto al metal durante 0, 6, 12, 24 horas y 7 días. La expresión se estudió por RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores específicos para el ARNr 18S y *GintABC1*. Los niveles relativos de transcripción se calcularon usando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Los datos representan las medias de tres repeticiones de un experimento representativo y las barras de error la desviación estándar.

### 3.2.3. Regulación de *GintABC1* por estrés oxidativo

En la sección anterior observamos que tan sólo los metales capaces de alterar el estado redox del micelio fueron capaces de inducir la expresión de *GintABC1*. Para discriminar si la inducción obedece específicamente a estos metales, o es resultado de la alteración del estado oxidativo del hongo, se aplicaron pulsos de 500 µM de paraquat al micelio extraradical de *G. intraradices*. Como se observa en la Figura 24, el paraquat indujo la transcripción de *GintABC1* en todos los tiempos analizados.

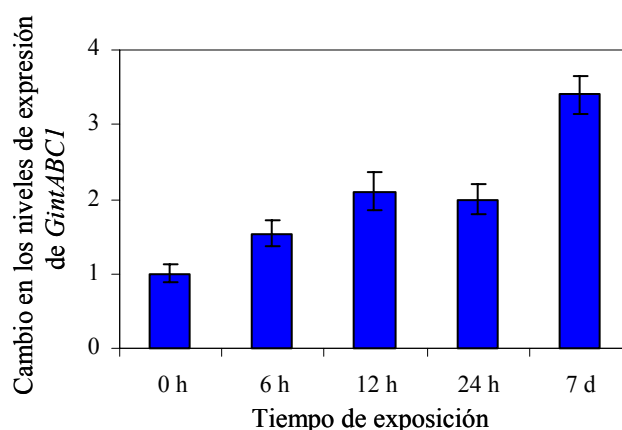


Figura 24. Expresión de *GintABC1* en el micelio extraradical de *G. intraradices* tras una exposición a 500  $\mu\text{M}$  de paraquat. Se extrajo ARN total del micelio expuesto a paraquat durante 0, 6, 12, 24 horas y 7 días. La expresión se estudió por RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores específicos para el ARNr 18S y *GintABC1*. Los niveles relativos de transcripción se calcularon usando el método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . Los datos representan las medias de tres repeticiones de un experimento representativo y las barras de error la desviación estándar.

### 3.3. Aislamiento y caracterización de la metalotioneína *GintMT1*

#### 3.3.1. Clonación y análisis de la secuencia de *GintMT1*.

Al explorar una base de datos de ESTs, se identificó un fragmento de 335 pb de ADNc correspondiente al extremo 3' de un gen putativo de metalotioneína de *G. intraradices* (número de acceso BI452270), el cual fue generosamente cedido la Dra. M. Harrison (Boyce Institute for Plant Research, Ithaca, EE.UU). La secuencia completa de cDNA (*GintMT1*) se obtuvo mediante 5'-RACE usando el cebador MT2 y ARN del micelio extraradical de *G. intraradices*. Este gen consiste de un marco de lectura abierto de 213 nucleótidos, una zona 5' no traducida (5'UTR) de 73 pb y una 3' de 187 pb. La presencia de varios codones de terminación aguas arriba del ATG de iniciación, y la presencia del codón de terminación TGA bastante antes de la terminación del ADNc, indican que esta secuencia contiene todo el fragmento codificante de *GintMT1* (Figura 25 A). La secuencia aminoacídica deducida de *GintMT1* consiste de 71 aminoácidos con una masa molecular predicha de 7.2 kDa, conteniendo 13 cisteínas (Figura 25 A). La comparación de la secuencia obtenida con las presentes en las bases de dato mediante BLAST indica que *GintMT1* está relacionado con miembros de la familia de las metalotioneínas, presentando la mayor homología con genes de metalotioneína de los hongos micorrícicos *Gi. rosea* y *Gi. margarita* (Tabla 8).



Tabla 7. Homología de GintMT1 con las metalotioneínas de otros organismos.

Metalotioneína	Organismo	Similitud	Identidad
GrosMT1	<i>Gi rosea</i>	55.3 %	53.2 %
GmarMT1	<i>Gi margarita</i>	48.3 %	46.6 %
MT45	<i>Citrus unshii</i>	48.3 %	46.6 %
OsMT1	<i>Oryza sativa</i>	45.8 %	44.1 %
MET1	<i>M. sativa</i>	42.1 %	40.4 %
CUP1	<i>S. cerevisiae</i>	36.8 %	36.8 %
MTII	<i>Candida glabatra</i>	32.1 %	28.6 %

Las metalotioneínas se clasifican en función de la disposición de de las cisteínas presentes en la proteína (Cherian & Chan 1993). GintMT1 contiene dos motivos ricos en cisteína separados por una región de unos 25 aminoácidos. La región N-terminal contiene seis residuos en la disposición: C-X-C-X<sub>3</sub>-C-X-C-X<sub>3</sub>-C-X-C, y el dominio C-terminal presenta 7 cisteínas dispuestas del siguiente modo: C-X<sub>4</sub>-C-X-C-X<sub>2</sub>-C-X-C-X<sub>4</sub>-C-X-C (figura 25 A). Este tipo de secuencia coincide con la que presentan las metalotioneínas de tipo II, que incluyen todas las metalotioneínas de plantas, hongos e invertebrados (Fowler *et al.* 1987; Kojima 1991). Sin embargo, esta clasificación en Clases, tiene el inconveniente de que no permite comparar similitudes estructurales entre metalotioneínas similares. De ahí, que recientemente, se haya propuesto una nueva clasificación para agrupar a todos los genes de las metalotioneínas (Clases I y II) en familias filogenéticamente relacionadas y, por tanto, con secuencias alineables (<http://www.unizh.ch/~mtpage/MT.html>) (Kojima *et al.* 1999). Cuando se sigue tal clasificación, la distribución de los restos de cisteína en GintMT1 no coincide con el patrón de ninguna de las familias de metalotioneínas descritas hasta ahórrala fecha.

Para determinar si se podría crear una nueva familia de metalotioneínas que agrupara a todas las metalotioneínas de los hongos micorrícicos, se alinearon las secuencias de las metalotioneínas de *G. intraradices*, *Gi. rosea* y *Gi. margarita*. Como se muestra en la Figura 25B, las secuencias deducidas de aminoácidos de estos tres genes alinean bastante bien, observándose en todos ellos dos dominios ricos en cisteína con la siguiente distribución: C-X-C-X<sub>3</sub>-C-X-C-X<sub>2,3</sub>-C-X-C en la zona N-terminal y C-X<sub>4</sub>-C-X-C-X<sub>2,3</sub>-X-C-X-C<sub>4</sub>-C-X-C, en la zona C-terminal. De este modo, se propone la creación de una nueva familia de metalotioneínas, a la que hemos llamado Familia 16: Metalotioneínas de la Glomeromycota.

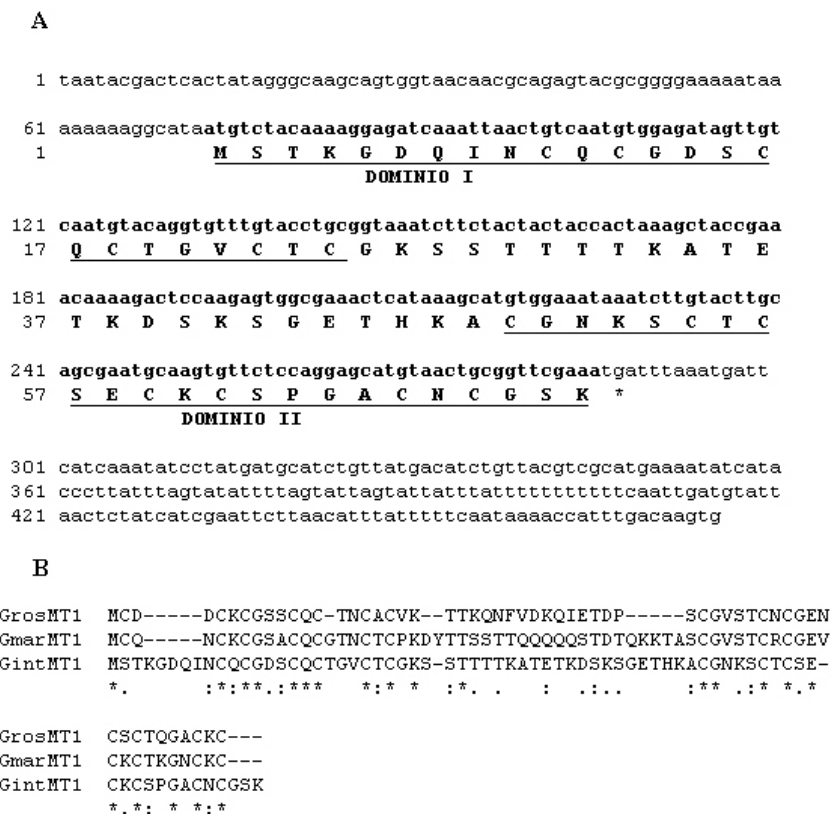


Figura 25. Secuencia nucleotídica y aminoacídica predicha de *GintMT1*. Los dos dominios ricos en cisteína están subrayados (A). Alineamiento múltiple de *GintMT1* con las otras secuencias conocidas de metalotioneínas de hongos micorrícicos (B).

### 3.3.2. Aislamiento y análisis del promotor de *GintMT1*

Mediante paseo cromosómico se lograron aislar 1430 pb aguas arriba del codón de inicio de la transcripción. El análisis bioinformático de esta secuencia nos ha permitido identificar tres secuencias de unión a Factores de Choque Térmico (HSF, *Heat Shock Factor*), y otra a MIG2, factor de transcripción de *S. cerevisiae* implicado en represión catabólica (Jung *et al.* 2002) (Figura 26).

Con el fin de caracterizar el promotor de *GintMT1*, se analizó ectópicamente en levadura una fusión transcripcional de dicho promotor con el gen que codifica la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*. Sin embargo, al igual que en el caso del promotor de *GintZnT1*, no fue posible realizar la caracterización del promotor propuesta, ya que no se detectó actividad  $\beta$ -galactosidasa en las levaduras transformadas y crecidas bien en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de metales pesados o paraquat.

+ ACGCGCTTTT	GGTGACCTAT	AGAATACTCA	AGCTATGCAT	CCAACGCGTT	GGGAGCTCTC	CCATATGGTC
- TGGCGGAAAA	CCACTGGATA	TCTTATGAGT	TCGATACGTA	GGTTGCGCAA	CCCTCGAGAG	GGTATACCAG
+ GACCTGCAGG	CGGCCGCGAA	TTCAC TAGTG	ATTGTAATAC	GACTCACTAT	AGGGCACGCG	TGGTCGACGG
- CTGGACGTCC	GCCGCGCCTT	AAGTGATCAC	TAACATTATG	CTGAGTGATA	TCCCCTGCGC	ACCAGCTGCC
+ CCCGGGCTGG	TCCTTTTACT	CTTTTATTGC	AAGTTGAATA	AAAGAAAGTA	CTGTCTCTTT	GGTCCCTTATT
- GGGCCCGACC	AGGAAAATGA	GAAAATAACG	TTCAACTTAT	TTTCTTTTCAT	GACAGAGAAA	CCAGGAATAA
+ TATTATATCT	ATTATTTCTT	AGTAAAATAT	AAAAGCAATT	AAAAACGTA	TGGATATATA	ACAAAAATTG
- ATAATATAGA	TAATAAAGAA	TCATTTTATA	TTTTCGTTAA	TTTTTTGCAT	ACCTATATAT	TGTTTTTAAC
+ GGATCCTGAT	ATAATTAGAT	ATTTGTTTTAA	ATATTACAGC	ATCTCAAATG	CTACTGATAG	AACAGAAGAC
- CCTAGGACTA	TATTAATCTA	TAAACAAATT	TATAATGTCT	TAGAGTTTAC	GATGACTA	TC TTGCTTCTG
+ AATTTAATTT	TTGATTTTTAA	TAAAATAAAG	AGTATTAATA	ATTCAAAGAT	AATGATGAAA	AGTTAAATAT
- TTAATTTAAA	AACTAAAATT	ATTTTATTTT	TCATAATTAT	TAAGTTTCTA	TTACTACTTT	TCAATTTATA
+ ATTACAAGAT	TGGAATTAAT	AATAAAGAAT	AAATAAATGA	AATAACAAAT	AATAACATAC	ATACTTTAAA
- TAATGTTCTA	ACCTTAATTA	TTATTTCTTA	TTTATTTACT	TTATTGTTTA	TTATTGTATG	TATGAAATTT
+ CTCAGGTTAT	TATATAAAAT	GCTTCTAATT	GTAAATATA	TTATAATAAA	AAAGCAATGT	GAAAAGTGTA
- GAGTCCAATA	ATATATTTTA	CGAAGATTAA	CAATTTATAT	AATATTATTT	TTTCGTTACA	CTTTTCACAT
+ AAAATATAAA	GTTATAAAAG	GAAAAGTTAC	CATTTTAAGC	TTTTCATGTT	TTATTATAGC	AAAAAAATA
- TTTTATATTT	CAATATTTTC	CTTTTCAATG	GTAAAATTCG	AAAAGTACAA	AATAATATCG	TTTTTTTTTAT
+ CACATGTTAC	ATAAAATCTT	GTGGTTTAAAT	ATGATATACA	TGTACCCCGG	GTCTTATAC	AAAAC TTTA
- GTGTACAATG	TATTTTAGAA	CACCAAATTA	TACTATATG	ACATGGGGCC	TAGAATATG	TTTTGAAAAT
+ TATATGTAC	CCGATTTTAA	AGTTAGAAGA	AAATGTTTTT	AGCTAGTAAA	ATACCCGGGT	ATTATGACAT
- ATATAACATG	GGCCTAAAAAT	TCAATCTTCT	TTTACAAAAA	TCGATCATTT	TATGGGCCCA	TAATACTGTA
+ AGAGGTACTA	ACTTATGATA	TTGATATTTA	TGCTTAATAT	TACTACTAAA	GAAAGTTTTT	AATAAAAGTT
- TCTCCATGAT	TGAATACTAT	AACTATAAAT	ACGAATTATA	ATGATGATTT	CTTCAAAA	TATTTTTCAA
+ TAAAATAAAT	TTTTTAAACA	CTTTTTCCTT	TTTTTATTAA	ATTAAAGAAT	TAAATATTTA	ATAAAAATTT
- ATTTTATTTA	AAAAATTTGT	GAAAAAGGAA	AAAAATAAAT	TAATTTCTTA	ATTTATAAAT	TATTTTTTTAA
+ AAGAGATTTA	AATCCTAAAT	AATATTTTTT	TATTAATTTA	TAAAAAATAT	TTACTTGTTT	AATTTTTGGTC
- TTCTCTAAAT	TTAGGATTTA	TTATAAAAAA	ATAATTAAT	ATTTTTTATA	AATGAACAAA	TTAAAACCAG
+ AGGTTTGTTA	TTAGGTTTAA	AAAAAATTTT	TAGAAGTTCT	TTTAATTTAT	CTTTATCAAG	TAAAAAATGC
- TCCAAACAAT	AATCCAAAT	TTTTTTAAAG	ATCTTCAAGA	AAATTAATA	GAAATAGTTC	ATTTTTTACG
+ ATCATTATGA	TGTTATTATT	TATCATTGGA	TTGATTATAT	ACGCCGCAGG	AAACGGCGTC	ACATGAAAAA
- TAGTAATACT	ACAATAATAA	ATAGTAACCT	AACTAATATA	TGCGGCGTCC	TTGCGCGCAG	TGTACTTTTT
+ AAAGTCTTAA	CAATAATATG	TGGCTTTATC	AACATGAATC	ATACATTATT	AAAAAAAAGA	TTGCATTGGC
- TTTTCAGGAT	GTTATTATAC	ACCGAAATAG	TTGTAATTA	TATGTAATAA	TTTTTTTTCT	AACGTAACCG
+ GAAATATAAA	AAAAATTTCTG	CCAATGGCAA	ATTCCTCTCC	CGCTTCCAGG	CGTAAACTAT	TGTGACGAAA
- CTTTATATTT	TTTTTAAGAC	GGTTACCGTT	TAAGGAGAGG	GCGAAGGTCC	GCATTTGATA	ACACTGCTTT
+ TTTAAAAAAA	ATTCTGCAAT	AGCAAAATCC	TCTCAGCTA	AACCATTGCG	ACGAAATTTA	AAAAAAATTC
- AAATTTTTTT	TAAGACGTTA	TCGTTTTAGG	AGAGTGCGAT	TTGGTAACGC	TGCTTTAAAT	TTTTTTTAAAG
+ TGCCAATGGC	AAAAGCATCT	CACGCTTCCA	GGCGTAAAAG	ATGGCATAAC	TATTGTGACG	AAAAC TAATT
- ACGGTTACCG	TTTTTCGTAGA	GTGCGAAGGT	CCGCATTTTC	TACCGTATTG	ATAACACTGC	TTTTGATTAA
+ CTGCTAGTGG	CAAAATCTTC	TCACGCTTTC	AGGCGTAAAA	TCTCATGTAA	AACATTGCAA	TATAAATAAG
- GACGATCACC	GTTTTAGAAG	AGTGCGAAAG	TCCGCATTTT	AGAGTACATT	TTGTAAGCTT	ATATTTATTC
+ ACCTACACTT	TTCTCTTTTT	CTGAAAAAAA	AAAAATCCCA	AATAAAAAAA	AAGCATAATG	
- TGGATGTGAA	AAGAGAAAAA	GACTTTTTTT	TTTTTAGGGT	TTATTTTTTT	TTCGTATTAC	

Figura 26. Análisis del promotor de *GintMT1*. En amarillo se indica el codon de inicio de la traducción y en azul la zona transcrita pero no traducida en 5'. Los dominios de reconocimiento por HSFs están marcados en rojo y los de reconocimiento por MIG2, en verde.

### 3.3.3. Expresión ectópica de *GintMT1*

Para caracterizar el producto génico de *GintMT1*, su cDNA se expresó en una cepa de levadura DTY113, deficiente en el gen de la metalotioneína CUP1, que deja al mutante sensible a Cu y Cd (Ecker *et al.* 1986). Como se muestra en la figura 27, la transformación de esta cepa con pGintMT1, restauró la capacidad de la cepa mutante de crecer a concentraciones superiores a 500  $\mu\text{M}$  Cu y 50  $\mu\text{M}$  Cd. Estos datos indican que *GintMT1* codifica una metalotioneína funcional.

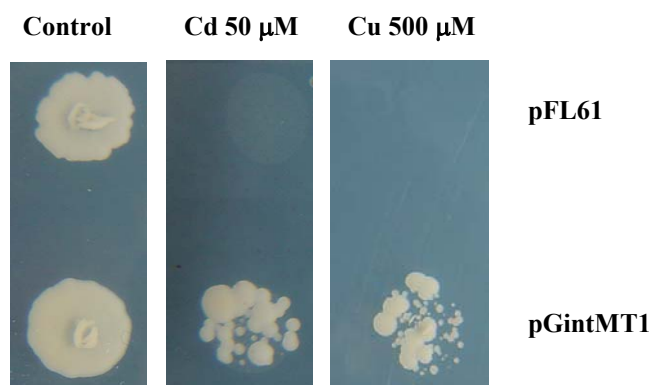


Figura 27. Complementación por *GintMT1* de una cepa de levadura deficiente en el gen de metalotioneína CUP1. Las células DTY113 se transformaron con pGintMT1 o con el vector vacío pFL61 y se cultivó en medio SD suplementado con 500  $\mu\text{M}$  Cu o 50  $\mu\text{M}$  Cd.

### 3.3.4. Regulación de *GintMT1* por metales pesados

La expresión de *GintMT1* se estudió en el micelio extraradical de *G. intraradices* expuesto de a Zn (75  $\mu\text{M}$  y 7.5 mM), Cu (50  $\mu\text{M}$  y 5 mM) o Cd (0.45 mM) durante 12 h, 24h y 7d mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando los cebadores MT1 y MT2. Como se muestra en la Figura 28 B, *GintMT1* se indujo 1.8 y 5 veces, respectivamente, a las 24 h y 7 d de la adición de 5 mM Cu. Sin embargo, la exposición al micelio a concentraciones más bajas de Cu tuvo un efecto inhibitorio transitorio a las 12 y 24 h, volviendo a los niveles basales de expresión 7 d después de la adición del metal. La exposición del micelio a Zn y a Cd provocó una inhibición de la transcripción de *GintMT1* en todos los tiempos y con todas las concentraciones examinadas (Figura 28 A y C).

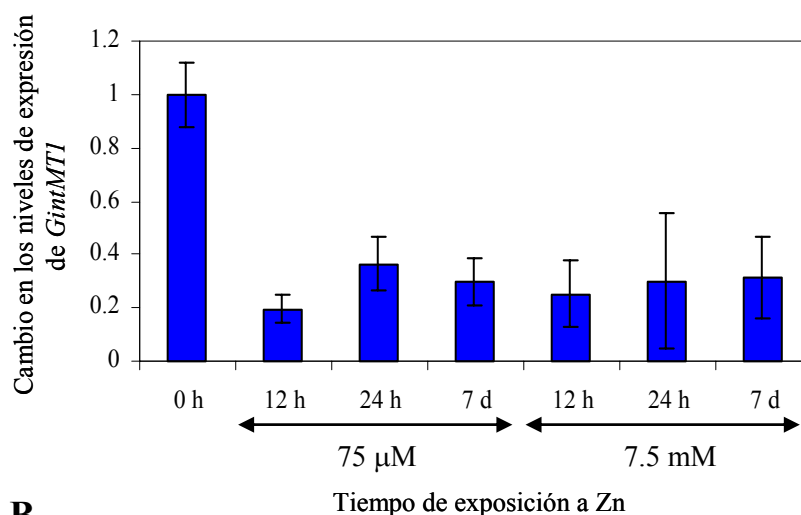
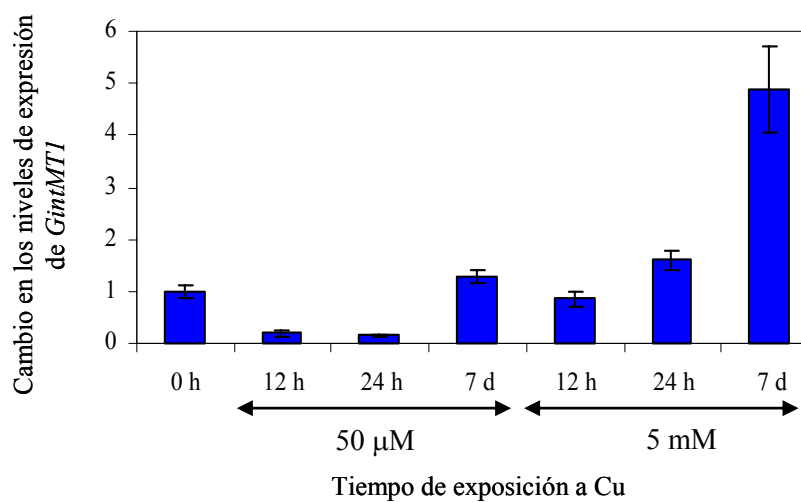
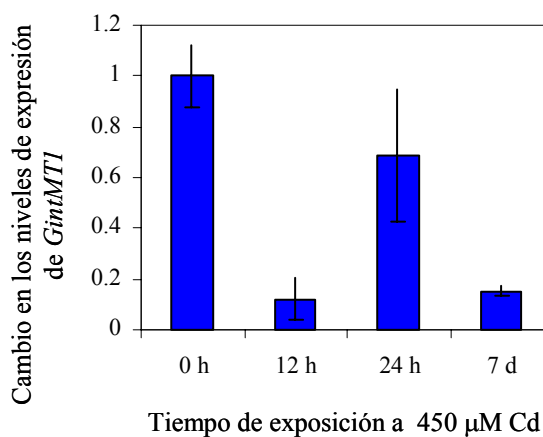
**A****B****C**

Figura 28. Expresión de *GintMT1* en el micelio extraradical de *G. intraradices* tras una exposición a a 75 ó 7500 µM Zn (A), 50 ó 5000 µM Cu (B), o 450 µM Cd durante a 0, 12, 24 horas y 7 días (C). La expresión se estudió por RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores específicos para el ARNr 18S y *GintMT1*. Los niveles relativos de transcripción se calcularon usando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Los datos representan las medias de tres repeticiones de un experimento representativo y las barras de error la desviación estándar.

Cuando se estudió la expresión de *GintMT1* en micelios que han crecido durante largo tiempo en medios suplementados con Zn, Cu y Cd, se observó que en todos los tratamientos ensayados la transcripción de este gen disminuyó con respecto a la de los controles (Figura 29).

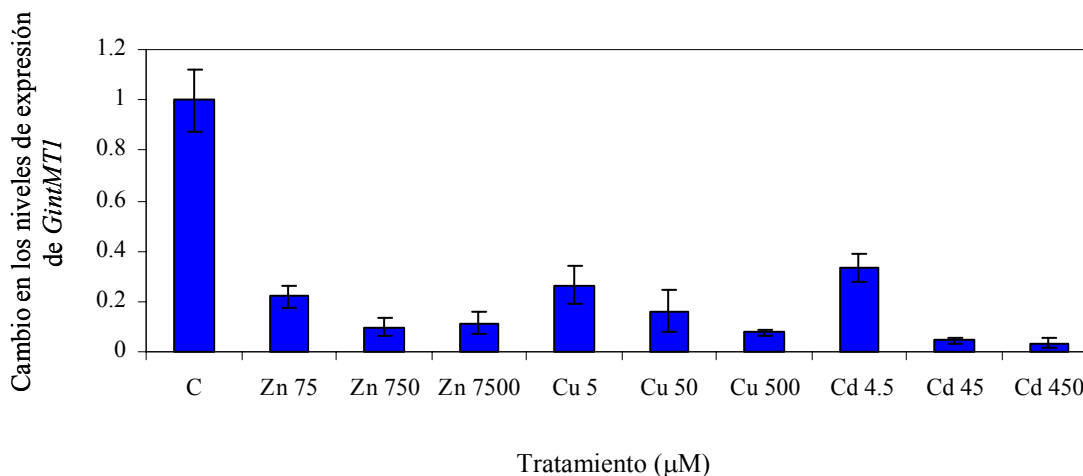


Figura 29. Análisis de la expresión de *GintMT1* en el micelio extraradical de *G. intraradices* en medio M-C (C) o suplementado con las concentraciones de Cu, Zn y Cd indicadas. La expresión se estudió por RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores específicos para el ARNr 18S y *GintMT1*. Los niveles relativos de transcripción se calcularon usando el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Los datos representan las medias de tres repeticiones de un experimento representativo y las barras de error la desviación estándar.

### 3.3.5. Regulación de *GintMT1* por estrés oxidativo.

A pesar de que la principal función de las metalotioneínas está relacionada con la tolerancia a metales pesados y su homeostasis, también pueden estar involucradas en la respuesta frente a otros estreses ambientales (Tamai *et al.* 1993; Li *et al.* 2004). Para evaluar si *GintMT1* desempeña un papel en la respuesta de defensa del hongo contra estreses oxidativos, se analizó la expresión de *GintMT1* en el micelio extraradical de *G. intraradices* expuesto durante 12h, 24 h o 7 d a paraquat, un agente oxidante. Se observó una inducción de los niveles de *GintMT1* de 2 veces a las 12 y 24 horas de la aplicación del paraquat, llegando a aumentar hasta 9 veces 7 días después (Figura 30).

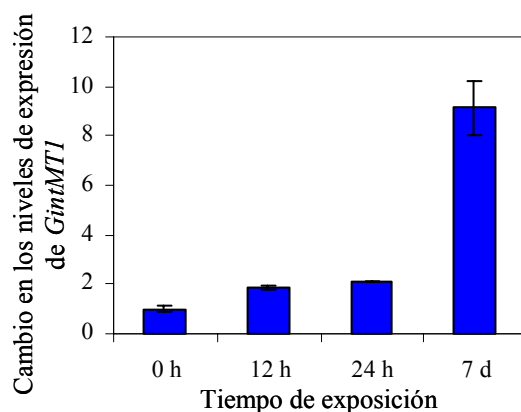


Figura 30. Expresión de *GintMT1* en el micelio extraradical de *G. intraradices* tras una exposición a 500  $\mu\text{M}$  de paraquat. Se extrajo ARN total del micelio expuesto a paraquat durante 0, 6, 12, 24 horas y 7 días. La expresión se estudió por RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores específicos para el ARNr 18S y *GintMT1*. Los niveles relativos de transcripción se calcularon usando el método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . Los datos representan las medias de tres repeticiones de un experimento representativo y las barras de error la desviación estándar.

### 3.4. Aislamiento de genes que codifican fitoquelatín sintasas

Las metalotioneínas no son los únicos quelantes intracelulares. Como se ha descrito en la Introducción, existen otros péptidos ricos en cisteína capaces de retener metales pesados, las fitoquelatinas (PCs). Con el objetivo de determinar si los Glomeromycota presenta PCs, se trató de clonar el gen que codifica la enzima que permite su síntesis, la fitoquelatín sintasa (PCS). Para ello se diseñaron cebadores degenerados en base a secuencias de PCS conocidas de hongos y plantas. Estos cebadores, si bien eran capaces de amplificar la PCS de ADN de *A. thaliana* (control positivo) no produjeron ninguna banda cuando se usó como molde ADN o ARN de *G. intraradices* y *G. mosseae*. Al fracasar esta aproximación, se intentó identificar el gen que codifica la PCS en una genoteca de ADN genómico de *G. mosseae*, usándose como sonda heteróloga el fragmento de ADN de *A. thaliana* amplificado con los cebadores degenerados. Pese a los numerosos intentos, no se pudo obtener ningún clon portador de alguna secuencia con homología a PCSs.

### 3.5 Aislamiento y caracterización de la Cu,Zn superóxido dismutasa *GintSOD1*

Como se ha descrito en la Introducción, estas proteínas están involucradas en la regulación de los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) y en la protección de la célula frente a estreses oxidativos. Dado que algunos metales pesados, como el Cu, producen ROS en condiciones fisiológicas y teniendo

en cuenta que la expresión de algunos de los genes estudiados en esta memoria de Tesis Doctoral se activa por un agente productor de iones superóxido, se decidió analizar la regulación por los metales pesados de un gen que codifica una Cu,Zn-SOD.

### 3.5.1. Clonación y análisis de la secuencia de *GintSOD1*

Al explorar una base de datos de ESTs, se identificó un fragmento de 650 pb de ADNc correspondiente a una Cu,Zn SOD putativa de *G. intraradices* (número de acceso BI452161). Este gen consiste de un marco de lectura abierto de 468 nucleótidos, una zona 5' no traducida (5'UTR) de 39 pb y una 3' de 87 pb. La presencia de varios codones de terminación aguas arriba del ATG de iniciación, y la presencia del codón de terminación TGA bastante antes de la terminación del ADNc, indican que esta secuencia contiene todo el fragmento codificante de *GintSOD1* (Figura 31). La secuencia aminoacídica deducida de *GintMT1* consiste de 156 aminoácidos con una masa molecular predicha de 16.3 kDa. La comparación de la secuencia obtenida con las presentes en las bases de dato mediante BLAST indica que *GintSOD1* está relacionado con miembros de la familia de las Cu,ZnSOD, presentando una gran homología con estos genes (por encima del 70 % de similitud) (Tabla 8).

```

ttcacgataattaatttttaaatatattatacattcataatgactattaaagctgngca
M T I K A X A
gtttttactcctgataaaccatctatcaaagtaggtggtactattactttcattcaggaa
V F T P D K P S I K V G G T I T F I Q E
agtgaaaatgggcccacggaattgatattaaattgaaggattagctcctggtgaacat
S E N G P T E I D I K I E G L A P G E H
ggattccacatccatgaattcgggtgataacacgaatggatgcacttcagctggacctcat
G F H I H E F G D N T N G C T S A G P H
ttaaaccattcggtaaaactcatggagctcctaaggatgatgatcgtcacggttggcgat
F N P F G K T H G A P K D D D R H V G D
ttgggtaatgttactgctggcccggatggtaaagttgctactaaaattactgatgaccaa
L G N V T A G P D G K V A T K I T D D Q
attaaattaagtggtcccaactctgtaatcggacgtactatcgttattcatgctgatggt
I K L S G P N S V I G R T I V I H A D V
gatgaccttggtaaaggtggtcatgaactatctcttaaaactggtaatgcggtgatcgt
D D L G K G G H E L S L K T G N A G D R
cttgcttggtggttattcggatcaccaataaattacatactatacacatatatttata
L A C G V I G I T K -
ttgtatattatataaaaaggatagccgggcccaccagaagaacgatcatcaccaaatat

```

Figura 31. Secuencia nucleotídica y aminoacídica predicha de *GintSOD1*.



Tabla 7. Homología de GintSOD1 con las Cu,ZnSOD de otros organismos.

Cu,ZnSOD	Organismo	Similitud	Identidad
MSODDcc	<i>Marchantia palacea</i>	76.9 %	65.2 %
SODCP	<i>A. thaliana</i>	75.0 %	62.5 %
HBSOD	<i>S. pombe</i>	73.2 %	63.8 %
GmarSOD1	<i>G. margarita</i>	72.7 %	65.6 %
SOD1	<i>S. cerevisiae</i>	70.7 %	62.1 %

El análisis predictivo de la estructura terciaria de GintSOD1 indica que es bastante similar a la de otras Cu,ZnSODs previamente cristalizadas (Figura 32 A y B). La comparación entre los aminoácidos implicados en la catálisis y coordinación de los núcleos metálicos (Figura 32 C) y de aquéllos implicados en la especificidad de sustrato (Figura 32 Den el cristal de la Cu,ZnSOD de espinaca (Kitagawa *et al.* 1991) y los de la secuencia aminoacídica de GintSOD1 muestra que son idénticos, lo que indica que el mecanismo de la catálisis debe de ser el mismo en ambas proteínas.

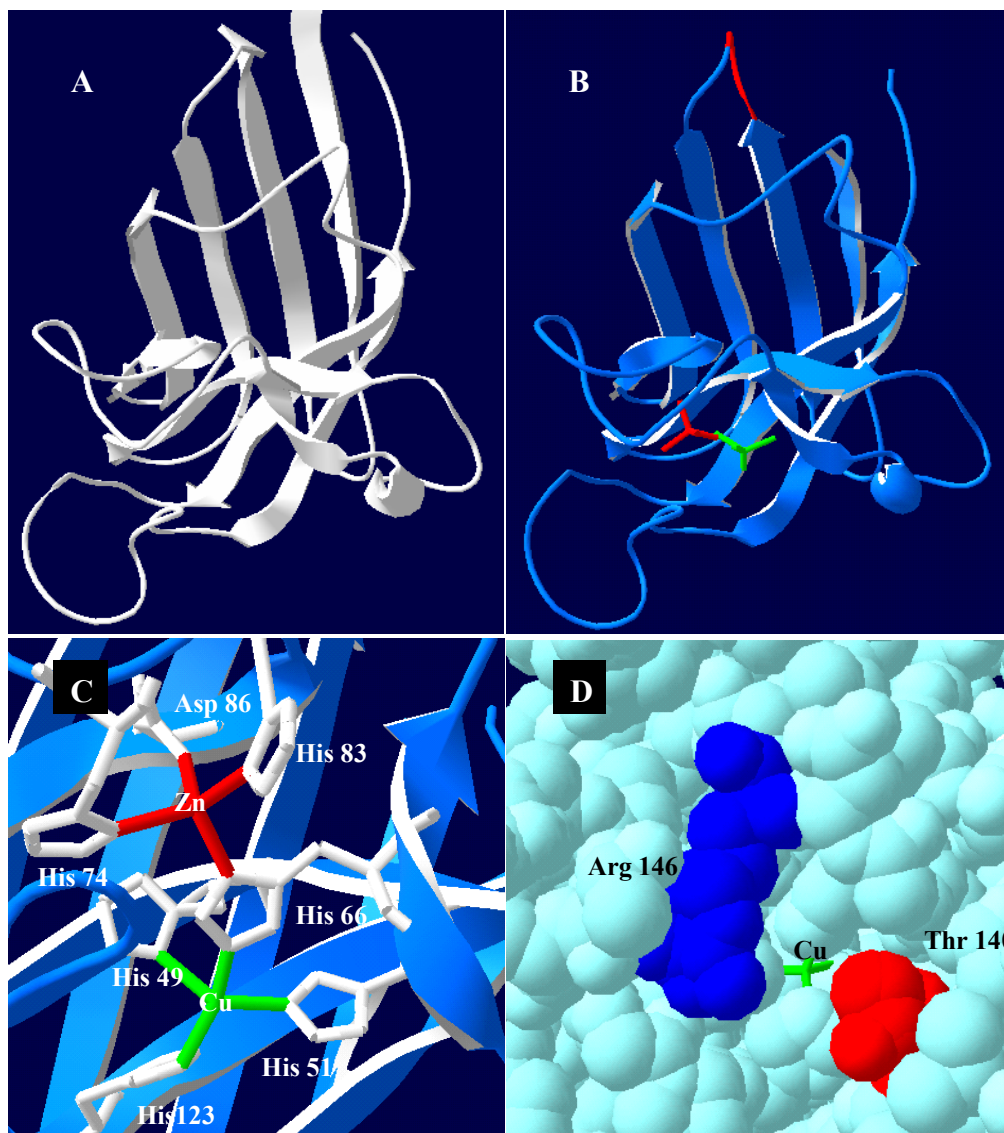


Figura 32. Estructura terciaria de la Cu,ZnSOD de espinaca (PDB 1srd) (A). Estructura terciaria predicha de GintSOD1 empleando SWISS-Model (B). El núcleo de Zn se indica en rojo y el de Cu en verde. Los aminoácidos que coordinan a estos núcleos y que están involucrados en la catálisis son idénticos en estas dos enzimas (C). La entrada del sustrato al núcleo de Cu se realiza por el hueco que dejan un resto de arginina y otro de treonina conservados en estas dos SODs (D).

### 3.5.2. Regulación de *GintSOD1* por metales pesados

El efecto de los metales pesados sobre la expresión de *GintSOD1* se analizó, mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real usando los cebadores específicos de SOD1 y SOD2, en ARN extraído de micelio externo de *G. intraradices* expuesto durante diferentes tiempos a Cu, Cd o Zn, o bien desarrollado en medios suplementados con diferentes concentraciones de estos metales pesados.

Como se muestra en la Fig. 33 A, la exposición del micelio a las dos concentraciones de Zn utilizadas en este estudio no alteró significativamente los niveles de expresión de *GintSOD1* en ninguno de los tiempos analizados. En el caso del Cu, la aplicación de una concentración de 50 mM no afectó los niveles de expresión de este gen en el intervalo estudiado (Fig 33 B). Por el contrario, el empleo de altas concentraciones de Cu causó un aumento en los niveles de expresión de *GintSOD1* en todos los tiempos medidos alcanzándose los mayores niveles de inducción a las 7 de aplicación del metal (Figura 33 B). La aplicación de Cd causó una inducción transitoria de *GintSOD1*, con un máximo de 14 veces a las 24 horas de exposición (Figura 33 C).

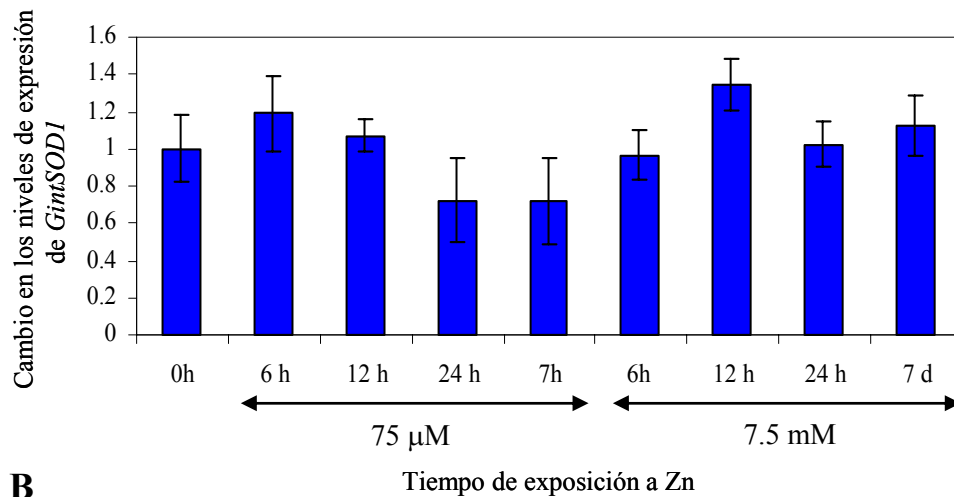
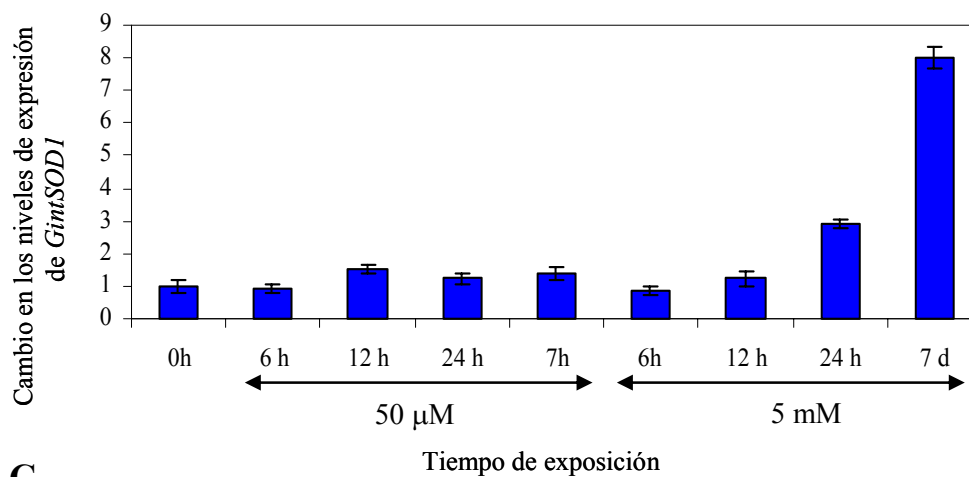
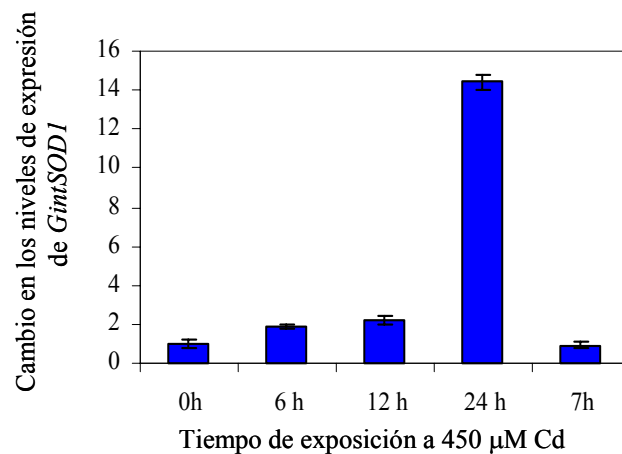
**A****B****C**

Figura 33. Expresión de *GintSOD1* en el micelio extraradical de *G. intraradices* tras una exposición a a 75 ó 7500 µM Zn (A), 50 ó 5000 µM Cu (B), o 450 µM Cd durante a 0, 12, 24 horas y 7 días (C). La expresión se estudió por RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores específicos para el ARNr 18S y *GintSOD1*. Los niveles relativos de transcripción se calcularon usando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Los datos representan las medias de tres repeticiones de un experimento representativo y las barras de error la desviación estándar.

Cuando el micelio se cultivó en presencia de los metales pesados, tan sólo en el micelio recuperado de las placas suplementadas con Cu se observó una inducción (hasta 5 veces) de la expresión de *GintSOD1*, no detectándose cambios significativos en el micelio desarrollado en presencia de Zn y Cd (Figura 34).

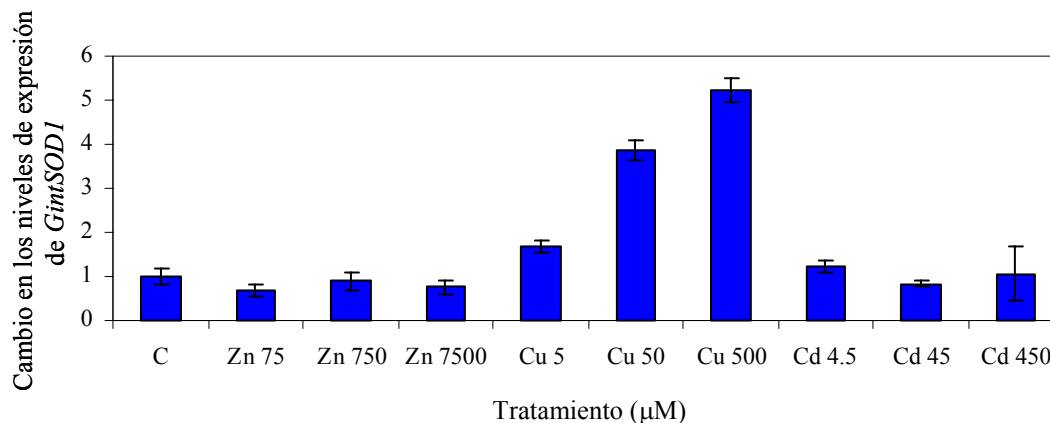


Figura 34. Análisis de la expresión de *GintSOD1* en el micelio extraradical de *G. intraradices* en medio M-C (C) o suplementado con las concentraciones de Cu, Zn y Cd indicadas. La expresión se estudió por RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores específicos para el ARNr 18S y *GintSOD1*. Los niveles relativos de transcripción se calcularon usando el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Los datos representan las medias de tres repeticiones de un experimento representativo y las barras de error la desviación estándar.

### 3.5.3. Regulación de *GintSOD1* por estrés oxidativo

Con el objeto de determinar la validez de *GintSOD1* como indicador de estrés oxidativo en el interior del micelio, se determinó como afectaba un agente oxidante como el paraquat los niveles de expresión de este gen. En la Figura 35 se observa que este agente induce la transcripción de *GintSOD1* de modo proporcional al tiempo de exposición.

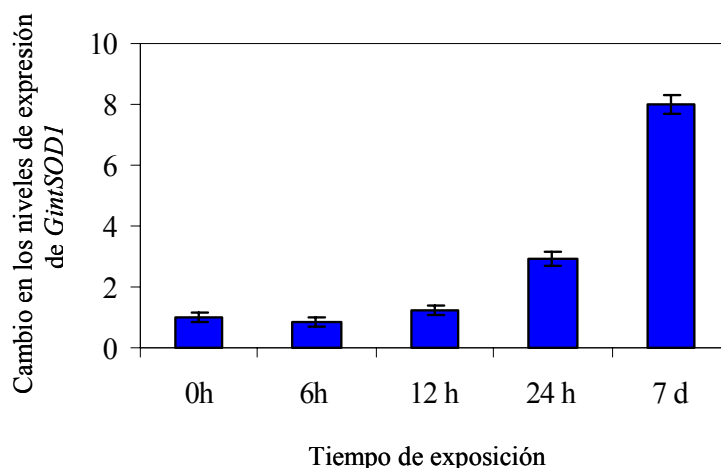


Figura 34. Análisis a lo largo del tiempo de la expresión de *GintSOD1* en el micelio extraradical de *G. intraradices* crecido en medio M-C después de un pulso de 500  $\mu\text{M}$  paraquat. La expresión se estudió por RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores específicos para el ARNr 18S y *GintSOD1*. Los niveles relativos de transcripción se calcularon usando el método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . Los datos representan las medias de tres repeticiones de un experimento representativo y las barras de error la desviación estándar.

#### 4. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA TOLERANCIA A METALES PESADOS EN *GLOMUS* sp. RIOTINTO

En las secciones anteriores se ha presentado cómo la exposición de *G. intraradices* a diferentes metales pesados regula la expresión de genes implicados en el mantenimiento de su homeostasis. Con el fin de tratar de definir mecanismos de tolerancia a metales pesados en los hongos micorrícicos, se comparó la expresión de los genes descritos en las secciones anteriores en dos especies de *Glomus*: *G. intraradices*, procedente de suelos no contaminados y *Glomus* sp Riotinto procedente de Minas de Riotinto (Huelva), una zona minera rica en Fe y Cu, que ha sido explotada desde los Tartessos.

En la Figura 35 se comparan los niveles de expresión de *GintMT1*, *GintSOD1*, *GintZnT1* y *GintABC1* en el micelio extraradical de ambos hongos cultivados en medio M-C. Como se puede observar, *GintSOD1* y *GintABC1*, inducibles por Cu en *G. intraradices*, se transcriben a niveles mucho mayores en el aislado de Riotinto. Por el contrario, *GintMT1*, cuya transcripción se inhibe tras una larga exposición de *G. intraradices* a Cu, presenta niveles menores de expresión en el aislado de Riotinto. *GintZnT1*, implicado en la homeostasis de zinc, se transcribe a niveles similares en los dos hongos.

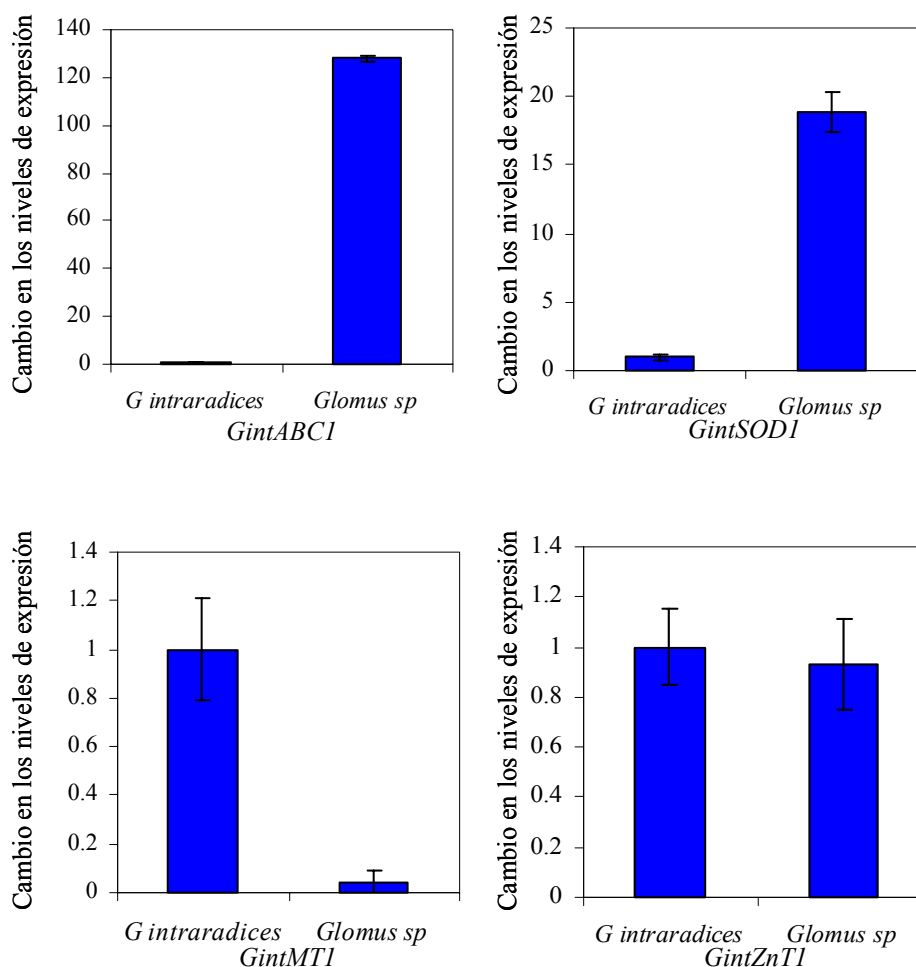


Figura 35. Comparación de los niveles de expresión de *GintABC1*, *GintSOD1*, *GintMT1* y *GintZnT1* en *G. intraradices* y *Glomus sp* Riotinto. La expresión se estudió por RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores específicos para el ARNr 18S y los genes analizados. Los niveles relativos de transcripción se calcularon usando el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Los datos representan las medias de tres repeticiones de un experimento representativo y las barras de error la desviación estándar.

Pese a esta diferencia en los niveles basales de expresión, la regulación de estos genes cuando el micelio de *Glomus sp* se cultiva en un medio suplementado con Zn, Cu o Cd sigue el mismo patrón que en *G. intraradices*. De este modo, como se observa en la Figura 36 A y B, los niveles de expresión de *GintABC1* y *GintSOD1* no se ven afectados por la presencia prolongada de cadmio o de zinc en el medio de cultivo, pero se induce cuando el hongo se cultiva en presencia de niveles elevados de cobre. Por el contrario, la expresión de *GintMT1* se inhibe en presencia de Zn, Cu y Cd (Figura 36 C). La regulación de la expresión de *GintZnT1* sigue un patrón similar al descrito para *G. intraradices*: se activa en medios suplementados con 75  $\mu$ M Zn, se inhibe a concentraciones superiores y no se afecta por los tratamientos con Cd. (Figura 36 D).

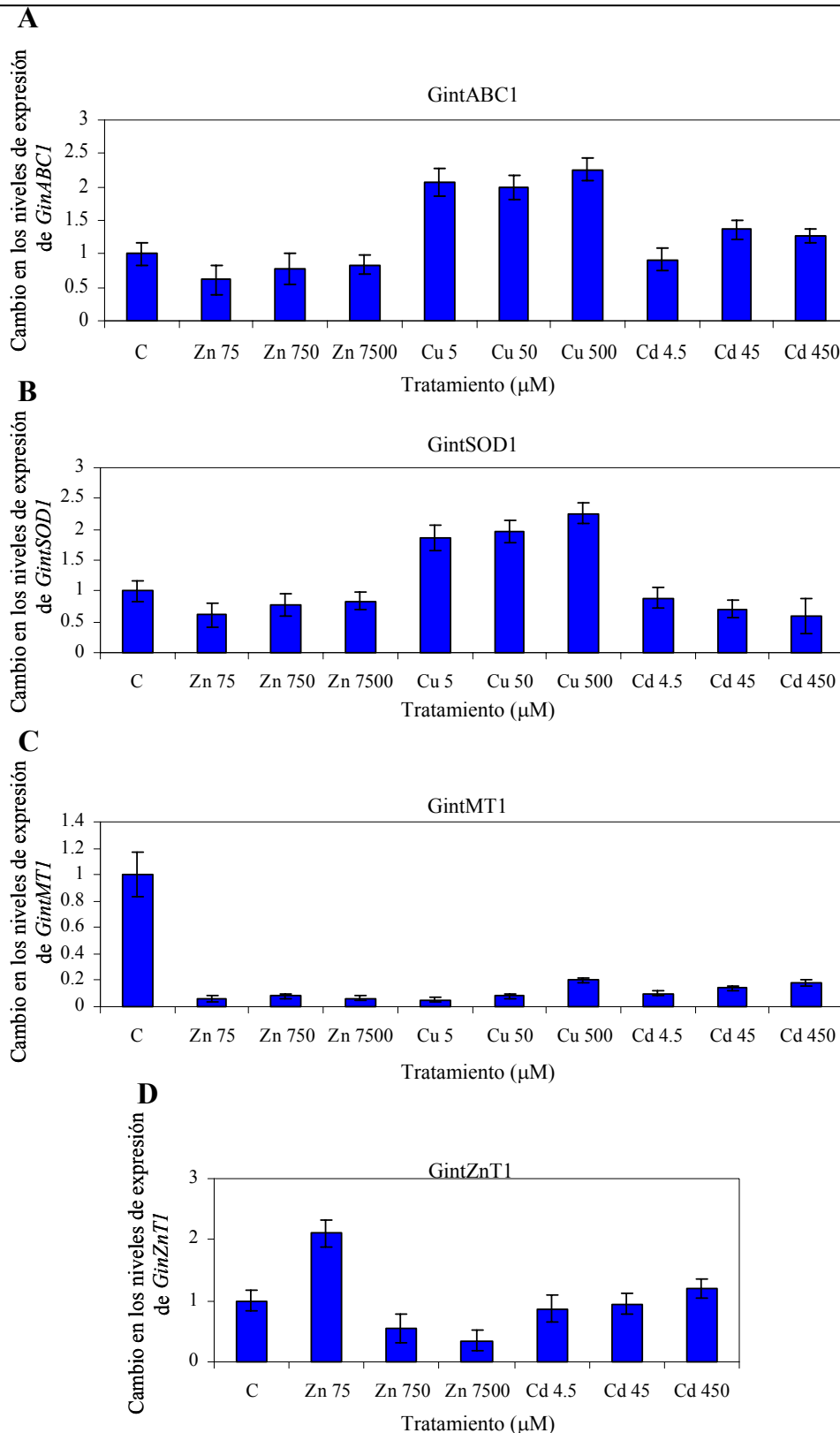


Figura 34. Análisis de la expresión de *GintABC1* (A), *GintSOD1*(B), *GintMT1* (C) y *GintZnT1* (D) en el micelio extraradical de *G. intraradices* en medio M-C (C) o suplementado con las concentraciones de Cu, Zn y Cd indicadas. La expresión se estudió por RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores específicos para el ARNr 18S y estos genes. Los niveles relativos de transcripción se calcularon usando el método  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ . Los datos representan las medias de tres repeticiones de un experimento representativo y las barras de error la desviación estándar.





## **DISCUSIÓN**



El trabajo expuesto en la presente Memoria de Tesis Doctoral ha pretendido estudiar el efecto de los metales pesados en el micelio extraradical de *G. intraradices* a distintos niveles: morfológico, ultraestructural y molecular.

A nivel morfológico se ha comprobado que los metales empleados, Cu, Cd y Zn, inducen respuestas morfogenéticas distintas en el micelio extraradical de *G. intraradices*. Sorprendentemente, el Cd, un ion no fisiológico, es el mejor tolerado por las hifas extraradicales, cuya morfología permanece casi inalterada incluso a las concentraciones más altas empleadas. Por el contrario, la presencia en el medio de concentraciones medias y altas de Zn y, especialmente, de Cu induce cambios severos en su desarrollo morfogenético y una alteración de la arquitectura de la colonia fúngica.

*G. intraradices*, como cualquier otro organismo, debe mantener los niveles citoplasmáticos de iones dentro de unos niveles tolerables. Mientras que estos niveles se mantengan, el patrón de crecimiento fúngico permanecerá inalterado y el ciclo de desarrollo del hongo (consistente de una fase absorptiva-asimilativa seguida de una fase esporulativa-reproductiva) se completará. Este parece ser el caso de todos los tratamientos de Cd y también para el bajo de Zn (75  $\mu$ M). La tolerancia del hongo a las concentraciones de Cd usadas en nuestros experimentos, sugiere que existe un mecanismo de barrera/detoxificación muy efectivo para este ion. Este mecanismo permitiría que *G. intraradices* mantenga controlados los niveles de Cd y, por tanto, que mantenga su patrón morfogenético normal. Por el contrario, las dos concentraciones de Zn más altas y todas las de Cu inducen cambios dramáticos en la morfogénesis del hongo, incluyendo una pérdida de la dominancia apical, protrusiones citoplasmáticas, enrollamientos y una supresión parcial de la esporulación. Efectos similares a éstos se han señalado para el micelio extraradical de *G. intraradices* cultivado en distintas situaciones de estrés, como pH bajos y medios ricos en amonio (Coughlan ; Bago *et al.* 2004). En todos estos tipos de estreses se observó la formación de ovillos "coils" que podrían formar parte de una estrategia fúngica para "excluir" el agente productor del estrés, creando una especie de refugio libre de agente estresante.

De cualquier modo, las alteraciones morfogenéticas que presenta el micelio extraradical de *G. intraradices* en las concentraciones media y alta de Zn y en todas las de Cu señalan la incapacidad de este hongo micorrizico para mantener la homeostasis citoplasmática de estos iones cuando se encuentran en exceso. Quizás el hecho de que Zn y Cu sean reconocidos como micronutrientes por el hongo,

explicaría, al menos parcialmente, por qué no son excluidos/detoxificados con tanta eficiencia como el Cd.

Otro efecto morfogénico observado en todos los tratamientos estudiados consiste en el descenso de la relación esporas/hifas (excepto 4.5  $\mu$ M Cd) Este efecto se traduce en una extensión de la fase explorativa en detrimento de la fase reproductiva, como respuesta a la presencia de metales en el medio que rodea a las hifas. De este modo, la colonia fúngica sería capaz de buscar ambientes más favorables para colonizar y formar las estructuras reproductivas/de resistencia: las esporas. No obstante, el descenso de la relación esporas/hifas podría ser también el resultado de que el metal se acumule en estas estructuras e impida su formación, lo que explicaría la presencia de esporas vacías en el tratamiento de 7.5 mM Zn. Esta toxicidad explicaría también el menor desarrollo del micelio.

Con los estudios de localización de metales pesados realizados mediante análisis de EDXS, hemos podido comprobar que tras cierto tiempo de exposición a concentraciones elevadas de metales pesados, el metal empieza a acumularse en el citoplasma, donde será potencialmente tóxico. En general, la primera respuesta a un incremento en la concentración de metal pesado en el medio de cultivo, es una acumulación en la pared de la espora y en los gránulos electrodensos (tanto en esporas como en hifas), manteniéndose los niveles citoplásmicos bajos. El hecho de que la pared de la espora presente una elevada afinidad por los metales pesados no es sorprendente, ya que en otros organismos, se ha descrito que es la base de los mecanismos de exclusión (Bardi *et al.* 1999). Los niveles citoplasmáticos de metales pesados después de la adición del metal se mantienen bajos para no interferir con las reacciones metabólicas que ocurren en el citoplasma. Por lo tanto, han de ser secuestrados en compartimentos donde causen menos daño, como ocurre en otros organismos (Clemens *et al.* 2002; MacDiarmid *et al.* 2003). Nuestros datos sugieren que el más importante de estos compartimentos en *G. intraradices* son los gránulos electrodensos, donde se detecta la mayor concentración del metal. Otros autores han señalado la asociación entre los metales pesados con estructuras densas a los electrones (Rauser & Ackerley 1987; Turnau *et al.* 1993; Turnau *et al.* 1993; Turnau *et al.* 1994). Estos gránulos, asimismo, tienen un alto contenido en fosfatos, un anion con alta afinidad por metales (Wood & Clark 1988), que explicaría la acumulación de Zn, Cu y Cd. La consideración de que en los hongos micorrícicos se ha comprobado la existencia de gránulos de polifosfato en las vacuolas fúngicas (White & Brown 1979), sugiere que los gránulos electrodensos detectados en este estudio estarían localizados en las a vacuolas y

que por tanto, en éstas se acumularía el exceso de los metales mediante la actuación de transportadores de metales pesados. La incorporación mayor de Cu en los gránulos electrodensos de la espora, sería el resultado de la acción de un transportador de Cu expresado diferencialmente en la en ambas estructuras o, más probablemente, a que los gránulos electrodensos ricos en Cu formados en las hifas, como consecuencia de su naturaleza cenocítica, serían transportados hacia las esporas, donde serían acumulados.

El cambio en los niveles de Zn y Cu en las paredes de las hifas entre las 8 horas y los 7 días podría resultar de fenómenos diferentes, pero no incompatibles: i) una baja afinidad de la pared de las hifas por los metales pesados por lo que requerirían más tiempo para acumular cantidades detectables de metal, ii) algún hipotético transportador que extruya metal al exterior de la hifa, quedando éste atrapado en las paredes de las hifas, o iii) un cambio en la composición de la pared debido a la exposición del metal, como ha sido observado por Lanfranco *et al.* (2002) en hongos formadores de micorrizas ericoides.

El Cd no se incorpora significativamente al micelio entre las 8 horas y los 7 días después de la adición del metal, lo que explicaría, en cierta medida, el que este metal no afecte la morfogénesis de *G. intraradices*. En este sentido, Joner *et al.* (2000) también observaron que el Cd no se acumulaba en un aislado de *G. mosseae* tolerante a metales pesados.

Comparando la evolución de la acumulación de metales pesados en el tiempo, la observación de los niveles de Cu incrementan conforme aumenta el tiempo de exposición mientras que los de Zn y Cd no varían a lo largo del tiempo sugiere los niveles de Zn y Cd en el interior de hongo se controlan mejor que los de Cu.

La comparación de la acumulación de los metales en las dos estructuras fúngicas analizadas, esporas e hifas, indican que, en general, las esporas secuestran preferencialmente el exceso de metal manteniendo, de este modo, las hifas libres de agentes que pudieran hacer peligrar la existencia de la colonia fúngica. Estos resultados están apoyados por las observaciones de Weiersbye *et al.* (1999) de que en la que en hongos aislados de escombreras de minas se detectó una acumulación preferencial de los metales en vesículas y esporas. De este modo, al conjugar los datos de morfogénesis y de EDXS, podemos concluir que: i) el Cd no afecta la morfogénesis porque se incorpora a unos niveles muy bajos en el micelio del hongo, ii) la disminución de la esporulación por concentraciones altas de

Zn se debe probablemente la acumulación de este ión en el citoplasma de la espora, y iii) el Cu es el elemento más tóxico para el hongo porque se acumula en el citoplasma de hifas y esporas, impidiendo el desarrollo de ambas estructuras.

Mediante EDXS hemos podido comprobar asimismo que una vez que el metal ha sido absorbido por el hongo es acumulado en orgánulos, probablemente, las vacuolas fúngicas, necesariamente mediante la acción de transportadores específicos. De éstos, en la presente Tesis Doctoral hemos descrito dos candidatos: *GintZnT1*, que estaría implicado en el transporte del Zn y *GintABC1* implicado en el transporte del Cu y Cd. La detección de los metales en el citoplasma indica que el metal que no es retirado a la debe ser estabilizado en el citosol, al fin de minimizar su efecto tóxico, mediante la actuación de otras proteínas, tales como las codificadas por *GintMT1* y *GintSOD1* identificados en la presente Memoria..

*GintZnT1* codifica una proteína de membrana que hemos asignado a la familia CDF de transportadores de Zn basándonos en el análisis de su secuencia y rasgos estructurales generales: 6 dominios transmembrana y dos bucles citosólicos, uno con el dominio HX y otro con el motivo H-D/E-X-H-X-W-X-L-T-X<sub>8</sub>-H.. Estas similitudes estructurales, junto con el alto grado de similitud de la secuencia de *GintZnT1* a la de otros miembros de la familia CDF, sugieren un papel de esta proteína en la homeostasis de Zn.

La función de *GintZnT1* se estudió en dos sistemas heterólogos: *S. cerevisiae* y *S. pombe*. A pesar del alto grado de similaridad de *GintZnT1* a *Zrc1*, *Cot1* y *Zhf*, la expresión de *GintZnT1* en cepas de levadura mutantes en estos transportadores no fue capaz de restaurar el fenotipo silvestre de ninguna de ellas. El que *GintZnT1* no complemente la función de las levaduras mutantes usadas en este Trabajo de Tesis Doctoral podría deberse a: (i) Discrepancia entre la masa molecular predicha de *GintZnT1* y su migración aparente en geles SDS-PAGE. Sin embargo, este es un fenómeno muy común en proteínas de membrana. . Por ejemplo, la masa molecular predicha del transportador de glucosa GLUT1 es de unos 55 kDa, pero la migración aparente en geles desnaturalizantes es de 35 kDa (McMahon & Frost 1995) (ii) *GintZnT1* no se detecta en la membrana de la vacuola de la levadura. De estas dos posibilidades la segunda es la más probable, ya que las levaduras usadas en este estudio carecen de los transportadores de Zn vacuolares. Por otra parte, los experimentos realizados con un plásmido reportero de respuesta a Zn, indicador muy sensible de alteraciones de la homeostasis de Zn en levadura, indican que *GintZnT1* disminuye los niveles citosólicos de Zn y que, por tanto, altera la homeostasis de Zn , lo que permite concluir que *GintZnT1* es

un transportador de Zn que retira este metal del citosol. Esta conclusión junto con la consideración de que *GintZnT1* no se expresa en la vacuola indica que el hecho de que esta proteína no sea capaz de restaurar la tolerancia de las cepas de levadura mutantes usadas en este estudio se debe bien a que el Zn se está acumulando en un compartimiento que no es capaz de tolerar concentraciones altas de Zn (como el retículo endoplásmico o aparato de Golgi), o a que no es capaz de retirar una cantidad suficiente de Zn como para restaurar la tolerancia de los mutantes.

La regulación de *GintZnT1* por Zn da luz sobre su papel en el micelio extraradical de *G. intraradices*. Hemos mostrado que los niveles de expresión más altos de este transportador alcanzan sus máximos 6 y 12 h después de la adición de concentraciones moderadas y altas de Zn respectivamente. Dado que este metal es abundante en el medio de cultivo (9  $\mu\text{M}$  aproximadamente), es probable que este medio tenga suficiente Zn. Por tanto, la inducción de *GintZnT1* por la adición de 75  $\mu\text{M}$  de Zn es probablemente una respuesta a la toxicidad de este ion. Estas observaciones son consistentes con el papel de *GintZnT1* como un sistema de retirada de Zn, cuya expresión estará regulada por la disponibilidad de Zn. El papel de *GintZnT1* en la detoxificación de Zn está apoyado por la ligera inducción observada en los experimentos a largo tiempo, concretamente en el micelio desarrollado en placas suplementadas con 75  $\mu\text{M}$  de Zn. La inhibición de *GintZnT1* cuando *G. intraradices* se desarrolla en presencia de concentraciones mayores de Zn, así como desde las 12 h en el pulso de 7.5 mM Zn, podrían estar causados por una alteración de la transcripción de este gen como consecuencia de la acumulación de este metal cuando el hongo se expone a concentraciones de Zn no fisiológicas.

El patrón de expresión de *GintZnT1* observado en los pulsos de 75  $\mu\text{M}$  de Zn, presentando un máximo de inducción 12 h después de la exposición a Zn, pero manteniendo un ligero grado de inducción en medidas posteriores, sugiere la existencia de mecanismos adicionales de control de la concentración de Zn actuando simultáneamente. Estos mecanismos comprenderían la inhibición de los sistemas de incorporación de Zn a la célula, ya sea mediante la retirada de transportadores ZIP de la membrana o la inhibición de su transcripción. Esto se ha probado en otros organismos, como *S. cerevisiae* donde la acumulación de Zn en el citoplasma, se logra mediante la regulación transcripcional y/o post-transcripcional de varios genes que codifican transportadores de Zn (Eide 2004). Por ejemplo, cuando a levaduras deficientes en Zn, con altos niveles de *Zrt1*, se le suministra



este ion, se inactiva este transportador mediante endocitosis y degradación vacuolar (Gitan *et al.* 1998).

La hipótesis de que la expresión de *GintZnT1* esté regulada por la disponibilidad de Zn está avalada por el hecho de que otros transportadores de Zn, como *Znt1*, se inducen en presencia de un exceso de Zn, activación mediada por el factor de transcripción MTF-1 (Langmade *et al.* 2000). El patrón de regulación de *GintZnT1* por Zn, similar a la respuesta mediada por MTF1, nos lleva a proponer la existencia de elementos de regulación similares en *G. intraradices*. Sin embargo, no se han detectado secuencias reconocidas por MTF en su promotor mediante análisis informático. No obstante, las secuencias de reconocimiento por HSFs (*Heat Shock Factor*, Factor de Choque Térmico) detectadas podrían causar la inducción de *GintZnT1*. Estos factores de transcripción se inducen ante distintas clases de estreses, térmicos y no térmicos (Silar *et al.* 1991; Tamai *et al.* 1994; Liu & Thiele 1996). Asimismo, las secuencias de unión de Rml1, factor inducido por daños y estreses en la pared celular (Jung *et al.* 2002), podrían inducir la transcripción de *GintZnT1*. En este sentido, se ha demostrado que Rml1 está regulado en levaduras por Yap1 (Dumond *et al.* 2000), que a su vez es capaz de inducir HSFs y genes involucrados en la detoxificación de metales pesados (Dumond *et al.* 2000). Sin embargo, dado que este promotor no es funcional en levadura, no podemos ir más allá de la mera especulación acerca de la estructura del promotor de *GintZnT1*.

Los datos de expresión, con un máximo a las pocas horas de exposición a Zn, coinciden con el patrón de acumulación de Zn detectado por EDXS, dado que la máxima acumulación de este metal en los gránulos electrodensos/vacuolas se produce en el periodo anterior a las 8 horas, próximo al periodo de máxima inducción de este gen.

Aunque otros transportadores de Zn son capaces de transportar Cd, la observación de que la expresión de *GintZnT1* no se regula por Cd sugiere que no es capaz de transportar este metal. Sin embargo, *GintABC1* podría realizar esta función, así como la de transportar Cu, como se discute a continuación

La secuencia de *GintABC1* sugiere que esta proteína formaría parte de un sistema de transporte ABC, cuya función parece estar relacionada con la retirada de Cu y Cd del citoplasma asociados a glutatión. Esto queda puesto de manifiesto por la inducción de *GintABC1* por Cu y Cd, así como por paraquat. La inducción por este último refleja que el agente responsable del aumento de la transcripción de *GintABC1* es una bajada en los niveles de glutatión reducido y no la acción directa

de Cu o de Cd. La medida de los niveles de expresión de *GintABC1* en presencia de Cd en el medio desde el inicio de la colonización, pone de nuevo de manifiesto que este metal es detoxificado muy eficientemente, ya que los niveles de este gen vuelven a los del tratamiento control. Sin embargo, en presencia de Cu, los niveles de *GintABC1* permanecen altos, lo que explica la continua acumulación de este metal en los gránulos electrodensos/vacuolas observados en el análisis con EDXS.

Los estudios de localización de los metales pesados indicaban que éstos además de acumularse en las vacuolas se acumulan en el citoplasma. Puesto que el hongo es capaz de desarrollarse en estas condiciones es probable que la toxicidad de los metales en el citoplasma se minimice mediante la acción de ciertas proteínas, tales como superóxido dismutasas o metalotioneínas, que permitan su estabilización/secuestro. *GintMT1* es la primera metalotioneína aislada en la familia de las Glomeraceae, tercera en los Glomeromycota. El análisis *in silico* de *GintMT1* sugiere que codifica una metalotioneína, lo que se confirmó mediante la caracterización funcional de la proteína codificada por este gen en un sistema heterólogo. La protección frente a la toxicidad por Cu y Cd de levaduras  $\Delta\chi up1$  transformadas con el gen *GintMT1*, sugiere la capacidad de *GintMT1* de unir Cu y Cd; sin embargo, tal capacidad de unión no pudo ser comprobada para otros metales (Zn, Co, Hg), ya que la metalotioneína de levadura no provee protección contra la toxicidad de estos metales (Ecker *et al.* 1986). Sin embargo, la posibilidad de que *GintMT1* sea capaz de unir otros metales en *G. intraradices* no se puede descartar.

Las metalotioneínas descritas hasta la fecha en hongos micorrícicos presentan unos motivos aminoacídicos específicos que los distinguen de otras metalotioneínas fúngicas. Dado que la disposición de los restos de cisteína está muy conservada en las tres metalotioneínas identificadas hasta ahora en hongos pertenecientes a la Glomeromicota, en este estudio proponemos la creación de una nueva familia de metalotioneínas, de acuerdo con el sistema de clasificación de Kojima (Kojima *et al.* 1999) que proporciona información acerca de la estructura primaria de la metalotioneína y sus relaciones filogenéticas. Esta nueva familia, Familia 16: Metalotioneínas de los Glomeromicotas, se caracteriza por el motivo conservado en N-terminal C-X-C-X<sub>3</sub>-C-X-C-X<sub>2-3</sub>-C-X-C y el patrón C-X<sub>4</sub>-C-X-C-X<sub>2-3</sub>-C-X-C-X<sub>4</sub>-C-X-C en C-terminal. La validación de esta adición a la clasificación actual de las metalotioneínas deberá esperar hasta que nuevas metalotioneínas se identifiquen en este phylum. Similarmente, la clonación de nuevas secuencias de hongos

micorrícicos apoyará la división en dos subfamilias de la familia 16 de las metalotioneínas, una para Gigasporaceae y otra para Glomeraceae.

Los estudios de expresión de *GintMT1* en el micelio extraradical de *G. intraradices* expuestos a distintas concentraciones de metales pesados y a paraquat proporcionan más evidencias sobre la función de esta metalotioneína. Según estos resultados, *GintMT1* presenta un patrón de regulación complejo que parece responder al menos a dos estímulos deletéreos: metales pesados y estrés oxidativo.

El papel más aceptado para las metalotioneínas es la detoxificación celular de especies inorgánicas, secuestrando iones metálicos presentes en elevadas concentraciones. No obstante, la expresión de *GintMT1* en el micelio extraradical disminuye notablemente cuando éste se cultiva en presencia de Cu, Cd o Zn o cuando se exponía a estos metales por periodos cortos de tiempo (con la excepción de 5 mM de Cu usado en los pulsos). La inhibición de la expresión de *GintMT1* por distintos metales ya ha sido descrito en diferentes plantas (Kawashima *et al.* 1991; Chang *et al.* 2004) y animales (Cui *et al.* 1998; Suhy *et al.* 1999; Egli *et al.* 2003; Costello *et al.* 2004), lo que sugiere que las metalotioneínas puedan tener otras funciones, tales como metalochaperonas o protección frente a estrés oxidativo (Egli *et al.* 2003; Mir *et al.* 2004; Costello *et al.* 2004).

Esta última función parece ser, al menos, uno de los papeles de *GintMT1*, como queda reflejado por la inducción de este gen por paraquat, un generador de superóxidos intracelulares, y por la adición de 5 mM Cu, un metal que también posee la habilidad de producir ROS a partir de reacciones Haber-Weiss (Halliwell & Gutteridge 1989). Estos datos indican que *GintMT1* puede estar influida por el estado redox del hongo, que podría ser un efecto secundario de la exposición a metales pesados. La inhibición de los transcritos de *GintMT1* en el micelio desarrollado en placas suplementadas con Cu sugiere que la protección conferida por *GintMT1* contra el estrés oxidativo es sólo transitoria.

La inhibición por metales pesados de *GintMT1* refleja que este gen está involucrado de algún modo en la homeostasis de metales pesados en *G. intraradices*, aunque no en la protección directa frente a la excesiva acumulación de estos iones en el citoplasma. En base a que *GintMT1* no es necesaria en condiciones en las que estos iones se encuentran en abundancia (salvo en el caso de los primeros momentos de exposición a 5 mM de Cu), cabe proponer que *GintMT1*

actúe como un reservorio de metales pesados o incluso como una metalochaperona.

El estudio del promotor de *GintMT1* no aclara la situación. Mediante análisis bioinformático hemos detectado la presencia de motivos de reconocimiento por HSF, que como ya hemos indicado, está involucrado en la respuesta a estreses. Además se ha detectado un dominio de unión de represores catabólicos, lo que podría apoyar su papel en aspectos nutricionales. Sin embargo, estos motivos no han podido ser verificados experimentalmente.

A tenor de los datos obtenidos, *GintMT1* no es la responsable de la estabilización de los metales pesados acumulados en el citoplasma, como se observa en los datos de EDXS, aunque sí participaría de algún modo en la protección frente al estrés oxidativo que estos metales crearían, especialmente en los primeros momentos de exposición. La estabilización de los metales pesados acumulados en el citoplasma la podrían realizar otras metalotioneínas, ya que es previsible que en *G. intraradices*, al igual que en otros organismos, constituyan una familia multigénica (Liu *et al.* 2002; Jenny *et al.* 2004), o fitoquelatinas. Sin embargo, en esta Tesis Doctoral no se han podido encontrar evidencias de la existencia de estas moléculas en los hongos formadores de micorrizas.

En la protección frente a estreses oxidativos, tanto a largo como a corto tiempo, juega un papel importante el último gen caracterizado en este estudio, *GintSOD1*. En base a su secuencia y estructura, este gen codifica una Cu,Zn SOD, cuya función sería proteger al hongo frente a estreses oxidativos. De los tres metales estudiados, sólo Cu y Cd son capaces de alterar el estado redox, aunque de distinto modo. El Cd ejerce su efecto en los primeros momentos de exposición, durante menos de una semana. Sin embargo, el efecto del Cu sería acumulativo, quedando evidenciado cuando el micelio se ha desarrollado en presencia de este metal. Tan sólo cuando las concentraciones de Cu son altas, el estado redox se altera inmediatamente.

Así proponemos los siguientes modelos para el control de la homeostasis de Zn, Cu y Cd en el hongo formador de micorrizas arbusculares *G. intraradices*:

Cuando el micelio en su desarrollo se encuentra con niveles elevados de Zn, la primera barrera de protección sería la pared celular de la espora, donde el metal queda adsorbido. Sin embargo, una parte del metal disponible penetra en las hifas a través de transportadores específicos, que son retirados rápidamente del citoplasma e introducidos en las vacuolas mediante la acción de *GintZnT1*, entre

otros. La inducción de *GintZnT1* y el incremento de la capacidad de retención de Zn por las paredes de las hifas al aumentar el tiempo de exposición del hongo al metal, podrían estar mediados por factores de transcripción similares a Rml1, factor para el que parece existir un motivo de unión en el promotor de *GintZnT1*. El exceso de Zn que queda en el citosol debe unirse muy probablemente a moléculas que lo estabilicen, como metalotioneínas o fitoquelatinas aún por identificar, ya que la *GintMT1* no parece realizar esta función. Esta metalotioneína actuaría más bien como una metalochaperona, es decir, como reservorio de este metal, de manera que los niveles de esta metalotioneína bajarían en presencia de elevadas concentraciones de Zn.

El caso del Cu es más complejo, dado que también altera el equilibrio redox. Al igual que en el caso de Zn, primero sería retenido por la pared de la espora o acumulado en vacuolas. *GintABC1* sería uno de los transportadores que introducirían este exceso de metal en la vacuola, muy probablemente unido a glutation. Cuando el Cu se acumula en cierto grado, ya sea directamente, mediante reacciones tipo Fenton o por la reducción en los niveles de glutation reducido que causa la acción de *GintABC1*, causa estrés oxidativo. En los primeros momentos, este estrés sería combatido por la acción de *GintSOD1* y a determinadas concentraciones de Cu (mayores de 50  $\mu\text{M}$ ) por *GintMT1*. A más largo tiempo, varias semanas, *GintMT1* no parece realizar ningún efecto protector, como parece indicar la inhibición de su transcripción observada en estas condiciones, lo que tal vez reflejara la predominancia de un papel en la nutrición de este oligoelemento.

Finalmente el Cd, el único metal que no es un bioelemento de los estudiados, es, sorprendentemente, el mejor tolerado por *G. intraradices*. Esta tolerancia refleja que los mecanismos de protección frente a este metal son muy eficaces, actuando a varios niveles. Fundamentalmente son importantes los sistemas que controlan la absorción de este metal por el hongo, ya que la acumulación es muy baja independientemente de la concentración utilizada y del tiempo de exposición. El poco Cd incorporado debe de ser eliminado del citosol, función en la que interviene *GintABC1*, probablemente en forma de complejos de glutation. Además el estrés oxidativo causado por este metal sería paliado, en cierta medida, mediante la acción de *GintSOD1*.

Una vez definido que de los genes analizados en este estudio *GintZnT1*, *GintABC1*, y *GintMT1* están implicados en el mantenimiento de la homeostasis de metales pesados en *G. intraradices* y que *GintMT1* y *GintSOD1* estarían implicados en la protección del hongo frente al estrés oxidativo producido como consecuencia

de la exposición del hongo a los metales pesados, nos planteamos definir el papel de estos genes en los mecanismos de tolerancia. Para ello se compararon los niveles de expresión de los mismos en un hongo procedente de suelos con niveles normales de metales pesados, el ecotipo de *G. intraradices* DAOM 197198 utilizado en este estudio, y en otro, *Glomus* sp. Riotinto, procedente de suelos de Minas de Riotinto, zona minera rica en mineral de Fe y Cu. En base a los niveles de expresión de estos genes en micelio obtenido de hongos cultivados en medios no suplementados con metales pesados, podemos concluir que la adaptación al crecimiento en suelos con altos niveles de Fe y Cu, podría deberse en parte a las altas tasas de transcripción de los genes implicados en la detoxificación de Cu, *GintABC1*, y en la eliminación de radicales libres, *GintSOD1*. El papel de metalochaperona que se le había asignado anteriormente *GintMT1* se ve apoyado por la observación de que este gen se encuentra a niveles menores en *Glomus* sp Riotinto que en *G. intraradices*. Por último indicar, que los mecanismos de regulación de los genes identificados en esta Memoria de Tesis Doctoral son comunes en ecotipos sensibles y tolerantes a los metales pesados.



**CONCLUSIONES**





1. El desarrollo del hongo formador de micorrizas arbusculares *Glomus intraradices* se afecta por la presencia de Zn, Cd y Cu en el medio de cultivo. Estas alteraciones consisten en una reducción del grado de esporulación y, en el caso de exposición a concentraciones elevadas de Cu y Zn, en una alteración de la apicalidad de las hifas.
2. Las esporas son las estructuras fúngicas donde se acumulan preferencialmente los metales pesados.
3. Las principales estructuras subcelulares involucradas en la protección frente al exceso de los metales pesados son la pared celular y las vacuolas ricas en fosfato.
4. Se ha aislado y por primera vez un transportador de Zn de un hongo formador de micorrizas arbusculares. Éste está involucrado en la detoxificación de Zn en *G. intraradices*.
5. El transportador ABC *GintABC1*, el primero aislado entre los glomeromicetos, colabora en la protección del micelio fúngico frente al exceso de Cu y Cd.
6. La metalotioneína *GintMT1* no forma parte de los mecanismos de tolerancia frente al Zn, Cd y Cu, aunque sí estaría implicada en la respuesta de defensa del hongo al estrés oxidativo inducido por el Cu. Además, esta proteína podría actuar como una metalochaperona en condiciones de deficiencia de Cu y Zn.
7. La Cu, Zn superóxidos dismutasa *GintSOD1* cataliza la detoxificación del ion superóxido generado por la exposición del hongo al Cu y Cd..
8. La adaptación de *Glomus* sp (Riotinto) a suelos con altos niveles de Fe y Cu puede deberse, entre otros mecanismos, a una inducción de *GintABC1*, implicado en la detoxificación del Cu y *GintSOD1*, implicado en la eliminación de radicales libres.



## **BIBLIOGRAFÍA**

- Agranoff D, Collins L, Kehres D, Harrison T, Maguire M, Krishna S** (2005) The Nramp orthologue of *Cryptococcus neoformans* is a pH-dependent transporter of manganese, iron, cobalt and nickel. *Biochem J* 385: 225-32
- Albrecht C, Geurts R, Lapyrie F, Bisseling T** (1998) Endomycorrhizae and rhizobial Nod factors both require SYM8 to induce the expression of the early nodulin genes *PsENOD5* and *PsENOD12A*. *Plant J* 15: 605-614
- Alexander T, Meier R, Toth E, Weber HC** (1988) Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* L. with reference to *Zea mays* L. *New Phytol* 110: 363-370
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ** (1990) Basic local alignment search tool- *J Mol Biol* 215: 403-410
- Andrews GK** (2000) Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions *Biochem Pharmacol.* 59: 95-104
- Andrews GK, Geiser J** (1999) Expression of the mouse metallothionein-I and -II genes provides a reproductive advantage during maternal dietary zinc deficiency *J. Nutr.* 129: 1643-1648
- Aono T, Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR, Harrison MJ, Saito M** (2004) Expression of alkaline phosphatase genes in arbuscular mycorrhizas *New Phytol* 162: 525-534
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K** (2005) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons Inc.,
- Azcón-Aguilar C, Díaz-Rodríguez RM, Barea JM** (1986) Effect of free-living fungi on the germination of *G. mosseae* on soil extract. In V Gianinazzi-Pearson, S Gianinazzi, eds *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. INRA, Paris, pp 515-519
- Azcón R** (1987) Germination and hyphal growth of *Glomus mosseae in vitro*: effects of rhizosphere bacteria and cell-free culture media *Soil Biol. Biochem.* 19: 417-419
- Azcón-Aguilar C, Bago B, Barea JM** (1998) Saprophytic growth of arbuscular-mycorrhizal fungi. In A Varma, B Hock, eds *Mycorrhiza: Structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer, Heidelberg, pp 391-408
- Azcón-Aguilar C, Jaizme-Vega MC, Calvet C** (2002) The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens. In

Mycorrhizal technology in agriculture. Birkhäuser Verlag, Germany, pp 187-197

**Bago B** (2000) Putative sites for nutrient uptake in arbuscular mycorrhizal fungi  
*Plant and Soil* 226: 263-274

**Bago B, Azcón-Aguilar C** (1997) Changes in the rhizospheric pH induced by arbuscular mycorrhizal formation in onion *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 333-339

**Bago B, Azcón-Aguilar C, Piché Y** (1998a) Architecture and development dynamics of the external mycelium at the arbuscular mycorrhizal *Glomus intraradices* grown under monoxenic conditions.. *Mycologia* 90: 52-62

**Bago B, Azcón-Aguilar C, Goulet A, Piché Y** (1998b) Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi *New Phytol.* 139: 375-388

**Bago B, Cano C, Azcón-Aguilar C, Samson J, Coughlan AP, Piché Y** (2004) Differential morphogenesis of the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus grown monoxenically on spatially heterogeneous culture media. *Mycologia* 96: 452-462

**Bago B, Chamberland H, Goulet A, Vierheilig H, Lafontaine JG, Piché Y** (1996) Effect of nikkomycin Z, a chitin-synthase inhibitor, on hyphal growth and cell wall structure of two arbuscular-mycorrhizal fungi. *Protoplasma* 192: 80-92

**Bago B, Pfeffer P, Shachar-Hill Y** (2001) Could the urea cycle be translocating nitrogen in the arbuscular mycorrhizal symbiosis? *New Phytol* 149: 4-8

**Bago B, Pfeffer PE, Douds DD, Brouillette J, Bécard G, Shachar-Hill Y** (1999) Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiol.* 121: 263-271

**Bago B, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y** (2000) Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiol.* 124: 949-957

**Bago B, Pfeffer P, Abubaker J, Jun J, Allen J, Brouillette J, Douds D, Lammers P, Shachar-Hill Y** (2003) Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiol* 131: 1496-1507

**Bago B, Vierheilig H, Piché Y, Azcón-Aguilar C** (1996) Nitrate depletion and pH changes induced by the extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus

*Glomus intraradices* grown in monoxenic culture. *New Phytol.* 133: 273-280

**Bago B, Zipfel W, Williams RM, Chamberland H, Lafontaine JG, Webb WW, Piché Y** (1998) In vivo studies on the nuclear behavior of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* grown under axenic conditions. *Protoplasma* 203: 1-15

**Bago B, Zipfel W, Williams RM, Jun J, Arreola R, Lammers PJ, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y** (2002) Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol* 128: 108-124

**Balagi B, Fa AM, LaRue TA, Tepfer D, Piché Y** (1994) *Pisum sativum* mutants insensitive to nodulation are also insensitive to invasion in vitro by the mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* *Plant Sci.* 102: 195-203

**Bardi L, Perotto S, Bonfante P** (1999) Isolation and regeneration of protoplasts from two strains of the ericoid mycorrhizal fungus *Oidiodendron maius*. Sensitivity to chemicals and heavy metals. *Microbio. Res.* 154: 105-111

**Bauer BE, Wolfger H, Kuchler K** (1999) Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.* 1461: 217-236

**Baylis GTS** (1967) Experiments on the ecological significance of phycomycetous mycorrhizas. *New Phytol.* 66: 231-243

**Bécard G, Doner LW, Rolin DB, Douds DD, Pfeffer PE** (1991) Identification and quantification of trehalose in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi *in vivo* <sup>13</sup>C NMR and HPLC analyses. *New Phytol.* 118: 547-552

**Bécard G, Fortin JA** (1988) Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108: 211-218

**Bécard G, Pfeffer PE** (1993) Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. *Protoplasma* 174: 62-68

**Becard G, Piché Y** (1989) Fungal growth-stimulation by CO<sub>2</sub> and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2320-2325

**Beers J, Glerum DM, Tzagoloff A** (1997) Purification, Characterization, and Localization of Yeast Cox17p, a Mitochondrial Copper Shuttle. *J. Biol. Chem.* 272: 33191-33196

**Beilby JP** (1980) Fatty acids and sterol composition of ungerminated spores of the

vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Acaulospora laevis*. *Lipids* 15: 949-952

**Beilby JP, Kidby DK** (1982) The early synthesis of RNA, protein, and some associated metabolic events in germinating vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores of *Glomus caledonius*. *Can. J. Microbiol.* 28: 623-628

**Bellemare DR, Shaner L, Morano KA, Beaudoin J, Langlois R, Labbe S** (2002) Ctr6, a Vacuolar Membrane Copper Transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 277: 46676-46686.

**Berreck M, Hanselwandter K** (2001) Effect of the arbuscular mycorrhizal symbiosis upon uptake of cesium and other cations by plants. *Mycorrhiza* 10: 275-280

**Bi Y, Li X, Christie P** (2003) Influence of early stages of arbuscular mycorrhiza on uptake of zinc and phosphorus by red clover from a low-phosphorus soil amended with zinc and phosphorus. *Chemosphere* 50: 831-837

**Bianciotto V, Bandi C, Minerdi D, Sironi M, Tichy H, Bonfante P** (1996) An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3005-3010

**Bird AJ, McCall K, Kramer M, Blankman E, Winge DR, Eide DJ** (2003) Zinc fingers can act as Zn<sup>2+</sup> sensors to regulate transcriptional activation domain function. *EMBO J.* 22 :5137-5146

**Blaudez D, Kohler A, Martin F, Sanders D, Chalot M** (2003). Poplar Metal Tolerance Protein 1 Confers Zinc Tolerance and Is an Oligomeric Vacuolar Zinc Transporter with an Essential Leucine Zipper Motif. *Plant Cell* 15: 2911-2928.

**Bonfante-Fasolo P** (1984) Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In CL Powell, DJ Bagyaraj, eds *Mycorrhizae*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA, pp 5-33

**Bonfante-Fasolo P, Fontana A** (1985) VAM fungi in *Ginkgo biloba* roots - their association at the cellular level. *Symbiosis* 1: 53-67

**Bonfante-Fasolo P, Peretto R, Perotto S** (1992) Cell surface interaction in endomycorrhizal symbiosis. In JA Callow, JR Green, eds *Perspectives in plant cell recognition*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 239-255

**Bonfante P, Genre A, Faccio A, Martini I, Schauser L, Stougaard J, Webb J, Parniske M** (2000) The Lotus japonicus LjSym4 gene is required for the successful symbiotic infection of root epidermal cells. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 1109-20



- Bovet L, Feller U, Martinoia E** (2005) Possible involvement of plant ABC transporters in cadmium detoxification: a cDNA sub-microarray approach. *Environment International* 31: 263-267.
- Bowler C, van Montagu M, Inzé D** (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 83-116
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Breuninger M, Trujillo CG, Serrano E, Fischer R, Requena N** (2004) Different nitrogen sources modulate activity but not expression of glutamine synthetase in arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Genetics and Biology* 41: 542-552
- Bringezu K, Lichtenberger O, Lepold I, Neumann D** (1999) Heavy metal tolerance of *Silene vulgaris*. *J. Plant Physiol.* 154: 536-546
- Bruns I, Sutter K, Menge S, Neuman D, Krauss GJ** (2001) Cadmium lets increase the glutathione pool in bryophytes. *Journal Plant Physiology* 158: 79-89
- Bücking H, Beckmann S, Heyser W, Kottke I** (1998) Elemental contents in vacuolar granules of ectomycorrhizal fungi measured by EELS and EDXS. A comparison of different methods and preparation techniques. *Micron* 29: 53-61
- Buee M, Rossignol M, Jauneau A, Ranjeva R, Becard G** (2000) The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 693-8
- Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW** (1993) The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet* 5: 327-37
- Chabaud M, Venard C, Defaux-Petras A, Becard G, Barker DG** (2002) Targeted inoculation of *Medicago truncatula in vitro* root cultures reveals *MtENOD11* expression during early stages of infection by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 156: 265-273
- Chabot S, Bécard G, Piché Y** (1992) Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. *Mycologia* 84: 315-321
- Chang T, Liu X, Xu H, Meng K, Chen S, Zhu Z** (2004) A metallothionein-like gene *htMT2* strongly expressed in internodes and nodes of *Helianthus tuberosus* and effects of metal ion treatment on its expression. *Planta* 218: 449-455

**Changela A, Chen K, Xue Y, Holschen J, Outten CE, O'Halloran TV, Mondragon A** (2003) Molecular Basis of Metal-Ion Selectivity and Zeptomolar Sensitivity by CueR. *Science* 301: 1383-1387

**Chen BD, Liu Y, Shen H, Christie P** (2003a) Uptake of cadmium from an experimentally contaminated calcareous soil by arbuscular mycorrhizal maize (*Zea mays* L. ). *Mycorrhiza*

**Chen B, Li X, Tao H, Christie P, Wong M** (2003b) The role of arbuscular mycorrhiza in zinc uptake by red clover growing in a calcareous soil spiked with various quantities of zinc. *Chemosphere* 50: 839-846

**Cherian GM, Chan HM** (1993) Biological functions of metallothioneins-a review. In KT Suzuki, N Imura, M Kimura, eds *Metallothionein III*. Birkhauser, Basel, pp 87-109

**Clapp JP, Rodriguez A, Dodd JC** (2001) Inter- and intra-isolate rRNA large sub-unit variation in spores of *Glomus coronatum*. *New Phytol.* 149: 539-554

**Clemens S, Bloss T, Vess C, Neumann D, Nies DH, zur Nieden U** (2002) A transporter in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe* cells mediates zinc storage and differentially affects transition metal tolerance abstract. *Biol. Chem* 277: 18215-18221

**Clemens S, Kim EJ, Neumann D, Schroeder JI** (1999) Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J* 18: 3325-33

**Clemens S, Schroeder JI, Degenkolb T** (2001) *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. *Eur J Biochem* 268: 3640-3

**Cobbett CS** (2000) Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr Opin Plant Biol* 3: 211-6

**Conklin D, McMaster J, Culbertson M, Kung C** (1992) COT1, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 12: 3678-3688

**Cooke JC, Gemma JN, Koske RE** (1987) Observations of nuclei in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia* 79: 331-333

**Costello LC, Guan Z, Franklin RB, Feng P** (2004) Metallothionein can function as a chaperone for zinc uptake transport into prostate and liver mitochondria. *J Inorg Biochem* 98: 664-666

**Coughlan AP** pH and nutrient availability influence extraradical hyphal

morphogenesis and substrate amelioration of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in monoxenic culture [MSc Thesis] Université Laval. Québec, Canada

**Cress WA, Throneberry GO, Lindsey DL** (1979) Kinetics of phosphorus absorption by mycorrhizal and non-mycorrhizal tomato roots. *Plant Phys.* 64: 484-487

**Cui L, Takagi Y, Wasa M, Iiboshi Y, Inoue M, Khan J, Sando K, Nezu R, Okada A** (1998) Zinc Deficiency Enhances Interleukin-1 $\alpha$ -Induced Metallothionein-1 Expression in Rats. *J. Nutr.* 128: 1092-1098

**Cumming JR, Ning J** (2003) Arbuscular mycorrhizal fungi enhance aluminium resistance of broomsedge (*Andropogon virginicus* L.). *J. Exp. Bot.* 54: 1447-1459.

**Daft MJ, Nicolson TH** (1966) Effect of *Endogone* mycorrhiza on plant growth. *New Phytol.* 65: 343-350

**Dancis A, Haile D, Yuan D, Klausner R** (1994) The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). Biochemical characterization, regulation by copper, and physiologic role in copper uptake. *J. Biol. Chem.* 269: 25660-25667

**de la Providencia IE, de Souza FA, Fernández F, Delmas NS, Declerck S** (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hyphal healing mechanisms between different phylogenetic groups. *New Phytol.* 165: 261-271

**de Vos RCH, Vonk MJ, Vooijs R, Schat H** (1992) Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis due to oxidative stress in *Silene vulgaris*. *Plant Physiol.* 98: 853-858

**Dean M, Allikmets R** (1995) Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr Opin Genet Dev* 5: 779-85

**Declerck S, Strullu DG, Plenchette C** (1996) *In vitro* mass-production of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycol. Res.* 100: 1237-1242

**Decottignies A, Goffeau A** (1997) Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat Genet* 15: 137-45

**del Val C, Barea JM, Azcón-Aguilar C** (1999a) Assessing the tolerance to heavy metals of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from sewage sludge-contaminated soils. *Applied soil ecology* 11: 261-269

**del Val C, Barea JM, Azcón-Aguilar C** (1999b) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Appl Environ Microbiol* 65: 718-723

**Delhaize E, Kataoka T, Hebb DM, White RG, Ryan PR** (2003) Genes Encoding Proteins of the Cation Diffusion Facilitator Family That Confer Manganese Tolerance. *Plant Cell* 15: 1131-1142.

**Demchenko K, Winzer T, Stougaard J, Parniske M, Pawlowski K** (2004) Distinct roles of *Lotus japonicus* *SYMRK* and *SYM15* in root colonization and arbuscule formation. *New Phytol* 163: 381-392

**Diaz G, Azcón-Aguilar C, Honrubia M** (1996) Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metals (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. *Plant and Soil* 180: 241-249

**Drazkiewicz M, Skórnyńska-Polit E, Krupa Z** (2004) Copper-induced oxidative stress and antioxidante defence in *Arabidopsis thaliana*. *BioMetals* 17: 379-387

**Dumond H, Danielou N, Pinto M, Bolotin-Fukuhara M** (2000) A large-scale study of Yap1p-dependent genes in normal aerobic and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stress conditions: the role of Yap1p in cell proliferation control in yeast. *Molecular Microbiology* 36: 830-845.

**Dunne MJ, Fitter AH** (1989) The phosphorus budget og a field-grown strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Hapil) crop: evidence for a mycorrhizal contribution. *Ann. App. Biol.* 114: 185-193

**Ecker DJ, Butt TR, Sternberg EJ, Neeper MP, Debouck C, Gorman JA, Crooke ST** (1986) Yeast metallothionein function in metal ion detoxification. *J. Biol. Chem.* 261: 16895-16900

**Edwards R, Dixon DP, Walbot V** (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci* 5: 193-198

**Egli D, Selvaraj A, Yepiskoposyan H, Zhang B, Hafen E, Georgiev O, Schaffner W** (2003) Knockout of 'metal-responsive transcription factor' MTF-1 in *Drosophila* by homologous recombination reveals its central role in heavy metal homeostasis. *EMBO J.* 22: 100-108

**Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML** (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA 93: 5624-5628

**Eide D** (2004) The ABC of solute carriers. The SLC39 family of metal ion transporters. *Eur J Physiology* 447: 796-800

**Eitinger T, Degen O, Böhnke U, Müller M** (2000) Nic1p, a relative of bacterial transition metal permeases in *Schizosaccharomyces pombe*, provides nickel ion for urease biosynthesis. *J Biol Chem* 275: 18029-18033

**Ellis CD, Wang F, MacDiarmid CW, Clark S, Lyons T, Eide DJ** (2004) Zinc and the Msc2 zinc transporter protein are required for endoplasmic reticulum function. *J. Cell Biol.* 166: 325-335

**Entry JA, Watrud LS, Reeves M** (1999) Accumulation of <sup>137</sup>Cs and <sup>90</sup>Sr from contaminated soil by three grass species inoculated with mycorrhizal fungi. *Environ. Poll.* 104: 449-457

**Ezawa T, Cavagnaro TR, Smith SE, Smith FA, Ohtomo R** (2004) Rapid accumulation of polyphosphate in extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus as revealed by histochemistry and a polyphosphate kinase/luciferase system. *New Phytol.* 161: 387-392

**Falcón-Pérez JM, Mazón MJ, Molano J, Eraso P** (1999) Functional domain analysis of the yeast ABC transporter Ycf1p by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 274: 23584-23590

**Fitter AH, Graves JD, Watkins NK, Robinson D, Scrimgeour C** (1998) Carbon transfer between plants and its control in networks of arbuscular mycorrhiza. *Func Ecol* 12: 406-412

**Forbes JR, Gros P.** (2001) Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol* 9: 397-403

**Fowler BA, Hildebrand CE, Kojima Y, Webb M** (1987) Nomenclature of metallothionein. *Experientia Suppl* 52: 21

**Frey B, Schüepp H** (1993) Acquisition of nitrogen by external hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Zea mays* L. *New Phytol.* 124: 221-230

**Fu D, Beeler TJ, Dunn TM** (1995) Sequence, mapping and disruption of CCC2, a gene that cross-complements the Ca<sup>2+</sup>-sensitive phenotype of *csg1* mutants and encodes a P-type ATPase belonging to the Cu<sup>2+</sup>-ATPase subfamily. *Yeast* 11: 283-292

**Gaither LA, Eide D** (2001) Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *BioMetals* 14: 251-270

**Gaither LA, Eide DJ** (2000) Functional characterization of the human hZIP2 zinc transporter. *J. Biol. Chem.* 275: 5560-5564

**Gaither LA, Eide DJ** (2001) The human ZIP1 transporter mediates zinc uptake in human K56Z erythroleukemia cells. *J. Biol. Chem.* 276: 22258-22264

**Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML** (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci.* 121: 151-159

**García-Garrido JM, Ocampo JA** (2002) Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J. Exp. Bot.* 53: 1377-1386.

**García-Romera I, García-Garrido JM, Martínez-Molina E, Ocampo JA** (1990) Possible influence of hydrolytic enzymes on vesicular-arbuscular mycorrhizal infections of alfalfa. *Soil Biol. Biochem.* 22: 149-152

**García-Romera I, García-Garrido JM, Ocampo JA** (1991) Pectolytic enzymes in the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 78: 343-346

**Georgatsou E, Mavrogiannis LA, Fragiadakis GS, Alexandraki D** (1997) The Yeast Fre1p/Fre2p Cupric Reductases Facilitate Copper Uptake and Are Regulated by the Copper-modulated Mac1p Activator. *J. Biol. Chem.* 272: 13786-13792

**George E, Haussler K, Vetterlein G, Gorgus E, Marschner H** (1992) Water and nutrient translocation by hyphae of *Glomus mosseae*. *Can. J. Bot.* 70: 2130-2137

**Gerdemann JW** (1964) The effect of mycorrhizas on the growth of maize *Mycologia* 56: 342-349

**Gerdemann JW, Trappe JM** (1974) The Endogonaceae in the Pacific Northwest *Mycologia*, memoir no.5

**Gianinazzi-Pearson V, Branzanti B, Gianinazzi S** (1989) *In vitro* enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis* 7: 243-255

**Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S** (1978) Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza II. Soluble alkaline phosphatase specific to mycorrhizal infection in onion roots. *Physiol. Plant Pathol.* 12: 45-53

**Gianinazzi-Pearson V, Morandi D, Dexheimer J, Gianinazzi S** (1981) Ultrastructural and ultracytochemical features of a *Glomus tenuis* mycorrhiza. *New Phytol.* 88: 633-639

**Gianinazzi-Pearson V, Smith SE, Gianinazzi S, Smith FA** (1991) Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas. Is H<sup>+</sup>-ATPase a component of ATP-hydrolysing enzyme activities in plant-fungus interfaces? *New Phytol.* 117: 61-74

**Gianinazzi S** (1991) Vesicular-arbuscular (endo-)mycorrhiza: Cellular, biochemical and genetic aspects. *Agr. Eco. Environ.* 35: 2-3

**Giovannetti M, Avio L, Sbrana C, Citernesi AS** (1993) Factors affecting appressorium development in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd. ) Gerd. and Trappe. *New Phytol* 123: 115-122

**Giovannetti M, Fortuna P, Citernesi AS, Morini S, Nuti MP** (2001) The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytol* 151: 717-724

**Giovannetti M, Sbrana C, Avio L, Citernesi AS, Logi C** (1993) Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytol.* 125: 587-594

**Gitan RS, Eide DJ** (2000) Zinc-regulated ubiquitin conjugation signals endocytosis of the yeast ZRT1 zinc transporter. *Biochem J* 346: 329-336

**Gitan RS, Luo H, Rodgers J, Broderius M, Eide D** (1998) Zinc- induced inactivation of the yeast ZRT1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. *J. Biol. Chem.* 273: 28617-28624

**Gitan RS, Shababi M, Kramer M, Eide D** (2003) A cytosolic domain of the yeast Zrt1 zinc transporter is required for its post-translational inactivation in response to zinc and cadmium. *J Biol Chem* 278: 39558-39564

**Glerum DM, Shtanko A, Tzagoloff A** (1996) SCO1 and SCO2 Act as High Copy Suppressors of a Mitochondrial Copper Recruitment Defect in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271: 20531-20535

**Govoni G, Vidal S, Cellier M, Lepage P, Malo D, Gros P** (1995) Genomic Structure, Promoter Sequence, and Induction of Expression of the Mouse Nramp1 Gene in Macrophages. *Genomics* 27: 9-19

**Griffioen WAJ, Ietswaart JH, Ernst WHO** (1994) Mycorrhizal infection of an

*Agrostis capillaris* population on a copper contaminated soil. Plant and soil 158: 83-89

**Grill E** (1987) Phytochelatins, the heavy metal binding peptides of plants: characterization and sequence determination. Experientia Suppl 52: 317-22

**Grill E, Loffler S, Winnaker E, Zenk M** (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific  $\gamma$ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). Proc Natl Acad Sci USA 86: 6838-6842

**Guarente L** (1983) Yeast promoters and lacZ fusions designed to study the expression of cloned genes in yeast. Methods Enzymol 101: 181-191

**Guo Y, Smith K, Lee J, Thiele DJ, Petris MJ** (2004) Identification of methionine-rich clusters that regulate copper-stimulated endocytosis of the human Ctr1 copper transporter. J. Biol. Chem. 279: 17428-17433

**Ha SB, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS** (1999) Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Plant Cell 11: 1153-64

**Hahn JS, Hu Z, Thiele DJ, Iyer VR** (2004) Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor. Mol Cell Biol 24: 5249-56

**Hall JL, Williams LE** (2003) Transition metal transporters in plants abstract. J. Exp. Bot. 54: 2601-2613

**Hall LT, Sanchez RJ, Holloway SP, Zhu H, Stine JE, Lyons TJ, Demeler B, Schirf V, Hansen JC, Nersissian AM, Valentine JS, Hart PJ** (2000) X-ray crystallographic and analytical ultracentrifugation analyses of truncated and full-length yeast copper chaperones for SOD (LYS7): a dimer-dimer model of LYS7-SOD association and copper delivery. Biochemistry 39: 3611-23

**Halliwell B, Gutteridge JMC** (1989) Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford, U.K.

**Hamza I, Schaefer M, Klomp LWJ, Gitlin JD** (1999) Interaction of the copper chaperone HAH1 with the Wilson disease protein is essential for copper homeostasis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 13363-13368.

**Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580



- Harrier LA, Wright F, Hooker JE** (1998) Isolation of the 3-phosphoglycerate kinase gene of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerdemann & Trappe. *Curr. Genet* 34: 386-392
- Harrison MD, Jones CE, Solioz M, Dameron CT** (2000) Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends Biochem Sci* 25: 29-32
- Harrison MJ** (1996) A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations *Plant J.* 9: 491-503
- Harrison MJ, van Buuren ML** (1995) A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* *Nature* 378: 626-629
- Harrison M, Dewbre G, Liu J** (2002) A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* 14: 2413-2429
- Hartley JL, Smith SE** (1983) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London, UK
- Hassett R, Kosman DJ** (1995) Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 270: 128-134
- Hawkins HJ, Johansen A, George E** (2000) Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 226: 275-285
- Hepper CM** (1981) Techniques for studying the infection of plants by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under axenic conditions. *New Phytol.* 88: 641-647
- Higgins CF, Hiles ID, Salmond GP, Gill DR, Downie JA, Evans IJ, Holland IB, Gray L, Buckel SD, Bell AW, et al** (1986) A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* 323: 448-50
- Hijri M, Sanders IR** (2004) The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is haploid and has a small genome size in the lower limit of eukaryotes. *Fung. Genet. Biol.* 41: 253-261
- Hildebrandt U, Janetta K, Bothe H** (2002) Towards growth of arbuscular mycorrhizal fungi independent of a plant host. *Appl. Environ. Microbiol* 68: 1919-1924
- Hildebrandt U, Kaldorf M, Bothe H** (1999) The zinc violet and its colonization by arbuscular mycorrhizal fungi *J. Plant Physiol.* 154: 709-717
- Himmelblau E, Mira H, Lin SJ, Culotta VC, Penarrubia L, Amasino RM** (1998)

Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from Arabidopsis. *Plant Physiol* 117: 1227-34

**Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S** (1998) SOSUI: Classification a secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14: 378-379

**Ho I, Trappe JM** (1973) Translocation of  $^{14}\text{C}$  from *Festuca* plants to their endomycorrhizal fungi. *Nature* 244: 30-31

**Ho I, Trappe JM** (1975) Nitrate reducing capacity of two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia* 67: 886-888

**Hodge A, Campbell CD, Fitter AH** (2001) An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature* 413: 297-299.

**Hosny M, de Barros JPP, Gianinazzi-Pearson V, Dulieu H** (1997) Base composition of DNA from glomalean fungi: high amounts of methylated cytosine. *Fung. Genet Biol* 22: 103-111

**Hosny M, Gianninazzi-Pearson V, Dulieu H** (1998) Nuclear DNA content of 11 fungal species in Glomales. *Genome* 41: 422-428

**Hosny M, Hijri M, Passerieux E, Dulieu H** (1999) rDNA units are highly polymorphic in *Scutellospora castanea* (Glomales, Zygomycetes). *Gene* 226: 61-71

**Howden R, Andersen CR, Goldsbrough PB, Cobbett CS** (1995) A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol* 107: 1067-73

**Huang L, Kirschke CP, Gitschier J** (2002) Functional characterization of a novel mammalian zinc transporter, ZnT6. *J Biol Chem* 277: 26389-26395

**Huffman DL, O'Halloran TV** (2000) Energetics of copper trafficking between the Atx1 metallochaperone and the intracellular copper transporter, Ccc2. *J. Biol. Chem.* 275: 18611-18614.

**Hung IH, Casareno RLB, Labesse G, Mathews FS, Gitlin JD** (1998) HAH1 is a copper-binding protein with distinct amino acid residues mediating copper homeostasis and antioxidant defense. *J. Biol. Chem.* 273: 1749-1754

**Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF** (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346: 362-5

- Jacquot E, van Tuinen D, Gianinazzi V, Gianinazzi-Pearson, S** (2000) Monitoring species of arbuscular mycorrhizal fungi in planta and in soil by nested PCR: application to the study of the impact of sewage sludge. *Plant Soil* 226: 179-188.
- Jakobsen I** (1996) Phosphorus inflow into roots of mycorrhizal and non-mycorrhizal peas under field conditions. In V Gianinazzi-Pearson, S Gianinazzi, eds *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. INRA, Paris, France, pp 317-321
- Jargeat P, Cosseau C, Ola'h B, Jauneau A, Bonfante P, Batut J, Becard G** (2004) Isolation, free-living capacities, and genome structure of "Candidatus Glomeribacter gigasporarum," the endocellular bacterium of the mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *J Bacteriol* 186: 6876-84
- Jeffries P, Barea JM** (2001) Arbuscular mycorrhiza - a key component of sustainable plant-soil ecosystems. In B Hock, ed *The Mycota vol. IX*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg. Germany, pp 95-113
- Jenny MJ, Ringwood AH, Schey K, Warr GW, Chapman RW** (2004) Diversity of metallothioneins in the American oyster, *Crassostrea virginica*, revealed by transcriptomic and proteomic approaches. *European Journal of Biochemistry* 271: 1702-1712
- Jia Y, Gray VM, Straker CJ** (2004) The influence of *Rhizobium* and arbuscular mycorrhizal fungi on nitrogen and phosphorus accumulation by *Vicia faba*. *Ann. Bot.* 94: 251-258
- Jiménez A, Hernández JA, del Río LA, Sevilla F** (1997) Evidence for the presence of ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol.* 114: 275-284
- Johansen A, Finlay RD, Olsson PA** (1996) Nitrogen metabolism of the external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol.* 133: 705-712
- Johansen A, Jakobsen I, Jensen ES** (1993) Hyphal transport by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus of N applied to the soil as ammonium or nitrate. *Biol. Fert. Soils* 16: 66-70
- Johansen A, Jakobsen I, Jensen ES** (1992) Hyphal transport of <sup>15</sup>N-labelled nitrogen by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and its effect on depletion of inorganic soil N. *New Phytol* 122: 281-288

- Jolicoeur M, Germette S, Gaudette M, Perrier M, Bécard G** (1998) Intracellular pH in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiol.* 116: 1279-1288
- Joner EJ, Briones R, Leyval C** (2000) Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant and soil* 226: 227-234
- Jung US, Sobering AK, Romeo MJ, Levin DE** (2002) Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Molecular Microbiology* 46: 781-789
- Kaldorf M, Schmelzer E, Bothe H** (1998) Expression of maize and fungal nitrate reductase genes in arbuscular mycorrhiza. *Mol Plant Microbe Int* 11: 439-448
- Kampfenkel K, Kushnir S, Babiychuk E, Inz0 D, Van Montagu M** (1995) Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. *J. Biol. Chem.* 270: 28479-28486
- Karandashov V, Kuzovkina I, Hawkins HJ, George E** (2000) Growth and sporulation of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus caledonium* in dual culture with transformed carrot roots. *Mycorrhiza* 10: 23-28
- Kawashima I, Inokuchi Y, Chino M, Kimura M, Shimizu N** (1991) Isolation of a gene for a metallothionein protein from soybean. *Plant Cell Physiol* 32: 913-916
- Kitagawa Y, Tanaka N, Hata Y, Kusunoki M, Lee GP, Katsube Y, Asada K, Aibara S, Morita Y** (1991) Three-dimensional structure of Cu,Zn-superoxide dismutase from spinach at 2.0 Å resolution. *J Biochem* 109: 477-85
- Knöpfel M, Schulthess G, Funk F, Hauser H** (2000) Characterization of an integral protein of the brush border membrane mediating the transport of divalent metal ions. *Biophys. J.* 79: 874-884
- Kojima Y** (1991) Definitions and nomenclature of metallothioneins. *Meth Enzymol* 205: 8-10
- Kojima Y, Binz PA, Kagi JHR** (1999) Nomenclature of metallothionein: proposal for revision. In C Klaassen, ed *Metallothioneins IV*. Birkhauser Verlag, Basel, pp 3-6
- Kolukisaoglu HU, Bovet L, Klein M, Eggmann T, Geisler M, Wanke D, Martinoia E, Schulz B** (2002) Family business: the multidrug-resistance related protein (MRP) ABC transporter genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216: 107-19
- Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot ML, Pakrasi HB** (1999) The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol Biol* 40: 37-44

**Kosuta S, Chabaud M, Loughon G, Gough C, Denarie J, Barker DG, Becard G** (2003) A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 131: 952-962

**Kuhlbrandt W** (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 282-95

**Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T3. *Nature* 227: 680-685

**Laliberte J, Whitson LJ, Beaudoin J, Holloway SP, Hart PJ, Labbe S** (2004) The *Schizosaccharomyces pombe* Pccs protein functions in both copper trafficking and metal detoxification pathways. *J. Biol. Chem.* 279: 28744-28755

**Lamb AL, Wernimont AK, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV, Rosenzweig AC** (1999) Crystal structure of the copper chaperone for superoxide dismutase. *Nat Struct Biol* 6: 724-9

**Lamb AL, Wernimont AK, Pufahl RA, O'Halloran TV, Rosenzweig AC** (2000) Crystal structure of the second domain of the human copper chaperone for superoxide dismutase. *Biochemistry* 39: 1589-95

**Lane C, Petris MJ, Benmerah A, Greenough M, Camakaris J** (2004) Studies on endocytic mechanisms of the Menkes copper-translocating P-type ATPase (ATP7A; MNK). Endocytosis of the Menkes protein. *BioMetals* 17: 87-98

**Lanfranco L, Balsamo R, Martino E, Perotto S, Bonfante P** (2002) Zinc ions alter morphology and chitin deposition in an ericoid fungus. *Eur J Histochem* 46: 341-350

**Lanfranco L, Bolchi A, Ros E, Ottonello S, Bonfante P** (2002) Differential expression of a metallothionein gene during the presymbiotic versus the symbiotic phase of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Plant Physiol* 130: 58-67

**Langmade SJ, Ravindra R, Daniels PJ, Andrews GK** (2000) The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J. Biol. Chem.* 275: 34803-34809

**Larin D, Mekios C, Das K, Ross B, Yang AS, Gilliam CT** (1999) Characterization of the interaction between the Wilson and Menkes disease proteins and the cytoplasmic copper chaperone, HAH1p. *J. Biol. Chem.* 274: 28497-28504

**Leslie EM, Haimeur A, Waalkes MP** (2004) Arsenic transport by the human

multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1): Evidence that a tri-glutathione conjugate is required. *J. Biol. Chem.* 279: 32700-32708

**Li L, Kaplan J** (2001) The yeast gene *MSC2*, a member of the cation diffusion facilitator family, affects the cellular distribution of zinc. *J. Biol. Chem* 276: 5036-5043

**Li X, Chen H, Epstein PN** (2004) Metallothionein protects islets from hypoxia and extends islet graft survival by scavenging most kinds of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 279: 765-771

**Li ZS, Lu YP, Zhen RG, Szczypka M, Thiele DJ, Rea PA** (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: *YCF1*-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 42-47

**Li ZS, Szczypka M, Lu YP, Thiele DJ, Rea PA** (1996) The yeast cadmium factor protein (*YCF1*) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J Biol Chem* 271: 6509-6517

**Linderman RG** (1992) Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. In GJ Bethlenfalvay, RG Linderman, eds *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. ASA, Madison, Wisconsin, USA, pp 45-70

**Liu P, Goh C, Loh C, Pua E** (2002) Differential expression and characterization of three metallothionein-like genes in Cavendish banana (*Musa acuminata*). *Phys. Plantar.* 114: 241-250

**Liu XD, Thiele DJ** (1996) Oxidative stress induced heat shock factor phosphorylation and HSF-dependent activation of yeast metallothionein gene transcription. *Genes Dev* 10: 592-603

**Livak K, Schmittgen T** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods* 25: 402-408

**MacDiarmid CW, Gaither LA, Eide D** (2000) Zinc transporter that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 19: 2845-2855

**MacDiarmid CW, Milanick MA, Eide D** (2002) Biochemical properties of vacuolar zinc transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 277: 39187-39194

**MacDiarmid C, Milanick M, Eide D** (2003) Induction of the *ZRC1* metal tolerance gene in zinc-limited yeast confers resistance to zinc shock. *J Biol Chem* 278: 15065-72

- Macdonald RM, Lewis M** (1978) The occurrence of some acid phosphatases and dehydrogenases in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *New Phytol.* 80: 135-140
- Malcová R, Rydlová J, Vosátka M** (2003) Metal-free cultivation of *Glomus* sp. BEG 140 isolated from Mn-contaminated soil reduces tolerance to Mn. *Mycorrhiza* 13: 151-157
- Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR, Harrison MJ** (2001) A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Mol. Plant- Microb. Inter.* 14: 1140-1148
- Malloch DW, Pirozyns KA, Raven PH** (1980) Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2113-2118
- Marschner H** (1995) Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London, UK
- Marsh B** (1971) Measurement of length in random arrangement of lines. *J Appl Ecol* 8: 265
- Matsubara Y, Uetake Y, Peterson RL** (1999) Entry and colonization of *Asparagus officinalis* roots by arbuscular mycorrhizal fungi with emphasis on changes in host microtubules. *Can J Bot* 77: 1159-1167
- McMahon RJ, Frost SC** (1995) Nutrient control of GLUT1 processing and turnover in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 270: 12094-12099
- Merryweather J, Fitter A** (1995) Phosphorus and carbon budgets: mycorrhizal contribution in the obligately mycorrhizal *Hyacinthoides non-scripta* (L.) Chouard ex Rothm. under natural conditions. *New Phytol.* 129: 619-627
- Meyer FH** (1973) Distribution of ectomycorrhiza in native and man-made forests. In GC Marks, TT Kozłowski, eds *Ectomycorrhizae*. Academic Press, New York, USA, pp 79-105
- Mills RF, Francini A, Ferreira da Rocha PSC, Baccarini PJ, Aylett M, Krijger GC, Williams LE** (2005) The plant P1B-type ATPase AtHMA4 transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels. *FEBS Letters* 579: 783-791
- Minet M, Dufour ME, Lacroue F** (1992) Complementation of *Saccharomyces*

*cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. Plant J 2: 417-422

**Mir G, Domenech J, Huguet G, Guo WJ, Goldsbrough P, Atrian S, Molinas M** (2004) A plant type 2 metallothionein (MT) from cork tissue responds to oxidative stress. J Exp Bot 55: 2483-93

**Miyabe S, Izawa S, Inoue Y** (2001) The Zrc1 is involved in zinc transport system between vacuole and cytosol in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. Biophys. Res. Com. 282 : 79-83

**Moreno S, Klar A, Nurse P** (1991) Molecular genetic analysis of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Methods Enzymol 191: 795-823

**Mosse B** (1957) Growth and chemical composition of mycorrhizal and non-mycorrhizal apples. Nature 179: 349-362

**Myers AM, Tzagoloff A, Kinney DM, Lusty CJ** (1986) Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of *LacZ* fusions. Gene 45 : 299-310

**Nishimura R, Hayashi M, Wu G-J, Kouchi H, Imaizumi-Anraku H, Murakami Y, Kawasaki S, Akao S, Ohmori M, Nagasawa M, Harada K, Kawaguchi M** (2002) HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. Nature 420: 426-429

**Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. App. Microbiol. Biotechnol. 49: 249-279

**Novero M, Faccio A, Genre A, Stougaard J, Webb KJ, Mulder L, Parniske M, bonfante P** (2002) Dual requirements of the *LjSym4* gene for mycorrhizal development in epidermal and cortical cells of *Lotus japonicus* roots. New Phytol 154: 741-749

**O'Halloran TV, Culotta VC** (2000) Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. J. Biol. Chem. 275: 25057-25060

**Ohana E, Segal D, Palty R, Ton-That D, Moran A, Sensi SL, Weiss JH, Hershinkel M, Sekler I** (2004) A sodium zinc exchange mechanism is mediating extrusion of zinc in mammalian cells. J. Biol. Chem. 279: 4278-4284

**Olsson PA, van Aarle IM, Allaway WG, Ashford AE, Rouhier H** (2002) Phosphorus effects on metabolic processes in monoxenic arbuscular mycorrhiza cultures. Plant Physiol 130: 1162-1171

**Ortiz DF, Ruscitti T, McCue KF, Ow DW** (1995) Transport of metal-binding



peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J Biol Chem* 270: 4721-8

**Outten C, O'Halloran T** (2001) Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* 292: 2488-2492

**Palmgren MG, Harper JF** (1999) Pumping with plant P-type ATPase. *Journal of Experimental Botany* 50: 883-893

**Palmiter RD, Findley SD** (1995) Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J.* 14: 639-649

**Parniske M** (2004) Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 414-421

**Pawlowska TE, Douds DD, Charvat I** (1999) *In vitro* propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*. *Mycol. Res* 103: 1549-1556

**Pawlowska TE, Taylor JW** (2002) Organization of genetic variation within glomalean individuals. *Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Mycological Congress, Osla* 73

**Pearson V, Read DJ** (1975) The physiology of the mycorrhizal endophyte of *Calluna vulgaris*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 64: 1-7

**Peña MMO, Puig S, Thiele DJ** (2000) Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *J. Biol. Chem.* 275: 33244-33251

**Peterson RL, Bonfante P** (1994) Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas. *Plant Soil* 159: 79-88

**Petris MJ, Smith K, Lee J, Thiele DJ** (2003) Copper-stimulated endocytosis and degradation of the human copper transporter, hCtr1. *J. Biol. Chem.* 278: 9639-9646

**Pfeffer PE, Douds DDJr, Becard G, Shachar-Hill Y** (1999) Carbon Uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol.* 120: 587-598.

**Pickering IJ, Prince RC, George GN, Rauser WE, Wickramasinghe WA, Watson AA, Dameron CT, Dance IG, Fairlie DP, Salt DE** (1999) X-ray absorption spectroscopy of cadmium phytochelatin and model systems. *Biochim Biophys Acta* 1429: 351-64

**Portnoy ME, Liu XF, Culotta VC** (2000) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the Nramp family of metal transporters. *Mol. Cell. Biol.* 20: 7893-7902

**Portnoy ME, Rosenzweig AC, Rae T, Huffman DL, O'Halloran TV, Culotta VC** (1999) Structure-function analyses of the ATX1 metallochaperone. *J. Biol. Chem.* 274: 15041-15045.

**Pringle JR, Adams AE, Drubin DG, Haarer BK** (1991) Immunofluorescence methods for yeast. *Methods Enzymol* 194: 565-602

**Pufahl RA, Singer CP, Peariso KL, Lin SJ, Schmidt PJ, Fahrni CJ, Culotta VC, Penner-Hahn JE, O'Halloran TV** (1997) Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science* 278: 853-6

**Rae TD, Schmidt P, Pufahl RA, Culotta VC**, (1999) Undetectable intracellular free copper: The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284: 805-808

**Raghothama KG** (1999) Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 665-693

**Rao KVM, Sresty TVS** (2000) Antioxidant parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Sci.* 157: 113-128

**Rasmussen N, Lloyd DC, Ratcliffe G, Hansen PE, Jakobsen I** (2000) <sup>31</sup>P NMR for the study of P metabolism and translocation in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 226: 245-253

**Rausch C, Bucher M** (2002) Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* 216: 23-37

**Rausch C, Daram P, Brunner S, Jansa J, Laloi M, Leggewie G, Amrhein N, Bucher M** (2001) A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature* 414: 462-466

**Rausser WE** (1995) Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiol* 109: 1141-9

**Rausser WE** (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochem Biophys* 31: 19-48

**Rausser WE, Ackerley CA** (1987) Localization of cadmium in granules within

differentiating and mature roots. *Can J Bot* 65: 643-646

**Rebbeer JF, Connolly GC, Ballatori N** (2002) Inhibition of Mrp2- and Ycf1p-mediated transport by reducing agents: evidence for GSH transport on rat Mrp2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 1559: 171-178

**Redecker D, Kodner R, Graham LE** (2000) Glomalean Fungi from the Ordovician. *Science* 289: 1920-1921

**Repetto O, Bestel-Corre G, Dumas-Gaudot E, Berta G, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S** (2003) Targeted proteomics to identify cadmium-induced protein modifications in *Glomus mosseae*-inoculated pea roots. *New Phytol* 157: 555-567

**Rivera-Becerril F, Calantzis C, Turnau K, Caussanel JP, Belimov AA, Gianinazzi S, Strasser RJ, Gianinazzi-Pearson V** (2002) Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. *J Exp Bot* 53: 1177-1185

**Rodríguez RL, Tait. RC** (1983) Recombinant DNA techniques. Addison-Wesley Publishing,

**Rogers EE, Eide D, Guerinot ML** (2000) Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 97: 12356-12360

**Rosendahl D, Taylor JW** (1997) Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLP™. *Mol. Ecol.* 6: 821-829

**Rosenzweig AC, O'Halloran TV** (2000) Structure and chemistry of the copper chaperone proteins. *Curr Opin Chem Biol* 4: 140-7

**Ruel MT, Bouis HE** (1998) Plant breeding: a long-term strategy for the control of zinc deficiency in vulnerable populations. *Am J Clin Nutr* 68: 488S-494S

**Rufyikiri G, Thiry Y, Declerck S** (2003) Contribution of hyphae and roots to uranium uptake and translocation by arbuscular mycorrhizal carrot roots under root-organ culture conditions. *New Phytol* 158: 391-399

**Rufyikiri G, Thiry Y, Wang L, Delvaux B, Declerck S** (2002) Uranium uptake and translocation by the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices*, under root-organ culture conditions. *New Phytol* 156: 275-281

**Ruiz-Lozano JM** (2003) Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. *New perspectives for molecular studies Mycorrhiza* 13: 309-317

**Russell PJ, Rodland KD, Rachlin EM, McCloskey JA** (1987) Differential DNA methylation during the vegetative life cycle of *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. 169: 2902-2905

**Ryan MH, McCully ME, Huang CX** (2003) Localization and quantification of phosphorus and other elements in fully hydrated, soil-grown arbuscular mycorrhizas: a cryo-analytical scanning electron microscopy study. New Phytol 160: 429-441

**Saito M** (1995) Enzyme activities of the internal hyphae and germinated spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall New Phytol 129: 425-431

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA

**Sanders FE, Tinker PB** (1973) Phosphate flow into mycorrhizal roots. Pest. Sci. 4: 385-395

**Schiestl RH, Gietz RD** (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. Curr Genet 16: 339-346

**Schmidt PJ, Kunst C, Culotta VC** (2000) Copper activation of superoxide dismutase 1 (SOD1) in vivo. role for protein-protein interactions with the copper chaperone for SOD1. J. Biol. Chem. 275: 33771-33776

**Schüßler A** (2000) *Glomus claroideum* forms an arbuscular mycorrhiza-like symbiosis with the hornwort *Anthoceros punctatus*. Mycorrhiza 10: 15-21

**Schüßler A, Schwarzott D, Walker C** (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. Mycol Res 105: 1413-1421

**Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch M** (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. Nucleic Acids Res 31: 3381-3385

**Shachar-Hill Y, Befroy DE, Pfeffer PE, Ratcliffe RG** (1997) Using bulk magnetic susceptibility to resolve internal and external signals in the NMR spectra of plant tissues. J. Magnetic Resonance 127: 17-25

**Shachar-Hill Y, Pfeffer PE, Douds DD, Osman SF, Doner LW, Ratcliffe RG** (1995) Partitioning of intermediary carbon metabolism in vesicular-arbuscular mycorrhizal leek. Plant Physiol. 108: 7-15

**Sherman F, Fink GR, Hicks JB** (1986) Methods in yeast genetics (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY)

- Silar P, Butler G, Thiele DJ** (1991) Heat shock transcription factor activates transcription of the yeast metallothionein gene. *Mol Cell Biol* 11: 1232-8
- Simon L, Bousquet J, Lévesque RC, Lalonde M** (1993) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69
- Smith SE** (1966) Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytol.* 65: 488-499
- Smith SE, Gianninazzi-Pearson V** (1988) Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39: 221-244
- Smith SE, Smith FA** (1990) Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. *New Phytol.* 114: 1-38
- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I** (2004) Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytol* 162: 511-524
- Smith S, Read D** (1997) *Mycorrhizal symbiosis* Academic Press, London
- Solaiman MZ, Senoo K, Kawaguchi M, Imaizumi-Anraku H, Akao S, Tanaka A, Obata H** (2000) Characterization of mycorrhizas formed by *Glomus* sp. on roots of hypernodulating mutants of *Lotus japonicus*. *J. Plant. Res.* 113: 443-448
- Solioz M, Vulpe C** (1996) CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends Biochem Sci* 21: 237-41
- Souza FAd, Berbara RLL** (1999) Ontogeny of *Glomus clarum* in Ri T-DNA transformed roots. *Mycologia* 91: 343-350
- St Arnaud, Hamel C, Vimard B, Caron M, Fortin JA** (1996) Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycol Res* 3: 328-332
- St-John BJ, Smith SE, Nicholas DJD, Smith FA** (1985) Enzymes of ammonium assimilation in *Pezizella ericae* Read. *New Phytol.* 100: 579-584
- Stommel M, Mann P, Franken P** (2001) EST-library construction using spore RNA of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Mycorrhiza* 10: 281-285

**Strullu DG** (1978) Cytologie des endomycorrhizes. *Physiologie Végétale* 16: 657-669

**Subramanian KS, Charest C** (1998) Arbuscular mycorrhizae and nitrogen assimilation in maize after drought and recovery. *Phys. Plant.* 102: 285-296

**Suhy DA, Simon KD, Linzer DIH, O'Halloran TV** (1999) Metallothionein is part of a zinc-scavenging mechanism for cell survival under conditions of extreme zinc deprivation. *J. Biol. Chem.* 274: 9183-9192

**Swaminathan V** (1979) Nature of the inorganic fraction of soil phosphate fed on by vesicular-arbuscular mycorrhizae of potatoes. *Proc. Ind. Acad. Sci.* 88B: 423-433

**Sward RJ** (1981) The Structure of the spores of *Gigaspora margarita*. II. Changes accompanying germination. *New Phytol* 88: 661-666

**Szczyпка MS, Wemmie JA, Moye-Rowley WS, Thiele DJ** (1994) A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem* 269: 22853-22857

**Tamai KT, Gralla EB, Ellerby LM, Valentine JS, Thiele DJ** (1993) Yeast and mammalian metallothioneins functionally substitute for yeast copper-zinc superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8013-8017

**Tamai KT, Liu X, Silar P, Sosinowski T, Thiele DJ** (1994) Heat shock transcription factor activates yeast metallothionein gene expression in response to heat and glucose starvation via distinct signalling pathways. *Mol Cell Biol* 14: 8155-65

**Tamasloukht M, Sejalon-Delmas N, Kluever A, Jauneau A, Roux C, Becard G, Franken P** (2003) Root Factors Induce Mitochondrial-Related Gene Expression and Fungal Respiration during the Developmental Switch from Asymbiosis to Presymbiosis in the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Gigaspora rosea*. *Plant Physiol.* 131: 1468-1478

**Theodolou FL** (2000) Plant ABC transporters. *Biochim Biophys Acta* 1465: 79-103

**Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680

**Tiwari P, Adholeya A** (2002) In vitro co-culture of two AMF isolates *Gigaspora*

*margarita* and *Glomus intraradices* on Ri-T-DNA transformed roots. FEMS Microbiol Lett 206: 39-43

**Tobar R, Azcón R, Barea JM** (1994) Improved nitrogen uptake and transport from <sup>15</sup>N-labelled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza under water-stressed conditions. New Phytol. 126: 119-122

**Tonin C, Vandenkoornhuysen P, Joner EJ, Straczek J, Leyval C** (2001) Assessment of arbuscular mycorrhizal fungi diversity in the rhizosphere of *Viola calaminaria* and effect of these fungi on heavy metal uptake by clover. Mycorrhiza 10: 161-168

**Towbin H, Staehelin T, Gordon JC** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications Proc. Natl. Acad. Sci USA 76: 4350-4354

**Trouvelot S, van Tuinen D, Hijri M, Gianninazzi-Pearson V** (1999) Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence in situ hybridization. Mycorrhiza 8: 203-206

**Turnau K, Kottke I, Dexheimer J, Botton B** (1994) Element distribution in mycelium of *Pisolithus arrhizus* treated with cadmium dust. Annals of Botany 74: 137-142

**Turnau K, Kottke I, Oberwinkler F** (1993) *Paxillus involutus*-*Pinus sylvestris* mycorrhizae from heavily polluted forest. Element localization using electron energy loss spectroscopy and imaging. Bot Acta 106: 213-219

**Uetake Y, Kojima T, Ezawa T, Saito M** (2002) Extensive tubular vacuole system in an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. New Phytol 154: 761-768

**Vallee B, Auld D** (1990) Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. Biochemistry 29: 5467-5659

**Van Tichelen KK, Colpaert JV, Vangronsveld J** (2001) Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity. New Phytologist 150[1], 203-213. 2001.

**Vandenkoornhuysen P, Leyval C, Bonnin I** (2001) High genetic diversity in arbuscular mycorrhizal fungi: evidence for recombination events. Heredity 87: 243-253

**Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA** (1999) AtPCS1, a phytochelatin

synthase from *Arabidopsis*: isolation and in vitro reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7110-5

**Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA** (2000) Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase: blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *J Biol Chem* 275: 31451-9

**Vulpe C, Levinson B, Whitney S, Packman S, Gitschier J** (1993) Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nat Genet* 3: 7-13

**Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ** (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1: 945-51

**Weber M, Harada E, Vess C, Roepenack-Lahaye EV, 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. *The Plant Journal* 37: 269-281

**Weiersbye IM, Straker CJ, Przybylowicz WJ** (1999) Micro-PIXE mapping of elemental distribution in arbuscular mycorrhizal roots of the grass *Cynodon dactylon*, from gold and uranium mine tailings. *Nuc. Inst. Meth. Phys. Res.* 158: 335-343

**Weissenhorn I, Glashoff A, Leyval C, Berthelin J** (1994) Differential tolerance to Cd and Zn of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal spores isolated from heavy metal-polluted and unpolluted soils. *Plant and Soil* 167: 189-196

**Wemmie JA, Moye-Rowley WS** (1997) Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* ATP-binding cassette transporter protein Ycf1p. *Molecular Microbiology* 25: 683-694

**Wernimont AK, Huffman DL, Lamb AL, O'Halloran TV, Rosenzweig AC** (2000) Structural basis for copper transfer by the metallochaperone for the Menkes/Wilson disease proteins. *Nat Struct Biol* 7: 766-71

**Westwater J, McLaren NF, Dormer UH, Jamieson DJ** (2002) The adaptive response of *Saccharomyces cerevisiae* to mercury exposure. *Yeast* 19: 233-239

**White JA, Brown MF** (1979) Ultrastructure and X-ray analysis of phosphorus granules in a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *Can J Bot* 57: 2812-2818



**Williams LE, Pittman JK, Hall JL** (2000) Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochim Biophys Acta* 1465: 104-126

Wood HG, Clark JE (1988) Biological aspects of inorganic polyphosphates *Ann Rev Biochem* 57: 235-260

**Ohwaki Y, Sugahara K** (1997) Active extrusion of protons and exudation of carboxylic acids in response to iron deficiency by roots of chickpea (*Cicer arietinum* L.). 189: 49-55

**Yamamoto Y, Hachia A, Matsumoto H** (1997) Oxidative damage to membranes by a combination of aluminium, and iron in suspension-cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol.* 38: 133-1339

**Yu T, Egger KN, Peterson RL** (2001) Ectendomycorrhizal associations - characteristics and functions. *Mycorrhiza* 11: 167-177

**Zenk MH** (1996) Heavy metal detoxification in higher plants-a review. *Gene* 179: 21-30

**Zhao H, Butler E, Rodgers J, Spizzo T, Duesterhoeft S, Eide D** (1998) Regulation of zinc homeostasis in yeast by binding of the ZAP1 transcriptional activator to zinc-responsive promoter elements. *J. Biol. Chem* 273: 28713-28720

**Zhao H, Eide D** (1996a) The yeast *ZRT1* gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2454-2458

**Zhao H, Eide D** (1996b) The *ZRT2* gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271: 23203-23210

**Zhou H, Thiele DJ** (2001) Identification of a Novel High Affinity Copper Transport Complex in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 276: 20529-20535